

**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 DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES  
COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA NO AMAZONAS**

**MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO SAMPAIO CARVALHO**

**MANAUS  
2015**

**MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO SAMPAIO CARVALHO**

**ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM  
LEUCEMIA LINFBLÁSTICA AGUDA NO AMAZONAS**

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:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie.

**Co-orientador:** Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji

**MANAUS  
2015**

Ficha Catalográfica elaborada por **Ana Cristina das C. Sena**  
Bibliotecária CRB 11/348 – Fundação Hemoam

C321e Carvalho, Maria do Perpétuo Socorro Sampaio. Estudo do perfil imunológico em crianças e adolescentes com leucemias linfoblástica aguda no Amazonas. Maria do Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho. Manaus: UEA/FHEMOAM. 2015.  
149p. Ilust.

Dissertação (Mestrado em Hematologia e Hemoterapia). Universidade do Estado do Amazonas. Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

Orientadora: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie  
Co-orientador: Dr. Nelson Abrahim Fraiji

1. Leucemia linfoblástica aguda. 2. Perfil celular. 3. Citocinas séricas.  
4. Quimiocinas séricas 5. Biomarcadores imune. 6. Título.

CDU:616.15

CDU: 616.15

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 10/2015**

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO (A) ALUNO (A) AO TÍTULO DE MESTRE

TURMA 01/2013

No dia dezesseis do mês novembro de 2015, as 09h00, realizou-se a Sessão Pública da Defesa de Dissertação “**Estudo do Perfil Imunológico das Crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda no Amazonas.**”

Apresentada por **Maria do Perpetuo Socorro Sampaio Carvalho**, para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Hematologia.

A banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

Prof. (a) Dr. (a) Adriana Malheiro Alle Marie (Presidente)  
Prof. (a) Dr. (a) Aya Sadahiro (Membro)  
Prof. (a) Dr. (a) Luiz Fernando de Souza Passos (Membro)

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. (a) Dr. (a) Adriana Malheiro Alle Marie      Conceito: Aprovada  
Prof. (a) Dr. (a) Aya Sadahiro                              Conceito: Aprovada  
Prof. (a) Dr. (a) Luiz Fernando de Souza Passos      Conceito: Aprovada

A Dissertação foi considerada:

Aprovada  
 Não Aprovada

Manaus, 16 de novembro de 2015.

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca e pelo aluno (a):

Prof. (a) Dr. (a) Adriana Malheiro Alle Marie (Presidente) Adriana Malheiro Alle Marie

Prof. (a) Dr. (a) Aya Sadahiro (Membro interno) Aya Sadahiro

Prof. (a) Dr. (a) Luiz Fernando de Souza Passos (Membro externo) Luiz Fernando de Souza Passos

Aluno (a) Maria do Perpetuo Socorro Sampaio Carvalho

**Maria do Perpetuo Socorro Sampaio Carvalho**

**ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS E  
ADOLESCENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA NO  
AMAZONAS**

**MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO SAMPAIO CARVALHO**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Aya Sadahiro**

---

**Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Passos**

Aos meus pais *Oneide* e *João* (*in memorium*) pelo amor incondicional.

Ao meu esposo *Elias* pelo incentivo, compreensão e amor.

Aos meus filhos *Filipe*, *Talita* e *Henrique* e a meu neto *Erick* que são meu tesouro.

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, porque tudo de bom que tem me proporcionado na vida;

A melhor coisa da nossa vida é a família:

Aos meus pais Oneide e João (*in memorium*) por todo amor, carinho, dedicação e ensinamentos que me foi passado, por colocar a educação dos filhos sempre como prioridade;

Ao meu esposo Elias, que é uma pessoa maravilhosa, por estar sempre ao meu lado, incentivando e apoiando;

Aos meus filhos Filipe, Talita e Henrique e ao meu neto Erick por serem amorosos e dedicados, que também me incentivaram nesta pesquisa;

Aos professores do CAPS pela disponibilidade e ensinamentos prestados e em especial a professora Dra. Mariane Stefani pelas orientações durante a minha defesa da dissertação;

À minha orientadora professora doutora Adriana Malheiro que é um exemplo de pesquisadora, de caráter e profissionalismo e que muito me orgulho de fazer parte de sua história. Agradeço pelo voto de confiança a mim depositado, incentivo e pelos ensinamentos prestados;

Ao meu co-orientador professor doutor Nelson Abrahim Fraiji, que sempre me incentivou em minha vida profissional e pela sua constante disponibilidade em atender-me. Considero um exemplo de profissional, com integridade, senso de justiça e imparcialidade. Além de um sonhador pelo avanço da pesquisa em nosso estado;

Aos professores de minha banca de qualificação: Professora dra. Leny da Motta Passos, pelo constante estímulo na minha vida profissional, foi a pessoa que me fez escolher atuar na área de hematologia e é um modelo de profissional. Professora dra. Marilu Barbieri Victória pelo incentivo na pesquisa. Professor dr. Marcelo Mira pelas orientações recebidas;

Ao Allyson Guimarães da Costa, profissional competente e dedicado, agradeço pelo apoio nas horas mais difíceis, pelo companheirismo, direcionamento da pesquisa nas horas que precisei, pelo exemplo de pesquisador e trabalho em equipe;

À Bruna Pires de Loiola e Rilza de Andrade Nonato pela disponibilidade, comprometimento, dedicação e todo apoio;

Aos colegas médicos pelo apoio e solidariedade durante minha ausência;

Aos colegas do mestrado, companheiros de jornada, pelos momentos felizes e difíceis, durante os dias e noites não dormidas, incentivando e solidarizando;

Aos professores do mestrado pelo conhecimento transmitido, em especial ao professor Rufino, pela dedicação e disponibilidade constante;

Aos secretários Wilmara Silva e Jaspe Valle Neto pelo apoio prestado durante todo o processo do curso;

Ao Núcleo de Estatística da FHEMOAM: Edson Lira e Luíz pelas orientações na área;

Ao laboratório de marcadores celular e citogenética: João Paulo Pimentel, Angela dos Santos, e em especial à Eliana Brasil pela sempre disponibilidade para orientar e apoiar e pelo espírito de pesquisadora;

Aos colegas do laboratório: Lecita Marreira, Lyvio Machado, Flávia, Wally Victória Sposina, Francirley Souza e toda equipe pelo apoio recebido;

À Luzinete Marcelino dos Santos de Souza pela colaboração inestimável na coleta das amostras das crianças do grupo controle;

À Dra. Aya Sadahiro que é uma profissional competente, comprometida, obrigada pelo carinho, incentivo e ensinamentos;

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, exemplo de profissional, competente e humilde;

À Dra. Andrea Teixeira Carvalho, obrigada pelas orientações;

À Dra. Silvia Regina Brandalise pelo exemplo de pessoa e por mudar o destino das crianças brasileiras com leucemias;

Ao Dr. Luiz Fernando Passos pela disponibilidade e ensinamentos;

À Lindalva Braga de Oliveira pela dedicação e apoio;

À enfermeira Maria de Nazaré Saunier Barbosa pelo apoio recebido;

Ao serviço de Nutrição: Arlete Muca de Souza e Gracineide Pereira da Silva pelo apoio na avaliação das crianças;

À Socorro Araújo pela colaboração e apoio;

À Cristiane Souza Sampaio, pela logística com as crianças saudáveis;

Ao Yuri Chaves pelo apoio na FIOCRUZ;

Ao SAME: Socorro Albuquerque, Mirian Lúcia, Jessica, Kelly, Mariana e Deusa e toda equipe;

À todos os pacientes da pesquisa por aceitarem participar da pesquisa, mesmo sem receberem nenhum bem imediato mas que concordaram que poderiam ajudar crianças com leucemia no futuro;

Pais e crianças saudáveis por permitiram que seus filhos façam parte da pesquisa;

Aos meus pacientes, pelo período de ausência para conclusão do mestrado;



À Biblioteca da FHEMOAM, pelo suporte e disponibilidade;

À equipe de enfermagem: Hilma, Josema e Loreta no apoio a coleta dos casos novos;

À enfermeira Neide Tavares pelo apoio;

À Universidade Estadual do Amazonas - UEA pela oportunidade de cursar o mestrado em Ciências Aplicadas a Hematologia

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas -FHEMOAM por concretizar a implantação do mestrado em Ciências Aplicadas a Hematologia;

À Direção da FHEMOAM pelo apoio recebido e por concretizar minha participação e conclusão do mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa - FAPEAM pelo auxílio financeiro à pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq por manter o incentivo a pesquisa;

À Universidade Federal do Amazonas - UFAM por disponibilizar as disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada;

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado - FMT pela disponibilidade das disciplinas ao nosso curso de mestrado;

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz –FIOCRUZ da Amazônia, pela disponibilização do citômetro de fluxo para leitura das citocinas e quimiocinas de meu projeto;

À todas as pessoas amigas que contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso deste estudo.

## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

Projeto de Pesquisa Aprovado no Âmbito do Programa de Apoio à Consolidação das Instituições Estaduais de Ensino e/ou Pesquisa (PRÓ-ESTADO), Resolução N° 002/2008, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), com aporte financeiro de R\$ 66.299,97 (Sessenta e Seis Mil e Duzentos e Noventa e Nove Reais e Noventa e Sete Centavos).

“Que os vossos esforços desafiem as  
possibilidades, lembrai-vos de que as grandes  
coisas do homem foram conquistadas do que  
parecia impossível.”

*Charles Chaplin*

## RESUMO

As propostas atuais de tratamento das crianças e adolescentes com leucemia linfoblástica aguda possibilitam o aumento de sobrevida, elevam as chances de cura dos pacientes e buscam reduzir os efeitos tardios relacionados à terapia e o Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente - GBTLI, propõe esquemas terapêuticos categorizados por critérios prognósticos de risco de recidiva desta patologia. Estes pacientes tem o perfil imunológico alterado pela própria doença e pela terapia realizada o que pode contribuir para a resposta e complicações durante o tratamento. O estudo teve como objetivo descrever a resposta imune celular, perfil de citocinas, quimiocinas e pesquisar possíveis biomarcadores imunes de acordo com o grupo de risco de tratamento com o protocolo GBTLI LLA-2009, em pacientes com LLA na faixa etária de zero a menor de 18 anos durante a terapia de indução. A metodologia usada foi a não experimental, longitudinal, de coorte e prospectivo. Participaram deste estudo, 29 pacientes que foram estratificados por grupo de risco: Alto Risco (AR), Baixo Risco (BR), LLA T, Filadélfia (Ph<sup>+</sup>) e Lactente e analisados durante a terapia de indução em quatro etapas: ao diagnóstico (D0), oitavo dia (D8), décimo quinto dia (D15) e trigésimo quinto dia (D35). O Grupo Controle, contou com 28 participantes e realizou apenas uma avaliação. A resposta imune foi caracterizada pela análise dos linfócitos totais, linfócitos T (LT), LT CD4<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup>, células NK, células NKT e linfócitos Treg CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>), assim como as citocinas séricas Th1, Th2, Th17 e Treg e quimiocinas séricas MCP-1, RANTES, IL-8, MIG e IP-10 através da técnica de citometria de fluxo. No estudo observou-se ao diagnóstico que os LT encontravam-se diminuídos nos primeiros quinze dias da indução. A IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4 estavam com sua produção diminuída, porém não significantes. Os LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup> estavam aumentados durante toda a indução. Os linfócitos Treg aumentados apenas no D15 e D35. As células NK diminuídas no D0, D15 e D35, e a célula NKT somente no D0 e em especial no grupo de AR. A IL-6 estava aumentada no D0 e a IL-10 no D0 e D8. A TNF- $\alpha$  apresentou-se diminuída em toda a indução. RANTES estava diminuída no D0, D8 e D15 e MIG diminuiu a partir do D8 até o final da indução. MCP-1 diminuiu no D15 e IL-8 aumentou no grupo de AR no D35. Nas redes de interações, os linfócitos Treg no D0 interagiram com MCP-1, MIG e IP-10 e a IL-10 com a IL-8, MCP-1 e MIG e perderam suas interações no D35. Estes resultados demonstram que os pacientes com LLA apresentam desregulação imune ao diagnóstico. O predomínio de interações da resposta imunorreguladora pela IL-10 e linfócito Treg com citocinas/quimiocinas inflamatórias podem indicar a diminuição ou perda de sua ação ao final da indução, ou seja no D35, havendo predomínio da resposta inflamatória, o que sugere controle tumoral e recuperação medular.

**Palavras-chave:** 1. Leucemia linfoblástica aguda. 2. Perfil celular. 3. Citocinas séricas. 4. Quimiocinas sérica. 5. Biomarcadores imune.

## ABSTRACT

Current proposals treatment of children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia enable increased survival, increase the chances of cure of patients and seek to reduce late effects related to therapy and the Brazilian Group of Treatment of Leukemia Acute Lymphoblastic of Children and Adolescents - GBTLI proposes regimens categorized by prognostic criteria for relapse risk of this condition. These patients have immunological profile changed by the disease itself and held by therapy which can contribute to the response and complications during treatment. The study aimed to describe the cellular immune response profile of cytokines, chemokines and identify possible immune biomarkers according to the treatment-risk group with GBTLI LLA-2009 protocol in patients with ALL aged zero to minor 18 years during induction therapy. The methodology used was not experimental, longitudinal, prospective cohort. Patients were stratified by risk group and analyzed during induction therapy in four stages: the diagnosis (D0), the eighth day (D8), the fifteenth day (D15) and thirty-fifth day (D35). The control group performed only one evaluation. The immune response was characterized by analysis of total lymphocytes, T lymphocytes (LT), LT CD4<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup>, NK cells, NKT cells and Treg lymphocytes (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>) and serum cytokines Th1, Th2, Treg and Th17 and serum chemokines MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 and MIG by flow cytometry. In the study it was observed that the diagnosis LT-were reduced in the first fifteen days of induction. IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-4 were reduced to their production, but not significant. The CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> were increased throughout the induction. Treg lymphocytes increased only on D15 and D35. NK cells decreased at D0, D15 and D35, and NKT cell only on D0 and in particular RA group. IL-6 was increased in D0 and IL-10 at D0 and D8. The TNF- $\alpha$  presented itself decreased throughout the induction. RANTES was decreased in D0, D15 and D8 and MIG decreased from D8 until the end of induction. MCP-1 decreased the D15 and IL-8 increased in RH group in D35. In interactions networks, Treg lymphocytes on D0 interacted with MCP-1, MIG and IP-10 and IL-10 with IL-8, MCP-1 and MIG and lost their interactions in D35. These results suggest that patients with ALL at diagnosis have immune dysregulation. The predominance of interactions immunoregulatory response by IL-10 and Treg lymphocytes with cytokines / chemokines may indicate a decrease or loss of its action at the end of induction, with a predominance of the inflammatory response, which suggests tumor control and bone marrow recovery.

**Keywords:** 1. Acute Lymphoblastic Leukemia. 2. Cell Profile. 3. Serum Cytokines. 4. Serum Chemokines. 5. Immune Biomarkers.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - Incidência de leucemia por 100.000 habitantes. Ambos os sexos e em todas as idades .....	22
<b>Figura 02</b> - Leucemia linfoblástica A e B: Esfregaço de medula óssea .....	26
<b>Figura 03</b> – Hiperdiploidia em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda .....	30
<b>Figura 04</b> - Processo de formação dos elementos figurados do sangue a partir das células tronco hematopoiéticas .....	36
<b>Figura 05</b> - Representação esquemática das diferentes vias de diferenciação das células Th0 destacando as principais citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg .....	38
<b>Figura 06</b> - Etapas do projeto de Pesquisa.....	51
<b>Figura 07</b> - Fluxograma de Atividades desenvolvidas .....	52
<b>Figura 08</b> - Identificação dos Linfócitos Totais, Linfócitos T e subpopulações (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) no programa FlowJo (v9.4) .....	58
<b>Figura 09</b> - Identificação dos Linfócitos Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> ) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4) .....	59
<b>Figura 10</b> - Identificação das Células NK (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ) e NKT (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4) .....	60
<b>Figura 11</b> - Estratificação dos pacientes por Grupo e Subgrupo de Risco nas fases da pesquisa .....	65
<b>Figura 12</b> - Análise do Hemograma em pacientes com Leucemia linfoblástica aguda.....	68
<b>Figura 13</b> - Análise do Hemograma em pacientes com leucemia linfoblástica aguda segregados de acordo com o grupo de risco .....	70
<b>Figura 14</b> - Análise do Perfil Celular por Citometria de Fluxo em pacientes com leucemia linfoblástica aguda.....	72
<b>Figura 15</b> - Análise do Perfil Celular por Citometria de Fluxo em pacientes com Leucemia linfoblástica aguda agrupado de acordo com o grupo de risco.....	74
<b>Figura 16</b> - Análise das Citocinas circulantes em pacientes com leucemia linfoblástica aguda no D0, D8, D15 e D35 .....	76
<b>Figura 17</b> - Análise das Citocinas circulantes em pacientes com leucemia linfoblástica nos diferentes grupos de Risco no D0, D8, D15 e D35 .....	78

<b>Figura 18</b> - Análise das Quimiocinas circulantes em pacientes com leucemia linfoblástica aguda no D0, D8, D15 e D35 .....	80
<b>Figura 19</b> - Análise das quimiocinas circulantes em pacientes com leucemia linfoblástica nos diferentes grupos de Risco no D0, D8, D15 e D35 .....	82
<b>Figura 20</b> - Redes de Biomarcadores celulares e solúveis circulantes em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda no D0, D8, D15 e D35 e em crianças saudáveis .....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda Segundo a OMS .....	21
<b>Tabela 02</b> - Distribuição das LLA e LMA por faixa etária no período de janeiro de 2007 a junho de 2015 na FHMOAM .....	23
<b>Tabela 03</b> - Imunofenotipagem para progenitores de linfócitos B e T .....	27
<b>Tabela 04</b> - Marcadores imunofenotípicos nas LLA-B e LLA-T.....	28
<b>Tabela 05</b> - Marcadores imunofenotípicos como critérios para classificação de leucemia de linhagem ambígua .....	28
<b>Tabela 06</b> - Alterações nos ligantes de quimiocinas CC e a expressão do receptor nas doenças humanas.....	42
<b>Tabela 07</b> - Ligantes de quimiocina CXC, XC e a expressão do receptor nas doenças relacionadas .....	43
<b>Tabela 08</b> - Distribuição dos anticorpos monoclonais de superfície e intracelular .....	55
<b>Tabela 09</b> - Distribuição dos anticorpos monoclonais intracelulares .....	56
<b>Tabela 10</b> - Descrição dos anticorpos, fluorescências, clones, lotes, número dos catálogos, marca e perfil celular dos anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo.....	56
<b>Tabela 11</b> - Dados demográficos dos pacientes e controles .....	62
<b>Tabela 12</b> - Características diagnósticas da imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	64



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01</b> - Características morfológicas dos blastos na leucemia linfoblástica aguda.....	26
<b>Quadro 02</b> - Características significantes da LLA – B com suas anormalidades citogenéticas, fenótipos e correlações clínicas .....	29
<b>Quadro 03</b> - Definições dos grupos de risco do Protocolo GBTLI LLA - 2009Classificação da Leucemia.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

AD: Água Destilada	IL-2R: receptor de IL- 2
AMO: aspirado de medula óssea	Ig: imunoglobulina
APC: Alofocianina	INCA: Instituto Nacional do Câncer
APCs: Células Apresentadoras de Antígeno	IP-10: Proteína induzida por interferon;
AR: Alto Risco	ISG: Gene estimulador de interferon
<b>BCR/ABL:</b> "breakpoint cluster region/"	LA: Leucemia Aguda
BR: Baixo risco	LAK: lymphokine- activated killers
BRI: Baixo risco Intermediário	LB: linfócitos B
BRV: Baixo Risco verdadeiro	LLA: Leucemia Linfoide Aguda
BSA: Albumina Bovina	LLC: Leucemia Linfoide Crônica
BMO: biópsia de medula óssea	LMA: Leucemia Mieloide Aguda
C: citoplasmático	LNH: linfoma não Hodgkin
CAAE: Certificado de Apresentação para Certificação Ética	LT: Linfócito T
CBA: "Cytometric Bead Array"	LTh: Linfócito T helper
CD: "Cluster Differentiation"	LTc: Linfócito T Citotóxico
DCs: Células Dendríticas	LTCD4 <sup>+</sup> : Linfócito T CD4 <sup>+</sup>
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa	LTCD8 <sup>+</sup> : Linfócito T CD8 <sup>+</sup>
CF: Citometria de Fluxo	LLA-B: Leucemia Linfoblástica Aguda de células B.
D1: Dia 1 da indução do protocolo GBTLI LLA-2009	LLL-T: Leucemia Linfoblástica Aguda de células T
D8: Dia 8 de indução do protocolo GBTLI 2009	MCP-1: proteína I quimioatraente de monócitos
D15: Dia 15 de indução do protocolo GBTLI LLA- 2009	MFI: Intensidade Média de Fluorescência
D35: Dia 35 da indução do protocolo GBTLI LLA-2009	MHC: "Major Histocompatibility Complex"
DAMPs: Padrões moleculares associados aos Danos	MIG: monocina induzida por interferon- $\gamma$ ;
DNA: Ácido Desoxirribonucleico	MIP: Proteínas Inflamatórias de Macrófagos
DRM: Doença Residual Mínima	mm: milímetro
EDTA: Ácido Etilenodiamino-tetracético	mL: Mililitro
FACS: "Fluorescence Absorbing Cell Sorting"	MO: Medula Óssea
FHEMOAM: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas	MS: Ministério da Saúde
FISH: Hibridização <i>In Situ</i>	NAB: Natural Antibodies
FITC: Isotiocianato de Fluoresceína	NCI: "National Cancer Institute"
FoxP3: Forkhead Box P3	NK: "Natural killer"
GBTLI: Grupo Brasileiro de Terapia da Leucemia na Infância	NK-T: "Natural killer-T"
HPV: Papiloma vírus humano	OMS: Organização Mundial da Saúde
HIV: vírus da imunodeficiência humana	PAMPS: Padrões Moleculares associados aos patógenos
IARC: Agência Internacional para Pesquisa em Câncer	PBS: Solução Tamponada com Fosfato
IFN- $\gamma$ : Interferon-gama	PBS-P: Solução Tamponada com Fosfato, Albumina e Saponina
	PBS-W: Solução Tamponada com Fosfato e Albumina
	PCR: Reação de Cadeia Polimerase
	P:E Ficoeritrina
	PE: População de Estudo
	PerCP: Clorofilpiridina
	Ph <sup>+</sup> : Filadélfia positivo

IL: Interleucina  
pg: picograma  
PR: População de Referência  
qsp: Quantidade suficiente para  
QT: Quimioterapia  
RANTES: quimiocina que regula expressão e secreção por linfócitos T;  
RCBP: Registro de Câncer de Base Populacional  
Rpm: Rotações por minuto  
s: superfície  
SLE: Sobrevida Livre de Eventos  
SNC: Sistema Nervoso Central  
SP: Sangue periférico  
TA: Temperatura ambiente  
TAI: Termo de Assentimento Informado  
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TCR: Receptor de células T  
TdT: Deoxinucleotidil Transferase Terminal  
TGF- $\beta$ : Fator de Crescimento Transformador-beta  
TLRs: Receptores do tipo Toll  
Th: T Helper  
Th1: T Helper 1  
Th2: T Helper 2  
Th17A: Thelp 17A  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral-alfa  
Treg: T regulatório  
UEA: Universidade do Estado do Amazonas  
 $\mu$ L: microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1. Leucemias .....</b>	<b>20</b>
1.1.1. Histórico das leucemias.....	20
1.1.2. Classificação das leucemias .....	20
1.1.3. Epidemiologia das leucemias .....	21
1.1.4. Etiopatogenia da Leucemia Linfoblástica Aguda .....	23
1.1.5. Manifestações Clínicas da LLA .....	24
1.1.6. Achados laboratoriais .....	25
1.1.7. Tratamento .....	31
<b>1.2. RESPOSTA IMUNE NA LLA .....</b>	<b>35</b>
1.2.1. O sistema imune na leucemia.....	35
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>47</b>
<b>2.1. Objetivos Específicos .....</b>	<b>47</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. MODELO DO ESTUDO.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3. POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4. POPULAÇÃO DE ESTUDO .....</b>	<b>48</b>
3.4.1. Casos .....	48
3.4.2. Grupo controle (Crianças sem LLA).....	49
<b>3.5. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
3.5.1. Casos .....	49
3.5.2. Grupo controle (Crianças sem LLA).....	50
<b>3.6. ETAPAS DO PROJETO .....</b>	<b>50</b>
<b>3.7. TAMANHO DA AMOSTRA .....</b>	<b>51</b>
<b>3.8. COLETA DE DADOS .....</b>	<b>51</b>
3.8.1. Procedimentos para Coleta de Dados.....	51
3.8.2. Fluxograma do trabalho de pesquisa.....	52
<b>3.9. COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO .....</b>	<b>53</b>
3.9.1. Coleta de Sangue periférico dos Pacientes com LLA (D0, D8, D15 e D35) .....	53
3.9.2. Coleta de Sangue Periférico dos indivíduos controle (Criança sem LLA) .....	53
<b>3.10. TESTES HEMATOLÓGICOS (HEMOGRAMA).....</b>	<b>54</b>
<b>3.11. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO (CF) .....</b>	<b>54</b>
3.11.1. Identificação da População de Linfócitos Totais, Linfócitos T e subpopulações (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) .....	57
3.11.2. Identificação da população dos Linfócitos T regulatórios (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> ).....	58
3.11.3. Identificação das Células NK (CD3-CD16+CD56+) e NKT (CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ).....	59
<b>3.12. DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PLASMÁTICAS POR CBA (CYTOMETRIC BEAD ARRAY) .....</b>	<b>60</b>
<b>3.13. ANÁLISES DESCRITIVAS, ESTATÍSTICA CONVENCIONAL E NETWORKS.....</b>	<b>61</b>

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1. DADOS DEMOGRÁFICO-EPIDEMIOLÓGICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS PRÉ-DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2. CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO, CITOGÉNÉTICA E DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL AO DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3. ESTRATIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE RISCO NAS FASES DA PESQUISA .....</b>	<b>64</b>
<b>4.4. ESTADO NUTRICIONAL .....</b>	<b>66</b>
<b>4.5. ANÁLISE DO HEMOGRAMA.....</b>	<b>67</b>
<b>4.6. PERFIL CELULAR, CITOCINAS E QUIMIOCINAS.....</b>	<b>71</b>
<b>4.7. INTERAÇÕES ENTRE OS BIOMARCADORES CELULARES E SOLÚVEIS CIRCULANTES NOS PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....</b>	<b>83</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE A: PROTOCOLO DE TRATAMENTO GBTLI LLA-2009 (GRUPO BAIXO RISCO VERDADEIRO -BRV).....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE B: PROTOCOLO DE TRATAMENTO GBTLI LLA-2009 (GRUPO BAIXO RISCO INTERMEDIÁRIO - BRI) .....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE C: PROTOCOLO DE TRATAMENTO GBTLI LLA-2009 (GRUPO ALTO RISCO RESPONDEDOR RÁPIDO - AR RR).....</b>	<b>106</b>
<b>APÊNDICE D: PROTOCOLO DE TRATAMENTO GBTLI LLA-2009 (GRUPO ALTO RISCO RESPONDEDOR LENTO – AR RL).....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE E: PROTOCOLO DE TRATAMENTO GBTLI LLA-2009 (GRUPO T-DERIVADA RESPONDEDOR RÁPIDO – LLA-T RR) .....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE F: PROTOCOLO DE TRATAMENTO GBTLI LLA-2009 (LLA T-DERIVADA RESPONDEDOR LENTO LLA-T RL).....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICE G: PROTOCOLO DE TRATAMENTO GBTLI LLA-2009 (GRUPO LLA PH+ - RESPONDEDOR RÁPIDO LLA-PH+ RR).....</b>	<b>118</b>
<b>APÊNDICE H: PROTOCOLO DE TRATAMENTO GBTLI LLA-2009 (GRUPO PH+ - RESPONDEDOR LENTO - LLA-PH+ RL) .....</b>	<b>123</b>
<b>APÊNDICE I: FICHA DE CADASTRO E IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE .....</b>	<b>127</b>
<b>APÊNDICE J: FICHA DE CADASTRO (ESTADO NUTRICIONAL DO PACIENTE).....</b>	<b>128</b>
<b>APÊNDICE K: FICHA DE CADASTRO (LABORATÓRIO) .....</b>	<b>129</b>
<b>APÊNDICE L: FICHA DE CADASTRO (PERFIL IMUNOLÓGICO) .....</b>	<b>131</b>
<b>APÊNDICE M: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – PAIS/RESPONSÁVEIS DE PACIENTES COM LLA .....</b>	<b>132</b>
<b>APÊNDICE N: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) - PAIS/RESPONSÁVEIS- CRIANÇA SAUDÁVEL.....</b>	<b>134</b>
<b>APÊNDICE O: TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO (TAI) - CRIANÇA COM LLA .....</b>	<b>136</b>
<b>APÊNDICE P: TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO (TAI) – CRIANÇA SAUDÁVEL.....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>142</b>
<b>ANEXO A: FICHA DO SERVIÇO SOCIAL DA FHEMOAM.....</b>	<b>142</b>

<b>ANEXO B: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INDUÇÃO DO PROTOCOLO GBTLI-2009 (LEUCEMIA B-DERIVADA) - REPRESENTAÇÃO GLOBAL .....</b>	<b>144</b>
<b>ANEXO C: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INDUÇÃO DO PROTOCOLO GBTLI-2009 (LEUCEMIA T-DERIVADA) - PLANEJAMENTO GLOBAL .....</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO D: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INDUÇÃO DO PROTOCOLO GBTLI-2009 (LEUCEMIA PH+) - PLANEJAMENTO GLOBAL.....</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO E: CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) DA FUNDAÇÃO HEMOAM .....</b>	<b>147</b>

---

---

# Introdução

## INTRODUÇÃO

### 1.1. Leucemias

Leucemia aguda (LA) é um grupo heterogêneo de doenças malignas primárias da medula óssea, caracterizada pela substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais pela expansão clonal de células hematopoiéticas imaturas na medula óssea<sup>1</sup>.

Dentre as leucemias agudas, a leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a desordem maligna mais comum na infância e as células precursoras de linfoblastos, podem estar comprometidas com qualquer uma das linhagens de células B ou T. Entretanto, as células de linhagem B são as mais comumente acometidas<sup>2-4</sup>.

#### 1.1.1. Histórico das Leucemias

Historicamente, os casos de leucemia vêm sendo registrados desde o século XIX. Peter Cullen, em 1811, descreveu um caso de esplenomegalia aguda relacionado com inexplicável sangue leitoso. Enquanto, Alfred Velpeau, em 1825, definiu associação de sintomas com pus nos vasos sanguíneos. Posteriormente, em 1844, Alfred Donné observou parada de maturação nestas células brancas do sangue. Em 1845, John Bennett usou o termo leucocitemia para nomear achados em estudo de microscopia por acúmulo de leucócitos. No ano seguinte, Henry Fuller realizou o primeiro diagnóstico microscópico de um paciente de leucemia em vida e Rudolf Virchow, em 1847, designou a doença como leucemia<sup>5</sup>.

#### 1.1.2. Classificação das leucemias

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2008, uma nova classificação foi definida para a LLA baseada nas características citogenéticas e moleculares conforme descrito na Tabela 1. As neoplasias linfoblásticas são divididas em duas categorias principais: leucemia linfoblástica B-derivada e T-derivada<sup>6-7</sup>.



**Tabela 01- Classificação da Leucemia Linfoblástica Aguda Segundo a OMS (2008).**

Neoplasias de células linfoblásticas precursoras		
<b>1. Leucemia linfoblástica B / linfoma B (LL-L-B)</b>	Leucemia linfoblástica B / linfoma B, SOE Leucemia linfoblástica B / linfoma B, com anormalidades genéticas recorrentes	- • Leucemia linfoblástica B/ linfoma B com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1 • Leucemia linfoblástica B/ linfoma B com t(v;11q23); rearranjo MLL • Leucemia linfoblástica B/ linfoma B t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) • Leucemia linfoblástica B/ linfoma B com hiperdiploidia • Leucemia linfoblástica B/ linfoma B com hipodiploidia • Leucemia linfoblástica B/ linfoma B com t(5;14)(q31;q32); IL3/IGH • Leucemia linfoblástica B/ linfoma B com t(1;19)(q23;p13.3); E2A-PBX1(TCF3-PBX1)
<b>2. Leucemia linfoblástica T / linfoma T (LL-L-T)</b>	-	-

Fonte: Swerdlow SH *et al.*,2008<sup>6</sup>.

### 1.1.3. Epidemiologia das leucemias

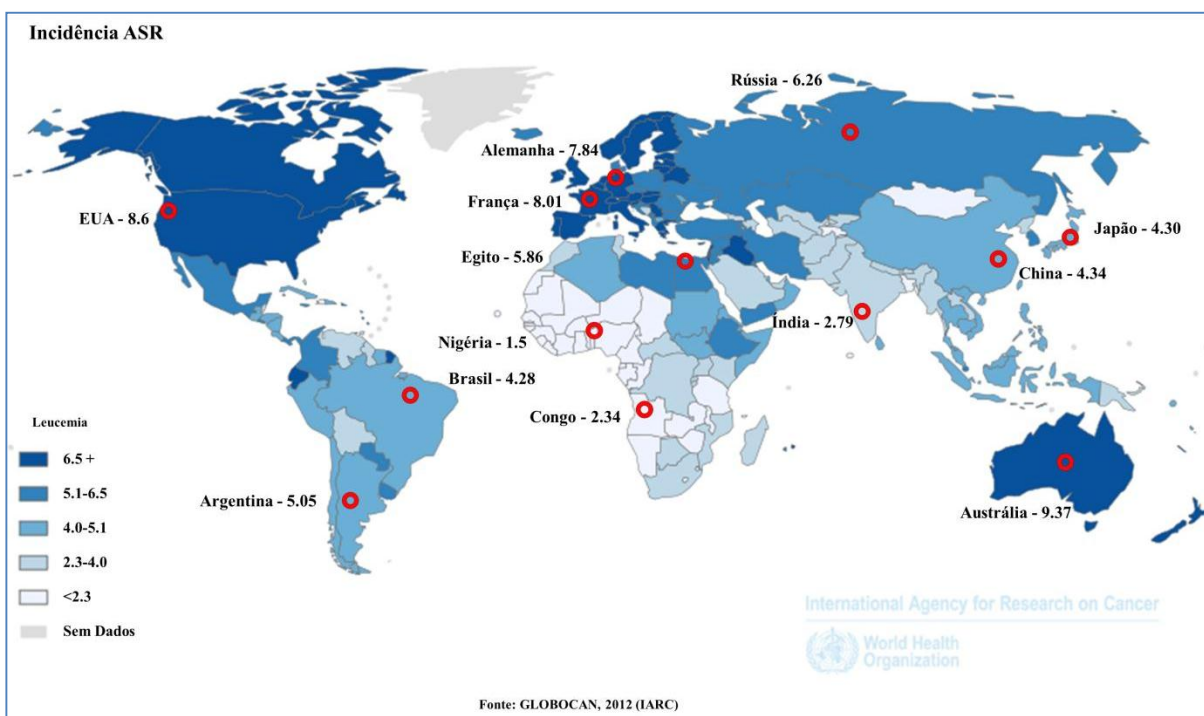
De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2012 ocorreram 14.1 milhões de casos novos e um total de 8.2 milhões de mortes por câncer no mundo, enquanto que no Brasil, em 2011, ocorreram 2.812 óbitos por câncer em crianças e adolescentes (de 0 a 19 anos)<sup>6-7</sup>.

A incidência mundial de tumores em crianças variou de 0.5 a 3.0 % do total de todos os casos de câncer. Devido o câncer nas crianças e adolescentes apresentar características histopatológicas próprias e ter comportamento clínico diferente dos adultos, devem ser estudados separados. Na maioria dos casos, esses cânceres têm curtos períodos de latência, são mais agressivos, crescem rapidamente, porém respondem melhor ao tratamento e são considerados de bom prognóstico<sup>8-10</sup>.

A leucemia é o tumor pediátrico mais comum, representando 25% de todos os tumores infantis entre crianças menores de 15 anos. Apesar de ocorrer nas crianças de todas as idades, o pico de incidência ocorre entre dois e cinco anos de idade, com uma ligeira predominância entre os meninos. Nas leucemias de célula B precursoras, 75% dos casos na população infantil, ocorrem em crianças menores de 6 anos de idade<sup>3, 9-11</sup>.

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a taxa de incidência de leucemia por 100.000 habitantes em ambos os sexos e em todas as idades em alguns países do mundo está demonstrada na Figura 1. Nota-se que o registro de maior incidência de leucemia está localizado nos países de primeiro mundo<sup>6-7</sup>.

**Figura 01-Incidência de leucemia por 100.000 habitantes, em ambos os sexos e em todas as idades.**



**Fonte:** Swerdlow SH et al., (2008); Globocan, (2012)<sup>6-7</sup>.

No Brasil, no ano de **2014** a taxa bruta de incidência de leucemia é de 4.28 na população, sendo para homens e mulheres, respectivamente 4.96 e 3.68e apresenta percentual mediano de 29, variando entre 19 em Aracaju e 42.5 em Manaus. O Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) da região norte destaca-se por apresentar os maiores percentuais para leucemia (acima de 39%), sendo a LLA o tipo de câncer de maior ocorrência em crianças de zero a 14 anos<sup>6-8</sup>.

No Amazonas, de acordo com dados da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM, no período de janeiro de 2007 a junho de 2015, foram diagnosticados 424 casos de leucemias agudas (LA) em crianças e adolescentes na faixa etária de zero a menor de 18 anos de idade, com média de 49.88 casos por ano, distribuídas em 356 casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e 68 casos de leucemia mieloide aguda (LMA), correspondendo a 83.96% e 16.04% respectivamente. Em 2014, o número de casos de LLA de novo diagnosticados nesta mesma faixa etária na FHEMOAM foi de 42 casos.

Na Tabela 02 está demonstrada a distribuição dos casos de LLA e LMA de novo relacionados com a faixa etária no período de janeiro de 2007 a junho de 2015 na FHEMOAM.

**Tabela 02-Distribuição das LLA e LMA por faixa etária no período de janeiro de 2007 a junho de 2015 na FHEMOAM.**

<b>Faixa etária</b>	<b>LLA (n)</b>	<b>LLA (%)</b>	<b>LMA (n)</b>	<b>LMA (%)</b>	<b>TOTAL</b>
<b>&lt; 1 ano</b>	08	2.25	03	4.41	11
<b>1 a &lt; 6 anos</b>	187	52.53	15	22.06	202
<b>6 a &lt; 9 anos</b>	53	14.88	08	11.77	61
<b>9 a &lt; 14</b>	68	19.10	20	29.41	88
<b>14 a &lt; 18 anos</b>	40	11.24	22	32.35	62
<b>Total</b>	356	100	68	100	424

**Fonte:** Dados do laboratório de marcadores celulares da FHEMOAM.

#### 1.1.4. Etiopatogenia da Leucemia Linfoblástica Aguda

A etiologia do câncer é multifatorial, dentre as causas, a exposição à radiação ionizante tem grande importância para a carcinogênese, levando a um aumento da incidência de quebras de cadeias duplas de DNA. Assim como o contato com produtos químicos poderão atuar na medula óssea via acúmulo seletivo e ativação metabólica<sup>11-13</sup>.

Outros fatores de risco também descritos está a exposição a determinados agentes infecciosos como HIV para sarcoma de Kaposi. O período de latência para o desenvolvimento da leucemia é mais curto em comparação aos outros tipos de câncer como o de pulmão, mama, estômago<sup>11-13</sup>.

A causa da LLA é desconhecida, acredita-se que sua etiologia na infância seja multifatorial, mas fatores de risco podem levar seu surgimento devido ao traço genético hereditário e ambiental, como radiação e toxinas. Dentre estes fatores está a exposição ao raios-x no pré-natal e no pós-natal; condições genéticas como Síndrome de Down, Neurofibromatose, Síndrome Shwachman, Síndrome de Bloom e Ataxia Telangiectasia; polimorfismos genéticos herdados. Portadores de uma translocação Robertsonian constitucional que envolve os cromossomos 15 e 21 são especificamente e altamente predispostas a desenvolver LLA<sup>14-15</sup>.

Outros fatores também são descritos tais como exposição a pesticidas, poluição do ar e da água, fumaça de cigarro, infecções e dieta inadequada<sup>15</sup>.

Algumas alterações genéticas do DNA como mutações também descritas podem ser herdadas dos pais ou adquiridos, ou mesmo ser desencadeadas pelo próprio câncer durante sua proliferação<sup>15</sup>.

Recentemente, evidências epidemiológicas e laboratoriais sugerem que recém-nascidos que apresentam baixos níveis de IL-10 poderão ter propensão de reagir a infecções normais de forma hiperresponsiva durante o primeiro ano de vida, o que poderá induzir a progressão de clones pré-leucêmicos através de processos inflamatórios associados à infecção<sup>15</sup>.

### 1.1.5. Manifestações Clínicas da LLA

O quadro clínico da LLA é caracterizado pela metaplasia leucêmica e pelo possível envolvimento de órgãos. Podendo apresentar infecções graves devido à granulocitopenia absoluta, hemorragias ou tendências a hemorragias, decorrente da plaquetopenia, anemia, dispneia por causa de tumor mediastinal e comum nas leucemias de células T, dor com frequência nas pernas e alterações abdominais como hepatoesplenomegalia<sup>16</sup>.

A infiltração leucêmica pode ocorrer em sistema nervoso central (SNC), testículo, ovário, rim, ossos, articulações, olhos, gânglios, fígado, baço, pele e em outros locais menos frequentes, tais com coração e pulmão<sup>17</sup>.

### 1.1.6. Achados laboratoriais

#### **Hemograma**

O hemograma é um dos exames, que apesar de simples e acessível à população, é considerado o mais importante para triagem de investigação inicial da leucemia. Através dele analisam-se os componentes do sangue como glóbulos vermelhos, plaquetas e células brancas<sup>15, 18</sup>.

#### **Punção lombar**

A punção lombar baseia-se na aspiração do líquido para exame citológico e também para injeção de quimioterapia com a finalidade de impedir o aparecimento (profilaxia) de células leucêmicas no SNC ou para destruí-las quando existir doença (meningite leucêmica) nesse local. É feita na maioria das vezes com anestesia local e com anestesia geral em crianças pequenas e as maiores que não cooperam com o procedimento<sup>8</sup>.

#### **Aspirado de Medula Óssea (AMO) - Mielograma**

Exame de grande importância diagnóstica que direciona a avaliação da doença é o aspirado de medula óssea (AMO). O mielograma proporciona as seguintes avaliações:

#### **Estudos citomorfológicos**

Um valor de 25% de blastos na medula óssea (MO) é considerado como limiar para definição de leucemia em muitos protocolos<sup>6</sup>.

A análise do aspirado de MO revela células de tamanho pequeno a médio com escasso citoplasma, uma alta relação núcleo/citoplasma, núcleos redondos ou ovais com manchas ou cromatina reticular e nucléolos proeminentes e variáveis, com menor frequência encontram-se células grandes com citoplasma mais abundante e contorno nuclear e cromatina variável. O citoplasma é basofílico e pode conter alguns vacúolos ou grânulos<sup>6,19</sup>. No Quadro 01 estão demonstradas as características morfológicas dos blastos na LLA.

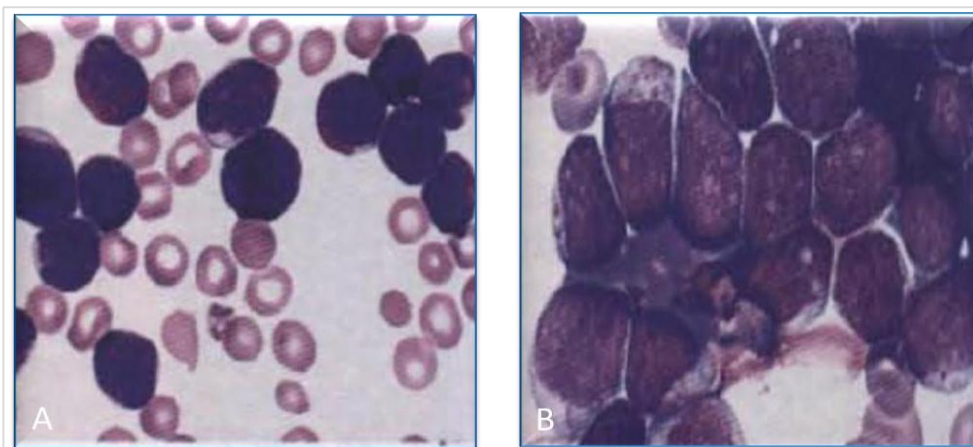
**Quadro 01- Características morfológicas dos blastos na leucemia linfoblástica aguda.**

	<b>Linfoblastos</b>
<b>Características gerais</b>	População de blastos tende a ser homogêneo
<b>Tamanho</b>	Variável, principalmente pequeno
<b>Núcleo</b>	Central, principalmente redonda; por vezes com endenteação, particularmente nos adultos. Alta relação núcleo/citoplasma em crianças e baixa relação núcleo/ citoplasma em adultos
<b>Cromatina</b>	Fina, com condensações dispersas. Muito condensado em linfoblastos pequenos
<b>Nucléolos</b>	Ausentes em pequenos linfoblastos, por vezes indistintos
<b>Citoplasma</b>	Escasso, basofílico, algumas vezes com única longa projeção (célula mão-espelho)
<b>Grânulos</b>	Raramente presente, azurófilos e sempre negativo para peroxidase, esterase e azul toluidine
<b>Bastonetes de Auer</b>	Sempre ausente
<b>Vacuolização</b>	Pode estar presente

Fonte: Adaptado de Chiaretti S, Zini G, Bassan R., 2014<sup>8</sup>.

Na Figura 02, observam-se células leucêmicas que podem ser encontradas de acordo com a sua morfologia, sendo que na figura 2A há vários linfoblastos com alta relação núcleo/citoplasma e cromatina nuclear condensada e na 2B, numerosos linfoblastos B contendo grosseiros grânulos azurófilos (6,20).

**Figura 02- Leucemia linfoblástica A e B: Esfregaço de medula óssea.**



Fonte: Swerdlow SH *et al.*, 2008<sup>6</sup>.

## Estudos Imunofenotípicos

A imunofenotipagem fornece informações para o diagnóstico, classificação e monitoramento para as doenças hematológicas malignas. Este exame requer seleção de combinações de marcadores individuais com base em seu grau de especificidade para identificação de uma determinada linhagem de célula, estágio de maturação e fenótipo aberrante, além de clones de anticorpos e conjugados de fluorocromos adequados para serem usados em combinações. Os perfis imunofenotípicos específicos e/ ou citogenética e anormalidades moleculares têm sido associados com o prognóstico<sup>20</sup>.

De acordo com o método de citometria de fluxo (CF), a imunofenotipagem é baseada na diferenciação de detecção de antígenos de superfície celular e intracelular e vai determinar o tipo de derivação celular (B ou T), além dos estágios de diferenciação para ajudar no diagnóstico. A aplicação de anticorpos monoclonais fornece um resultado mais preciso, melhorando o diagnóstico diferencial da leucemia, bem como para determinar a origem de células malignas e seu grau de diferenciação (Tabela 3)<sup>21</sup>.

**Tabela 03-Imunofenotipagem para progenitores de linfócitos B e T**

Linhagem B	CD10	CD19	CD22	CD79a	Tdt	Ig
Pró-B	-	+	+	+	+	-
Comum	+	+	+	+	+	-
Pré-B	±	+	+	+	+	C-μ
Pró-T	-	-	C	-	+	-
Pré-T	-	+	C	-	+	-
T Cortical	+	+	C	+	+	+
T Medular	-	+	C,S*	±	+	±

Abreviações: C, citoplasmático; S, superfície. \*Linfócitos T medular são positivos apenas para CD4 ou CD8, mas não ambos.

Fonte: adaptado de McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S, (2012)<sup>21</sup>.

O marcador de superfície CD19 é o mais comum em todos os pacientes com LLA-B, assim como os marcadores CD22 e CD79a citoplasmáticos. Complementando os marcadores imunofenotípicos das LLA-B e T já expostos na Tabela 03, apresentam-se outros marcadores para auxiliar no diagnóstico das leucemias agudas (Tabela 04).

**Tabela 04-Marcadores imunofenotípicos nas LLA-B e LLA-T**

	Comumente positivo	Expressão variável
<b>LLA- B</b>	CD19*	CD20
	cCD22*	CD34
	cCD79a*	CD45
	PAX5†	CD13
	CD10	CD33
	sCD22	sIgM‡
	CD24	
	TdT	
<b>LLA- T</b>	cCD3§	CD1a
	TdT	CD2
	CD7	sCD3
		CD4
		CD5
		CD8
		CD10
		CD34
		CD99
		CD19
		CD33
		CD79a
		CD117
		CD56

Antígenos são listados aproximadamente na ordem de frequência, **Abreviaturas:** c, citoplasmático; s, superfície, “\*” quase sempre positivo; †, mais específico para linhagem B, mas pode ser positivo em LMA t(8;21); ‡ raramente presentes; § somente marcadores considerados de linhagem específica; ¶ Provável coexpressão.

**Fonte:** McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S, (2012)<sup>21</sup>.

Para as leucemias de linhagem ambígua, os marcadores imunofenotípicos estão destacados no Tabela 05<sup>6, 21-22</sup>.

**Tabela 05-Marcadores imunofenotípicos como critérios para classificação de leucemia de linhagem ambígua**

Linhagem	Marcador
Mieloide	Coloração Mieloperoxidase ou até 2 NSE marcadores diferentes de monócitos CD11c CD14 CD64 Lisozima
Linfócito-T	CD3 citoplasmático demonstrado por citometria de fluxo usando marcador específico para a cadeia épsilon ou CD3 de superfície
Linfócito-B	D19 com a presença de pelo menos 1 marcador forte adicional  CD19 com a presença de pelo menos 2 CD79a marcadores fracos adicionais CD22 citoplasmático CD10

**Fonte:** McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S, (2012)<sup>21</sup>.



## Estudos de biologia molecular e citogenética ao diagnóstico

A maioria das crianças com LLA tem alterações cromossômicas. Aproximadamente 75% de todos os casos de LLA B apresentam uma aneuploidia ou um rearranjo cromossômico grave recorrente, que incluem hiperdiploidia com ganho não-aleatório de pelo menos cinco cromossomos (incluindo cromossomos X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21), como demonstrado no Quadro 02 e Figura 03. Hipodiploidia com menos de 46 cromossomos e translocações recorrentes, incluindo t (12;21) (p13;q22), codificação ETV6-RUNX1 (TEL-AML1); t (1;19) (q23;p13), que codifica Tcf3-PBX1 (E2A-PBX1); t (9;22) (q34;q11), que codifica a BCR-ABL1; rearranjo MLL envolvendo 11q23<sup>4,21</sup>.

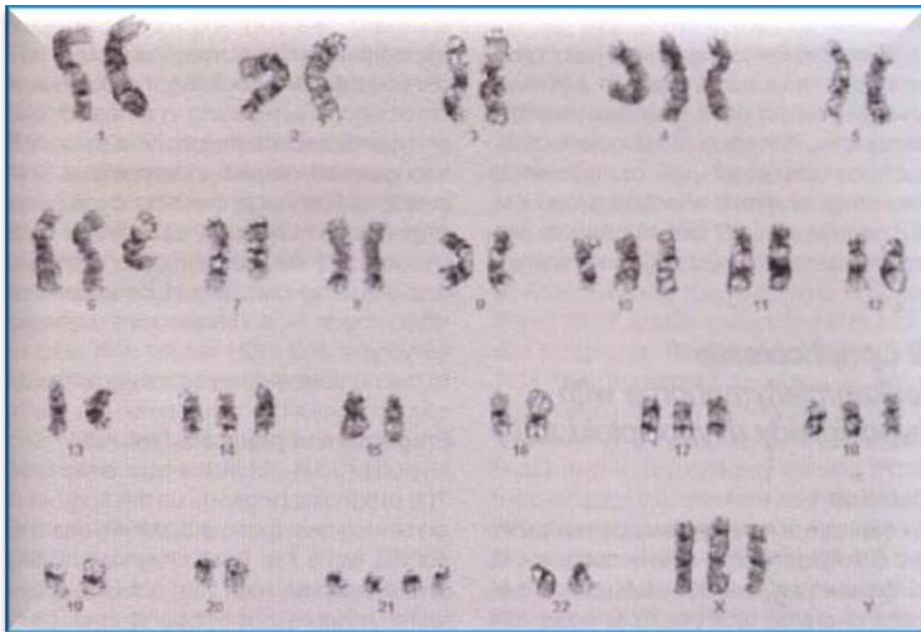
Várias dessas alterações são utilizadas na estratificação de risco por estarem associadas com o resultado, especialmente em LLA-B, tal como hiperdiploidia e ETV6-RUNX1 que estão associadas com resultado favorável. A hipodiploidia e rearranjo MLL estão associadas a um prognóstico sombrio. Frequentemente, ETV6-RUNX1 é detectável no nascimento, anos antes do aparecimento de leucemia, sugerindo que os fatores genéticos secundários são necessários para induzir a leucemia<sup>4, 22-24</sup>.

### Quadro 02- Características significantes da LLA – B com suas anormalidades citogenéticas, fenótipos e correlações clínicas.

Anormalidade citogenética	Fenótipos	Correlação clínica
t(9;22)(q33;q11;2)	CD19 <sup>+</sup> , CD10 <sup>+</sup> , CD25 <sup>+</sup> , frequentes expressões de antígenos mieloides	Pior resposta
t(v;11q23) fusão comum incluem AF4(4q21), ENL (p13)	CD19 <sup>+</sup> , CD10 <sup>-</sup> , expressões aberrantes de antígenos mieloides CD15	Apresentação frequente com alta contagem de leucócitos e envolvimento de SNC
t(12;21)(p13;q22)	CD19 <sup>+</sup> CD10 <sup>-</sup> , expressões aberrantes de antígenos mieloides CD13	Resposta favorável
Hiperdiploidia número de cromossomos >50, <66 cópias extras de cromossomos não randômicos. Cromossomos mais frequentes 21, X, 14 e 4	CD19 <sup>+</sup> , CD10 <sup>+</sup> , fenótipo não distintos	Resposta favorável
Hipodiploidia número de cromossomos <46	CD19 <sup>+</sup> , CD10 <sup>+</sup> , fenótipo não distintos	Pior resposta
t(5;14)(q31;q32)	CD19 <sup>+</sup> , CD10 <sup>+</sup> , fenótipo não distintos	Eosinofilia reativa com IL-3, pode ter menos de 20% de blastos na medula óssea e indetectável em sangue periférico
t(1;19)(q23;p13.3)	CD19 <sup>+</sup> , CD10 <sup>+</sup> , μ <sup>+</sup> citoplasmático	Associação não significativa com a resposta para a terapia no momento

Fonte: Adaptado de Swerdlow SH *et al.*, 2008<sup>6</sup>.

### Figura 03-Hiperdiplodia em pacientes com Leucemia



#### Linfoblástica Aguda.

Cariótipo banda G mostrando 55 cromossomos, com trissomia do 4, 6, 10,14, 17,18 e X e tetrassomia do 21. Não existem anormalidades estruturais.

Fonte: Swerdlow SH *et al.*, 2008<sup>6</sup>.

### Estudo da análise da doença residual mínima

Os testes da Doença Residual Mínima (DRM) são importantes para identificar a leucemia antes de evidente recaída, detectar a carga leucêmica antes do transplante e controle do tratamento em relação a outro anterior. Pode ser realizado através da Citometria de Fluxo (CF) e Reação de Cadeia Polimerase (PCR) de amplificação de genes de Imunoglobulina/ Receptores de Células T (Ig / TCR)<sup>25</sup>.

A imunofenotipagem por CF, também provou ser de grande utilidade para a detecção de baixos números de células blásticas residuais e sua distinção das células imaturas normais regeneradas da Medula Óssea (MO) de pacientes com leucemia aguda durante o tratamento<sup>20</sup>.

### Biópsia de Medula Óssea (BMO)

Tecido obtido através da biópsia de medula óssea, hipercelular e é geralmente difusa. Os linfoblastos são homogêneos, têm tamanhos intermediários e escasso citoplasma, deslocando megacariócitos e pequenas coleções de precursores eritroides, os núcleos dos linfoblastos podem ser redondos ou convolutos, com uma cromatina descrita como

uniformemente dispersa ou pontilhado, mas pode ser um pouco condensado. Os nucléolos são imperceptíveis, mas podem ser proeminentes, além de atividade mitótica Brisk quase sempre presente<sup>21</sup>.

### **Biópsia Testicular**

As células da leucemia, no processo da doença, podem infiltrar vários tecidos extramedulares e no caso dos testículos, a infiltração microscópica apresenta taxas que variam de 1.9% a 21%. A infiltração ao diagnóstico é rara, comumente ocorre no curso da doença ou na sua recaída<sup>26</sup>.

### **Exames de imagem**

Os exames solicitados dependem da gravidade do caso. Podem ser o raios-x de tórax, ultrassonografia abdominal, tomografia computadorizada, ressonância magnética e petscan<sup>10</sup>.

#### 1.1.7. Tratamento

### **Quimioterapia**

O tratamento é baseado em poliquimioterapia com estratificação por risco de recorrência da doença. Os medicamentos a serem administrados incluem corticosteroides, inibidores da metáfase (alcaloide da vinca), asparaginase (depleção da asparagina), antraciclinas, agentes alquilantes, antimetabólitos (metotrexato) e antagonista de purina (mercaptipurina)<sup>18</sup>.

A terapia de indução de remissão para pacientes com LLA deverá incluir um glicocorticoide, vincristina e asparaginase, porque eles agem sinergicamente, tem seus mecanismos de ação distintos e não são mielossupressores. A prednisona tem sido o glicocorticoide mais frequentemente utilizado nesta fase do tratamento, entretanto a dexametasona apresenta melhor resultado em pacientes com LLA-T e parece ter melhor controle da resposta no Sistema Nervoso Central (SNC)<sup>27</sup>.

No Brasil, o Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Linfoblásticas Agudas na Infância e Adolescência – GBTLI, apresenta proposta de tratamento (versão 2009) onde se

estratifica os grupos terapêuticos de acordo com sua linhagem de origem: B-derivada (Grupo de Baixo Risco e Alto Risco); T-derivada; cromossomo Philadelphia ( $Ph^+$ ) e Lactente<sup>28</sup>.

### **LLA B-derivada: Baixo Risco:**

**Baixo Risco Verdadeiro (BRV):** Critério NCI (crianças de 1 a menor que 9 anos, com contagem global de leucócitos menor que 50.000/ $\mu$ L ao diagnóstico). Sem acometimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Sem citogenética de mau prognóstico (BCR/ABL, rearranjo MLL e hipodiploidia <46 cromossomos). Para permanecer no grupo, precisa ter no D8 < 1000 blastos/ $\mu$ L em sangue periférico (SP), no D15 MO M1 com CF-DRM negativo (<0,01%) e no D35 MO M1 com PCR-DRM negativo (<10<sup>-3</sup>).

**Baixo Risco Intermediário:** Critério NCI (Inclui crianças de 1 a menor que 9 anos, com contagem global de leucócitos menor que 50.000 blastos/ $\mu$ L ao diagnóstico). Sem acometimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Sem citogenética de mau prognóstico (BCR/ABL, rearranjo MLL e hipodiploidia <46 cromossomos). Para permanecer no grupo precisa ter no D8 <1000 blastos/ $\mu$ L em SP, no D15 MO M1/2 com CF-DRM entre 0,01 a <10% e no D35 MO M1 ou PCR-DRM negativo. (<10<sup>-3</sup>).

### **LLA B-derivada: Alto Risco**

**Alto Risco Respondedor Rápido:** Inclui crianças de 9 a menor que 18 anos com contagem de leucócitos igual ou maior que 50.000 blastos/ $\mu$ L ao diagnóstico. Pacientes que apresentarem no D8 < 1000 blastos/ $\mu$ L em SP, no D15 MO M1/2 com CF-DRM <10% e no D35 MO M1 com PCR-DRM negativo (< 10<sup>-3</sup>).

**Alto Risco Respondedor Lento:** Inclui crianças de 9 a menor que 18 anos com contagem de leucócitos igual ou maior que 50.000 blastos/ $\mu$ L ao diagnóstico. Aqueles com mais de 1000 blastos/ $\mu$ L em SP no D8, MO M2/3 com CF-DRM positiva ( $\geq$ 10%). MO M2/3 com PCR-DRM positivo ( $\geq$  10<sup>-3</sup>) no D35. Neste grupo são incluídos os pacientes em esquema de Baixo Risco que no D8 apresentarem >1000 blastos/ $\mu$ L em SP, MO M3 e/ou DRM/CF positiva ( $\geq$  10%) no D15 e/ou MO M2/M3 e/ou PCR-DRM positivo no D35 ( $\geq$  10<sup>-3</sup>).

### **LLA do Lactente: crianças menores que 1 ano de idade.**

**Subgrupo Respondedor Rápido:** Pacientes que apresentarem no D8 < 1000 blastos/ $\mu$ L em SP, no D15 MO M1/2 com CF-DRM <10% e no D35 MO M1 com PCR-DRM negativo (<  $10^{-3}$ ).

**Subgrupo Respondedor Lento:** Aqueles com mais de 1000 blastos/ $\mu$ L em SP no D8, MO M2/3 com CF-DRM positivo ( $\geq 10\%$ ). MO M2/3 com PCR-DRM positivo ( $\geq 10^{-3}$ ) no D35.

### **Leucemia Linfoide Aguda Philadelphia positivo (Ph+).**

**Subgrupo Respondedor Rápido:** Pacientes que apresentarem no D8 < 1000 blastos/ $\mu$ L em SP, no D15 MO M1/2 com CF-DRM < 10% e no D35 MO M1 com PCR-DRM negativo (<  $10^{-3}$ ).

**Subgrupo Respondedor Lento:** Aqueles com mais de 1000 blastos/ $\mu$ L em SP no D8, MO M2/3 com CF-DRM positiva ( $\geq 10\%$ ). MO M2/3 com PCR-DRM positivo ( $\geq 10^{-3}$ ) no D35.

### **LLA T-derivada**

**Subgrupo Responder Rápido:** Pacientes que apresentarem no D8 < 1000 blastos/ $\mu$ L em SP, no D15 MO M1/2 com CF-DRM <10% e no D35 MO M1 com PCR-DRM negativo (<  $10^{-3}$ ).

**Subgrupo Respondedor Lento:** Aqueles com mais de 1000 blastos/ $\mu$ L em SP no D8 e/ou MO M2/3 com CF-DRM positiva ( $\geq 10\%$ ), MO M2/3 com PCR-DRM positivo ( $\geq 10^{-3}$ ) no D35.

O Quadro 03 apresenta um resumo das estratificações dos grupos e subgrupos do tratamento do Protocolo GBTLI LLA-2009, os quais irão definir o esquema terapêutico adequado de acordo com sua resposta a terapia inicial.

Os esquemas terapêuticos do Protocolo GBTLI LLA-2009, encontram-se demonstrados nos Apêndices A à H onde constam os medicamentos quimioterápicos, doses, vias de administração e dias de tratamento dos diferentes subgrupos de tratamento dos pacientes da pesquisa.

**Quadro 03-Definições dos grupos de risco do Protocolo GBTLI  
LLA - 2009**

Grupos de Risco	Baixo Risco*		Alto Risco		T		Ph <sup>+</sup>		Lactente
	Idade(anos)	≥ 1e<9		≥ 9e<18		-		-	
Leucócitos inicial(/mm <sup>3</sup> )	<50.000		≥ 50.000		-		-		-
SNC (SNC-3)	NÃO	NÃO	-		-		-		-
Citogenética de mau prognóstico	NÃO	NÃO	Hipodiploidia (<46cromossomos), t(4;11) ou fusão do gene MLL/AF		-		-		t(4;11) ou fusão do gene MLL/AF
SUBGRUPOS	BRV	BRI	RR	RL	RR	RL	Ph <sup>+</sup> e LACTENTE		
							RR	RL	
D8 (SP/blastos/mm <sup>3</sup> )	<1000	<1000	<1000	≥1000	<1000	≥1000	<1000	≥1000	
D15 (MO/DRM-CF%)	M1	M1/2	M1/2	M2/3	M1/2	M2/3	M1/2	M3	
	<0,01	≥ 0,01 e <10	<10	≥10	<10	≥10	<10	≥10	
D35 (M0/DRM- PCR)	M1	M1	M1	M2/3	M1	M2/3	M1	M2/3	
	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	≥10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	≥10 <sup>-3</sup>	<10 <sup>-3</sup>	≥10 <sup>-3</sup>	

\*Nota: Pacientes do grupo de baixo risco serão transferidos para o grupo de alto risco respondedor lento aqueles que apresentarem: No D8 ≥1.000 blastos/mm<sup>3</sup> em SP e/ou; no D15, MO M3, com CF-DRM≥10%; e/ou no D35 ou MO M2/3 com PCR- DRM ≥10<sup>-3</sup>. Definições: MO M1: Menor que 5% de células blásticas, MO M2: 5% a 25% de células blásticas, MO M3: Maior que 25% de células blásticas (critérios pelo NCI).

**Fonte:** Elaborado pela autora

### Profílatia e tratamento do Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) é o local extramedular mais frequentemente afetado ao diagnóstico (<5%) e nas recaídas da LLA (30 a 40%). Fatores de risco ao diagnóstico são relatados para corroborar com o risco de recaída em SNC como LLA-T, presença da t(9;22) e t(4;21), hiperleucocitose (acima de 100 x 10<sup>9</sup>/μL e infiltração em SNC ao diagnóstico. Também é descrito como fator de risco a punção lombar traumática ao diagnóstico (>10 células vermelhas/μL no líquido) com ou sem a presença de blastos. Quimioterapia intratecal como metotrexate ou a tripla quimioterapia metotrexate, citarabina e hidrocortisona, é administrada para prevenir recaídas em SNC<sup>24</sup>.

No caso da radioterapia, muitos protocolos reservam sua utilização apenas para aqueles pacientes com maior risco de recaída em SNC, enquanto algumas instituições suspenderam a sua utilização por completo<sup>30</sup>.

## Transplante

O papel do transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas tem importância em pacientes de alto risco ou após a recaída da doença hematológica maligna. No entanto, não está bem definida a sua indicação em primeira remissão. Geralmente é indicado para aqueles pacientes com maior risco de recidiva e/ ou falha do tratamento e tem sido associado aos que apresentam hipodiploidia ou falha indutória. Os resultados são melhores para os que recebem o transplante com DRM negativa. O doador ideal é um irmão compatível, apesar de avanços com fontes alternativas de doadores terem sido promissoras<sup>30</sup>.

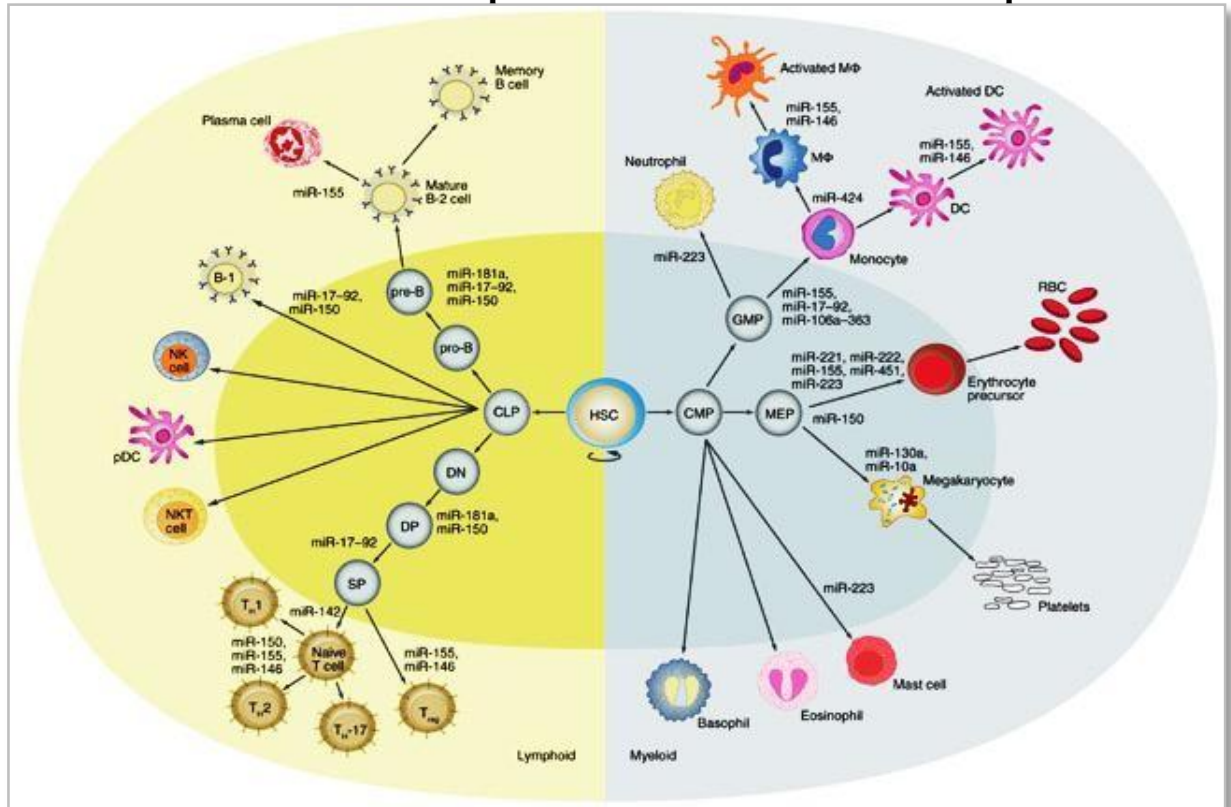
### 1.2. Resposta Imune na LLA

#### 1.2.1. O sistema imune na leucemia

O sistema imune humano é organizado de uma forma complexa, protege o hospedeiro contra organismos invasores e controla a resposta imune apropriada a diferentes estímulos antigênicos. Essa resposta é classificada em imune inata e adaptativa<sup>30-31</sup>.

A resposta imune inata atua prontamente contra os antígenos. Participam deste processo células efetoras denominadas de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer (NK), além das proteínas do sistema complemento e peptídeos antibacterianos. Suas funções são fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, síntese de proteína de fase aguda, citocinas e quimiocinas. A resposta adaptativa depende da ativação de células especializadas como linfócitos e moléculas solúveis por eles e suas funções são especificidade, diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância aos componentes do próprio organismo. Essas células são formadas na Medula Óssea, oriundas das células-tronco hematopoiéticas, como demonstrado na Figura 04<sup>31-33</sup>.

**Figura 04-Processo de formação dos elementos figurados do sangue a partir das células tronco hematopoiéticas.**



Fonte: Baltimore D et al., 2008<sup>33</sup>.

Os leucócitos mais abundantes no sangue periférico são os neutrófilos, possuem importante papel nas fases precoces das reações inflamatórias e sensíveis a agentes quimiotáticos como produtos de clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) e substâncias liberadas por mastócitos e basófilos. Estão entre as primeiras células a migrarem dos vasos para os tecidos atraídos por quimiocinas, como a IL-8 e são ativados por diversos estímulos, dentre eles produtos bacterianos, proteínas do complemento (C5a), imunocomplexos (IC), quimiocinas e citocinas<sup>32</sup>.

Os monócitos dão origem a macrófagos e são considerados fagócitos eficientes, eles englobam os patógenos e debris celulares e podem permanecer por meses ou anos nos tecidos, atuando como verdadeiras sentinelas. Outra função é processar e apresentar antígenos via moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), estimulando a resposta mediada por LT. Na inflamação, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs) potencializando a ativação de LT e linfócitos B (LB) pela expressão de moléculas coestimuladoras e liberação de citocinas pró-inflamatórias como Interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-12, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas<sup>32</sup>.



As células NK têm origem na medula óssea a partir de um progenitor comum aos LTs constituindo de 5% a 20% das células mononucleares do sangue. Tem propriedades citotóxicas e capacidades de produzir citocinas. São consideradas células efetoras do sistema imune inato que reconhecem e lisam células transformadas, isto é, células de tumor e infectadas por vírus, bactérias e protozoários<sup>32, 41</sup>.

Estas células, também recrutam neutrófilos e macrófagos, ativam células dendríticas (CDs) e LT e LB. Células infectadas por vírus e células tumorais frequentemente apresentam baixa expressão de MHC classe I, tornando-se vulneráveis à ação das NK. A capacidade tumoricida das NKs é aumentada por citocinas como interferons (IFN) e interleucinas (IL-2 e IL-12), regulando o sistema imune, o que favorece o desenvolvimento da resposta de células Th1<sup>32, 41</sup>.

Inicialmente as células progenitoras dos LT migram da medula óssea para o timo, onde as suas fases de desenvolvimento podem ser identificadas por alterações na expressão de marcadores de sua superfície celular. Na etapa inicial da maturação há proliferação celular dos tímócitos na região mais externa do córtex, e a medida que os tímócitos maturam, migram do córtex para a medula tímica<sup>33-34</sup>.

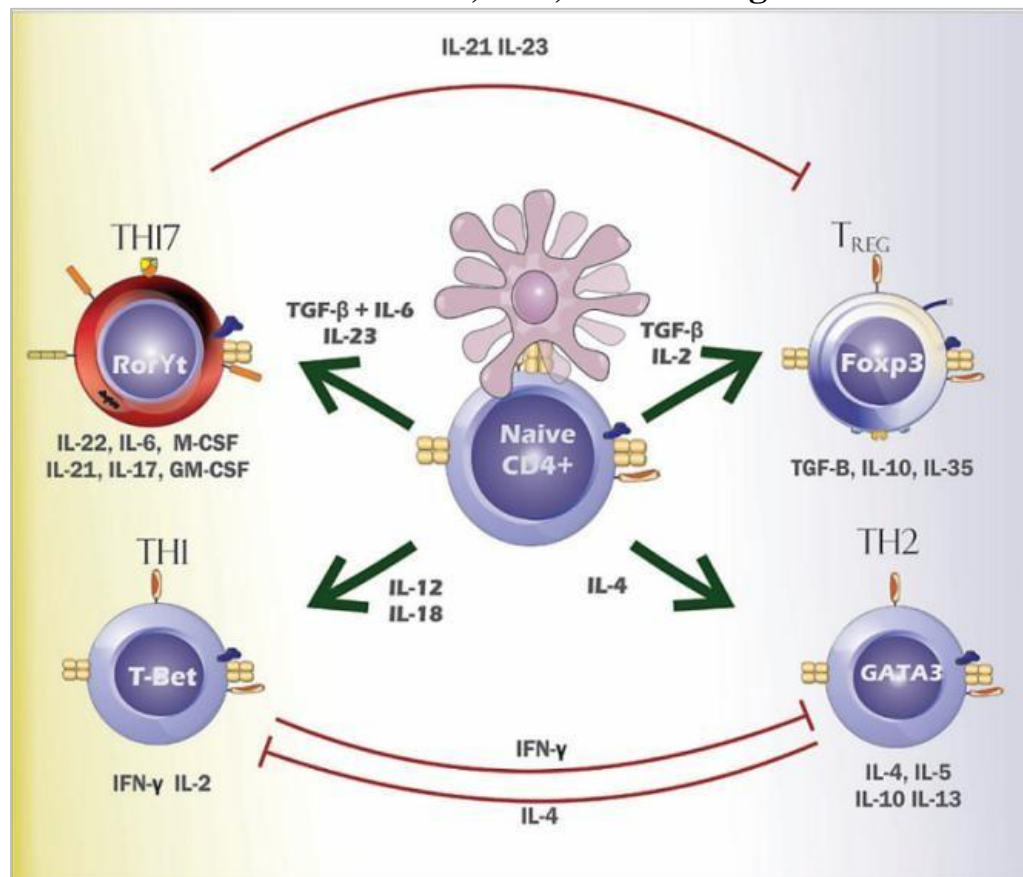
A interação dos tímócitos com as células do microambiente tímico é fundamental para a proliferação e diferenciação celular. Os tímócitos bem sucedidos na expressão completa de Receptores de Células T (TCR) com cadeias  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ , são submetidos a dois processos diferentes como seleção positiva e negativa. Posteriormente, parte dessas células é selecionada para diferenciar-se em células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup><sup>35-36</sup>.

A seleção positiva associa a apresentação dos peptídeos através das moléculas de MHC Classe I e Classe II para os LT CD8<sup>+</sup> e LT CD4<sup>+</sup>, respectivamente. Vale ressaltar que estes LT posteriormente vão desempenhar um papel importante na imunorregulação e na imuno-estimulação<sup>35</sup>.

Os linfócitos Th0 evoluem para diferenciação Th1 ou Th2 ainda em um estágio inicial da ativação celular. As células Th1 caracterizam-se principalmente pela produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Caracteristicamente, as citocinas do perfil Th1 ou Th2 direcionam para o desenvolvimento de sua respectiva via, inibindo a expressão do padrão oposto. Deste modo, uma vez polarizada a resposta imune para o padrão Th1, a via Th2 será inibida e vice-versa. Isso ocorre devido à regulação do nível

de receptores de membrana, da expressão diferencial de fatores de transcrição e de mudanças epigenéticas, como demonstrado na Figura 05<sup>35</sup>.

**Figura 05-Representação esquemática das diferentes vias de diferenciação das células Th0 destacando as principais citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg.**



Fonte: Souza AWS *et al.*, 2010<sup>36</sup>.

As células Th1 e Th2 são consideradas subconjuntos dos LT CD4<sup>+</sup>, que tem entre suas funções, ativar macrófagos e secretar citocinas Th1 tais como IFN-γ e IL-2 e por sua vez facilitar a produção de LT citotóxicos. Estas citocinas estão envolvidas principalmente na resposta imune contra protozoários, bactérias, vírus intracelulares e tumores<sup>36</sup>.

Enquanto que as células Th2 irão secretar as citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 e direcionar a resposta imune contra os helmintos e patógenos extracelulares, assim como induzir as células B a produzir anticorpos (resposta imune humoral), além de suprimir a ação de células T citotóxicas<sup>35-36</sup>.

Na resposta imune, observa-se que células Th1 e Th2 são para a população de LT CD4<sup>+</sup> como os homólogos do LT citotóxicos (Tc) tipos 1 e 2 (Tc1 /Tc2), são para LT CD8<sup>+</sup><sup>37</sup>.

É importante enfatizar que no decorrer de uma resposta imune, as citocinas produzidas por linfócitos Th1 e Th2, juntamente com linfócitos T citotóxicos tipos 1 (Tc1) e 2 (Tc2) são importantes para a eficácia da resposta. A expansão desregulada de um ou outro subconjunto pode contribuir para a disfunção do sistema imune mediado por células T em pacientes com câncer<sup>37</sup>.

As células Th17 representam um subtipo de LT efetores importantes na proteção contra infecção por microrganismos extracelulares e tem como função mediar a inflamação tecidual precoce, produzindo IL-17 e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células Th1 aos sítios inflamatórios, independente do acúmulo de células T regulatórias (Treg) no local, para tornar as células-alvo menos suscetíveis à imunorregulação e diminuir o poder imunossupressor das Tregs<sup>34, 38</sup>.

As Tregs tem seu desenvolvimento e maturação no timo e função, entre outras, é secretar IL-10 que estão envolvidas na homeostase e tolerância periférica ao antígeno auto-imune, impedindo ou diminuindo as consequências das reações de hipersensibilidade e das doenças autoimunes<sup>39</sup>.

Células com função imunorreguladora estão envolvidas na modulação e controle dos processos de eliminação de patógenos onde há destruição de tecidos próprios, exposição de auto-antígenos e produção de citocinas pró-inflamatórias, condições que favorecem a indução e a manutenção dos eventos autoimunes e necessitam ser controlados. Essas células atuam em uma complexa rede de mecanismos reguladores destinados a assegurar a modulação das respostas imunológicas frente aos diversos antígenos provenientes de agentes infecciosos, tumores, alo-antígenos, auto-antígenos e alérgenos<sup>34</sup>.

Estas células tem entre suas características alta expressão de CD25 no linfócito T CD4<sup>+</sup>, assim como do marcador Foxp3. A medula óssea é considerada um importante reservatório para estas células e apresentam quantidade mais elevada de células Treg CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>hi</sup>/FoxP3<sup>+</sup> que o sangue periférico, entretanto, as células T circulantes podem ainda ser recrutadas para a MO leucêmica e com isso, aumentar ainda mais o número destas células no espaço medular em pacientes com leucemia<sup>40</sup>.

Alguns autores demonstraram que a percentagem de LTreg foi significativamente maior nos pacientes com LLA-B e LLA-T em comparação aos indivíduos saudáveis, assim como foi observado redução da secreção de IL-2 e aumento de IL-10 e TGF- $\beta$ . Estes

resultados indicam que as células Treg podem suprimir a resposta imune através da baixa regulação de IL-2 e o aumento da expressão de IL-10 e TGF- $\beta$ <sup>20</sup>.

Ressaltamos que a função das células T efetoras, tais como Th1, Th2 e Th17, é controlada por células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), o que faz manter a tolerância periférica<sup>42</sup>.

Entre os LT com função imunorreguladora temos as células T reguladoras de ocorrência natural (Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>, Foxp3<sup>+</sup>), as células Tr1 que regulam mediante a produção de IL-10 e suprimem o desenvolvimento de algumas respostas de LT in vivo. Existem ainda várias outras células com função reguladora, dentre elas células NKT<sup>34</sup>.

É importante ressaltar que Indivíduos com leucemia apresentam uma intensa redução no número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no momento do diagnóstico e estas não se recuperam durante a terapia. Além disso, estes pacientes apresentam diminuição do número de LT que deixam o timo, ocorrendo conseqüentemente, uma redução significativa dos linfócitos naive<sup>43</sup>.

No entanto, a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> em pacientes com LLA-B ao diagnóstico está diminuída, embora populações de Linfócitos Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e Linfócitos Treg CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup> estejam elevadas, sugerindo uma melhor função destas células em crianças com LLA-B<sup>39</sup>.

Durante a resposta imune, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> apresentam um papel importante na produção de citocinas, estas são pequenas moléculas de proteínas solúveis (8-14 kDa) produzidas e secretadas por uma variedade de células cuja função é mediar e regular a hematopoese<sup>15, 43</sup>.

As citocinas podem ser detectadas em fluidos e tecidos biológicos, a elevação da sua concentração indica a ativação de vias envolvidas no processo da resposta inflamatória ou desenvolvimento da doença. Portanto, pode-se concluir que as citocinas são usadas como potenciais biomarcadores de várias doenças e as alterações na sua concentração podem ser utilizadas no seguimento desta patologia<sup>43-44</sup>.

Por outro lado, os macrófagos induzidos por células Th2, chamados macrófagos M2, são responsáveis por promover o crescimento e progressão do tumor através da elaboração da citocina imunossupressora, a IL-10, enquanto as quimiocinas pró-inflamatórias produzidas pelos leucócitos ou tecidos neoplásicos recrutam células Th2 e Treg. Em se tratando das quimiocinas, estas podem mediar a anergia das células T e desativar a sua capacidade para destruir células neoplásicas<sup>36</sup>.

Zhang em 2000, após estudo no sangue periférico de crianças com LLA observou a redução das citocinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) ao diagnóstico, assim como a recuperação das citocinas com o alcance da remissão completa da leucemia em alguns pacientes, considerando a eliminação de células tumorais que estaria associada a reversão de produção de citocinas Th1<sup>38</sup>.

No caso do IFN- $\gamma$ , o sistema imune inato induz sua secreção através da estimulação dos receptores Toll-like (TLRs) e outras vias de sinalização em resposta a biomoléculas extracelulares específicos como padrões moleculares associados aos patógenos ou aos danos (PAMPS ou DAMPS)<sup>45-47</sup>.

A citocina IL-2, apresenta três subunidades proteicas: alfa, beta e gama, ela é um fator de crescimento de célula T e tem seu efeito biológico induzido pelo receptor de IL- 2 (IL- 2R). Esta Interleucina induz a ativação e proliferação de células T e NK que vão estimular a citotoxicidade antitumoral, portanto a propriedade básica da IL-2 é ativar células efetoras para levar à lise seletiva das células tumorais<sup>48-49</sup>.

Quanto ao papel das quimiocinas na resposta imune, sabe-se que são constituídas por citocinas quimiotáticas de polipeptídeos de 8 a 12 kDa com duas pontes de dissulfeto internas. Movimentam as células brancas direcionando-as tanto na circulação sanguínea, quanto nos vasos linfáticos e tecidos, incluindo ambiente estromal e matrizes extracelulares, para locais de inflamação tecidual<sup>45</sup>.

Atualmente a família de quimiocinas humanas tem 50 membros e são subdivididos em 04 grupos com base no número e localização dos resíduos de cisteína N-terminais. As duas principais famílias de quimiocinas são CC e CXC, onde a primeira corresponde a resíduos de cisteínas adjacentes e a outra a resíduos separados por um aminoácido diferente de cisteínas. Na Tabela 06 está demonstrado sua classificação<sup>31,45,50</sup>.

**Tabela 06-Alterações nos ligantes de quimiocina CC e a expressão do receptor nas doenças humanas**

Receptor	Ligantes de Quimiocinas	Tipos de células	Ligação com doenças
CCR1	CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL14 (HCC1), CCL4, CCL6, CCL8, CCL13, CCL15, CCL16, CCL23	Células T, eosinófilos, basófilos	Artrite reumatoide, Esclerose múltipla, câncer colorretal
CCR2	CCL2 (MCP-1), CCL8(MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4), CCL16 (HCC4), CCL5, CCL8	Monócitos, células dendríticas (imatura), células T de memória	Aterosclerose, artrite reumatoide, esclerose múltipla, resistência para patógeno intracelular, diabetes mellitus tipo 2
CCR3	CCL11 (eotaxin), CCL13 (eotaxin-2), CCL7 (MCP-3), CCL5 (RANTES), CCL8 (MCP-2), CCL13 (MCP-4), CCL4, CCL11, CCL15, CCL24, CCL26, CCL28	Eosinófilos, basófilos, mastócitos, Th2, plaquetas	Asma e rinite alérgica, carcinoma renal
CCR4	CCL17 (TARC), CCL22 (MDC)	Células T (Th2), células dendríticas (madura), basófilos, macrófagos, plaquetas	Infecção parasitária, rejeição de enxerto, homing célula T para pele
CCR5	CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1), CCL5 (RANTES), CCL11 (eotaxin), CCL14 (HCC1), CCL16 (HCC4), CCL7	Células T, monócitos	Co-receptor HIV-1 (Tropismo linhagem-T), rejeição de transplante, câncer de mama, Câncer colorretal
CCR6	CCL20 (MIP-3 $\beta$ , LARC)	Células T (células T regulatória e memória), célula B, células dendríticas	Imunidade humoral de mucosa, asma alérgica, homing célula T intestinal, câncer colorretal
CCR7	CCL19 (ELC), CCL21 (SLC)	Células T, Células Dendríticas (madura)	Transporte de linfócitos T e células para linfonodo, imunidade celular tipo 2, melanoma, câncer de mama, câncer de pulmão de não pequenas células, carcinoma gástrico, câncer colorretal, LLC de célula B, LLC
CCR8	CCL1 (1309)	Células T (Th2), monócitos, células dendríticas	Migração de células dendríticas para linfonodo, imunidade celular tipo 2, formação de granuloma
CCR9	CCL25 (TECK)	Células T, Células plasmáticas IgA	Homing de células T e células plasmáticas IgA+ para o intestino, doença inflamatória intestinal, melanoma, câncer de mama, LLA-T
CCR10	CCL27 (CTACK), CCL28 (MEC)		Homing de célula T para intestino e pele, Melanoma, CTCL
ACKR3	CCL11, CCL12		Câncer de pulmão, rabdomiossarcoma
ACKR6	CCL18		Câncer de mama

**Fonte:** Adaptado de Charo F & Ransohoff RM, 2006; Vela M *et al.*, 2015<sup>50-51</sup>.

A movimentação de células é baseada na mediação de quimiocinas e tem sido caracterizada em quase todos os tipos celulares, embora a função fisiológica mais associada com a estimulação das quimiocinas seja seu recrutamento<sup>39</sup>.

A via de sinalização convencional atribuída a receptores de quimiocinas também envolve a mobilização de cálcio a partir de armazenamentos intracelulares. Ressaltamos que o pareamento de cada quimiocina com seu receptor através de sua ligação aos receptores dos componentes extracelulares é de fundamental importância para o início dos eventos de sinalização. Em alguns casos, os ligantes de quimiocinas, como CCL2 ou CXCL8, são capazes de ligar-se a diferentes receptores, conforme observado na Tabela 07<sup>45</sup>.

**Tabela 07-Ligantes de quimiocina CXC, XC e a expressão do receptor nas doenças relacionadas.**

Receptor	Ligantes de Quimiocinas	Tipo Celular	Doença Relacionada
CXCR1	CXCL8 (IL-8), CXCL6 (GCP2), CXCL5 (ENA78)	Neutrófilos e Monócitos	Doença Inflamatória de pulmão, COPD, melanoma, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata
CXCR2	CXCL8, CXCL1 (GRO $\alpha$ ), CXCL2 (GRO $\beta$ ), CXCL3 (GRO $\gamma$ ), CXCL5 (ENA78), CXCL6, CXCL7	Neutrófilos monócitos células endoteliais microvascular	Doença Infamatória de pulmão, COPD, angioestático para crescimento tumoral, melanoma, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma de célula renal, carcinoma de esôfago
CXCR3	CXCL4 (PF4), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC)	CélulasTh1, mastócitos células mesangiais células endoteliais microvascular, células neoplásicas	Doença inflamatória de pele, esclerose múltipla, rejeição a transplante, LLA, LLC célula B, angioestático para crescimento tumoral
CXCR4	CXCL12 (SDF-1)	Altamente expresso	Correceptor HIV-1 (tropismo célula T), metástase tumoral, hematopoiese, melanoma, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de bexiga, câncer de pâncreas, câncer colorretal, câncer renal, osteossarcoma, NSCLC, LMA, LLA, LLC, LNH, mieloma múltiplo neuroblastoma
CXCR5	CXCL13 (BCA-1)	Células B, células T helper folicular	Formação de folículos de células B, LLC célula B, linfoma do manto
CXCR6	CXCL16 (SR-PSOX)	Células T CD8+, células natural killer, células T CD4+ de memória	Doença inflamatória de fígado, aterosclerose (CXCL16)
CX3CR1	CXCL1 (fractalkine)	Macrófago, células endoteliais, células de músculo liso	Aterosclerose, câncer de mama, câncer de próstata, câncer colorretal
XCR1	XCR1 (lymphotactin), XCL2	Células T, células natural killer	Artrite reumatoide, nefropatia IgA, resposta tumoral

**Fonte:** Adaptado de Charo F & Ransohoff RM, 2006; Vela M *et al.*, 2015<sup>50-51</sup>.

As quimiocinas podem ser constitutivas ou induzidas (inflamatórias). As constitutivas são produzidas por vários tecidos e tem a função de recrutar leucócitos como linfócitos, na ausência de inflamação, enquanto as induzidas são produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios e tem como função recrutar leucócitos para o local da inflamação<sup>32</sup>.

Existem grupos diferentes de quimiocinas capazes de direcionar o tráfico exclusivo de células imunes, tanto para condições inflamatórias quanto para homeostáticos. Entretanto, durante a inflamação patogênica, tal como a infecção, trauma ou câncer, a produção de um grupo alternativo de quimiocinas pode ser induzido e ser direcionada ao local da inflamação<sup>39,45</sup>.

Em relação as citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), estes induzem a transcrição de uma grande variedade de quimiocinas, que incluem CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL25, CCL27, CXCL9 e CXCL10, e por sua vez atraem células ativadas de ambos os sistemas imune inato e adaptativo<sup>45</sup>.

Enfatizamos que, as quimiocinas têm efeito tanto pró quanto anti-tumor dentro do microambiente tumoral e que estas funções são realizadas através da regulação da infiltração de células imunitárias. No entanto, mediadores de quimiocina recrutam neutrófilos para os locais neoplásicos e tem sido sugerida como um mecanismo de defesa do tumor<sup>35</sup>.

Dentre as funções das quimiocinas, pode-se afirmar que geralmente, as quimiocinas CXC atraem neutrófilos (CXCL1, CXCL2, CXCL8) e linfócitos Th1 (CXCL9, CXCL10, CXCL11), enquanto as quimiocinas CC atraem linfócitos Th2 (CCL17 e CCL22), linfócitos Th17 (CCL20) e monócitos (CCL2, CCL7, CCL13)<sup>37, 51</sup>.

Até o momento já foram identificados 11 receptores diferentes para quimiocinas CC (CCR1 a CCR11) e sete receptores para as quimiocinas CXC (CXCR1 a CXCR7) e estes podem ser específicos para uma determinada quimiocina (CCR6, CCR9 e CXCR6) ou o mesmo receptor pode ligar-se a várias quimiocinas<sup>32</sup>.

Destacamos que em doenças como o câncer, o aumento da expressão de quimiocinas leva a infiltração de células imunes podendo ser correlacionadas com o aumento da sobrevida do paciente, por exemplo, a expressão CXCR4 tem sido correlacionada com uma variedade de câncer incluindo malignidades hematológicas como LLA e leucemia mieloide<sup>32</sup>.

A quimiocina CCL2, após ser estimulada por IL- 2, IL-12 e IFN-  $\gamma$ , irá ativar os macrófagos para que estes tenham a capacidade de destruir as células tumorais. Neste processo, ocorre o recrutamento do linfócito Treg, responsável pela supressão imune durante o desenvolvimento do tumor, expressam CCR4 e são atraídos para o local do tumor por CCL22, que é ligante para CCR4<sup>37, 45</sup>.

Consistentemente, podemos afirmar que as CCL2 e CCL5 também são conhecidos por causar afluxo de Treg para os tecidos periféricos inflamados. As quimiocinas têm dois



efeitos opostos sobre a progressão do tumor e sua resposta vai depender da presença de outros mediadores celulares e moleculares ou da quantidade de quimiocinas presentes<sup>37</sup>.

As células apresentadoras de antígenos (APC) tem papel importante na resposta imune, sendo as células dendríticas (CD) as mais importantes. Tem como principal função, após a fagocitose de antígenos (ex.: células tumorais), processar e apresentar antígenos em sua superfície para outras células através das moléculas de MHC e tornam-se ativadas pelo CCR7 e assim são responsivas a MIP-3 $\beta$  / CCL19 e CCL2<sup>37</sup>.

Estes ligantes de receptores de quimiocinas, permitem que as células dendríticas migrem para os órgãos linfoides secundários, onde irão estimular as células T para iniciar a reatividade imune<sup>36</sup>.

Pode-se afirmar que as quimiocinas de órgãos linfoides secundários são conhecidas por diminuir a carga tumoral devido a migração de CDs mais direcionadas para os nódulos linfáticos, com isso, desencadeando as respostas imunitárias contra tumores<sup>37</sup>.

As células T fazem parte da imunidade adaptativa, elas reconhecem os antígenos apresentados pelas APCs enquanto célula T naive (expressam CXCR4 e CCR7) presentes na corrente sanguínea e órgãos linfoides secundários, passam a ser células T de memória e efetoras (responsíveis à CCL5, CCL2, CCL8 e CCL7; expressam CXCR5 e CXCR3) e dirigem-se ao sítio da lesão ou tumor para as respostas inflamatórias<sup>37</sup>.

Entretanto, os linfócitos B (LB) leucêmicos podem apresentar antígenos tumorais através das moléculas de MHC e fornecer o primeiro sinal de ativação de células T, mas como não expressam B7.1, o segundo sinal não pode ser emitido, resultando em ativação incompleta dos LT<sup>52-54</sup>.

EK em 2005 e 2011<sup>54,56</sup> relata que após análise dos fatores envolvidos com a resposta imune, relatou que a imunossupressão comumente ocorre em pacientes em tratamento com drogas antineoplásicas e no processo de reconstituição imunológica e está relacionado com a natureza da doença, o tipo e dosagem de drogas e a idade do paciente poderão levar a efeitos colaterais importantes durante o tratamento, como infecções graves e ser responsável por aproximadamente 80% dos óbitos das crianças com LLA.

Muitos tratamentos têm sido propostos na tentativa de se buscar a efetividade na cura das leucemias e para a LLA se propõe atualmente o Protocolo GBTLI-LLA 2009. No entanto, se observa que muitos destes pacientes apresentam recaídas importantes, com alterações imunológicas marcantes ao longo do tratamento. Desta forma, compreender os mecanismos

imunes envolvidos na imunossupressão durante a fase de indução do tratamento, assim como a reconstituição imune nestes pacientes é de fundamental importância para o sucesso do tratamento atualmente proposto.

---

---

# Objetivos

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Descrever a resposta imune celular, perfil de citocinas, quimiocinas e pesquisar possíveis biomarcadores imunes de acordo com o grupo de risco de tratamento com o protocolo GBTLI LLA-2009, em pacientes com LLA na faixa etária de zero a menor de 18 anos durante a terapia de indução.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Analisar os parâmetros do hemograma como população de leucócitos totais, linfócitos totais, neutrófilos, monócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas em pacientes na faixa etária de zero menor de 18 anos portadores de LLA ao diagnóstico, D8, D15 e final da terapia de indução (D35) do protocolo GBTLI LLA-2009;
- Caracterizar as populações celulares em sangue periférico de linfócitos totais, linfócitos T (LT), LTCD4<sup>+</sup>, LTreg (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>), LTCD8<sup>+</sup>, NK e NKT na população de pacientes durante o protocolo de indução (D0, D8, D15 e D35);
- Descrever o perfil de citocinas séricas Th1, Th2, Treg e Th17 e quimiocinas séricas MCP-1, RANTES, IL-8, MIG e IP-10 nas quatro etapas da pesquisa;
- Relacionar o perfil da resposta imune através de biomarcadores imunes com os grupos de risco de tratamento da terapia de indução em pacientes na faixa etária de zero a menor de 18 anos portadores de LLA em uso do protocolo GBTLI LLA-2009.

---

---

# MATERIAL E MÉTODOS

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Modelo do estudo**

É um estudo não experimental, longitudinal de coorte e prospectivo. Os pacientes foram acompanhados de acordo com o intervalo de tempo compreendido entre o diagnóstico e o dia 35 da indução.

A intensidade da imunossupressão através de biomarcadores imunes foi demonstrada no tratamento de pacientes na faixa etária de zero a 18 anos com leucemia linfoblástica aguda (LLA), nos diferentes grupos de tratamento e na fase de indução do protocolo GBTLI-LLA 2009.

#### **3.2. Aspectos Éticos da Pesquisa**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM), com o Número de CAAE: 18309913.6.0000.0009.

#### **3.3. População de referência**

Pacientes na faixa etária de zero a menor de 18 anos com diagnóstico de leucemia aguda (LA).

#### **3.4. População de estudo**

##### **3.4.1. Casos**

Pacientes na faixa etária de zero a menor de 18 anos atendidos na FHMOAM, que apresentarem alteração no hemograma com suspeita de serem portadores de LA, com clínica de anemia e/ou infecção e/ou sufusões hemorrágicas.

Na FHMOAM são atendidos em torno de 1400 pacientes de primeira vez por ano com suspeita de LA. Os pacientes foram examinados, colhido a história clínica com anamnese e exame físico, coletado amostras de sangue periférico para hemograma e posteriormente realizado mielograma para diagnóstico de LLA e confirmação pela citomorfologia, imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF), estudo citogenético e biologia molecular.

A seleção foi realizada a partir da confirmação de LLA *de novo*. Preenchido os critérios de inclusão da pesquisa e foi solicitada a participação dos pacientes para os pais ou responsáveis legais, em caso de menores de idade. Após o consentimento da família, foi lido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o (s) responsável (eis) e realizado a assinatura do documento, em duas vias e entregue uma via ao (s) responsável (eis).

Também foi solicitado à criança sua participação na pesquisa e aquelas acima de 06 anos de idade e alfabetizadas foi lido o Termo de Assentimento Informado (TAI) e após seu consentimento foi solicitado sua assinatura no documento, em duas vias e entregue uma via para a criança/ responsável (eis).

Após a assinatura dos pais e da criança, a mesma foi encaminhada à sala de coleta de amostras para procedimento da coleta de rotina e da pesquisa. Novas coletas foram realizadas no D8, D15 e D35 da Indução do protocolo GBTLI LLA-2009.

No período da pesquisa, os pacientes estavam internados na FHMOAM ou em outro serviço de saúde, alguns ao final da indução encontravam-se de alta, no seu domicílio. No D35 as crianças compareceram à FHMOAM para coleta de mielograma e exame laboratorial da avaliação do tratamento e nesta data foi feito também a coleta para a pesquisa.

Um banco de dados foi abastecido com os resultados dos exames da pesquisa para posterior análise. Em caso de abandono ou óbito, os dados foram computados até data do mesmo.

O período de coleta de dados de casos e controles foi de agosto de 2014 a julho de 2015.

#### 3.4.2. Grupo controle (Crianças sem LLA)

Para valores de referência comparativos na análise do hemograma, perfil celular e de citocinas e quimiocinas foi utilizado um grupo controle.

### 3.5. Critérios de Inclusão e Exclusão

#### 3.5.1. Casos

Os critérios de inclusão utilizados foram: Idade: zero a menor de 18 anos, LLA *de novo* admitido no Serviço de Hematologia Pediátrica da FHMOAM no período de agosto de 2014 a maio de 2015, paciente em fase de indução do protocolo GBTLI LLA-2009. Como

critérios de exclusão foram utilizados os seguintes parâmetros: Material biológico insuficiente, coagulado, mal conservado ou com contaminação, material coletado após a data programada e crianças portadores de Síndrome de Imunodeficiência Adquirida diagnosticado após inclusão no estudo.

### 3.5.2. Grupo controle (Crianças sem LLA)

Neste grupo foram definidos como critérios de inclusão: Idade de zero à menor de 18 anos, resultado com valores normais do hemograma. As crianças sem infecção prévia há menos de 04 semanas. Como critérios de exclusão foram utilizados os seguintes dados: Material biológico insuficiente, coagulado, mal conservado ou com contaminação. Participaram deste grupo, crianças e adolescentes saudáveis, filhos de servidores da FHEMOAM, irmãos de pacientes em tratamento para leucemia e crianças de bairro centro sul da cidade.

Solicitada a participação das crianças saudáveis para os pais ou responsáveis legais, e após o consentimento da família, foi lido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o (s) responsável (eis) e realizado a assinatura do documento, em duas vias e entregue uma via ao (s) responsável (eis).

À criança acima de 06 anos de idade e alfabetizadas e aos adolescentes, foi lido o Termo de Assentimento Informado (TAI) e após seu consentimento foi solicitado sua assinatura no documento, em duas vias e entregue uma via para a criança/ responsável (eis).

Após a assinatura dos pais e da criança, a mesma foi encaminhada à sala de coleta de amostras para procedimento da coleta de rotina e da pesquisa.

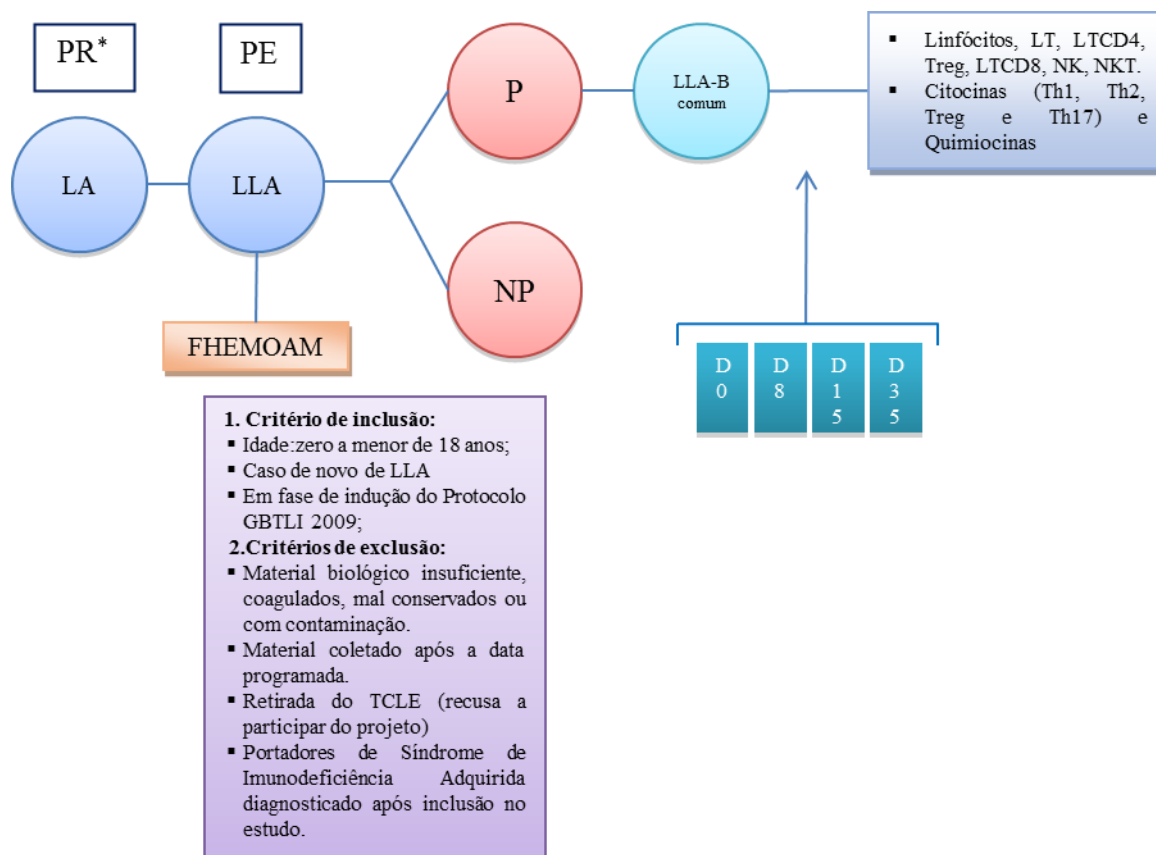
Um banco de dados foi abastecido com os resultados dos exames da pesquisa para posterior análise.

O período de coleta de dados de controles foi de maio à julho de 2015.

## 3.6. Etapas do Projeto

As etapas da investigação deste projeto estão demonstradas na Figura 06.



**Figura 06 - Etapas do projeto de Pesquisa.**

\***PR:** População de Referência; **PE:** População de Estudo; **LA:** Leucemia Aguda; **LLA:** Leucemia Linfoblástica Aguda; **P:** Participantes; **NP:** Não Participantes.

### 3.7. Tamanho da amostra

A coleta da amostra para a pesquisa foi realizada de forma sequencial de acordo com o cronograma estabelecido para a realização da pesquisa.

Em média são diagnosticados 40 pacientes com LLA por ano, portanto, a prevalência estimada é de 0,0285 (2,85%). A amostra adotada foi a amostra aleatória simples (AAS), com um erro de 5%, sendo um total de 41 pacientes<sup>57</sup>.

### 3.8. Coleta de dados

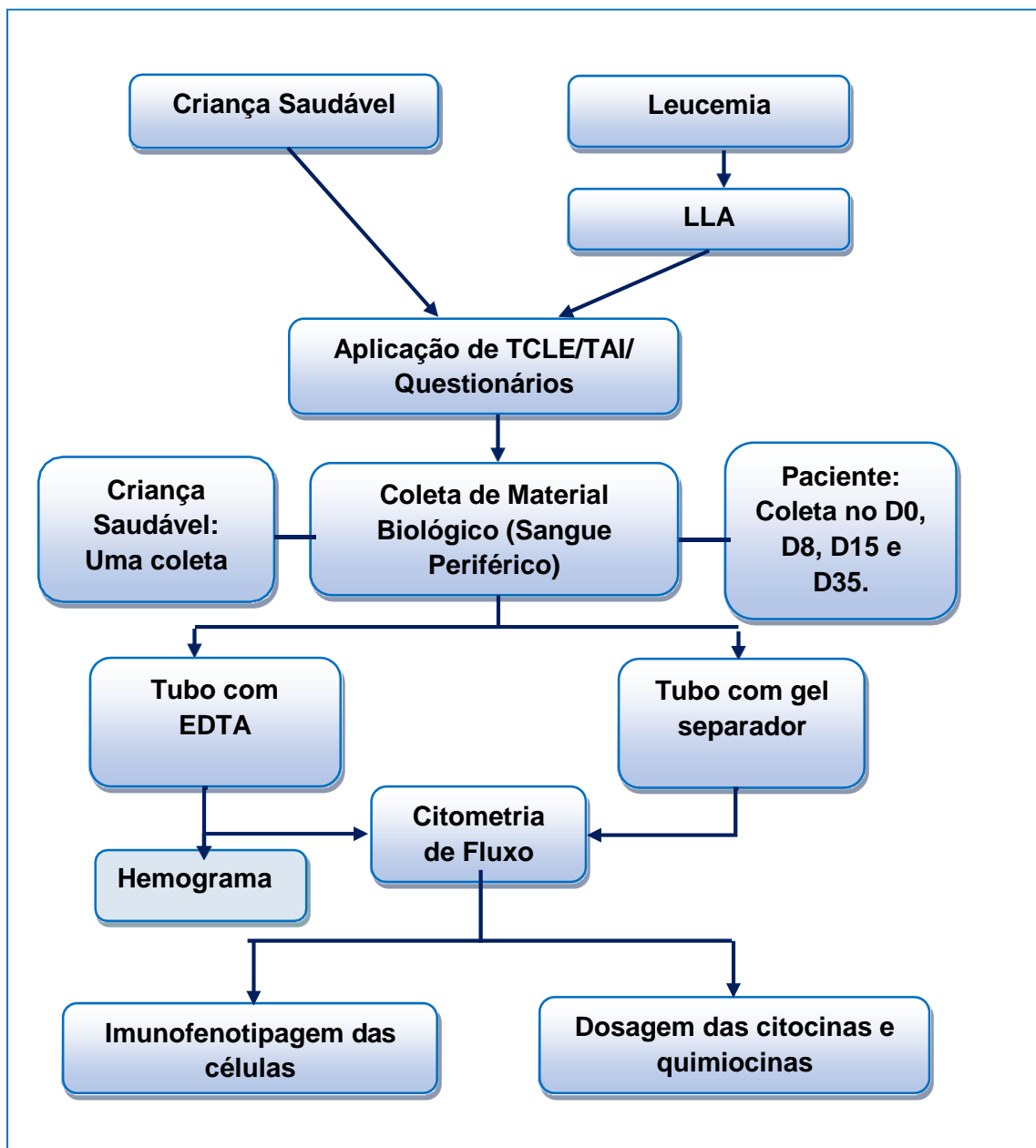
#### 3.8.1. Procedimentos para Coleta de Dados

A coleta de dados foi realizada a partir das consultas aos prontuários, fichas sociais dos pacientes e as informações foram anotadas nos formulários da pesquisa. Esses dados foram revisados pela pesquisadora e arquivados em pasta específica, dentro do serviço de Hematologia Pediátrica da FHEMOAM para posterior análise.

### 3.8.2. Fluxograma do trabalho de pesquisa

O fluxograma das atividades realizadas durante a pesquisa está descrito na Figura 07.

**Figura 07 - Fluxograma de Atividades desenvolvidas.**



### **3.9. Coleta e Processamento do Material Biológico**

#### **3.9.1. Coleta de Sangue periférico dos Pacientes com LLA (D0, D8, D15 e D35).**

Para este procedimento foi coletado um total de 3 ml e distribuídos entre os frascos com Ácido Etilenodiamino-tetracético (EDTA) para o hemograma e estudo do perfil celular por citometria de fluxo (1 ml) e um frasco sem anticoagulante para estudo das citocinas/quimiocinas séricas (2 ml). As amostras foram colhidas na sala de procedimentos ou na enfermaria onde os pacientes estavam internados. Casos excepcionais cujo o paciente não pode dirigir-se à FHEMOAM, a coleta foi realizada no serviço de saúde que o mesmo estava internado.

As amostras foram identificadas com o código do projeto e enviadas ao laboratório de marcadores celulares para o hemograma e posterior encaminhamento ao laboratório multidisciplinar para identificação dos marcadores celulares por citometria de fluxo. As amostras sem anticoagulante, destinada à dosagem das citocinas e quimiocinas séricas, foram segregadas em alíquotas e congeladas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  devidamente identificadas até o momento da realização dos testes.

#### **3.9.2. Coleta de Sangue Periférico dos indivíduos controle (Criança sem LLA).**

A coleta foi realizada na sala de procedimentos, no laboratório de análises clínicas da FHEMOAM e em sala disponibilizada em bairro da cidade. Após a identificação dos tubos com o código do projeto, o material foi coletado por punção venosa um total de 3 ml e distribuídos entre os frascos com EDTA para o hemograma e estudo do perfil celular (1 ml), outro frasco sem anticoagulante para estudo das citocinas e quimiocinas séricas (2 ml) por citometria de fluxo. Após o registro para o hemograma, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de marcadores celulares da FHEMOAM para a realização do hemograma e posterior encaminhamento ao laboratório multidisciplinar para identificação dos marcadores celulares por citometria de fluxo. As amostras sem anticoagulante, para fins de dosagem das citocinas e quimiocinas séricas, foram segregadas em alíquotas e congeladas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e identificadas para posterior realização dos testes.

### 3.10. Testes hematológicos (Hemograma)

Para a realização dos testes hematológicos, foram realizadas a contagem global dos leucócitos totais e diferencial, das hemácias, das plaquetas, determinação do hematócrito, dosagem de hemoglobina e índices hematimétricos em contador hematológico automatizado *ADVIA®2120i Hematology System (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany)*

Paralelo ao hemograma automatizado foi realizada leitura das lâminas por microscopia de luz, após a sua preparação, seguindo o protocolo abaixo:

Inicialmente procedeu-se a identificação das lâminas com as iniciais do paciente e os tubos com o código do projeto e data. A coleta de sangue foi realizada em uma veia periférica e as primeiras gotas de sangue são colocadas em duas lâminas histológicas, com posterior esfregação analítico com o auxílio de uma terceira lâmina (extensora), que é posicionada em um ângulo de 30 a 45 graus. A lâmina extensora é recuada em direção à gota de sangue, permitindo que o sangue se distribua por meio da borda da lâmina. A lâmina foi então deslocada para frente em um movimento relativamente rápido, formando o esfregação. O volume recomendado para o tubo foi respeitado, para evitar desproporção sangue/EDTA, o que poderia causar erro pré-analítico. Nos esfregaços sanguíneos, os corantes utilizados foram o *May-Grunwald-Giemsa*. A leitura foi feita em microscópio com objetiva de pequeno aumento (objetiva de 10x), seguido pela leitura com óleo de imersão com objetiva de grande aumento (100x).

### 3.11. Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo (CF)

Para este procedimento foram coletados por punção venosa, 1 ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA como anticoagulante para a caracterização do perfil celular utilizando a técnica de CF.

As células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (Tabela 08) que se fixam em epítomos específicos e são captadas pelo CF para a caracterização das populações celulares. Neste estudo foi utilizado um painel de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos específicos, para detecção dos linfócitos totais (FSCxSSC), linfócitos T (CD3<sup>+</sup>), LT auxiliar (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>), LT citotóxico (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) e LT reguladores (CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>), além das células NK (CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) e NKT (CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>).

Inicialmente, foram identificados e distribuídos anticorpos de superfície em 5 tubos de citometria conforme descrição na Tabela 09, em seguida adicionado 100 µL de sangue total nos tubos 1 a 3 e 200 µL nos tubos 4 e 5. Estes foram homogeneizados e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz. Após o período de incubação foi feito a lise das hemácias com o uso da solução de lise (*BD FACS™ Lysing Solution, Cat. N° 349202, Lot: 24299, BD® Biosciences*), diluída 10 vezes em água destilada (AD). Os tubos foram novamente homogeneizados e incubados por 10 minutos nas mesmas condições. Passado a fase de incubação, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e acrescentado 2 mL de PBS-W (8,0 g de NaCl, 1,16 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g de KCl e 5,0 g de BSA, qsp 1L H<sub>2</sub>O destilada, pH: 7,2) para lavagem do pellet formado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 300 µL de PBS-W nos tubos sendo armazenados em geladeira até o momento da leitura pelo Citômetro de Fluxo FACSCalibur®.

**Tabela 08 - Distribuição dos anticorpos monoclonais de superfície e intracelular**

TUBO	FITC	PE	Percp	APC
1. CN	-	-	-	-
2. LT	Anti- CD8 <sup>+</sup> (2µL)	Anti- CD4 <sup>+</sup> (2µL)	Anti- CD3 <sup>+</sup> (2µL)	-
3. NK	Anti- CD16 <sup>+</sup> (2µL)	Anti- CD56 <sup>+</sup> (2µL)	Anti- CD3 <sup>-</sup> (2µL)	-
4. CN Treg	-	-	-	-
5. Treg	Anti- CD25 <sup>+</sup> (10µL)	Anti- CD4 <sup>+</sup> (2µL)	-	-

Dando continuidade na marcação intracelular, foi adicionado 2 ml de PBS-P (8,0g de NaCl, 1,16g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2g de KCl, 5,0g de BSA e 5,0g de Saponina, qsp 1L H<sub>2</sub>O destilada, pH:7,2) nos tubos 4 e 5 para permeabilização celular, homogeneizados e incubados por 10 minutos a TA e ao abrigo da luz. Posteriormente foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos e descartado o sobrenadante. O pellet foi ressuscitado em 2 ml de PBS-W, homogeneizado, centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, descartado o sobrenadante, adicionado 100 µL de PBS- P no tubo 4 e 10<sup>lv</sup> µL do anticorpo de FoxP3 (Tabela 09) diluído

em PBS- P (1:10) no tubo 5. Os tubos foram incubadas por 20 minutos ao abrigo da luz em TA.

**Tabela 09 - Distribuição dos anticorpos monoclonais intracelular.**

TUBO	FITC	PE	Percp	APC
4. CN Treg	-	-	-	-
5. Treg	-	-	-	Foxp3 <sup>+</sup> (10µL)

Após o período de incubação das células, foram lavadas com 2 ml de PBS-W, homogeneizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, descartado o sobrenadante e ressuspendido o pellet em 300 µL de PBS-W, homogeneizado e armazenado em geladeira até o momento da leitura.

A aquisição das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo FACSCalibur® (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) da FHEMOAM, utilizando o software *Cell-Quest*. Para a identificação morfológica e imunofenotípica das células foi utilizado o programa *FlowJo* (v9.4), com o auxílio de “gates” para a seleção das populações de interesse em gráficos que combinaram características morfológicas (tamanho e granulosidade) com características imunofenotípicas através das fluorescências dos anticorpos monoclonais utilizados para identificar as células alvos. Os gráficos utilizados foram do tipo “*dot plot*”, “*contour plot*” e histograma, por apresentarem uma melhor visualização das estratégias de análise. A descrição dos anticorpos utilizados, fluorescência, clones, lotes, números do catálogo, marca e perfis celulares analisados estão descritos na Tabela 10.

**Tabela 10 - Descrição dos anticorpos, fluorescências, clones, lotes, número dos catálogos, marca e perfil celular dos anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo.**

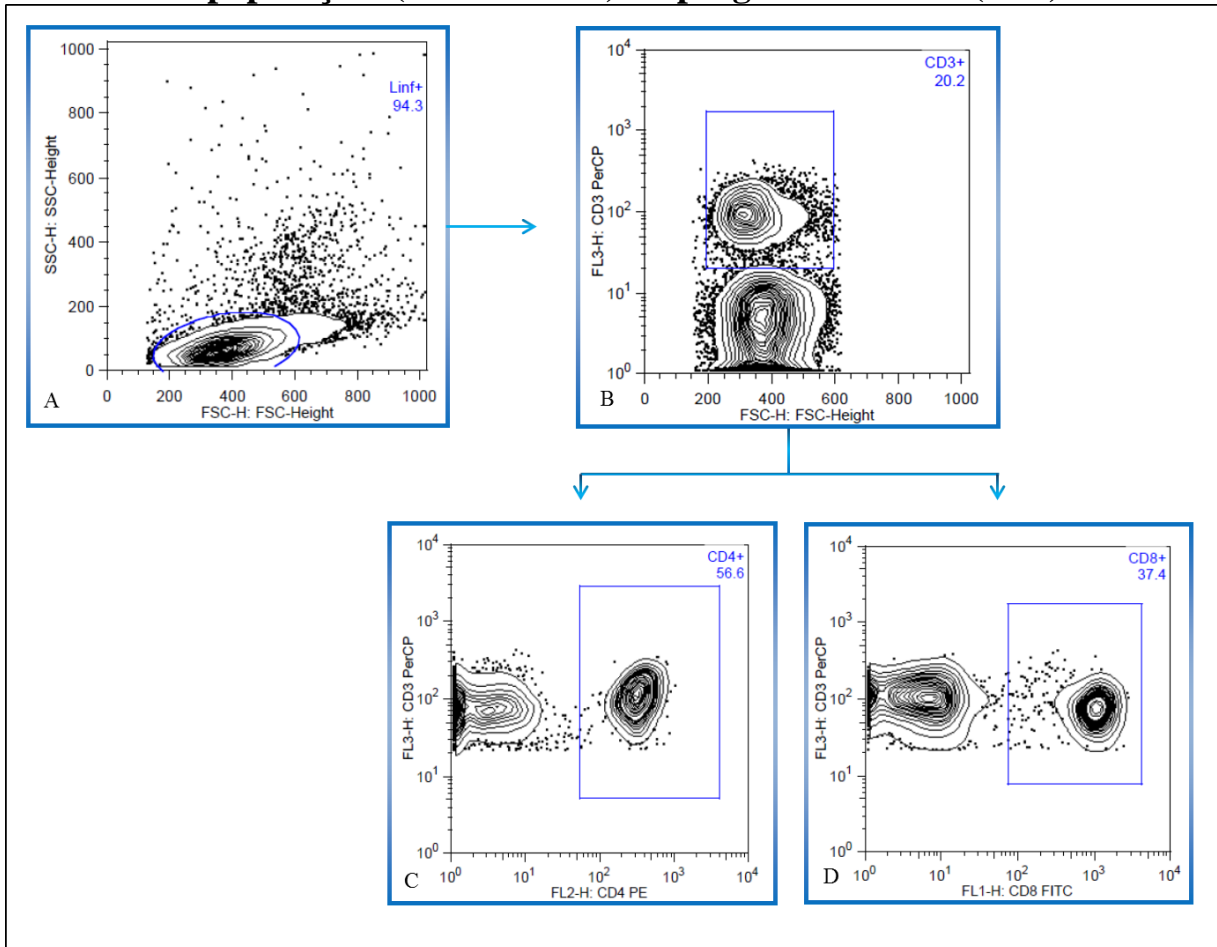
Tubo	Anticorpo	Fluorescência	Clone	Lote	Cat.Nº	Marca	Perfil Celular
01	-	-	-	-	-	-	CN
02	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	BD® Biosciences	Linf. T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup>
	Human Anti-CD4	PE	RPA-T4	75982	555346	BD® Biosciences	
	Human Anti-CD8	FITC	HIT8a	15483	555634	BD® Biosciences	

03	Human Anti-CD3	PercP	SK7	41864	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Células NK e NKT
	Human Anti-CD16	FITC	3G8	74331	555406	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD56	PE	B159	67211	555516	<i>BD® Biosciences</i>	
04	-	-	-	-	-	-	CN Intracelular
05	Human Anti-CD25	FITC	M-A251	66993	555431	<i>BD® Biosciences</i>	Linf. Treg
	Human Anti-CD4	PE	RPA-T4	75982	555346	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-Foxp3	AF647	259D/C7	68982	560015	<i>BD® Biosciences</i>	

### 3.11.1. Identificação da População de Linfócitos Totais, Linfócitos T e subpopulações (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>).

A identificação da população de Linfócitos Totais foi realizada primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (Figura 08A) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Em seguida foram elaborados três gráficos: 1) Para Linfócitos T: CD3 PercP x FSC (Figura 8B); 2) Para linfócitos TCD4<sup>+</sup>: CD3 PercP x CD4 PE (Figura 8C); Para linfócitos TCD8<sup>+</sup>: CD3 PercP x CD8 FITC (Figura 8D). Em seguida foram selecionadas as populações positivas com o auxílio de uma “gate” para CD3<sup>+</sup> (Linfócitos T), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Linfócitos T CD4<sup>+</sup>) e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Linfócitos T CD8<sup>+</sup>).

**Figura 08 - Identificação dos Linfócitos Totais, Linfócitos T e subpopulações (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) no programa *FlowJo* (v9.4).**



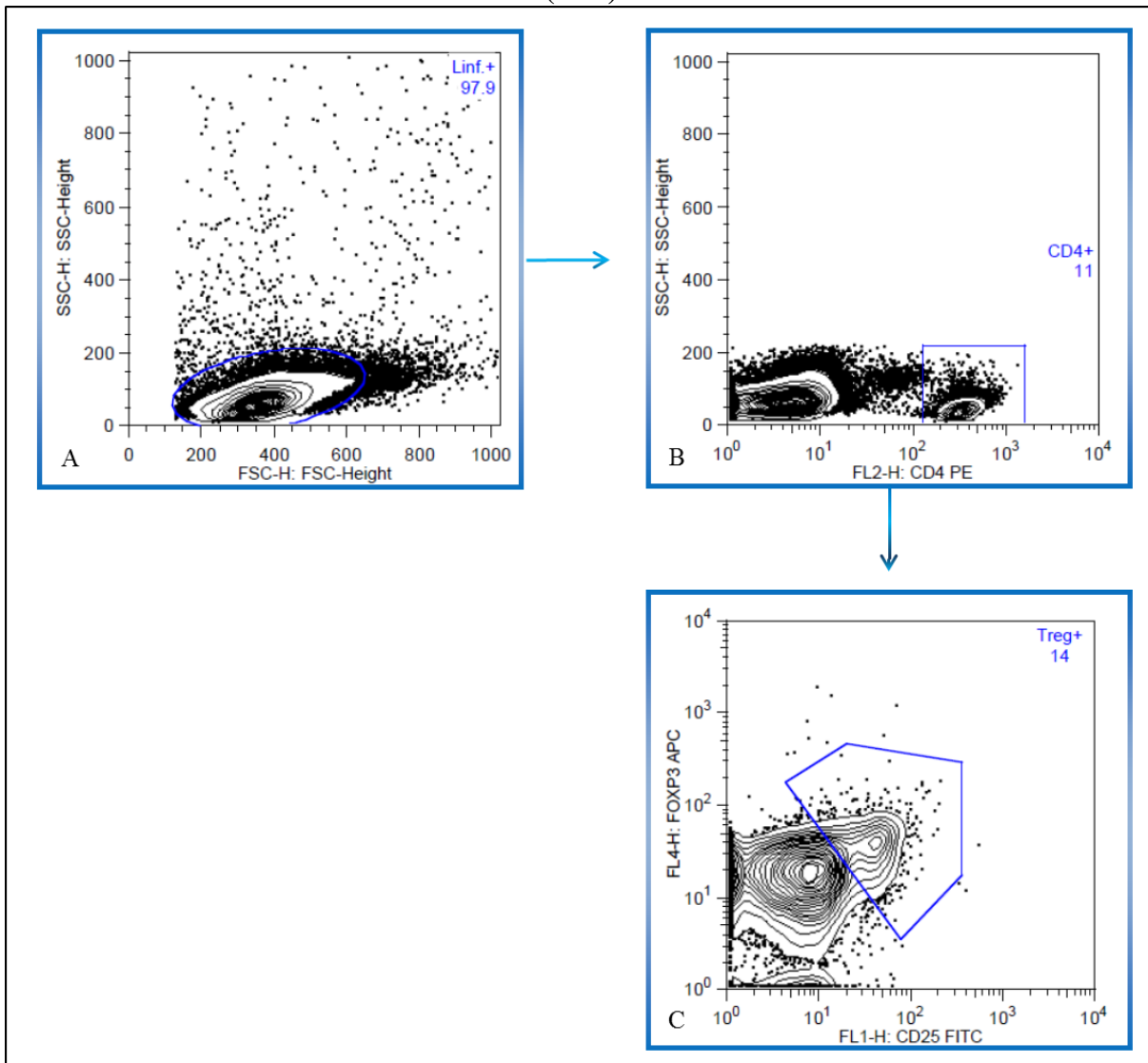
Fonte: Programa *FlowJo* (v9.4).

### 3.11.2. Identificação da população dos Linfócitos T regulatórios (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>)

Para a identificação dos linfócitos T regulatórios (Treg) foi realizado a análise inicial com um gráfico de SSC x FSC (Figura 09A) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Após, foi elaborado gráfico de SSC x CD4 PE (Figura 09B) e em seguida foi feito um gráfico CD25 FITC x FoxP3 AF647 (Figura 09C) com a população de LTCD4<sup>+</sup>. A população positiva para CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> foi selecionada, caracterizando os linfócitos Treg.



**Figura 09-Identificação dos Linfócitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) no programa *FlowJo* (v9.4)**

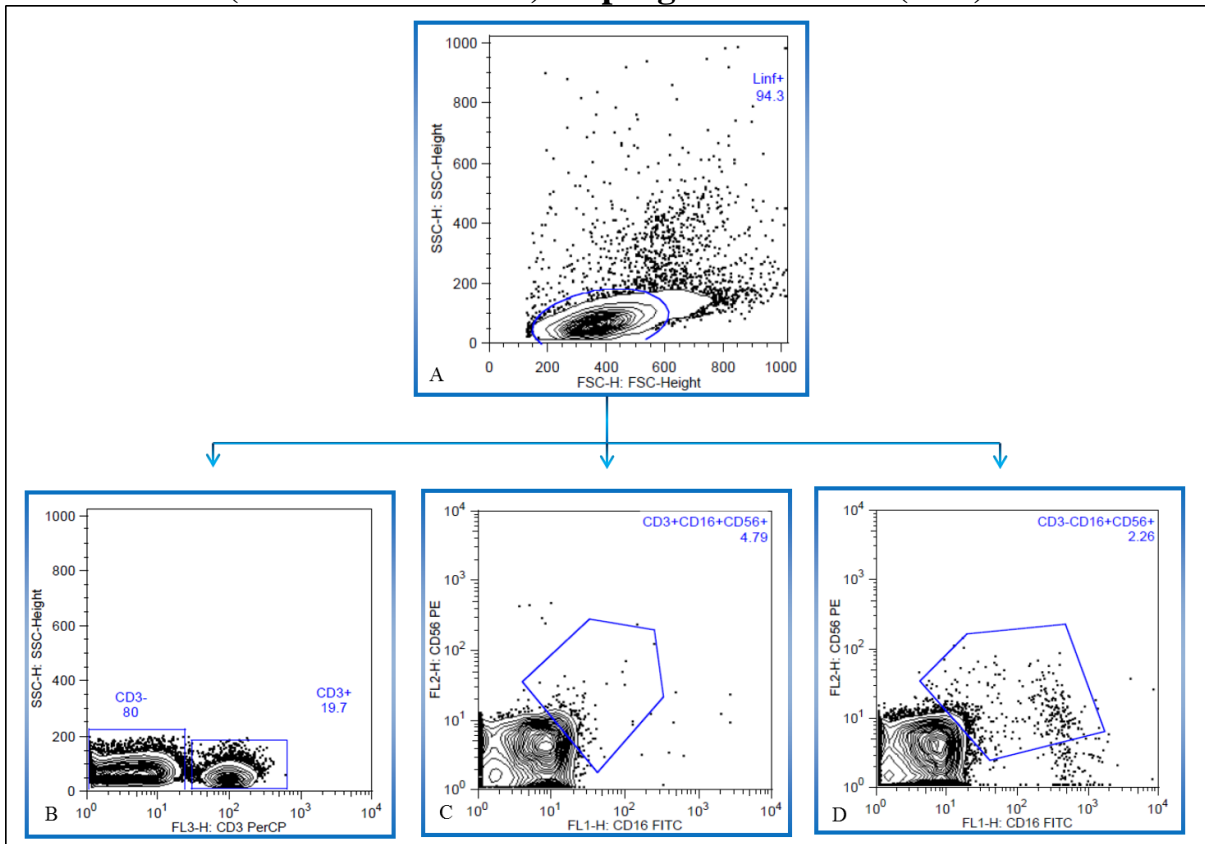


Fonte: Programa *FlowJo* (v9.4).

### 3.11.3. Identificação das Células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) e NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).

A identificação das populações de Células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) e NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) foram elaboradas primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (Figura 10A) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Após, foi elaborado gráfico de SSC x CD3 PercP (Figura 10B). Em seguida foram elaborados dois gráficos: 1) CD3<sup>-</sup> com CD56 PE x CD16 FITC (Figura 10C); 2) CD3<sup>+</sup> com CD56 PE x CD16 FITC (Figura 10D). Ao final foram selecionados as populações CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (Células NK) e CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (Células NKT).

**Figura 10-Identificação das Células NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) e NKT (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) no programa *FlowJo* (v9.4).**



Fonte: Programa *FlowJo* (v9.4).

### 3.12. Dosagem de Citocinas e Quimiocinas Plasmáticas por CBA (*Cytometric Bead Array*).

A dosagem de citocinas e quimiocinas das amostras de soro dos pacientes e controles foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo com os kits *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (Cat. N° 560484, Lot.: 5030932, marca *BD® Biosciences, San Diego, CA, USA*) e *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit* (Cat. N° 552990, Lot.: 5069733, marca *BD® Biosciences, San Diego, CA, USA*), seguindo as orientações descritas pelo fabricante. As citocinas e quimiocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-8 (CXCL8), RANTES (CCL5), MIG (CXCL9), MCP-1 (CCL2) e IP-10 (CXCL10). Os Kits *BD™ CBA* utilizam uma série de partículas (microesferas ou beads) de tamanho conhecido e com intensidades de fluorescências distintas para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas e quimiocinas solúveis. Cada bead de captura estava conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra foi

realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina e quimiocina da amostra ligada as beads. Os complexos formados de bead de captura + citocina/quimiocina da amostra + anticorpo de detecção são quantificados através da CF. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revelou a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia.

Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina foi utilizado o software FCAP-Array™ (v3.0.1).

### **3.13. Análises Descritivas, Estatística Convencional e *Networks***

Os dados demográficos, epidemiológicos e características clínicas dos pacientes foram apresentados em formas de tabelas e gráficos, elaboradas com o programa *Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)*.

A análise estatística convencional dos dados obtidos foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA)*. Todos os dados foram considerados como apresentando uma distribuição não paramétrica, após a verificação de distribuição de normalidade dos dados com o teste de *Shapiro-Wilk*. As comparações de valores medianos entre dois grupos de dados foram realizadas com teste de *Mann-Whitney*, enquanto que para as comparações entre os grupos de três ou mais variáveis, a análise de dados foi realizada por meio do teste de *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunns (Dunn's Multiple Comparison Test)* para múltiplas comparações entre os grupos.

A elaboração das *Networks* (redes) e demonstração das interações complexas entre as células, citocinas e quimiocinas avaliadas no estudo foi realizada a partir da associação desses marcadores em cada grupo clínico. Inicialmente, foi realizado o teste de correlação de *Spearman* para avaliar a relação entre o percentual das células e os níveis de cada citocina/quimiocina (pg/mL), com o auxílio do software *Graphpad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA)*. Com os dados gerados após a análise de correlação, foi realizada a construção das *networks* (redes) com o software *Cytoscape 3.0.1 (Cytoscape Consortium San Diego, CA, USA)*, seguindo as recomendações e instruções presentes no software. A forma e a espessura das linhas foram ajustadas para representar os tipos de correlações existentes (positivas ou negativas), além da intensidade dessas correlações.

---

---

# Resultados

## 4. RESULTADOS

Foram coletadas 104 amostras de 29 pacientes com leucemia linfoblástica aguda atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM). Além dos pacientes, foram recrutadas 28 crianças sem leucemias como grupo controle.

### 4.1. Dados demográfico-epidemiológicos e características clínicas pré-diagnóstico

Os dados demográfico-epidemiológicos dos pacientes com LLA e grupo controle estão descritos na Tabela 11, sendo obtidos após a assinatura do TCLE/TAI e aplicação da ficha de cadastro de laboratório para registro de resultados de exames: Hematológicos, Mielograma, Imunofenotipagem, Líquor, Cariótipo, Doença Residual Mínima por citometria de fluxo (CF-DRM), Doença Residual Mínima por reação de cadeia polimerase (PCR- DRM), características das células, quantificação das citocinas e quimiocinas, além da ficha do estado nutricional.

**Tabela 11-Dados demográficos dos pacientes e controles.**

	Pacientes (n=29)	Controles (n=28)	<i>p</i> valor*	Intervalo de Confiança
<b>Gênero</b>				
Masculino:Feminino	20 (69%): 9 (31%)	15 (53.6%):13 (46.4%)	0.2829	
<b>Naturalidade</b>				
Manaus/AM	17 (58.6%)	24 (85.7%)		
Outros municípios/AM	9 (31%)	4 (14.3%)	<b>0.0473</b>	
Outros estados	3 (10.4%)	-		
<b>Procedência</b>				
Manaus/AM	15 (51.7%)	27 (96.4%)		
Outros municípios/AM	11 (37.9%)	1 (3.6%)	<b>0.0006</b>	
Outros estados	3 (10.4%)	-		
<b>Idade (média ± DP))</b>	5,1 ± 4,4	7,8 ± 4,3	<b>0.0129</b>	<b>5</b>
<b>Faixa etária (anos)</b>				
< 1	0	0		
1 a <5	19 (65.5%)	8 (28.6%)		
5 a <9	4 (13.8%)	9 (32.1%)	<b>0.0175</b>	
9 a <14	2 (6.9%)	8 (28.6%)		
14 a <18	4 (13.8%)	3 (10.7%)		

\**p* valor obtido com o Teste Exato de Fisher ou Teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ )

Como pode ser observado na tabela 08, A média de idade dos pacientes foi menor que a do grupo controle, ( $5,1 \pm 4,4$ ) para os pacientes e ( $7,8 \pm 4,3$ ) para o grupo controle. Entre as crianças com LLA, a faixa etária com maior número de casos foi de 1 a  $\leq 5$  anos, representando 65,5% dos casos. As outras faixas etárias foram  $< 1$  ano: 0%, 5 a  $\leq 9$  anos: 13,8%, 9 a  $\leq 14$  anos: 6,9% e 14 a  $\leq 18$  anos: 13,8%.

Em relação ao gênero, os pacientes com LLA apresentou predomínio do sexo masculino 20/29 (69%) em relação ao sexo feminino que foi 9/29 (31%) com razão de M:F de 2.2:1. No caso da naturalidade, observou-se que 17/29 (58,6%) eram de Manaus, 9/29 (31%) do interior do Amazonas e 3/29 (10,4%) de outros Estados. Quanto a procedência, 15/29 (51,7%) eram de Manaus, 11/29 (37,9%) do interior do Amazonas e 3/29 (10,4%) de outros Estados.

Quanto aos parâmetros clínicos pré-diagnóstico, observou-se que 4/29 (13,8%) dos pacientes fizeram uso de corticoide e 25/29 (86,2%) não fizeram uso deste medicamento. Nenhum dos pacientes recebeu algum tipo de vacina até 04 semanas antes do diagnóstico. Em relação a transfusão de sangue, 23/29 (79,1%) dos pacientes receberam algum tipo de transfusão de concentrado de hemácias ou concentrado de plaquetas ou ambos, apenas 6/29 (20,7%) não receberam nenhuma transfusão. Ao diagnóstico 16/29 (55,2%) dos pacientes apresentava alguma clínica sugestiva de infecção e 13/29 (44,8%) não apresentou sinais clínicos de infecção. Enquanto que nas 4 semanas antes do diagnóstico, 25/29 (86,2%) apresentaram pelo menos um pico febril e 4/29 (13,8%) não apresentaram nenhuma manifestação febril neste período pré-diagnóstico da LLA.

#### **4.2. Características diagnósticas da imunofenotipagem por citometria de fluxo, citogenética e do sistema nervoso central ao diagnóstico.**

Ao analisar a Tabela 12 observamos que dos 29 pacientes com LLA, 25/29 (86,2%) eram LLA B Comum, 1/29 (3,45%) LLA Ph<sup>+</sup>, 2/29 (6,9%) LLA pré B e 1/29 (3,45%) LLA T. Neste estudo não foi registrado nenhum caso de LLA B Madura, LLA pró B e LLA Transicional.

Quanto ao marcador CD10<sup>+</sup> (marcador para LLA B), 28/29 (96,55%) eram CD10<sup>+</sup> e somente 1/29 (3,45%) era CD10 negativo, que foi o único caso de LLA T.

**Tabela 12- Características diagnósticas da imunofenotipagem por citometria de fluxo**

<b>Característica</b>	<b>%</b>
<b>Imunofenotipagem</b>	
<b>LLA Pró B</b>	0
<b>LLA B Comum</b>	25 (86.2%)
<b>LLA B Comum Ph<sup>+</sup></b>	1 (3,45%)
<b>LLA Pré B</b>	2 (6,9%)
<b>LLA Transicional</b>	0
<b>LLA B Madura</b>	0
<b>LLA T</b>	1 (3.45%)
<b>CD 10<sup>+</sup></b>	
<b>Positivo</b>	28 (96.55%)
<b>Negativo</b>	1 (3.45%)
<b>Fenótipo anômalo</b>	
<b>Sim</b>	21 (72.4%)
<b>Não</b>	5 (17.4%)
<b>CD 13/ CD33 negativo*</b>	3 (10.3%)

“\*\*”A pesquisa do fenótipo anômalo foi pesquisado somente para os marcadores CD13 e CD33 e estes encontravam-se negativos.

A presença de fenótipo anômalo foi encontrada em 21/29 (72,4%), enquanto que 5/29 (17,3%) não apresentava nenhum fenótipo anômalo. Em 3/29 (10,3%) foi pesquisado apenas o marcador CD13/CD33, sendo confirmado o resultado negativo.

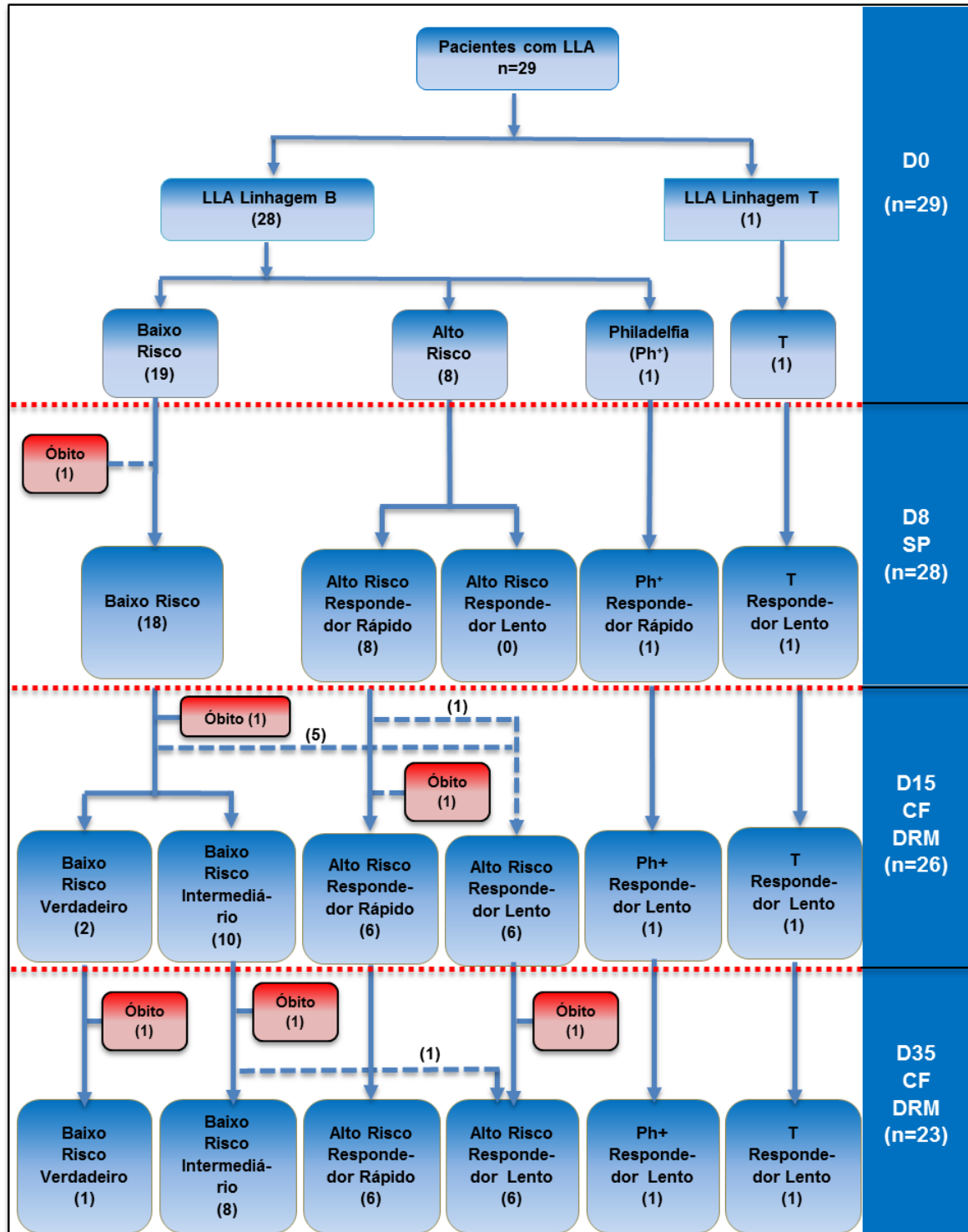
Dos 29 pacientes com LLA, apenas 13/29 (44,8%) tiveram resultado de cariótipo e desses, 8/29 (27,6%) com resultado normal e 5/29 (17,2%) com resultado alterado.

Um total de 27/29 (93,1%) dos pacientes encontrava-se com líquido normal (SNC-1: ausência de células leucêmicas identificados no líquido), 1/29 (3,45%) com SNC-2 (presença de células blásticas numa amostra que contém <5 leucócitos/mL) e 1/29 (3,45%) com SNC-3 (uma amostra que contém ≥5 leucócitos e células blásticas identificáveis, ou na presença de massa ou nervo craniano, paralisia cerebral com células leucêmicas no LCR).

### **4.3. Estratificação dos Grupos de Risco nas fases da pesquisa**

Os pacientes com LLA foram estratificados nos diferentes grupos de riscos nas fases da pesquisa. Como observado na Figura 11, no D0, 19/29 (65,5%) dos pacientes com LLA encontravam-se no Grupo de Baixo Risco (BR), 8/29 (7,6%) no Alto Risco (AR), 1/29 (3,45%) LLA-T e 1/29 (3,45%) LLA Filadelfia positivo (Ph<sup>+</sup>).

**Figura 11-Estratificação dos pacientes por Grupo e Subgrupo de Risco nas fases da pesquisa**



No D8 não foi observado grandes mudanças em relação ao D0, 18/28 (64.3%) encontravam-se no grupo BR, 8/28 (28.5%) no Alto Risco Responder Rápido (AR RR), 1/28 (3,6%) subgrupo Ph<sup>+</sup> Responder Rápido (Ph<sup>+</sup> RR), e 1/28 (3,6%) T Responder



Lento (T RL). O número de óbitos do D0 ao D8 foi 1/29 com uma taxa de letalidade de 3,45%.

Em relação ao D15 houve uma mudança importante após análise da Doença Residual Mínima por Citometria de Fluxo (CF-DRM). Dos 18/28 pacientes que se encontravam no grupo de BR no D8, 5/18 (27.8%) foram reestratificados para o subgrupo AR RL, 10/18 (55.6%) foram reestratificados para o subgrupo de Baixo Risco Intermediário (BRI) e apenas 2/18 (11.1%) para o subgrupo de Baixo Risco Verdadeiro (BRV), sendo que ocorreu 1 óbito neste grupo de BR.

Analisando no D15, os 8/28 pacientes do subgrupo AR RR do D8, 1/8 (12.5%), foi reestratificados para o subgrupo AR RL, ocorreu 1/8 óbito neste subgrupo e permaneceram como AR RR 6/8 (75%) dos pacientes. Para o subgrupo AR RL foram reestratificados mais 5 pacientes procedentes do BR, ficando com 6/26 (23%) dos pacientes. O paciente do subgrupo AR Ph<sup>+</sup> RR 1/26 (3.6%) foi reestratificado para Ph<sup>+</sup> RL e o paciente com LLA T RL 1/26 (3.6%) permaneceu sem alteração. O número de óbitos do D0 ao D15 foram 3/29, com uma taxa de letalidade de 10,3%.

Ao analisar o D35, observou-se que no subgrupo BRV dos 2 pacientes do subgrupo BRV do D15, apenas 1/2 (50%) permaneceu neste subgrupo 1/26 (4,4%). Em relação a LLA, ocorreu 1/2 (50%) óbito após o D15. Dos 10 pacientes do Subgrupo BRI do D15, 1/10 (10%) foi reestratificado para o subgrupo AR RL, ocorreu 1/10 (10%) óbito e permaneceram como BRI 8/10 (80%) ou seja 8/23 (34,8%) dentre todos os pacientes vivos. Os pacientes do subgrupo AR RR, 6/23 (26%) do D15 continuaram o tratamento sem mudança de subgrupo de risco no D35. No subgrupo AR RL ocorreu um óbito dos 6 pacientes após o D15, porém recebeu um paciente reestratificado do subgrupo BRI, permanecendo com 6/23 (26%) pacientes. O número de óbitos do D0 ao D35 foi de 6/29, com uma taxa de letalidade em 10.6%.

#### **4.4. Estado nutricional**

Observando o estado nutricional dos pacientes com LLA durante o estudo, notamos que no D0, 19/29 (65.5%) encontravam-se eutróficos, 7/29 (24.15%) com desnutrição leve, 1/29 (3.45%) com desnutrição moderada e 2/29 (6.9%) não foram avaliados.

Analisando o D8 18/28 (64.2%) encontravam-se eutróficos, 7/28 (25%) com desnutrição leve, 1/28 (3.6%) com desnutrição moderada, em 2/28 (7.2%) não foi realizado a avaliação e 1/29 (3,45%) não foi realizado por óbito.

No D15 17/26 (65.4%) encontravam-se eutróficos, 5/26 (19.2%) com desnutrição leve, 2/26 (7.7%) com desnutrição moderada, em 2/26 (7.7%) não foi realizado a avaliação nutricional e 3/29 (10.3%) não foi realizado por óbito.

Quanto ao D35, 15/23 (65.3%) encontravam-se eutróficos, 4/23 (17.4%) com desnutrição leve, 3/23 (13%) com desnutrição moderada, 1/23 (4.4%) não realizado e 3/23 (13%) não realizada a avaliação nutricional por óbito.

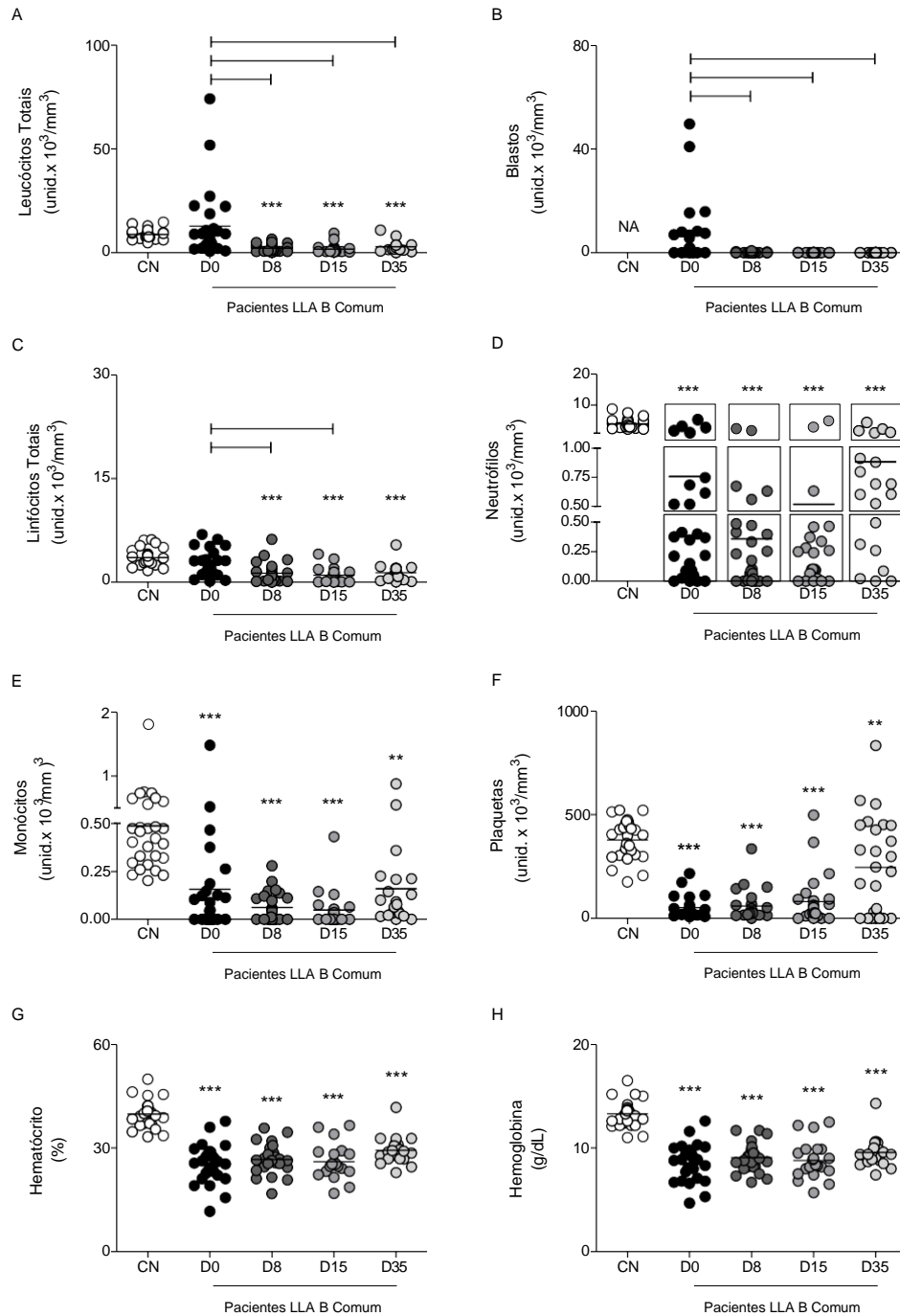
#### **4.5. Análise do Hemograma**

Como demonstrado na figura 12 observou-se que na contagem dos leucócitos totais houve redução significativa nos dias D8, D15 e D35 quando comparado com o grupo controle. Também houve diminuição estatisticamente significativa dos leucócitos totais entre os pacientes com LLA do D0 quando comparados com D8, D15 e D35. (Figura 12A). Em relação aos blastos, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas quando avaliado pacientes com LLA do D0 em relação ao D8, D15 e D35 (Figura 12B).

Na análise dos linfócitos totais, notou-se que houve diminuição estatisticamente significativa nos dias, D8, D15 e D35 quando comparados com o grupo controle. Assim como observou-se diminuição estatisticamente significativa quando comparado os pacientes com LLA do D0 com D8 e D15 (Figura 12C). Na figura 12D pode se observar significativa diminuição de neutrófilos nos pacientes com LLA nos dias D0, D8, D15 e D35 quando comparados com grupo de crianças saudáveis (controle). Por outro lado, observou-se diminuição significativa dos monócitos no D0, D8, D15 e D35, quando comparado com controles saudáveis (Figura 12E).

Como demonstrado na Figura 12F, observou-se diminuição estatística significativa das plaquetas no D0, D8, D15 e D35 quando comparados os pacientes com LLA e o grupo controle. Quando avaliamos o hematócrito (Figura 12G) e a concentração da hemoglobina (Figura 12H) observamos que nos quatro tempos analisados os valores encontravam-se estatisticamente significativos, ou seja, abaixo dos resultados dos controles saudáveis.

## Figura 12-Análise do Hemograma em pacientes com leucemia linfoblástica aguda



Quantificação de leucócitos, linfócitos totais, neutrófilos, monócitos, plaquetas, hematócrito e hemoglobina no ADVIA®2120i Hematology System, contagem absoluta de blastos por leitura manual. Neutropenia leve: contagem de neutrófilos entre 1000 e 1500/ $\text{mm}^3$ , neutropenia moderada: neutrófilos entre 1000 e 500/ $\text{mm}^3$  e neutropenia severa: neutrófilos abaixo de 500/ $\text{mm}^3$ . Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de contagem individual por população no D0, D8, D15 e D35. Foram analisados 26 pacientes com LLA-B comum no D0, 25 pacientes no D8, 22 pacientes no D15, 20 pacientes no D35, além de 28 crianças saudáveis. “\*” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentava resultados com significância estatística em comparação com o grupo controle, nos quais “\*” ( $p < 0,05$ ), “\*\*” ( $p \leq 0,001$ ), “\*\*\*” ( $p \leq 0,0001$ ) “—|—” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os demais grupos. Resultados obtidos através do teste não paramétricos *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunn's* para múltiplas comparações entre os grupos, além Teste de *Mann-Whitney*.

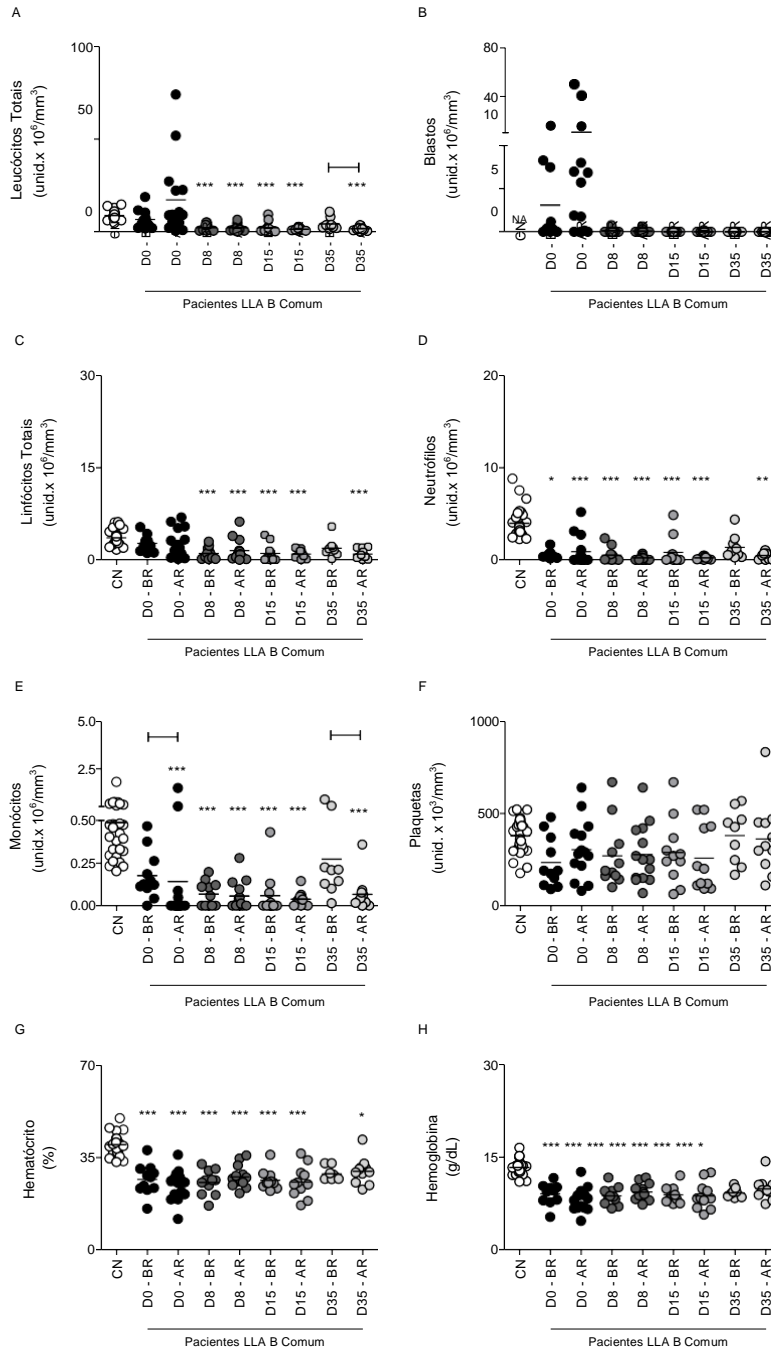
Analisando os dados do hemograma pela estratificação de Grupo de Risco, observamos diminuição estatisticamente significativa dos leucócitos totais no grupo de Baixo Risco (BR) no D8 e D15 e no grupo de Alto Risco (AR) no D8, D15 e D35 quando comparado ao grupo controle e no D35 entre os grupos BR e AR (Figura 13A).

Não foi encontrada nenhuma alteração com significância estatística ao avaliar os blastos e plaquetas (Figuras 13B e 13F). Entretanto, para os linfócitos totais (Figura 13C) encontramos diminuição estatisticamente significativa no grupo BR no D8 e D15 e no grupo AR no D8, D15 e D35, quando comparados com o grupo de crianças saudáveis. Ao analisar os neutrófilos (Figura 13D), houve diminuição estatisticamente significante para o grupo BR no D0, D8 e D15 enquanto para o grupo de AR ocorreu em todos os tempos avaliados quando comparado aos controles saudáveis.

Observando os monócitos (Figura 13E), notamos diminuição estatisticamente significante para o grupo BR no D8 e D15 e para o grupo AR em todas as fases da pesquisa quando comparados ao grupo controle e entre os pacientes com LLA do grupo BR e AR no D0 e no D35.

Para a análise do hematócrito (Figura 13G), observamos a diminuição estatisticamente significante no grupo BR no D0, D8 e D15 e para o grupo AR em todas as fases avaliadas quando comparados ao grupo controle. No caso da hemoglobina (Figura 13H), todas as fases analisadas nos grupos BR e AR estavam significativamente diminuídas em comparação ao grupo controle.

## Figura 13-Análise do Hemograma em pacientes com leucemia linfoblástica aguda segregados de acordo com o grupo de risco



Quantificação de leucócitos, linfócitos totais, neutrófilos, monócitos, plaquetas, hematócrito e hemoglobina no ADVIA®2120i Hematology System, contagem absoluta de blastos por leitura manual. Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de contagem individual por população no D0, D8, D15 e D35 e nos diferentes grupos de risco. Foram analisados 11 pacientes com LLA-B comum no D0-BR, 15 pacientes no D0-AR, 11 pacientes no D8-BR, 14 pacientes no D8-AR, 11 pacientes no D15-BR, 11 pacientes no D15-AR, 09 pacientes no D35-BR e 11 pacientes no D35-AR, além de 28 crianças saudáveis. “\*” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentava resultados com significância estatística em comparação com o grupo controle, nos quais “\*” ( $p < 0,05$ ), “\*\*” ( $p < 0,001$ ), “\*\*\*” ( $p < 0,0001$ ). “┌” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os demais grupos. Resultados obtidos através do teste não paramétricos *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunns* para múltiplas comparações entre os grupos, além do Teste *Mann-Whitney*.

#### 4.6. Perfil Celular, Citocinas e Quimiocinas.

Na análise da população celular por citometria de fluxo observamos na Figura 14A aumento significativo da população de linfócitos totais nos pacientes com LLA nos dias D0, D8 e D15 em comparação com o grupo controle. Pode se observar ainda diminuição significativa destas células quando comparamos os pacientes com LLA entre os dias, D0 e D35. Não foi observada diferença neste grupo nos demais tempos avaliados.

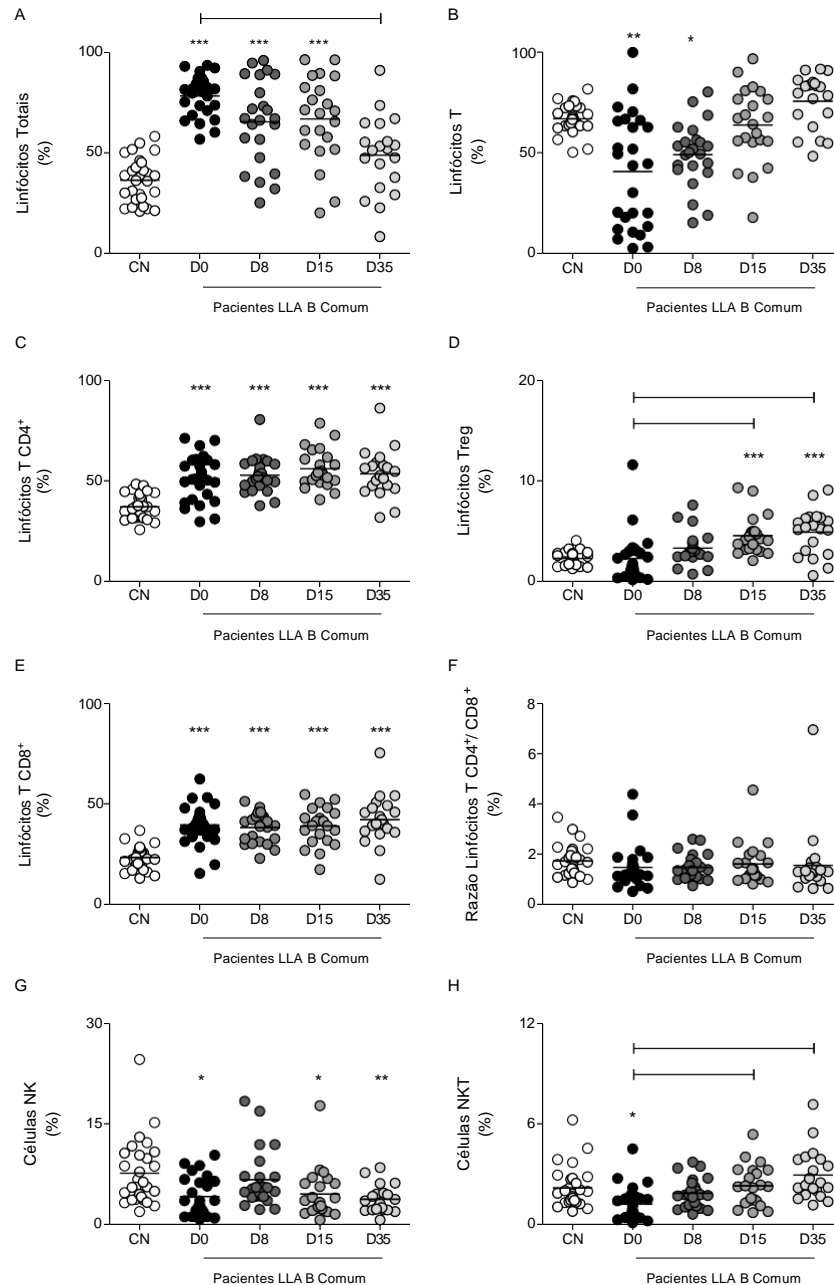
Para os linfócitos T foi observado diminuição estatística significativa nos dias D0 e D8 quando comparamos os pacientes com LLA e o grupo controle. Por outro lado, observou-se aumento estatisticamente significativo quando comparou-se os pacientes com LLA no D0 com o D15 e D35. Esta diferença também foi observada nos pacientes com LLA quando comparou-se o D8 e D35, (Figura 14B).

Como demonstrado na Figura 14C e Figura 14E houve aumento significativo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos tempos avaliados quando comparado com o grupo controle. A razão entre linfócitos CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Figura 14F) não apresentou significância estatística entre pacientes e controles saudáveis, e os pacientes com LLA entre si nos diferentes tempo.

Quando avaliou-se a população de células Treg foi observado aumento significativo destas células nos diferentes tempos analisados, D15 e D35, tanto quando comparado ao controle e quanto ao D0.

Ainda foi observado diminuição significativa das células NK no D0, D15 e D35 em relação ao controle (Figura 14G). Ao analisar as células NKT notamos diminuição significativa nos pacientes com LLA no D0 quando comparado com o grupo de crianças saudáveis. Por outro lado observou-se aumento estatisticamente significativo quando comparou-se os pacientes com LLA nos dias D0 com D15 e D35 (Figura 14H).

## Figura 14-Análise do Perfil Celular por Citometria de Fluxo em pacientes com leucemia linfoblástica aguda



Perfil imune celular de linfócitos totais, subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, Razão de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, Células Treg, NK e NKT de pacientes com leucemia linfoblástica aguda. O período da análise foi nos dias D0, D8, D15 e D35 do tratamento. Imunofenotipagem por citometria de fluxo utilizando painel de tripla marcação para quantificar a percentagem de linfócitos (FSC x SSC), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), linfócitos Treg (CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>), células NK (CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) e NKT (CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando as populações e subpopulações de linfócitos. “\*” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam resultados com significância estatística em comparação com o grupo controle ou entre os grupos. Foram analisados 26 pacientes com LLA no D0, 25 pacientes no D8, 22 pacientes no D15 e 20 pacientes no D35, além de 28 crianças saudáveis. “\*\*\*”(p<0,05), “\*\*\*”(p<0,001), “\*\*\*\*”(p<0,0001) é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os demais grupos de pacientes com LLA. Resultados obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunns* para múltiplas comparações entre os grupos, além do Teste *Mann-Whitney*.

Considerando as diferenças clínicas relacionadas aos diferentes grupos de risco, realizamos uma análise estratificada de acordo com estes grupos. Observamos que na população de linfócitos totais (Figura 15A) houve aumento significativo de linfócitos totais nos pacientes do grupo BR no D0 e o do grupo de AR no D0, D18 e D15 em relação ao grupo controle.

Por outro lado, foi observado (Figura 15B) diminuição estatisticamente significativa de linfócitos T no D0 do grupo AR em relação ao grupo controle. Também foi observada diminuição significativa entre os pacientes com LLA no D0 do grupo BR com o D0 do grupo AR.

Para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, houve aumento estatisticamente significativo em todas as fases e em todos os grupos de risco (Figura 15C e Figura 15E). Não foi observado alteração significativa na razão entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Figura 15F).

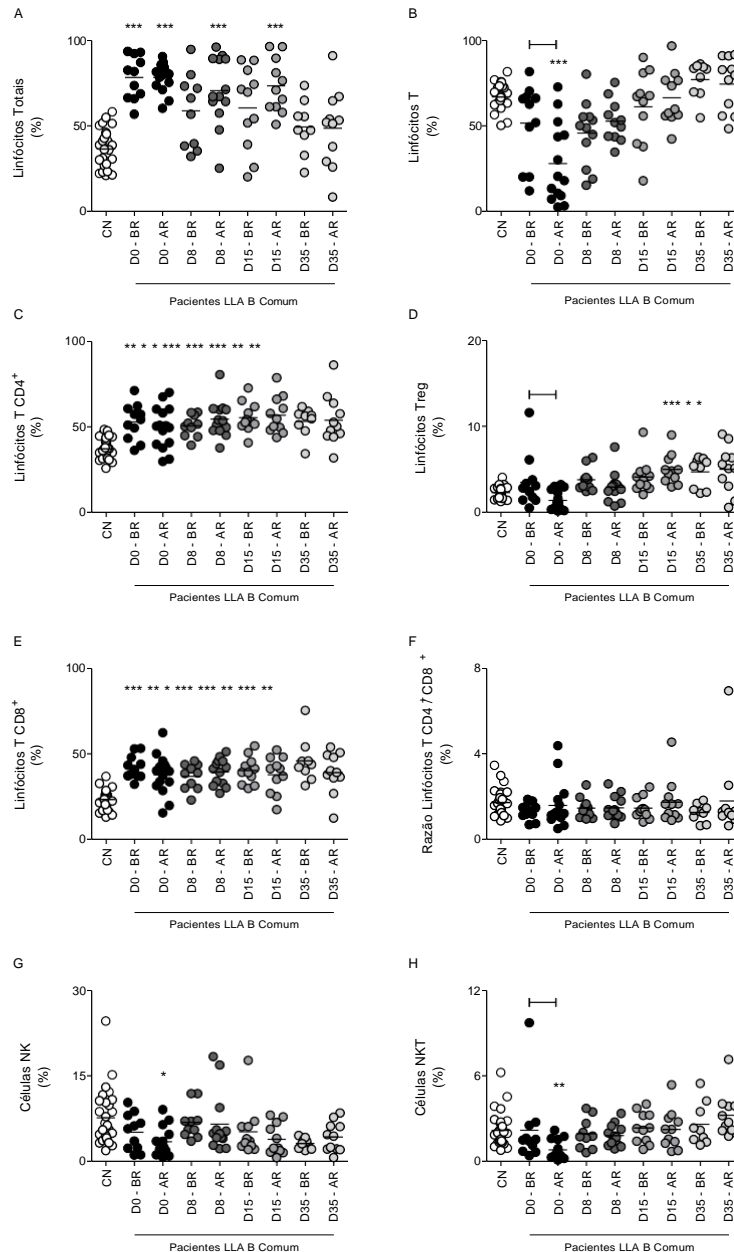
Na população de linfócitos Treg (Figura 15D), encontramos aumento significativo nos dias D15 e D35 no grupo AR e D35 do grupo BR em comparação ao grupo controle e entre os pacientes BR e AR no D0.

No caso da população de células NK, observamos diminuição estatisticamente significativa no D0 do grupo AR em comparação com o grupo controle (Figura 15G).

Analisando as células NKT (Figura 15H) encontramos diminuição com significância estatística no grupo AR no D0 quando comparada com o grupo controle e entre os grupos BR e AR no D0.



## Figura 15-Análise do Perfil Celular por Citometria de Fluxo em pacientes com Leucemia linfoblástica aguda agrupado de acordo com o grupo de risco

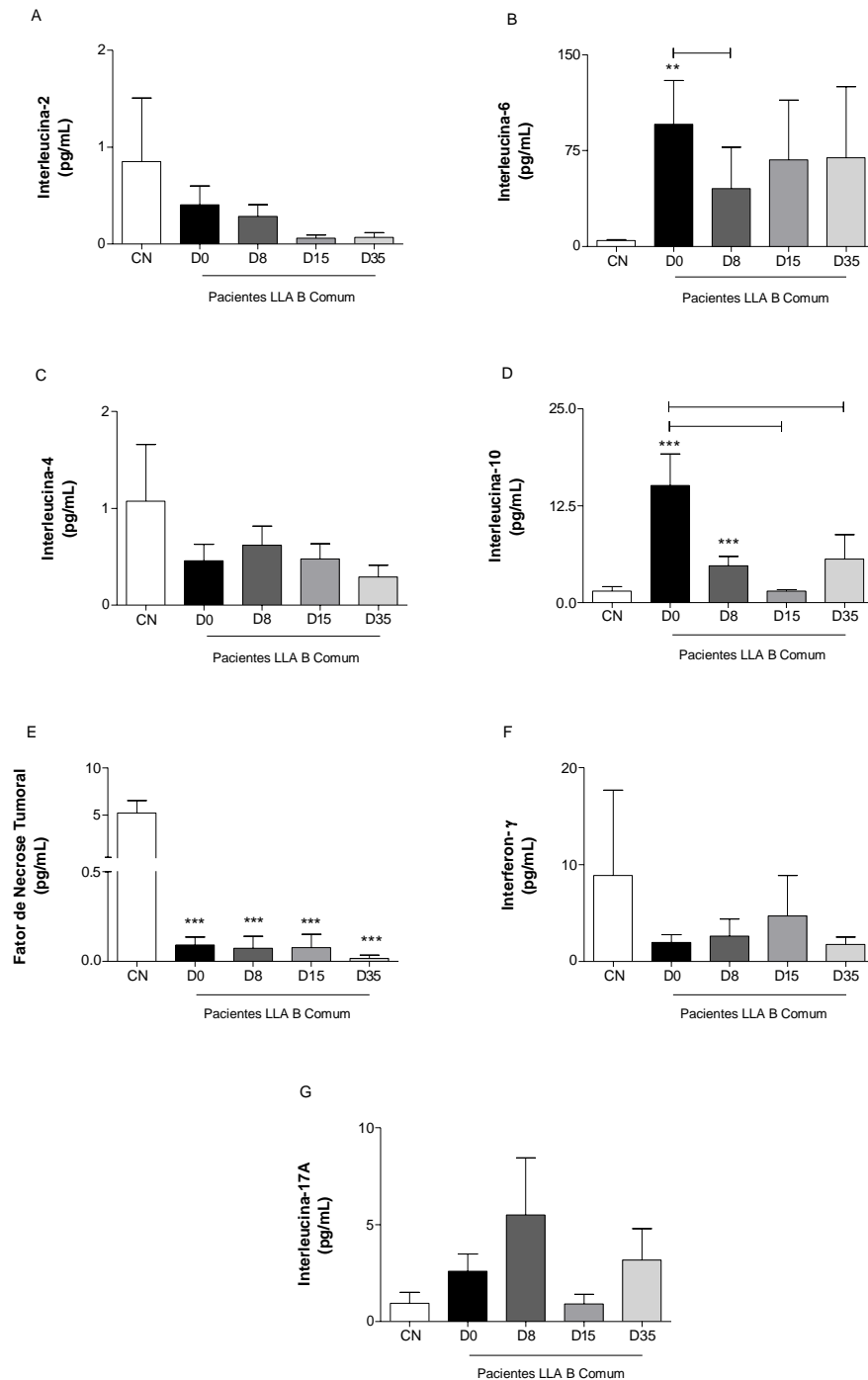


Perfil imune celular de linfócitos totais, subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, Razão de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, Células Treg, NK e NKT de pacientes com leucemia linfoblástica aguda. O período da análise foi nos dias D0, D8, D15 e D35 do tratamento. Imunofenotipagem por citometria de fluxo utilizando painel de tripla marcação para quantificar a percentagem de linfócitos (FSC x SSC), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), linfócitos Treg (CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>), células NK (CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) e NKT (CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando as populações e subpopulações de linfócitos. Foram analisados 11 pacientes com LLA-B comum no D0-BR, 15 pacientes no D0-AR, 11 pacientes no D8-BR, 14 pacientes no D8-AR, 11 pacientes no D15-BR, 11 pacientes no D15-AR, 09 pacientes no D35-BR e 11 pacientes no D35-AR, além de 28 crianças saudáveis. “\*” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam resultados com significância estatística em comparação com o grupo controle ou entre os grupos, sendo que “\*” (p<0,05), “\*\*” (p≤0,001), “\*\*\*” (p≤0,0001). “†” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os demais grupos de pacientes com LLA. Resultados obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunn* para múltiplas comparações entre os grupos, além do Teste *Mann-Whitney*.

Um outro parâmetro avaliado nestes pacientes nos diferentes tempos foi o perfil de citocinas séricas. Nenhuma alteração significativa foi observada para IL- 2 (Figura 16A), IL- 4 (Figura 16B), IFN- $\gamma$  (Figura 16F) e IL- 17A (Figura 16G), quando comparado tanto os pacientes com LLA com o grupo controle e entre os pacientes nos diferentes tempos. Por outro lado, observou-se aumento significativo de IL-6 no D0 dos pacientes com LLA quando comparado com os controles. Foi observada diminuição significativamente entre os pacientes com LLA no D0 com o D8 (Figura 16C). No entanto, quando comparados pacientes com LLA no D0 com crianças saudáveis, foram observadas concentrações baixas, não significativas, da IL- 2, IL- 4, TNF-  $\alpha$  e IFN-  $\gamma$  (Figuras 16A, 16C, 16E e 16F).

Quanto à avaliação da IL- 10 observou-se concentração mais elevadas estatisticamente significativa no D0 e D8 quando comparado ao grupo de crianças saudáveis e diminuição significativa entre os pacientes com LLA quando comparado os dias D0 com D15 e D35 (Figura 16D). Analisando o TNF-  $\alpha$ , notou-se diminuição significativa desta citocina em todos os tempos avaliados quando comparado com o grupo controle (Figura 16E).

**Figura 16-Análise das Citocinas circulantes em pacientes com leucemia linfoblástica aguda no D0, D8, D15 e D35.**



As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , foram quantificadas pela técnica de CBA (Cytometric beads array). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL) em gráficos de coluna. Foram analisados 26 pacientes com LLA no D0, 25 pacientes no D8, 22 pacientes no D15 e 20 pacientes no D35, além de 28 crianças saudáveis. “\*” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam resultados com significância estatística em comparação com o grupo controle ou entre os grupos, sendo que “\*” ( $p < 0,05$ ), “\*\*\*” ( $p < 0,001$ ), “\*\*\*\*” ( $p < 0,0001$ ).  $\overline{---}$  é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os demais grupos de pacientes com LLA. Resultados obtidos através do teste não paramétricos *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunns* para múltiplas comparações entre os grupos, além do Teste *Mann-Whitney*.

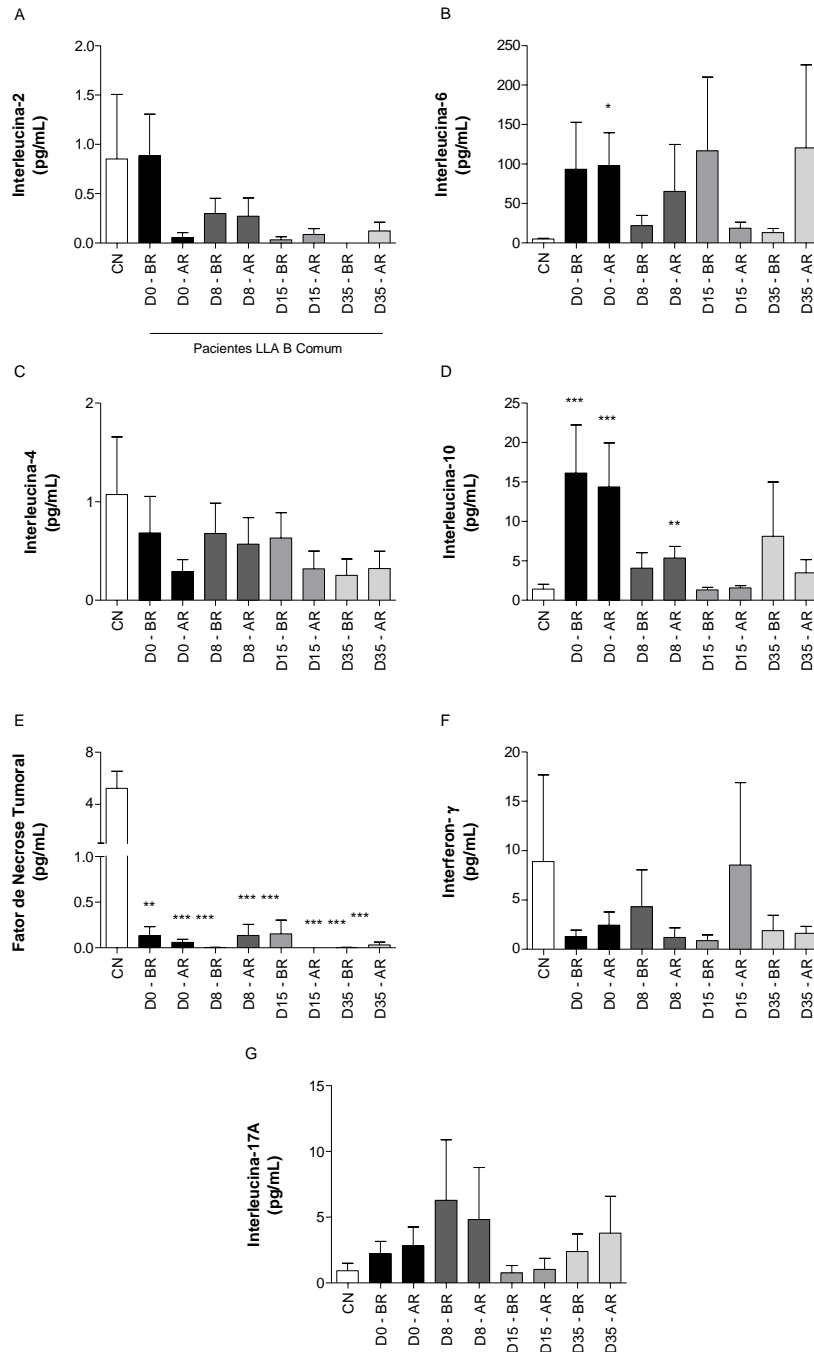
A figura 17 demonstra o perfil de citocinas pela estratificação dos grupos de risco, BR e AR. Também não foi observada diferença estatística significativa para IL-2 (Figura 17A), IL-4 (Figura 17C), IFN- $\gamma$  (Figura 17F) e IL-17A (Figura 17G), quando comparado ao controle ou entre os diferentes tempos de tratamento dos pacientes com LLA.

Quanto a IL-6, podemos observar o aumento de sua concentração estatisticamente significativo no D0 do grupo de AR quando comparado com o grupo controle (Figura 17B). No D15, a análise de sua concentração no grupo de BR está mais elevada, coincidindo com elevado número de DRM positiva nesta fase. Após reestratificação de grupo de risco e intensificação do tratamento, ao analisar o D35, observamos a diminuição de sua concentração no grupo de BR e elevação não significativa no grupo de AR.

Em contrapartida foi observado elevada concentração significativa de IL-10 (Figura 17D), no grupo BR no D0 e no grupo AR o D0 e o D8 quando comparado com o grupo controle.

Para o TNF- $\alpha$ , foi observado diminuição estatisticamente significativa em todos os tempos avaliados e em ambos os grupos de risco. (Figura 17E).

**Figura 17-Análise das Citocinas circulantes em pacientes com leucemia linfoblástica nos diferentes grupos de Risco no D0, D8, D15 e D35.**



As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , foram quantificadas pela técnica de CBA (Cytometric beads array). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL) em gráficos de coluna. Foram analisados 11 pacientes com LLA-B comum no D0-BR, 15 pacientes no D0-AR, 11 pacientes no D8-BR, 14 pacientes no D8-AR, 11 pacientes no D15-BR, 11 pacientes no D15-AR, 09 pacientes no D35-BR e 11 pacientes no D35-AR, além de 28 crianças saudáveis. “\*” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam resultados com significância estatística em comparação com o grupo controle ou entre os grupos, sendo que “\*” ( $p < 0,05$ ), “\*\*” ( $p < 0,001$ ), “\*\*\*” ( $p < 0,0001$ ). # é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os demais grupos de pacientes com LLA. Resultados obtidos através do teste não paramétricos *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunns* para múltiplas comparações entre os grupos, além do Teste *Mann-Whitney*.

Quanto aos dados das quimiocinas séricas podemos observar que a Interleucina (IL)-8 (CXCL8) encontrou-se aumentada nos pacientes com LLA no D0 e no D35, quando comparada com controle saudável, porém não foi observado significância estatística (Figura 18A).

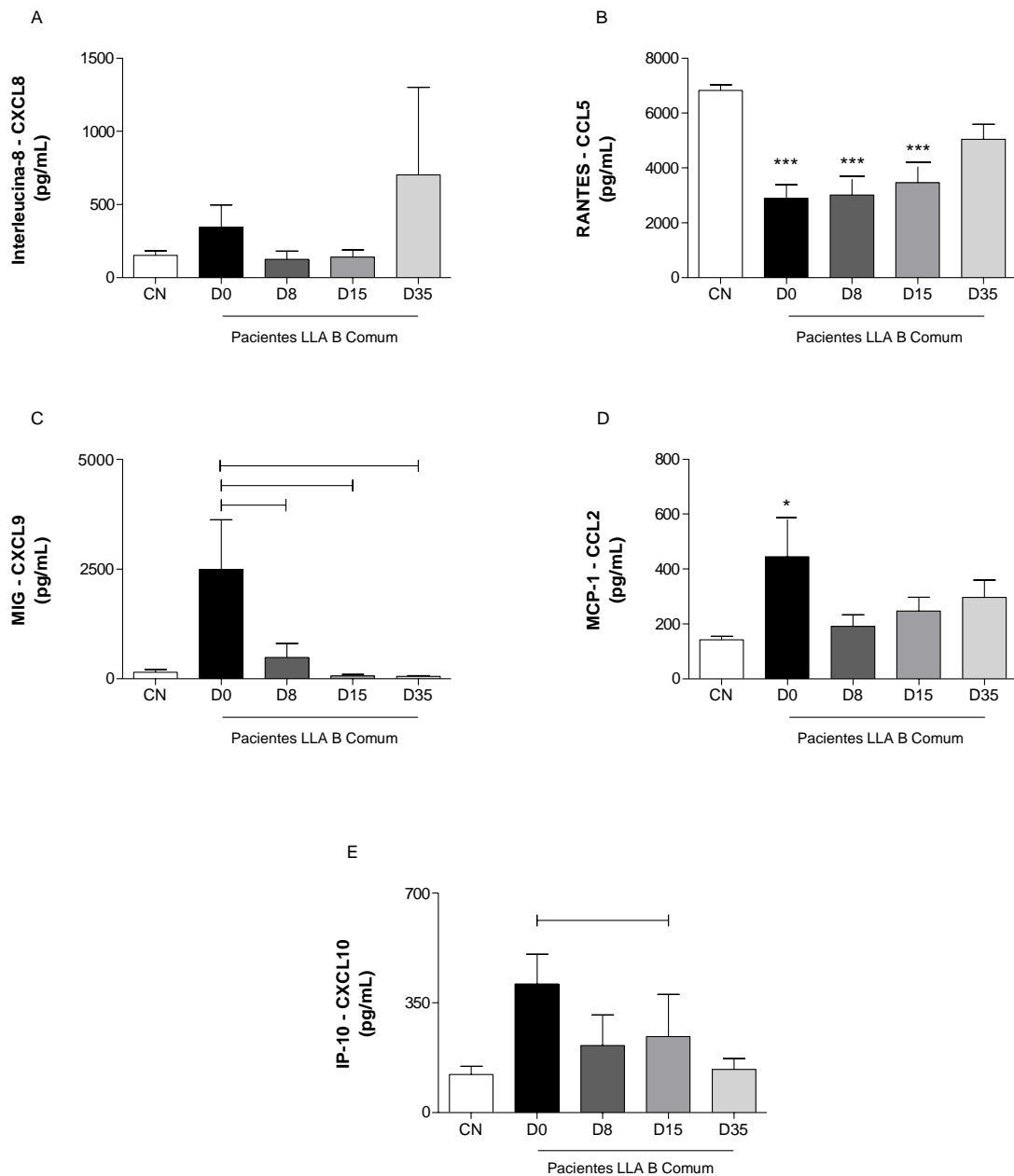
Quando avaliamos a quimiocina RANTES (CCL5), observamos diminuição estatisticamente significativa nos pacientes com LLA nos dias D0, D8 e D15 quando comparado ao grupo controle (Figura 18B).

Enquanto que para o MIG (CXCL9), notamos diminuição significativa nos pacientes com LLA quando comparado os dias D0 com D8, com D15 e com D35 (Figura 18C).

Por outro lado, observou-se que MCP-1 (CCL2), encontrava-se aumentada em todos os tempos avaliados, porém significativamente aumentada apenas no D0, quando comparado com os controles saudáveis (Figura 18D).

Como demonstrado na Figura 18E, observou-se diminuição estatisticamente significativa da IP-10 (CXCL10) no D15 dos pacientes com LLA quando comparado com o D0.

**Figura 18-Análise das Quimiocinas circulantes em pacientes com leucemia linfoblástica aguda no D0, D8, D15 e D35.**



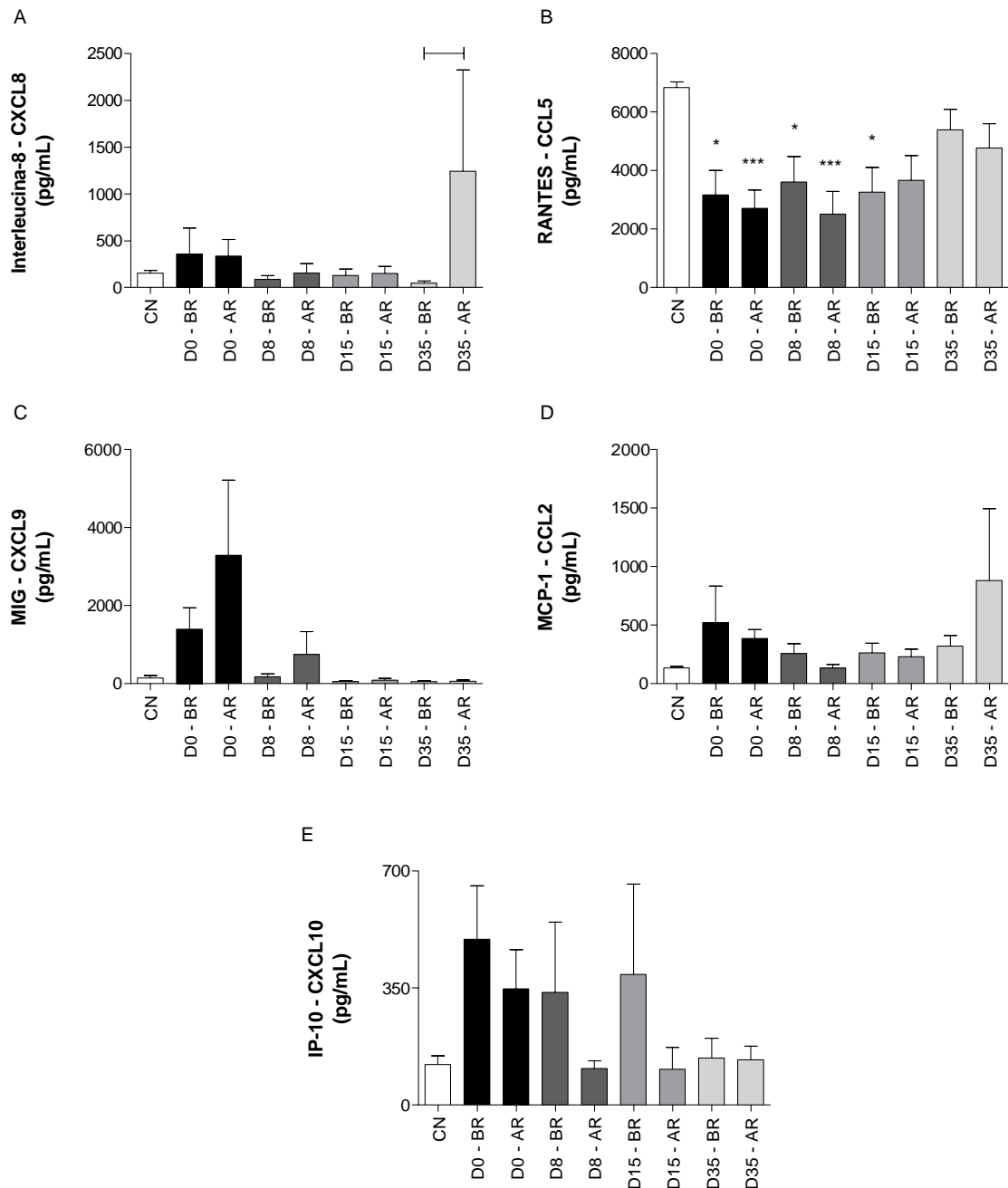
As quimiocinas IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10, foram quantificadas pela técnica de CBA (Cytometric beads array). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL) em gráficos de coluna. Foram analisados 26 pacientes com LLA no D0, 25 pacientes no D8, 22 pacientes no D15 e 20 pacientes no D35, além de 28 crianças saudáveis. “\*” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam resultados com significância estatística em comparação com o grupo controle ou entre os grupos, sendo que “\*” ( $p < 0,05$ ), “\*\*\*” ( $p \leq 0,001$ ), “\*\*\*\*” ( $p \leq 0,0001$ ). — é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os demais grupos de pacientes com LLA. Resultados obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunns* para múltiplas comparações entre os grupos, além do Teste *Mann-Whitney*.

Ao analisar as quimiocinas séricas por estratificação de Grupo de Risco, observamos que a IL-8 apresentou aumento estatisticamente significativo entre pacientes com LLA no grupo BR e AR no D35 (Figura 19A).

No caso do RANTES (Figura 19B) observamos diminuição estatisticamente significativa no grupo BR no D0, D8 e D15 e no grupo AR no D0 e D8 quando comparados ao grupo de crianças saudáveis.



**Figura 19-Análise das quimiocinas circulantes em pacientes com leucemia linfoblástica nos diferentes grupos de Risco no D0, D8, D15 e D35.**



As quimiocinas IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10, foram quantificadas pela técnica de CBA (Cytometric beads array). Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL) em gráficos de coluna. Foram analisados 11 pacientes com LLA-B comum no D0-BR, 15 pacientes no D0-AR, 11 pacientes no D8-BR, 14 pacientes no D8-AR, 11 pacientes no D15-BR, 11 pacientes no D15-AR, 09 pacientes no D35-BR e 11 pacientes no D35-AR, além de 28 crianças saudáveis. “\*” é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam resultados com significância estatística em comparação com o grupo controle ou entre os grupos, sendo que “\*” ( $p < 0,05$ ), “\*\*” ( $p < 0,001$ ), “\*\*\*” ( $p < 0,0001$ ). † é usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em comparação com os demais grupos de pacientes com LLA. Resultados obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunns* para múltiplas comparações entre os grupos, além do Teste *Mann-Whitney*.

#### **4.7. Interações entre os Biomarcadores celulares e solúveis circulantes nos pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda**

Com o intuito de verificar o grau de relação entre os biomarcadores celulares e solúveis na LLA, foram realizadas várias análises de correlação para avaliar a associação entre as células, as citocinas/quimiocinas estudadas. Os resultados das comparações estão demonstrados na Figura 20, com a descrição das interações em cada grupo estudado.

Ao analisarmos a interação entre os biomarcadores celulares e solúveis (citocinas e quimiocinas) nos grupos de pacientes com LLA e os indivíduos controles (CN), observamos que o grupo CN apresenta rede de ação moderada influenciada pelos linfócitos totais em associação com a IL-8, IFN- $\gamma$  e IL-4, com regulação mediada pela IL-10. Vale salientar as correlações negativas das células NK com os Linfócitos T, T CD4<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$  (Figura 20A).

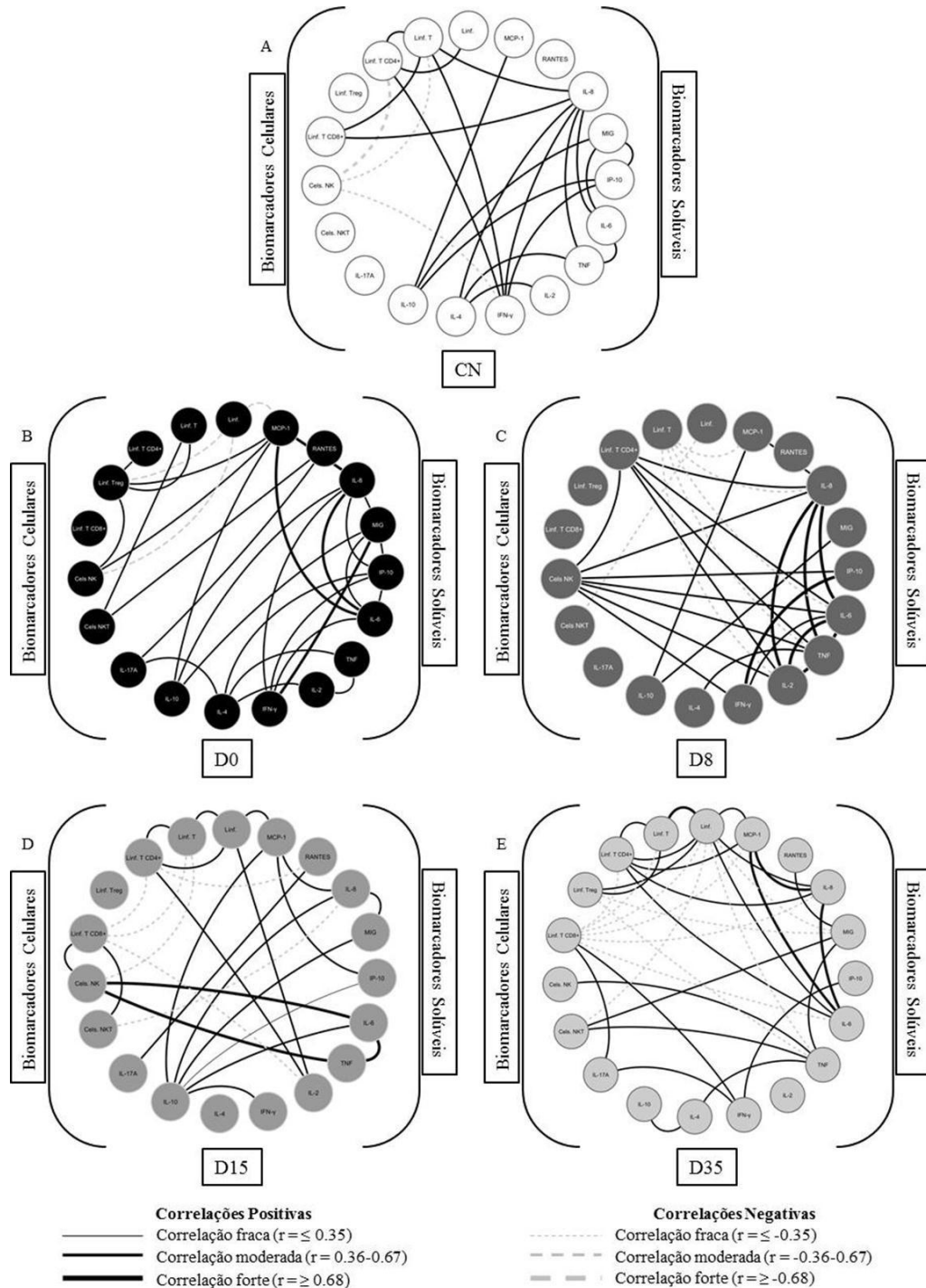
Os pacientes com LLA ao diagnóstico (D0), apresentaram uma rede mais robusta, com interligação entre as células analisadas e as moléculas solúveis dosadas. Notam-se interações fortes entre as quimiocinas MCP-1, IL-8 e MIG com as citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$ , respectivamente, sugerindo intenso processo inflamatório nesse grupo. As interações observadas no grupo CN estão mantidas no grupo com LLA-D0, com ganho de interações positivas para os Linfócitos Treg e para as quimiocinas MCP-1, MIG e IP-10 (Figura 20B).

As interações desses pacientes durante o D8 (Figura 20C) parece ser ampliada, com aumento das correlações de células e moléculas inflamatórias nessa fase do tratamento. Há um aumento da comunicação entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e células NK com as moléculas inflamatórias IP-10, IL-8, IL-6, TNF, IL-2 e IFN- $\gamma$ , sendo observada intercomunicação entre elas. Além disso, os pacientes parecem perder o processo de regulação da resposta imune, com diminuição ou perda de ação da citocina IL-10 e dos linfócitos Treg.

Durante o período de indução no D15, é observada regulação da resposta imune com aumento da ação da citocina IL-10 nessa fase. As principais relações inflamatórias estão perdidas no D15, no entanto, parece haver um processo integrado entre as células NK e as citocinas IL-6 e TNF, além do aumento de correlações negativas (Figura 20D).

Em relação à fase final do processo de indução (D35), nota-se aumento de correlações negativas, além das interações entre os linfócitos totais, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, MCP-1, IL-8, IL-6 e TNF, sendo notado nessa fase o repovoamento das células presentes no sangue periférico, com um perfil mais inflamatório, também observado no D0 e D8 (Figura 20E).

**Figura 20-Redes de Biomarcadores celulares e solúveis em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda no D0, D8, D15 e D35 e em crianças saudáveis.**



Os Biomarcadores Celulares (Linfócitos totais, Linfócitos T, Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, Linfócitos Treg, linfócitos T CD8<sup>+</sup>, Células NK e NKT) e Solúveis (Citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ; Quimiocinas: IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10), foram analisados em sangue total e soro de pacientes com LLA B comum. Cada linha de ligação representa uma correlação significativa entre um par de biomarcadores. As linhas contínuas representam correlações positivas, enquanto que as linhas tracejadas representam correlações negativas. O grau de significância é representado pela espessura da linha. As correlações foram obtidas através do Teste de Spearman “r” e utilizadas para classificar as conexões como fraca, moderada ou forte (positivas ou negativas). A ausência da linha, como a não existência de correlação. Foram analisados 26 pacientes com LLA nesta fase. Elaborado através do programa *Cytoscape* versão 3.2.

---

---

# DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

Em nosso estudo caracterizamos a resposta imunológica dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) através de biomarcadores imunes. O resultado da pesquisa foi associado com as respostas ao tratamento por estratificação de grupo de risco do protocolo brasileiro GBTLI LLA-2009, nas fases do diagnóstico (D0), dia 8 (D8), dia 15 (D15) e no final da terapia de indução (D35). Para isso, foi analisado o hemograma e caracterizadas as populações celulares de linfócitos totais, linfócitos T (LT), LT CD4<sup>+</sup>, linfócitos Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), LT CD8<sup>+</sup>, células Natural Killer (NK) e Natural Killer T (NKT), além do perfil das citocinas Th1, Th2, Treg, Th17 e quimiocinas.

Dentre os achados que apresentaram maior significância podemos citar os LT CD4<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup> e linfócitos Treg, as citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e a quimiocina RANTES.

Participaram deste estudo 29 pacientes com LLA na faixa etária de zero a menor que 18 anos, em tratamento na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHMOAM e 28 crianças saudáveis como grupo controle, totalizando 132 amostras. O período de coleta foi de agosto de 2014 a julho de 2015.

Todos os pacientes receberam tratamento com o protocolo brasileiro GBTLI LLA-2009, utilizando as medicações quimioterápicas de acordo com a estratificação de grupo de risco e acompanhados pela mesma equipe médica da FHMOAM.

Dos 29 pacientes com LLA, 20 eram do sexo masculino e 09 do sexo feminino, e a razão M:F foi de 2,2:1. Essa razão entre os gêneros foi maior que as publicações da literatura, que variam de 1.3:1 à 1.9:1. Em nosso estudo, o aumento desta razão pode ser justificado pelo tamanho da amostra<sup>24, 58</sup>.

A média de idade dos pacientes foi de 5,1 $\pm$ 4,4 anos. Esses valores são próximos ao encontrado nos trabalhos publicados com pacientes com LLA (6,3 $\pm$ 0,5 a 6,50 $\pm$ 4,89 anos)<sup>58-59</sup>. A maioria dos pacientes foram incluídos na faixa etária de 1 a menor de 5 anos, o que está de acordo com dados da literatura<sup>24, 38</sup>. Mais da metade dos pacientes eram naturais e procedentes de Manaus e parte do interior e alguns de outros estados da região norte.

O grupo controle foi composto por 28 crianças saudáveis, a maioria natural e procedente de Manaus, e apresentava média de idade de 7,8 $\pm$ 4,3. No estudo de Luczyński W, *et al.*, 2005<sup>59</sup>, a média de idade encontrada no grupo controle foi 7.32 $\pm$ 4.09 anos.

Ao diagnóstico a maioria dos pacientes encontrava-se eutrófico e um pouco mais de um quarto dos pacientes apresentava algum tipo de desnutrição, o que foi compatível com estudo de Borim LNB *et al.*, 2000<sup>60</sup>.

Ao analisar os dados clínicos prévios ao diagnóstico que constavam na Ficha de Cadastro, foi observado que a febre foi o sintoma mais frequente, corroborando com os achados de Souza DWL *et al.*, (2015)<sup>58</sup>. O uso prévio de corticoide ocorreu em um pequeno grupo de pacientes, mas foi observado que não houve impacto na resposta inicial ao tratamento. A maioria dos pacientes recebeu algum tipo de hemocomponente.

O diagnóstico imunofenotípico predominante foi a LLA B e dentre estas, a LLA B Comum foi a prevalente. Em nossos resultados, a LLA B Comum encontrava-se maior que o descrito na literatura<sup>58, 61</sup>, que evidenciam um pouco mais de cinquenta por cento de prevalência desse diagnóstico imunofenotípico de leucemia. Dentre os casos diagnosticados, havia um paciente portador de Síndrome de Down. A maioria dos casos era CD10 positivo e muitos apresentavam fenótipos anômalos, compatível com a literatura<sup>25</sup>.

Mais da metade dos pacientes não tem resultado de cariótipo por diversos motivos. Dentre os cinco pacientes com resultados alterados, um apresentava a t(9;22), conforme descrito por Swerdlow SH *et al.*, (2008), é considerada de mal prognóstico e o paciente foi reestratificado para esquema terapêutico específico do protocolo GBTLI LLA-2009.

Apenas um paciente apresentava infiltração no sistema nervoso central o que corrobora com a literatura, que refere que é raro o envolvimento ao diagnóstico na LLA<sup>26</sup>.

Após confirmação do diagnóstico de LLA, mais da metade dos pacientes foram estratificados para o grupo de Baixo Risco (BR) e quase um terço para o Alto Risco (AR).

Quanto à mudança de grupo de risco, a etapa de maior impacto foi a avaliação no D15, com o auxílio dos exames citomorfológicos e da doença residual mínima por citometria de fluxo (CF-DRM). Com a utilização do exame da DRM para avaliação de resultados, ocorreu o maior número de reestratificação, principalmente no grupo de Baixo Risco (BR), na qual a grande maioria apresentava CF-DRM positivo. Chiaretti S, Zini G, Bassan R *et al.*, 2014<sup>8</sup>, referem que o nível de DRM é o melhor exame de indicador prognóstico na avaliação da resposta da terapia de indução da remissão.

A taxa de letalidade nesta fase do estudo foi de 20,6%, sendo que os dados de cada paciente foram computados até a data do óbito.

Alguns dados não mostrados, como a avaliação de resposta por faixa etária e por gênero, demonstram que os pacientes da faixa etária, de 6 a menor que 9 anos, apresentaram maior mudança de grupo de risco, todos os quatro pacientes desse grupo foram alocados para outro subgrupo. Em relação ao gênero, o masculino teve pior resposta ao tratamento que o feminino, ocorrendo a mudança de grupo de risco em 70% e 55,5% respectivamente. Observamos que o gênero feminino apresentava concentrações de IL-8, RANTES e MIG diminuídos em relação ao masculino, assim como IL-4, IL-6 e IL-17A, e aumento de LTCD4<sup>+</sup>, linfócitos Treg e IL-2 em comparação ao gênero masculino.

Todos os pacientes com LLA do estudo apresentaram anemia ao diagnóstico. Estudo realizado por Souza DWL *et al.*, 2015<sup>58</sup> descreveu que 85% dos pacientes apresentavam anemia nesta fase, o que estaria associado a doença mais avançada. Na contagem de plaquetas, a maioria encontrava-se maior que 20.000/mm<sup>3</sup>, provavelmente devido às transfusões recebidas em outros serviços de saúde. A média da contagem de leucócitos foi de 28.746,9±63.386,3, com a mediana de 8.670. Mais da metade dos pacientes com LLA estavam com leucócitos iniciais abaixo de 10.000/mm<sup>3</sup> e a maioria abaixo de 50.000/mm<sup>3</sup>, estes dados corroboram com achados descritos na literatura<sup>58</sup>.

Analisando o hemograma, observamos o aumento da população de linfócitos totais nos primeiros quinze dias do tratamento, porém ao realizar a avaliação por grupo de risco, o BR encontrava-se aumentado apenas no D0 e o AR no D0, D8 e D15.

Para a população de LT observamos que estava com diminuição estatisticamente significativa, principalmente ao diagnóstico e no grupo AR e permaneceu diminuída no D8, porém houve elevação não significativa ao final da indução nos dois grupos de risco.

O percentual dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> estavam aumentados em todas as etapas do estudo. Os LT CD8<sup>+</sup> podem ser responsáveis pela atividade citotóxica contra o tumor e geralmente são recrutados pela quimiocina RANTES nesses quadros patológicos<sup>37, 39</sup>.

Alta razão entre LT CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> podem demonstrar linfócitos residuais correspondendo à resposta precoce favorável<sup>62</sup>, no entanto, em nosso estudo, a razão entre os LT CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> não apresentou nenhum resultado estatisticamente significativo, fato este também observado por Luczyński W *et al.*, (2005)

Bhattacharya K, Chandra S, Mandal C, (2013) descrevem que o aumento do número das Treg pode ser observado tanto no microambiente do tumor quanto em sangue periférico e que o aumento dos linfócitos Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> sugerem melhor prognóstico ao

paciente. Em nosso estudo, os linfócitos Treg dos pacientes com LLA ao diagnóstico encontravam-se com redução significativa quando comparados com indivíduos saudáveis, entretanto o grupo AR apresentava-se significativamente mais baixo que o grupo de BR, sugerindo melhor resposta ao grupo de BR, o que corrobora com os achados descritos nos estudos acima citado.

No caso das células tumorais, elas apresentam baixa expressão de MHC de Classe I, o que a torna vulnerável à ação das NK. A atividade antineoplásica dessas células podem ser aumentadas pela presença das citocinas IL-2 e IL-12, assim como a destruição de células alvo revestidas por imunoglobulinas IgG via receptores Fc<sup>32</sup>. Em nosso estudo, observamos diminuição das células NK com significância estatística nos dias D0, D15 e D35 quando comparado pacientes com LLA com grupo de pacientes saudáveis. A produção da célula NK pode ser prejudicada em pacientes com LLA devido à diminuição da expressão de ativação de seus receptores ou seus ligantes, assim como a baixa produção de algumas citocinas<sup>32,42</sup>.

O papel das Células NKT tem sido sugerido na resposta para mediar ambas as funções protetoras e imunomoduladoras em várias leucemias<sup>62</sup>. No nosso estudo, as células NKT estavam diminuídas ao diagnóstico e apresentaram aumento gradativo durante o tratamento, mantendo a proporção maior para o grupo AR.

A IL-2 é uma citocina de resposta Th1 importante e capaz de promover a proliferação da célula T, secreção de anticorpos pelas células B e ativação das células NK<sup>23</sup>. Em nossa pesquisa, ao avaliar as citocinas Th1 e Th2, observamos diminuição destas citocinas em todos os tempos avaliados, tanto da IL-2, quanto do IFN- $\gamma$ , porém não foram estatisticamente significantes, resultados estes semelhantes aos achados de Wu CP *et al.*, 2012 e de Luczyński W *et al.*, 2005. Neste último estudo os autores pesquisaram células T com co-expressão de IL-4 e células T com co-expressão de de IFN-  $\gamma$ .

Estudos realizados em pacientes com LLA, por Zhang et al., (2000) e Luczyński *et al.*, (2005) revelaram aumento da IL-4 que é uma citocina de resposta Th2. Em nossa pesquisa, observamos que a IL-4 encontrava-se diminuída em relação ao grupo controle, porém ao analisar a razão Th1/Th2 de pacientes com controles, observamos que a razão da IL-4 encontrava-se mais elevada que a razão da IL-2, quando comparadas ao grupo de indivíduos controles e esta razão permaneceu elevada durante toda a indução.

Ao analisar por grupo de risco, observamos que a razão Th1/Th2, do grupo BR apresentava maior concentração de IL-4 em todos os tempos analisados, apresentando pico no



D15. Este resultado poderá estar associado com aumento da resposta imunossupressora da IL-4 e é considerada função pró-tumor, assim como a diminuição da proliferação de linfócitos, da diferenciação e ativação de LT CD8<sup>+</sup> e da ativação de macrófagos<sup>39</sup>. Esses dados podem sugerir a presença de doença comprovada através da CF-DRM no D15 e sua redução no D35, após intensificação do tratamento e recuperação medular.

As respostas Th1 e Th2 dependem da ativação dos linfócitos T via moléculas de MHC. A ativação pelo complexo peptídeo/MHC pode não ocorrer devido a não propagação do segundo sinal através da ligação da molécula B7.1 com CD28 (CD80) do linfócitos, que em tese poderia favorecer a geração de células Th1, ou pela interação de moléculas B7.2/CD28 do LT (CD86) as células Th2<sup>17</sup>.

Na ausência deste segundo sinal o LT torna-se anérgico ou seja, não ativado. Células leucêmicas podem apresentar antígenos tumorais através das moléculas de MHC, porém, não expressam a molécula co-estimulatória B7.1, portanto não ativam células T. Porém, tem sido relatado em outros estudos que alguns clones Th2 utilizam IL-4 como um fator de crescimento autócrino e não necessitam de co-estimulação de CD28 para a produção de IL-4, podendo assim justificar o aumento desta citocina em nosso estudo<sup>17, 39,54</sup>.

No caso da citocina pró-inflamatória IL-17A, esta apresentava-se elevado em todas as fases deste estudo, porém não estatisticamente significativa, no entanto no D8 encontrava-se acima de 5 pg/mL. Em relação a IL-6, observamos aumento em todas as etapas, porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos, apenas diminuição significativa quando comparado o D0 com D8 dos pacientes com LLA.

Em estudo de Wu CP *et al.*, (2012) foi observado aumento da IL-10, que é considerada importante fator imunossupressor capaz de modificar a resposta imune do organismo, da expressão antigênica do MHC-II e mediar interregulação entre células Th1 e Th2. Em nosso estudo, observamos aumento significativo ao diagnóstico e após a pré-fase com corticoterapia (D8), seguido de diminuição significativa no D15 e D35, quando comparados com D0, sugerindo diminuição da imunorregulação e resposta ao tratamento. Nos grupos de BR e AR a IL-10 encontrava-se significativamente elevada ao diagnóstico e no D8 somente para o AR, o que sugere controle da imunorregulação através das citocinas regulatórias no decorrer do tratamento.

No caso da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , ela apresenta um papel importante na participação da ativação das células endoteliais e estas por sua vez, desencadeiam a adesão

dos leucócitos no endotélio vascular e induzem a expressão pró-inflamatória das quimiocinas<sup>59</sup>. Em nosso estudo a quantificação desta citocina encontrava-se com níveis reduzidos estatisticamente significantes em todos os tempos avaliados quando comparado os pacientes com LLA e o grupo controle, que pode sugerir diminuição da resposta imune inata e adquirida, assim como da secreção de quimiocinas o que poderá promover a proliferação tumoral.

A CXCL8 (IL- 8) e CCL2 (MCP-1) produzidas nos locais de infecção se ligam aos proteoglicanos na matriz extracelular e em moléculas similares na superfície das células endoteliais, atraem neutrófilos através da liberação dessas citocinas pelos macrófagos ativados e são estimuladas a penetrar no tecido inflamado. Já é descrito que níveis de IL-8 no plasma e expressão de mRNA de IL-8 pelos blastos leucêmicos foram associados a um pior resultado em adulto com LLA e também indicam pior evolução em paciente com leucemia linfocítica crônica (LLC)<sup>32, 63</sup>.

Em nosso estudo, a IL-8 encontrava-se elevada nos pacientes com LLA ao diagnóstico nos dois grupos de risco e ao término da Indução no grupo de AR quando comparada com os indivíduos controles, porém não foi observada diferença estatística. Ao final do tratamento da indução durante a recuperação medular houve aumento significativo desta quimiocina no grupo AR quando comparado ao grupo BR. Este fato sugere que a presença desta citocina pode estar relacionada ao pior prognóstico, como já descrito por outros autores, como citado anteriormente.

Quanto a MCP-1, em nossa pesquisa sua concentração encontrava-se aumentada em todos os tempos estudados, porém significativamente aumentada apenas ao diagnóstico quando comparado com os controles saudáveis. Observamos aumento não significativo no D35 de sua concentração no grupo de AR, sugerindo permanência de resposta inflamatória neste grupo de risco.

A quimiocina CCL5 (RANTES) também pode estar envolvida com a progressão do tumor de uma forma autócrina, assim como pode ser associada a angiogênese promovida pela MCP-1 e metástase do tumor.<sup>37</sup>. Em nossa pesquisa, observamos diminuição estatisticamente significativa desta quimiocina nos pacientes com LLA nos dias D0, D8 e D15 quando comparado ao grupo controle e entre os grupos de risco. Nos grupos de tratamento, observamos que no D0 e D8 os pacientes apresentam valores semelhantes, sendo que o BR estava significativamente menor que os controles.

Para a CXCL9 (MIG) e CXCL10 (IP-10), que são quimiocinas inflamatórias, elas direcionam linfócitos para o local da inflamação. No caso do câncer, a produção dessas citocinas é induzida por citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que por sua vez irão atrair células do sistema imune inato e adaptativo<sup>32, 45</sup>. Em nosso estudo observamos que ao diagnóstico (D0) a MIG estava elevada, porém sem significância estatística e que ocorreu diminuição significativa no D8, D15 e D35 quando comparado com o D0. Ao analisarmos os resultados entre os grupos de BR e AR, não foi observado alterações significantes entre os grupos.

Analisando a IP-10, esta se encontrava mais elevada que o do grupo dos controles saudáveis, porém sem significância estatística. Comparando D0 com D15, este apresentou diminuição significativa no D15, o que sugere diminuição de migração de linfócitos e consequentemente melhora da doença. Quando comparamos os resultados entre os grupos de BR e AR, observamos que a IP-10 no grupo de BR encontravam-se sempre mais elevada que no grupo de AR, porém sem significância estatística.

Quando observamos as interações entre os biomarcadores celulares e solúveis circulantes nos pacientes com LLA comparadas com os CN, notamos que ao diagnóstico ocorreu o ganho de células reguladoras Treg com interações positivas com a quimiocina inflamatória MCP-1, demonstrando imunorregulação da resposta imune o que facilitaria a proliferação tumoral. Durante a avaliação do D15, onde maioria dos pacientes encontrava-se com CF-DRM positivo, os pacientes ainda apresentavam ampliação das interações da IL-10 nesta fase, sugerindo ainda a regulação da resposta imune. A perda das interações da IL-10 com as moléculas inflamatórias ao término do tratamento de indução, assim como a Treg, sugere diminuição da imunorregulação.

Observamos aumento da resposta inflamatória por meio do aumento da concentração da IL-6 em todas as fases do estudo quando comparado com o grupo de controles. No D0 notamos que a concentração desta citocina encontrava-se semelhante nos dois grupos de risco. No entanto, no D15 observou-se aumento de sua concentração no grupo de BR, que coincidiu com o grande número de CF-DRM positiva neste grupo nesta fase da pesquisa. Após intensificação do tratamento, ao analisar o D35, o grupo de BR apresentava-se com concentrações menores quando comparado com o grupo de AR.

Também observamos o aumento da resposta inflamatória pela presença de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 nesta fase de recuperação medular e controle da doença.

---

---

# CONCLUSÃO

## CONCLUSÃO

No presente estudo observamos que o perfil da resposta imunológica dos pacientes com LLA apresentavam desregulação ao diagnóstico e durante o tratamento. Diante dos resultados do presente estudo podemos concluir que:

- A atividade dos neutrófilos estava prejudicada pela neutropenia, assim também a dos monócitos, comprometendo a resposta imune inata;
- Para os linfócitos totais no hemograma ocorreu diminuição e podem sugerir baixa produção medular pela ocupação e substituição do estroma da medula óssea por células leucêmicas e/ou pela ação da quimioterapia. A diminuição do LT também pode ocorrer devido sua ativação parcial por um segundo sinal ineficaz;
- Os LT CD4+ e LT CD8+, encontravam-se significativamente aumentados em todas as etapas de nosso estudo sugerindo ativação e proliferação celular;
- Os linfócitos Treg CD4+CD25+FoxP3+ encontravam-se diminuídos em sangue periférico ao diagnóstico o que pode ocorrer devido ao seu recrutamento para o espaço medular. Após início de tratamento e controle da doença esse recrutamento não se fez mais necessário, justificando seu aumento no D15 e D35;
- As células NK, apresentavam-se diminuídas no D0, D15 e D35 o que sugere menor recrutamento de neutrófilos, macrófagos ao local inflamado, assim como a diminuição de produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ . O grupo de AR estava menor que o BR, sugerindo menor ação efetora desta célula no grupo de AR;
- A célula NKT apresentava sua ação imunossupressora comprometida ao diagnóstico com melhora gradativa com o decorrer do tratamento pela recuperação celular. O grupo de BR apresentava-se mais elevada que o AR o que sugere que neste grupo ocorreu maior imunossupressão tumoral;
- A diminuição nas concentrações de IFN- $\gamma$  e IL-2 e aumento de IL-10 sugere uma regulação da resposta Th1 e indução de imunotolerância ao tumor;
- O aumento de IL-6 ao diagnóstico sugere resposta inflamatória nesta fase, e o grupo de AR encontrava-se mais elevado ao diagnóstico;

- O recrutamento de macrófagos pela TNF- $\alpha$  está prejudicado pela diminuição dessa citocina inflamatória em todas as etapas da pesquisa e este fato levará a menor ativação de LT e secreção de outras citocinas inflamatórias;
- As quimiocinas estudadas MCP-1, RANTES, IL-8, MIG e IP-10 parecem regular a migração de leucócitos de forma específica da medula para o sangue periférico nas diferentes fases da resposta ao tratamento.

Estudos posteriores se faz necessário para entender melhor a resposta imune dos pacientes com LLA, para compreender o resultado por grupo risco, assim como os bons e maus respondedores ao tratamento.

---

---

# Referências Bibliográficas

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Elman I, Silva MEMP. Crianças Portadoras de Leucemia Linfóide Aguda: Análise dos Limiares de Detecção dos Gostos Básicos. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(3): 297-303.
2. Ek T, Mellander L, Hahn-Zoric M, Abrahamsson J. Intensive Treatment for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Reduces Immune Responses to Diphtheria, Tetanus, and Haemophilus influenzae Type b. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26: 727-734.
3. Hirzel AC, Cotrell A, Gasparini R, Sriganeshan V. Precursor B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma with L3 Morphology, Philadelphia Chromosome, MYC Gene Translocation, and Coexpression of TdT and Surface Light Chains: A Case Report. *Case Rep Pathol.* 2013; 2013: 679892.
4. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 2012; 122(10): 3407-3415.
5. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia* 2012; 36(1): 6-13.
6. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: LYON, 2008.
7. GLOBOCAN (International Agency for research on cancer). World Health Organization. (WHO). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence worldwide in 2012. Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Acessado em 12 de agosto de 2015.
8. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014, 6(1): e2014073.



9. Brasil, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas do Câncer no Brasil (2014): Síntese de Resultados. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/tumores\\_infantis/pdf/9\\_resultados\\_comentarios\\_incidencia\\_por\\_tipo\\_de\\_cancer.pdf](http://www1.inca.gov.br/tumores_infantis/pdf/9_resultados_comentarios_incidencia_por_tipo_de_cancer.pdf). Acessado em 28 de Junho de 2015.
10. Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA. The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer*. 1988; 42(4): 511-520.
11. National Cancer Institute (NCI). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment for health professionals (PDQ<sup>®</sup>): General Information About Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). Disponível em: [http://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq#link/\\_7\\_toc](http://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq#link/_7_toc). Acessado em: 28 de Junho de 2015.
12. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, Reaman GH, Carroll WL. Improved Survival for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Between 1990 and 2005: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 30(14):1663-1669. 2012.
13. Bathia S, Robinson L. Epidemiology of leukemia in childhood. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT, editors. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and childhood*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 2003.
14. Hosoi Y. Radiation carcinogenesis. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2013; 40(11): 1446-1450.
15. Ellinghaus E, Stanulla M, Richter G, Ellinghaus D, Kronnie G, Cario G, Cazzaniga G, Horstmann M, Panzer-Grümayer R, Cavé H, Trka J, Cinek O, Teigler-Schlegel A, ElSharawy A, Häsler R, Nebel A, Meissner B, Bartram T, Lescai F, Franceschi C, Giordan M, Nürnberg P, Heinzow B, Zimmermann M, Schreiber S, Schrappe M, Franke A. Identification of germline susceptibility loci in ETV6-RUNX1-rearranged childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2012; 26(5): 902-909.

16. Wiemels J. Perspectives on the Causes of Childhood Leukemia. *Chem Biol Interact.* 2012; 196(3): 59-67.
17. Duramad P, Tager IB, Holland NT. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicol Lett.* 2007; 172(1-2): 48-59.
18. Bartram CR, Schrauder A, Köhler R, Schrappe M. Acute lymphoblastic leukemia in children: treatment planning via minimal residual disease assessment. *Dtsch Arztebl Int.* 2012; 109(40): 652-658.
19. Braga JAP, Tone LG, Loggetto SR. *Hematologia para a Pediatria.* São Paulo: Atheneu, 2007.
20. Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology.* 5<sup>th</sup> ed, USA: Elsevier, 2011.
21. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol.* 2012; 29(1): 2-11.
22. Van Dongen JJ. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012; 26(9): 1908-1975.
23. Wu CP, Qing X, Wu CY, Zhu H, Zhou HY. Immunophenotype and increased presence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett.* 2012; 3(2): 421-424.
24. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2013; 381(9881): 62187-62194.
25. Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in lymphoblastic leukemia: comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010; 23(3): 347-358.

26. Garcia AV, Alobeid B, Traina JM, Chen SS, Weiner MA, Middlesworth W. Isolated primary testicular B lymphoblastic lymphoma: an unusual presentation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013; 35(2): e88-e90.
27. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood.* 2012; 120(6): 1165-1174.
28. Brandalise SR, Pinheiro VR, LEE MLM. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente- GBTLI, Brasil, 2009.
29. Shah A, Coleman MP. Increasing incidence of childhood leukemia: a controversy re-examined. *Br J Cancer.* 2007; 8, 97 (7): 1009-1012.
30. Cooper SL, Brown PA. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 2015; 62(1): 61-73.
31. Feuerecker M, Mayer W, Kaufmann I, Gruber M, Muckenthaler F, Yi B, Salam AP, Briegel J, Schelling G, Thiel M, Choukèr A. A corticoid-sensitive cytokine release assay for monitoring stress-mediated immune modulation. *Clin Exp Immunol.* 2013; 172(2): 290-299.
32. Cruvinel WM, Mesquita D Jr, Araújo JA, Catelan TT, de Souza AW, da Silva NP, Andrade LE. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol.* 2010; 50(4): 434-461.
33. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature Immunology.* 2008; 9: 839 – 845.
34. Eisenbarth SC, Flavell RA. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. *EMBO Mol Med.* 2009; 1(2): 92-98.

35. Capitini CM, Chisti AA, Mackall CL. Modulating T cell Homeostasis with IL-7: Preclinical and Clinical Studies. *Journal of Internal Medicine*. 2009; 266(2): 141-153.
36. Souza AWS, Mesquita-Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Cruvinel WM, Andrade LEC, Silva NP. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity. *Bras J Rheumatol* 2010; 50(6): 665-694.
37. Dayanidhi Raman D, Paige J. Baugher PJ, Yee Mon Thu YM, Ann Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett*. 2007; 256(2): 137-165.
38. Zhang, XL, Komada Y, Chipeta J, Li QS, Inaba H, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M. Intracellular cytokine profile of T cells from children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49:165-172.
39. Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel Wde M, Andrade LE, Silva NP. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev Bras Reumatol*. 2010; 50(5): 552-580.
40. Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Immune response mechanisms to infections. *An bras Dermatol*. 2004; 79(6): 647-664.
41. Bhattacharya K, Chandra S, Mandal C. Critical stoichiometric ratio of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells and CD4(+) CD25(-) responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Immunology*. 2014; 142(1): 124-139.
42. Farnault L, Sanchez C, Baier C, Le Treut T, Costello RT. Hematological malignancies escape from NK cell innate immune surveillance: mechanisms and therapeutic implications. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 421702.
43. Shigeru S, Akitosh NJ, Tomoko S. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010; 63(6): 601-610.

44. Haining WN, Neuberger DS, Keczkemethy HL, Evans JW, Rivoli S, Gelman R, Rosenblatt HM, Shearer WT, Guenaga J, Douek DC, Silverman LB, Sallan SE, Guinan EC, Nadler LM. Antigen-specific T-cell memory is preserved in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005; 106(5): 1749-1754.
45. Roy I, Evans DB, Dwinell MB. Chemokines and chemokine receptors: Update on utility and challenges for the clinician. *Surgery*. 2014; 155(6): 961-973.
46. Stelmaszczyk-Emmel A, Kopatys A, Górska E, Głodkowska-Mrówka E, Demkow U. The usefulness of flow cytometric analysis of cytokines in peripheral blood and bone marrow plasma. *Postepy Hig Med Dosw*. 2013; 67: 879-886.
47. Cheon H, Borden EC, Stark GR. Interferons and their stimulated genes in the tumor microenvironment. *Semin Oncol*. 2014; 41(2): 156-173.
48. Maraninchi D, Vey N, Viens P, Stoppa AM, Archimbaud E, Attal M, Baume D, Bouabdallah R, Demeoq F, Fleury J, Michallet M, Olive D, Reiffers J, Sainty D, Tabilio A, Tiberghien P, Brandely M, Hercend T, Blaise D. A phase II study of interleukin-2 in 49 patients with relapsed or refractory acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1998; 31(3-4): 343-349.
49. Pels E. Comparison of saliva interleukin-2 concentration to the condition of gums in children with acute lymphoblastic leukaemia during anti-tumour treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015; 76(1): 205-210.
50. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006; 354(6): 610-621.
51. Vela M, Aris M, Llorente M, Garcia-Sanz JA, Kremer L. Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: achievements and challenges. *Front Immunol*. 2015; 6:12.
52. Yung SC, Murphy PM. Antimicrobial chemokines. *Front Immunol*. 2012; 3: 276.

53. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; 283(1): R7-28.
54. Yotnda P, Mintzb P, Grigoriadou K, Lemonnier F, Vilmer E, Langlade-Demoyen P. Analysis of T-cell defects in the specific immune response against acute lymphoblastic leukemia cells. *Exp Hematol*. 1999; 27(9): 1375-1383.
55. Ek T, Mellander L, Andersson B, Abrahamsson J. Immune reconstitution after childhood acute lymphoblastic leukemia is most severely affected in the high risk group. *Pediatr Blood Cancer*. 2005; 44(5): 461-468.
56. Ek T, Josefson M, Abrahamsson J. Multivariate Analysis of the relation between immune dysfunction and treatment intensity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood Cancer*. 2011; 56(7): 1078-1087.
57. Hulley SB, Cumming SR, Browner WS, Grady DG, Hearst NB, Newman TB. *Delineando a Pesquisa Clínica: uma abordagem epidemiológica*. 2<sup>th</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
58. Sousa DWL, Ferreira FVA, Félix FHC, Lopes MVO. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015; 37(4): 223-229.
59. Luczyński W, Stasiak-Barmuta A, Krawczuk-Rybak M, Malinowska I. Assessment of selected co-stimulatory, adhesion and activatory molecules and cytokines of Th(1)/Th(2) balance in acute lymphoblastic leukemia in children. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005; 53(4): 357-363.
60. Borim LNB, Ruiz MA, Conte ACF, Camargo B. Estado nutricional como fator prognóstico em crianças portadoras de Leucemia Linfocítica Aguda. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2000; 22 (1): 47-54.
61. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact*. 2012; 196(3):59-67.

62. Lustfeld I, Altvater B, Ahlmann M, Ligges S, Brinkrolf P, Rosemann A, Moericke A, Rossig C. High proportions of CD4<sup>+</sup> T cells among residual bone marrow T cells in childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with favorable early responses. *Acta Haematol.* 2014; 131(1): 28-36.
63. Vasconcellos JF, Laranjeira AB, Leal PC, Bhasin MK, Zenatti PP, Nunes RJ, Yunes RA, Nowill AE, Libermann TA, Zerbini LF, Yunes JA. Induces Cell Death and Cell Cycle Arrest in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells through the Activation of GLIPR1. *PLoS One.* 2015; 10(8): e0134783.

---

---

# APÊNDICES



## APÊNDICES

### Apêndice A - Protocolo de Tratamento GBTLI LLA-2009 (Grupo Baixo Risco Verdadeiro -BRV).

Medicação		Dose	Via	Dia
<b>Pré- Fase</b>				
MIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1
Prednisona		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1 a 7
<b>Indução</b>				
Dexametasona		6 mg/m <sup>2</sup>	VO	8 a 29
Vincristina		1.5 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
Daunoblastina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15
L-asparaginase		5000 UI/m <sup>2</sup>	IM	12, 15, 18, 21 24, 27, 30, 33.
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15 e 35. (8 se SNC -2)
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação da Remissão</b>				
Aracytin		75 mg/m <sup>2</sup>	SC	2-5, 9-12, 16- 19, 23-26
6-mercaptopurina		50 mg/m <sup>2</sup>	VO	1 a 29
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 29
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Intensificação</b>				
Metotrexate		1 g/m <sup>2</sup>	EV	1, 15, 29, 43
Ácido folínico		15 mg/m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate de 6/6
6-mercaptopurina		50 mg/m <sup>2</sup>	VO	1- 56
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8, 22, 36, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação Tardia</b>				
Dexametasona		6 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-7, 14-21, 29- 35
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15, 22, 29
Doxorrubicina		30 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 22
L- asparaginase		5.000 UI/m <sup>2</sup>	IM	10, 12, 14, 16
Aracytin		75 mg/m <sup>2</sup>	SC	37-40, 44- 47, 51- 54
Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	36- 57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	36, 57
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Manutenção</b>				

Metotrexate	Grupo 1	200 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Da semana 22 à semana 106, a cada 3 semanas
	Grupo 2	200 mg/ m <sup>2</sup> , escalonando 25mg/ m <sup>2</sup> até o teto de 300 mg/ m <sup>2</sup> .		
Ácido folínico		5 mg/ m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 36 do Metotrexate- 2 doses
6-mercaptopurina		100 mg/ m <sup>2</sup>	VO	Por 10 dias a partir da hora 24 do Metotrexate
<b>Dose padronizada do MADIT</b>				
	Idade (anos)	MTX (mg)	Ara-C (mg)	Volume Final (ml)
*MADIT	≥1 <3	10	20	6,7
	≥3 <9	12	24	8,0
	≥9	15	30	10,0
Dexametasona: 2 mg/ m <sup>2</sup> ( máx. 2 mg)				

**Fonte:** Elaborado pela autora a partir do Protocolo de Tratamento GBTLI LLA (2009).

**Apêndice B - Protocolo de Tratamento GBTLI LLA-2009 (Grupo  
Baixo Risco Intermediário - BRI).**

Medicação		Dose	Via	Dia
<b>Pré- Fase</b>				
MIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1
Prednisona		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1 à 7
<b>Indução</b>				
Dexametasona		6 mg/m <sup>2</sup>	VO	8 à 29
Vincristina		1.5 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
Daunoblastina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
L-asparaginase		5000 UI/m <sup>2</sup>	IM	12, 15, 18, 21 24, 27, 30, 33.
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15 E 35. (8, 22, 29 se houver infiltração em SNC)
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação da Remissão</b>				
Ciclofosfamida		1 g/m <sup>2</sup>	EV	1, 29
Mesna	Hora 0 e 4 da ciclofosfamida	300 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 29
Aracytin		75 mg/m <sup>2</sup>	SC	2-5, 9-12, 16- 19, 23-26
6-mercaptopurina		50 mg/m <sup>2</sup>	VO	1 a 29
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 29
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Intensificação</b>				
Metotrexate		1 g mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 15, 29, 43
Ácido folínico		15 mg/m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6
6-mercaptopurina		50 g/m <sup>2</sup>	VO	1- 56
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8, 22, 36, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação Tardia</b>				
Dexametasona		6 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-7, 14-21, 29-35
Vincristina		1.5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15, 22, 29
Doxorrubicina		30 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 22
Ciclofosfamida		1 g/ m <sup>2</sup>	EV	36
Mesna		300 mg m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da

				ciclofosfamida
L- asparaginase		5000 UI/m <sup>2</sup>	IM	10, 12, 14, 16
Aracytin		75 mg/m <sup>2</sup>	SC	37-40, 44- 47, 51- 54
Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	36- 57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	36, 57
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Manutenção</b>				
Metotrexate	Grupo 1	200 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Da semana 22 à semana 106, a cada 3 semanas
	Grupo 2	200 mg/ m <sup>2</sup> , escalonando 25mg/ m <sup>2</sup> até o teto de 300 mg/ m <sup>2</sup> .		
Ácido folínico		5 mg/ m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 36 do Metotrexate- 2 doses
Merptopurina		100 mg/ m <sup>2</sup>	VO	Por 10 dias a partir da hora 24 do Metotrexate
<b>Dose padronizada do MADIT</b>				
	Idade (anos)	MTX (mg)	Ara- C (mg)	Volume Final (ml)
*MADIT	≥1 <3	10	20	6,7
	≥3 < 9	12	24	8,0
	≥9	15	30	10,0

**Fonte:** Elaborado pela autora a partir do Protocolo de Tratamento GBTLI LLA (2009).

**Apêndice C - Protocolo de Tratamento GBTLI LLA-2009 (Grupo  
Alto Risco Responder Rápido - AR RR).**

Medicação		Dose	Via	Dia
<b>Pré- Fase</b>				
MIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1
Prednisona		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1 - 7
<b>Indução</b>				
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	8 - 29
Vincristina		1.5 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
Daunoblastina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15 e 22
L-asparaginase		5000 UI/m <sup>2</sup>	IM	8,11,14,17,20,23, 26,29 e 32.
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15 e 35. (8, 22, se houver infiltração em SNC)
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação da Remissão</b>				
Vepesid-16		150 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	1-2, 8-9, 15- 16
Tioguanina		60 g/m <sup>2</sup>	VO	1-21
Metotrexate		2 g/m <sup>2</sup>	EV	22, 43
Ácido folínico		15 mg/m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate- 4 doses
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	29
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	29- 36
6-mercaptopurina		50 mg/m <sup>2</sup>	VO	29- 57
Metotrexate		25 mg/m <sup>2</sup>	IM	29, 36, 50, 57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 29, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>INTENSIFICAÇÃO</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Doxorrubicina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L-asparaginase		6000 UI/m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10, 12
Dexametasona		10 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
Vepesid- 16		150 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 36, 43
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	29-30, 36-37, 43- 44, 50-51
Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	29-57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 29, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Interfase</b>				
Metotrexate		2 g/m <sup>2</sup>	EV	1, 22, 43
Ácido folínico		15 mg/m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate de

				6/6
L- asparaginase		10000 UI/m <sup>2</sup>	IM	2, 23, 44
6-mercaptopurina		60 g/m <sup>2</sup>	VO	1- 15, 22- 6, 43-57
Metotrexate		25 mg/m <sup>2</sup>	IM	8, 15, 50, 57
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	22, 29
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	22- 29
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8, 29, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação Tardia</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Daunoblastina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 mg/m <sup>2</sup>	IM	1 3, 5, 8, 10, 12
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
Ciclofosfamida		500 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 43
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da ciclofosfamida
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	29-30, 43-44
6- Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	29-49
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 36, 57 (17, 22, 24, 29 se receber radioterapia, a partir de então não faz mais MADIT)
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
**Radioterapia	Profilática			
	Terapêutica			
<b>MANUTENÇÃO</b>				
Metotrexate	Grupo 1	200 mg/ m <sup>2</sup> a cada 21 dias	EV	Da semana 22 à semana 106
	Grupo 2	200 mg/m <sup>2</sup> , a cada 21 dias escalonando 25mg/ m <sup>2</sup> até o teto de 300 mg/m <sup>2</sup> .		
Ácido folínico		5 mg/ m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 36 do Metotrexate- 2 doses
6-mercaptopurina		100 mg/ m <sup>2</sup> /dia (Mx 175 mg/dia)	VO	Por 10 dias a partir da hora 24 do Metotrexate
Vincristina		1,5 mg/ m <sup>2</sup> .	EV	A cada 4 semanas a partir da semana 34- 12 doses
Prednisona		40 mg/ m <sup>2</sup> - Por 7 dias	VO	A cada 4 semanas a partir da semana 34
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	A cada 8

	Aracytin	De acordo com a idade		semanas
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Dose padronizada do MADIT</b>				
	Idade (anos)	MTX (mg))	Ara-C (mg)	Volume Final (ml)
*MADIT	≥1 <3	10	20	6,7
	≥3 < 9	12	24	8,0
	≥9	15	30	10,0
	Dexametasona: 2 mg/ m <sup>2</sup> (máx. 2 mg)			

**Fonte:** Elaborado pela autora a partir do Protocolo de Tratamento GBTLI LLA (2009).

**Apêndice D - Protocolo de Tratamento GBTLI LLA-2009 (Grupo  
Alto Risco Responder Lento – AR RL).**

Medicação		Dose	Via	Dia
<b>Pré- Fase</b>				
MIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1
Prednisona		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-7
<b>Indução</b>				
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	8- 29
Vincristina		1.5 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
Daunoblastina		40 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 23
L- asparaginase		5000 UI/m <sup>2</sup>	IM	8, 11, 14,17, 20, 23,26, 29 E 32.
Ciclofosfamida		1g/ m <sup>2</sup> de 12/12 hs	EV	22, 23
Mesna		300 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15 e 35 (8, 22 se SNC-3)
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação da Remissão</b>				
Vincristina		1,5 mg/ m <sup>2</sup>	EV	1, 15, 43, 57
Vepesid-16		200 mg/ m <sup>2</sup>	EV	1, 15, 43, 57
Dexametasona		6 mg/ m <sup>2</sup>	VO	1-14, 43- 57
Doxorrubicina		25 mg/ m <sup>2</sup>	EV	1, 23, 43
Metotrexate		3 g/ m <sup>2</sup>	EV	22
Ácido fólnico		15 mg/ m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6
Ciclofosfamida		500 mg/ m <sup>2</sup> de 12/12 hs (3 doses)	EV	23-24
Mesna		300 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
Prednisona		60 mg/ m <sup>2</sup>	VO	22- 29
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 29, 57
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Intensificação</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Doxorrubicina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 UI/m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10, 12
Dexametasona		10 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
Vepesid- 16		150 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 36, 43
Aracyrin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	29-30, 36-37,



				43-44, 50-51
Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	29-57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 29, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Interfase</b>				
Metotrexate		5 g/m <sup>2</sup>	EV	1, 22, 43
Ácido folínico		15 mg/m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do MTX DE 6/6hs
L-asparaginase		10000 UI/m <sup>2</sup>	IM	2, 3, 44
6-mercaptopurina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-15, 22-36, 43-57
Metotrexate		25 mg/m <sup>2</sup>	IM	8, 15, 50, 57
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	22, 29
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	22-29
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8, 29, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação Tardia</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Daunoblastina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L-asparaginase		6000 mg/m <sup>2</sup>	IM	1 3, 5, 8, 10, 12
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
Ciclofosfamida		500 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 43
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da ciclofosfamida
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	29-30, 43-44
6- Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	29-49
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 36, 57 (17, 22, 24, 29- se receber radioterapia- a partir de então não faz mais MADIT)
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
**Radioterapia	Profilática	12 Gy		A partir do dia 15.
	Terapêutica	18 Gy		
<b>Manutenção</b>				
Metotrexate	Grupo 1	200 mg/ m <sup>2</sup> a cada 21 dias	EV	Da semana 22 à semana 106
	Grupo 2	200 mg/ m <sup>2</sup> , a cada 21 dias escalonando 25mg/ m <sup>2</sup> até o teto de 300 mg/ m <sup>2</sup> .		

Ácido folínico		5 mg/ m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 36 do MTX- 2 doses
6- merptopurina		100 mg/ m <sup>2</sup> /dia (Mx 175 mg/dia)	VO	Por 10 dias a partir da hora 24 do Metotrexate
Vincristina		1,5 mg/ m <sup>2</sup> .	EV	A cada 4 semanas a partir da semana 34- 12 doses
Prednisona		40 mg/ m <sup>2</sup> - Por 7 dias	VO	A cada 4 semanas a partir da semana 34
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	A cada 8 semanas
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Dose padronizada do MADIT</b>				
	Idade (anos)	MTX (mg))	Ara-C (mg)	Volume Final (ml)
*MADIT	≥1 <3	10	20	6,7
	≥3 < 9	12	24	8,0
	≥9	15	30	10,0
Dexametasona: 2 mg/ m <sup>2</sup> (máx. 2 mg)				
<b>Radioterapia</b>				
**Radioterapia		Pacientes com leucometria inicial ≥ 100.000/mm <sup>3</sup> ou do Subgrupo RL receberão radioterapia com 12Gy em SNC		A partir do dia 15.
	Terapêutica	Aqueles com SNC-3 ao diagnóstico receberão a radioterapia craneana com 18 Gy.		
	Obs: Pacientes irradiados será suspenso posteriormente o MADIT			

**Fonte:** Elaborado pela autora a partir do Protocolo de Tratamento GBTLI LLA (2009).

**Apêndice E - Protocolo de Tratamento GBTLI LLA-2009 (Grupo T-derivada Responder Rápido – LLA-T RR).**

Medicação	Dose	Via	Dia	
<b>Pré- Fase</b>				
MIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1
Prednisona		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-7
<b>Indução</b>				
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	8- 29
Vincristina		1.5 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
Daunoblastina		40 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22
L- asparaginase		10000 UI/m <sup>2</sup>	IM	14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30.
Ciclofosfamida		500 mg/ m <sup>2</sup> de 12/12 hs	EV	8
Mesna		300 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8, 15 e 35
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação da Remissão</b>				
Vepesid-16		150 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	1-2, 8-9, 15- 16
Tioguanina		60 mg/ m <sup>2</sup>	VO	1-15
Ciclofosfamida		1 g/m <sup>2</sup>	EV	1
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da ciclofosfamida
Metotrexate		2 g/m <sup>2</sup>	EV	22,43
Ácido fólnico		15 mg/m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 de 6/6
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	29
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	29-36
6-mercaptopurina		50 mg/m <sup>2</sup>	VO	29-57
Metotrexate		25 mg/m <sup>2</sup>	IM	29, 36, 50, 57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 29, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Intensificação</b>				
Vincristina		1,5 mg/ m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Doxorrubicina		25 mg/ m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 UI/ m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10, 12
Prednisona		40 mg/ m <sup>2</sup>	VO	1-14
Vepesid- 16		150 mg/ m <sup>2</sup>	EV	29, 36, 43
Aracytin		60 mg/ m <sup>2</sup>	SC	9-30, 36-37, 43-44, 50-51
6- Tioguanina		60 mg/ m <sup>2</sup>	VO	29-57

*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1, 22 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Interfase</b>				
Metotrexate		2 g/ m <sup>2</sup>	EV	1, 22, 43, 64
Ácido fólico		15 mg/ m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6
L- asparaginase		10000 UI/ m <sup>2</sup>	IM	2, 23, 44
6-mercaptopurina		60 mg/ m <sup>2</sup>	VO	1-15, 22-36, 43-57
Metotrexate		25 mg/ m <sup>2</sup>	IM	8, 15, 50, 57
Vincristina		1,5 mg/ m <sup>2</sup>	EV	22, 29
Prednisona		40 mg/ m <sup>2</sup>	VO	22-29
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8, 29, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação Tardia</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Daunoblastina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 UI/ m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10, 12
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
Ciclofosfamida		500 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 43
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da ciclofosfamida
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	30-31, 44-45, 51-52
6- Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	30-57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1, 29, 57
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
Radioterapia	Profilática	12 Gy		
	Terapêutica	18 Gy		
<b>Manutenção</b>				
Metotrexate		200 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias	EV	A cada 21 dias por 18 meses
Ácido fólico		5 mg/m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 36 do MTX- 2 doses
6-mercaptopurina		100 mg/m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 24 do MTX por 10 dias
<b>Pulso A</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	VO	1,8,15
Dexametasona		6 mg/m <sup>2</sup>		1-5, 10-14
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	Iniciar na semana 9. A cada 8 semanas
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		

<b>Dose padronizada do MADIT</b>				
	Idade (anos)	MTX (mg)	Ara-C (mg)	Volume Final (ml)
*MADIT	$\geq 1 < 3$	10	20	6,7
	$\geq 3 < 9$	12	24	8,0
	$\geq 9$	15	30	10,0
Dexametasona: 2 mg/ m <sup>2</sup> (máx. 2 mg)				
<b>Radioterapia</b>				
**Radioterapia	Profilática	Pacientes com leucometria inicial $\geq 100.000/\text{mm}^3$ ou do Subgrupo RL receberão radioterapia com 12Gy em SNC		A partir do dia 15
	Terapêutica	Aqueles com SNC-3 ao diagnóstico receberão a radioterapia craneana com 18 Gy.		
Obs: Pacientes irradiados, será suspenso posteriormente o MADIT				

**Fonte:** Elaborado pela autora a partir do Protocolo de Tratamento GBTLI LLA (2009).

**Apêndice F - Protocolo de Tratamento GBTLI LLA-2009 (LLA  
T-derivada Responder Lento LLA-T RL).**

Medicação		Dose	Via	Dia
<b>Pré- Fase</b>				
MIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1
Prednisona		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-7
<b>Indução</b>				
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	8- 29
Vincristina		1.5 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
Daunoblastina		40 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 9, 10,15
L- asparaginase		10000 UI/m <sup>2</sup>	IM	14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30.
Ciclofosfamida		500 mg/ m <sup>2</sup> de 12/12 hs	EV	8
Mesna		300 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8, 15 e 35
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação da Remissão</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 15, 43, 57
Vepesid-16		200 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 15, 43, 57
Dexametasona		6 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14, 43-57
Doxorrubicina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 23, 43
Metotrexate		5 g/m <sup>2</sup>	EV	22
Ácido folínico		15 mg/m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6hs
Ciclofosfamida		500 mg/m <sup>2</sup> - 3 doses	EV	23 e 24
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
Prednisona		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	22-29
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Intensificação</b>				
Vincristina		1,5 mg/ m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Doxorrubicina		25 mg/ m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 UI/ m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10, 12
Prednisona		40 mg/ m <sup>2</sup>	VO	1-14
Vepesid- 16		150 mg/ m <sup>2</sup>	EV	29, 36, 43
Aracytin		60 mg/ m <sup>2</sup>	SC	29-30, 36-37, 43-44, 50-51
6- Tioguanina		60 mg/ m <sup>2</sup>	VO	29-57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1, 22 50

	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Interfase</b>				
Metotrexate		5 g/ m <sup>2</sup>	EV	1, 22, 43
Ácido folínico		15 mg/ m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6
L- asparaginase		10000 UI/ m <sup>2</sup>	IM	2, 23, 44
6-mercaptopurina		60 mg/ m <sup>2</sup>	VO	1-15, 22-36, 43-57
Metotrexate		25 mg/ m <sup>2</sup>	IM	8, 15, 50, 57
Vincristina		1,5 mg/ m <sup>2</sup>	EV	22, 29
Prednisona		40 mg/ m <sup>2</sup>	VO	22-29
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8, 29, 50
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação Tardia</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Daunoblastina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 UI /m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10, 12
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
Ciclofosfamida		500 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 43
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da ciclofosfamida
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	29- 30, 43- 44
6- Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	29- 57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1, 29, 57 ( 16, 18, 23, 25, 30 no caso de indicação de radioterapia. A partir de então não deverá mais realizar MADIT)
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
Radioterapia	Profilática	12 Gy		
	Terapêutica	18 Gy		
<b>Manutenção</b>				
Metotrexate	Grupo 1	200 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias	EV	Da semana 22 à semana 106
	Grupo 2	200 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias, escalonando 25 mg/m <sup>2</sup> até o teto de 300 mg /m <sup>2</sup>		
Ácido folínico		5 mg/m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 36 do Metotrexate- 2 doses
6-mercaptopurina		100 mg/m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora

				24 do Metotrexate por 10 dias
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	De 4/4 semanas a partir da semana 34- total de 12 doses
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup> - por 7 dias	VO	A cada 4 semanas a partir da semana 34- total de 12 doses.
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	Iniciar na semana 30. A cada 8 semanas até semana 106
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Dose padronizada do MADIT</b>				
	Idade (anos)	MTX (mg)	Ara-C (mg)	Volume Final (ml)
*MADIT	≥1 <3	10	20	6,7
	≥3 <9	12	24	8,0
	≥9	15	30	10,0
Dexametasona: 2 mg/ m <sup>2</sup> (máx. 2 mg)				
<b>Radioterapia</b>				
**Radioterapia	Profilática	Pacientes com leucometria inicial ≥ 100.000/mm <sup>3</sup> ou do Subgrupo RL receberão radioterapia com 12Gy em SNC		A partir do dia 15.
	Terapêutica	Aqueles com SNC-3 ao diagnóstico receberão a radioterapia craneana com 18 Gy.		
	Obs: Pacientes irradiados, será suspenso posteriormente o MADIT			

**Fonte:** Elaborado pela autora a partir do Protocolo de Tratamento GBTLI LLA (2009).



**Apêndice G - Protocolo de Tratamento GBTLI LLA-2009 (Grupo LLA Ph+ - Responder Rápido LLA-Ph+ RR).**

Medicação		Dose	Via	Dia
<b>Pré- Fase</b>				
MIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1
Prednisona		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-7
<b>Indução</b>				
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	8- 29
Vincristina		1.5 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
Daunoblastina		40 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
L- asparaginase		10000 UI/m <sup>2</sup>	IM	16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32.
Ciclofosfamida		500 mg/ m <sup>2</sup> de 12/12 hs- 2 doses	EV	8
Mesna		300 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8, 15 e 35 (22 se SNC-3)
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação da Remissão</b>				
Vepesid-16		150 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	1-2, 8-9, 15- 16
Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-15
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>	VO	1- 21
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Mx. 2 mg)		
<b>Bloco 2</b>				
Metotrexate		2 g/ m <sup>2</sup>	EV	1
Ácido folínico		15 mg/ m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6
6- Tioguanina		100 mg/ m <sup>2</sup>	VO	2-5
Ciclofosfamida		200 mg/ m <sup>2</sup>	EV	5 e 6
Mesna		300 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida

Aracytin		1 g/ m <sup>2</sup> 12/12 hs- 2 doses	EV	7
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Bloco 3</b>				
Metotrexate		5 g/ m <sup>2</sup>	EV	1
Ácido folínico		15 mg/ m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6
6-mercaptopurina		100 mg/ m <sup>2</sup>	VO	2-5
Aracytin		1 g/ m <sup>2</sup> 12/12 hs- 2 doses	EV	5
L- asparaginase		10000 UI/ m <sup>2</sup>	IM	7
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Intensificação</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Doxorrubicina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 UI/m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10, 12
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
Vepesid-16		150 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 36, 43
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	EV	29-30, 36-37, 43-44
6- tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	30-51
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-22, 36-57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 43
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Bloco 2</b>				
Metotrexate		2 g/ m <sup>2</sup>	EV	1
Ácido folínico		15 mg/ m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6

6- Tioguanina		100 mg/ m <sup>2</sup>	VO	2-5
Ciclofosfamida		200 mg/ m <sup>2</sup>	EV	5 e 6
Mesna		300 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
Aracytin		1 g/ m <sup>2</sup> 12/12 hs – 2 doses	EV	7
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Bloco 3</b>				
Metotrexate		5 g/ m <sup>2</sup>	EV	1
Ácido folínico		15 mg/ m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6
6-mercaptopurina		100 mg/ m <sup>2</sup>	VO	2-5
Aracytin		1 g/ m <sup>2</sup> 12/12 hs	EV	5
L- asparaginase		10000 UI/ m <sup>2</sup>	IM	7
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação Tardia</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Daunoblastina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 UI /m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10, 12
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
Ciclofosfamida		500 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 43
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da ciclofosfamida
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	30-31, 44-45, 51-52
6- Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	30-57
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>	VO	8-22, 36-47
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1, 29, 57
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Mx. 2 mg)		
Radioterapia	Profilática	12 Gy		

	Terapêutica	18 Gy		
<b>Manutenção</b>				
Metotrexate		200 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias	EV	A cada 21 dias por 18 meses
Ácido folínico		5 mg/m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 36 do MTX- 2 doses
6-mercaptopurina		100 mg/m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 24 do MTX por 10 dias
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>	VO	5- 19 a cada 21 dias.
<b>Pulso A</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	VO	1,8,15
Dexametasona		6 mg/m <sup>2</sup>		1-5, 10-14
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>		1-14
<b>Pulso B</b>				
Ciclofosfamida		500 mg/m <sup>2</sup>		1 e 8
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>		Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>		1-2, 7-8
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>		1-14
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	Iniciar na semana 9. A cada 8 semans
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Dose padronizada do MADIT</b>				
	Idade (anos)	MTX (mg))	Ara-C (mg)	Volume Final (ml)
*MADIT	≥1 <3	10	20	6,7
	≥3 < 9	12	24	8,0
	≥9	15	30	10,0
Dexametasona: 2 mg/ m <sup>2</sup> (máx. 2 mg)				
<b>Radioterapia</b>				
**Radioterapia	Profilática	Pacientes com leucometria inicial ≥ 100.000/mm <sup>3</sup> ou do Subgrupo RL receberão radioterapia com 12Gy em SNC		A partir do dia 15.
	Terapêutica	Aqueles com SNC-3 ao		

		diagnóstico receberão a radioterapia craniana com 18 Gy.		
Obs: Pacientes irradiados, será suspenso posteriormente o MADIT				

**Fonte:** Elaborado pela autora a partir do Protocolo de Tratamento GBTLI LLA (2009).

**Apêndice H - Protocolo de Tratamento GBTLI LLA-2009 (Grupo Ph+ - Responder Lento - LLA-Ph+ RL).**

Medicação		Dose	Via	Dia
<b>Pré-Fase</b>				
MIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1
Prednisona		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-7
<b>Indução</b>				
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	8- 29
Vincristina		1.5 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 15, 22 e 29
Daunorrubicina		40 mg/m <sup>2</sup>	EV	8, 9, 10 e 15
L-asparaginase		10000 UI/m <sup>2</sup>	IM	16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32.
Ciclofosfamida		500 mg/ m <sup>2</sup> de 12/12 hs- 2 doses	EV	8
Mesna		300 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
Mesilato de Imatinibe		340 mg/ m <sup>2</sup>	VO	16- 33
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	align="center">IT	align="center">8, 15 e 35 (22 se SNC+)
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Bloco 1</b>				
Ifosfamida		1,8 g/ m <sup>2</sup>	EV	1- 4
Mesna		400 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0, 4 e 8 da Ifosfamida
Vepesid-16		150 mg/ m <sup>2</sup>	EV	1- 4
Mesilato de Imatinibe		340 mg/ m <sup>2</sup>	VO	8- 22
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	align="center">IT	align="center">15
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Bloco 2</b>				
Metotrexate		2 g/ m <sup>2</sup>	EV	1
Ácido folínico		15 mg/ m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6
6- Tioguanina		100 mg/ m <sup>2</sup>	VO	2-5
Ciclofosfamida		200 mg/ m <sup>2</sup> de 12/12 hs, 4 doses	EV	5 e 6

Mesna		300 mg/ m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
Aracytin		1 g/ m <sup>2</sup> de 12/12 hs- 2 doses	EV	7
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Bloco 3</b>				
Metotrexate		5 g/ m <sup>2</sup>	EV	1
Ácido folínico		15 mg/ m <sup>2</sup>	EV	A partir da hora 36 do Metotrexate, de 6/6
6- Meracptopurina		100 mg/ m <sup>2</sup>	VO	2-5
Aracytin		1 g/ m <sup>2</sup> 12/12 hs- 2 doses	EV	5
L- asparaginase		10000 UI/ m <sup>2</sup>	IM	7
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	8
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Intensificação</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Doxorrubicina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 UI/m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10, 12
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
Vepesid-16		150 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 36, 43
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	29-30, 36-37, 43-44
6- tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	30-51
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-22, 36-57
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	15, 43
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Consolidação Tardia</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
Daunoblastina		25 mg/m <sup>2</sup>	EV	1, 8, 15
L- asparaginase		6000 UI/ m <sup>2</sup>	IM	1, 3, 5, 8, 10,12
Prednisona		40 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14

Ciclofosfamida		500 mg/m <sup>2</sup>	EV	29, 43
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>		Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	30-31, 44-45, 51-52
6- Tioguanina		60 mg/m <sup>2</sup>	VO	30-57
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>	VO	8-22, 36-47
*MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	1, 29, 57
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
Radioterapia	Profilática	12 Gy		
	Terapêutica	18 Gy		
<b>Manutenção</b>				
Metotrexate		200 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias	EV	A cada 21 dias por 18 meses
Ácido folínico		5 mg/m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 36 do Metotrexate de 6/6 horas- 2 doses
6-mercaptopurina		100 mg/m <sup>2</sup>	VO	A partir da hora 24 do Metotrexate por 10 dias
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
<b>Pulso A</b>				
Vincristina		1,5 mg/m <sup>2</sup>	EV	1,8,15
Dexametasona		6 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-5, 10-14
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
<b>Pulso B</b>				
Ciclofosfamida		500 mg/m <sup>2</sup>	EV	1 e 8
Mesna		300 mg/m <sup>2</sup>	EV	Na hora 0 e 4 da Ciclofosfamida
Aracytin		60 mg/m <sup>2</sup>	SC	1-2, 7-8
Mesilato de Imatinibe		340 mg/m <sup>2</sup>	VO	1-14
MADIT	Metotrexate	De acordo com a idade	IT	Iniciar na semana 9. A cada 8 semans
	Aracytin	De acordo com a idade		
	Dexametasona	2 mg/m <sup>2</sup> (Máx. 2 mg)		
<b>Dose padronizada do MADIT</b>				
	Idade (anos)	MTX (mg))	Ara-C (mg)	Volume Final



				(ml)
*MADIT	$\geq 1 < 3$	10	20	6,7
	$\geq 3 < 9$	12	24	8,0
	$\geq 9$	15	30	10,0
Dexametasona: 2 mg/ m <sup>2</sup> (máx. 2 mg)				
<b>Radioterapia</b>				
**Radioterapia	Profilática	Pacientes com leucometria inicial $\geq 100.000/\text{mm}^3$ ou do Subgrupo RL receberão radioterapia com 12Gy em SNC		A partir do dia 15.
	Terapêutica	Aqueles com SNC-3 ao diagnóstico receberão a radioterapia craneana com 18 Gy.		
Obs: Pacientes irradiados, será suspenso posteriormente o MADIT				

**Fonte:** Elaborado pela autora a partir do Protocolo de Tratamento GBTLI LLA (2009).

## Apêndice I - Ficha de Cadastro e Identificação do Paciente.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA



**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA  
DO AMAZONAS-FHEMOAM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA-PPGH  
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA  
PROJETO: ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS**

### Ficha de Cadastro (Identificação)

Nome do paciente:		
Nome da Mãe:		
Registro:	Registro do Projeto:	Idade:
<b>Naturalidade:</b> <input type="checkbox"/> Manaus e região Metropolitana de Manaus <input type="checkbox"/> Interior do Estado do Amazonas: _____ <input type="checkbox"/> Outros estados: _____. <input type="checkbox"/> Outros países: _____. 		<b>Procedência:</b> <input type="checkbox"/> Manaus e região Metropolitana de Manaus <input type="checkbox"/> Interior do Estado do Amazonas: _____ <input type="checkbox"/> Outros estados: _____. <input type="checkbox"/> Outros países: _____. 
Gênero: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F Raça: <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Não Branca <input type="checkbox"/> indígena		Data do nascimento: ___/___/___. Data do diagnóstico: ___/___/___. Data do início do tratamento: ___/___/___. Data do término da indução: ___/___/___. 
Idade: em anos <input type="checkbox"/> 0 a <1 <input type="checkbox"/> 9 a <14 <input type="checkbox"/> 1 a <5 <input type="checkbox"/> 14 a <18 <input type="checkbox"/> 5 a <9		Data de início da coleta: ___/___/___. Data de término da coleta: ___/___/___. 
*Infecção há até 4 semanas antes da coleta/ diagnóstico? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim: _____ *Recebeu algum medicamento há 4 semanas? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim: _____ Recebeu alguma vacina há 4 semanas? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim: _____ *Recebeu transfusão? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim: _____ *Febre? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim: _____ *Perda de peso? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim: _____		No exame Físico: *Linfonodos: <input type="checkbox"/> Não palpáveis <input type="checkbox"/> > 2 cm: _____. *Hepatomegalia: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim _____cm *Esplenomegalia: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim _____cm *Testículos: <input type="checkbox"/> normais <input type="checkbox"/> alterados: Direito___Esquerdo___(se aumentado colocar X no lado comprometido). *Lesões de pele? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim: _____


Responsável pela Avaliação: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_.

## Apêndice J - Ficha de Cadastro (Estado Nutricional do Paciente).



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA**  
**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**  
**DO AMAZONAS-FHEMOAM**



**PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA-PPGH**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA**  
**PROJETO: ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA**  
**LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS**

### Ficha de Cadastro (Estado Nutricional)

Nome do paciente:				
Nome da Mãe:				
Registro:		Registro do Projeto:		Idade:
	<b>AO DIAGNÓSTICO</b>	<b>D8</b>	<b>D15</b>	<b>D35</b>
Data				
Peso (Kg)				
Estatura (cm)				
Circunferência braquial(cm)				
Prega cutânea tricipital (mm)				

### Estado Nutricional

	<b>AO DIAGNÓSTICO</b>	<b>D8</b>	<b>D15</b>	<b>D35</b>
Data				
Desnutrição leve				
Desnutrição moderada				
Desnutrição grave				
Eutrofia				

Responsável pela Avaliação: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_.

## Apêndice K - Ficha de Cadastro (Laboratório).



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA

**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA**

DO AMAZONAS-FHEMOAM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA-PPGH

MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA

**PROJETO: ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA**

**LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS**



### Ficha de Cadastro (Laboratório)

Nome do paciente: _____		
Nome da Mãe: _____		
Registro: _____	Registro do Projeto: _____	Idade: _____
<b>Grupo de risco:</b> <input type="checkbox"/> B-derivada RB <input type="checkbox"/> Ph <sup>+</sup> <input type="checkbox"/> B-derivada AR <input type="checkbox"/> Lactente MLL neg <input type="checkbox"/> T-derivada <input type="checkbox"/> Lactente MLL pos		<b>Acometimento extramedular:</b> Testículo: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não SNC: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Outros: _____
Mudança de grupo de risco: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Grupo de risco da mudança: _____		
<b>Raio-x de tórax:</b>		
Realizado: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Resultado: <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> alterado: _____		
<b>Resultado do hemograma ao diagnóstico:</b> Leucócitos/mm <sup>3</sup> : _____ Blastos: _____ Hemoglobina/ hematócrito: _____ Plaquetas: _____ Linfócitos: _____		<b>Leucometria inicial /mm<sup>3</sup>:</b> <input type="checkbox"/> <10.000 <input type="checkbox"/> ≥ 10.000 e < 50.000 <input type="checkbox"/> ≥ 50.000 e < 100.000 <input type="checkbox"/> ≥ 100.000
<b>Concentração de hemoglobina inicial:</b> <input type="checkbox"/> < 7 g% <input type="checkbox"/> ≥ 7 g% e <10g% <input type="checkbox"/> ≥ 10g%		<b>Plaquetas iniciais:</b> <input type="checkbox"/> < 20.000/mm <sup>3</sup> <input type="checkbox"/> ≥ 20.000 < 50.000 <input type="checkbox"/> ≥ 50.000 <100.000 <input type="checkbox"/> ≥ 100.000
<b>Resultado do líquor ao diagnóstico:</b> Leucócitos/mm <sup>3</sup> : _____ Blastos: <input type="checkbox"/> presentes <input type="checkbox"/> ausentes		<b>**Medula óssea</b> D15: <input type="checkbox"/> M1, <input type="checkbox"/> M2, <input type="checkbox"/> M3 D35: <input type="checkbox"/> M1, <input type="checkbox"/> M2, <input type="checkbox"/> M3



## Apêndice L - Ficha de Cadastro (Perfil Imunológico).



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA**  
**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**  
**DO AMAZONAS-FHEMOAM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA-PPGH**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA**  
**PROJETO: ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA**  
**LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS**

### Ficha de Cadastro (Perfil Imunológico)

Nome do paciente:		
Nome da Mãe:		
Registro:	Registro do Projeto:	Idade:

Perfil Celular				
	AO DIAGNÓSTICO	D8	D15	D35
Data:				
LT (CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> )				
NK CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> )				
LTreg (CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> /FoxP3 <sup>+</sup> )				

Perfil das Citocinas Séricas					
CITOCINAS		AO DIAGNÓSTICO	D8	D15	D35
<b>Th1</b>	IL-2				
	INF- $\gamma$				
	TNF- $\alpha$				
<b>Th2</b>	IL-4				
	IL-5				
	IL-6				
	IL-10				
	IL-13				
<b>Th17</b>	IL-17				

Responsável pela Avaliação: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_.

## Apêndice M - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Pais/Responsáveis de Pacientes com LLA.



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA



DO AMAZONAS-FHEMOAM  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA-PPGH  
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA  
PROJETO: ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO NA  
PESQUISA INTITULADA “ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM  
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS”.

### PAIS/RESPONSÁVEIS (PACIENTES)

Seu (sua) filho (a) tem um câncer no sangue chamado leucemia linfóide aguda. Ele iniciará o tratamento com o Protocolo Brasileiro para Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda na Infância e Adolescência (GBTLI- 2009) e será incluído em um dos cinco grupos de risco de recidiva, são estes: Baixo Risco, Alto Risco, Grupo de Lactentes, Leucemia T-derivada e Leucemia cromossomo Philadelphia positivo.

Estamos nos dirigindo a você(s) para solicitar autorização de que seu (sua) filho (a) participe de um estudo de pesquisa que tem como objetivo acompanhar a imunossupressão, que é a diminuição da defesa do organismo de seu filho, por conta da própria doença e/ou pelo tratamento quimioterápico.

O planejamento do acompanhamento destes níveis de baixa imunidade, a coleta das amostras para estudo, serão realizadas no momento das coletas de sangue de controle laboratorial de rotina do tratamento da leucemia.

Se você(s) concordar(em) que seu(sua) filho(a) participe do estudo, ele(a) irá fazer coletas de sangue ao diagnóstico da doença, 8 dias de tratamento, com 15 dias de tratamento e depois com 35 dias de tratamento de Indução. A indução é a primeira parte do protocolo de tratamento da leucemia.

**Riscos e desconfortos:** Existem riscos próprios da coleta de sangue, tais como hematomas, equimoses (manchas arroxeadas) no local da punção, que fazem parte dos riscos da rotina.

**Benefícios:** Ter disponível as características da baixa imunidade durante o tratamento e possibilitar condutas futuras de tratamento, beneficiando crianças que participarem de



posteriores tratamentos para leucemia linfóide aguda.

**Confidencialidade:** A identidade da sua criança não será revelada em publicações. Os registros do prontuário também são confidenciais e, sob a responsabilidade do Hospital.

**Participação Voluntária:** A participação da sua criança neste estudo é voluntária. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo para sua criança, assim como, não comprometerá o cuidado médico com a mesma.

**Você(s) permite(m) que sejam guardadas amostras de sangue para pesquisas futuras?**

Sim

Não

**Esclarecimento de dúvidas:** A qualquer momento, em caso de dúvidas, solicite(m) ao médico(a) do seu(sua) filho(a) os esclarecimentos necessários. Você(s) poderá(ão) também contatar a Pesquisadora do Estudo. Abaixo estão meus dados para contato.

Nome: **Maria do P. Socorro Sampaio Carvalho**

RG:541982 / CPF: 214668232-91

Endereço: Av. Constantino Nery, 4.397 - Chapada, CEP: 69,002-50 /

Manaus – AM Telefone(s): (92) 3655 0100, Fax: (92) 3656 2066

e- mail: socorro\_sampaio@yahoo.com.br



**Apêndice N - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) -  
Pais/Responsáveis- Criança Saudável.**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA**



**DO AMAZONAS-FHEMOAM  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA-PPGH  
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA  
PROJETO: ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO NA  
PESQUISA INTITULADA “ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM  
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS”.**

**PAI(S) / RESPONSÁVEL(IS) (CRIANÇA SAUDÁVEL)**

Seu (sua) filho (a) está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, de um estudo de pesquisa que tem como objetivo acompanhar a imunossupressão, que é a diminuição da defesa do organismo, por conta da própria doença e/ou pelo tratamento quimioterápico, de pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda na Fundação Hemoam. Neste estudo participarão 28 crianças saudáveis e seu filho está sendo convidado a participar deste estudo como criança saudável.

Se você (s) concordar (em) que seu(sua) filho(a) participe do estudo, será preenchida uma ficha com dados pessoais, físicos e condição de saúde atual, agendado uma consulta com a nutricionista da FHEMOAM para avaliar seu estado nutricional e um horário no Laboratório de Análises Clínicas ou na sala de procedimentos da Fundação Hemoam que está localizado na Avenida Constantino Nery, 4397-Chapada, CEP 69.050-002 Manaus- Amazonas, para coleta das amostras de sangue periférico para a pesquisa.

A coleta das amostras para o estudo serão realizadas concomitantes com as da coleta do exame solicitado pelo médico da triagem. Será feito a coleta de 3 ml de sangue periférico, para serem divididos da seguinte forma: 1 ml em tubo com anticoagulante (EDTA) e 2 ml em tubo sem anticoagulante.

**Riscos e desconfortos:** Existem riscos próprios da coleta das amostras de sangue que fazem parte da rotina de sua coleta, tais como hematomas ou equimoses (manchas arroxeadas) no local de punção.

CXXX

**Benefícios:** Ter disponível as características do perfil imune que será comparado aos

dos pacientes com leucemia linfóide aguda. Poderá levar benefício para crianças que participarem de futuros tratamentos para leucemia linfóide aguda.

**Confidencialidade:** A identidade da sua criança não será revelada em publicações. Os registros do prontuário também são confidenciais e sob a responsabilidade do Hospital.

**Participação Voluntária:** A participação da sua criança neste estudo é voluntária. A recusa na participação não levará a nenhum prejuízo para sua criança.

**Você(s) permite(m) que sejam guardadas amostras de sangue para pesquisas futuras?**

Sim

Não

**Esclarecimento de dúvidas:** A qualquer momento, em caso de dúvidas, solicite(m) ao pesquisador(a) do Estudo esclarecimentos necessários. Abaixo estão os dados para contato.

Nome: **Maria do P. Socorro Sampaio Carvalho**

RG:541982 / CPF: 214668232-91

Endereço: Av. Constantino Nery, 4.397 - Chapada, CEP: 69.002-50 /

Manaus – AM Telefone(s): (92) 3655 0100; Fax: (92) 3656 2066

e- mail: socorro\_sampaio@yahoo.com.br

### Autorização

Eu li este documento a respeito do estudo “Estudo do perfil imunológico em crianças com leucemia linfóide aguda no Amazonas” ou ele foi lido para mim. Eu fui informado sobre os riscos e benefícios. Decidi que meu (minha) filho (a) participe desta pesquisa de forma voluntária. Eu sei, também, que tenho a liberdade de recusar a participação de meu (minha) filho (a) neste estudo e, assim mesmo, minha criança continuará a receber o atendimento médico nesse serviço, caso seja necessário. Eu receberei uma cópia deste consentimento.

Eu dei permissão para meu (minha) filho (a) \_\_\_\_\_ faça parte de forma voluntária do estudo “*Estudo do Perfil imunológico em crianças com leucemia linfóide aguda no Amazonas*” em / /.

_____	_____/_____/_____
Assin. Pai criança	Data
_____	_____/_____/_____
Assin. Mãe criança	Data
_____	_____/_____/_____
Testemunha	Data

Eu expliquei aos familiares/criança este estudo e, considero que eles tiveram suficiente informação com respeito aos riscos e benefícios, fazendo uma decisão embasada. Eu informarei aos mesmos, no momento oportuno, quaisquer modificações no procedimento.

_____	_____/_____/_____
Assin. Médico	Data

## **Apêndice O - Termo de Assentimento Informado (TAI) - Criança com LLA.**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA**



**DO AMAZONAS-FHEMOAM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA-PPGH  
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA  
PROJETO: ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS**

**TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO (TAI) PARA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA  
INTITULADA “ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS”.**

**(CRIANÇA EM TRATAMENTO)**

Nome: \_\_\_\_\_

Este formulário de assentimento informado é para crianças/adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda entre as idades de 6 anos (alfabetizadas) a menor de 18 anos que comparecerão a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-FHEMOAM.

Meu nome é Maria do Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho, sou médica pediatra e hematologista, e vou pesquisar sobre a imunossupressão, que é a baixa defesa do organismo, nos pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda em tratamento na FHEMOAM.

Estou convidando-o a participar desta pesquisa, que será sobre o estudo da baixa imunidade do organismo através das células do sangue.

Você pode escolher se quer participar ou não. Discutimos esta pesquisa com seu (s) pai (s) ou responsável l(is) e ele(s) sabe(m) que estamos conversando com você pedindo seu acordo.

Para você participar da pesquisa, seu (s) pai (s) ou responsável (is), deverão concordar. Mas se você não quiser fazer parte desta pesquisa, você não é obrigado, mesmo se seus pais concordarem.

Você pode falar com qualquer pessoa que quiser sobre a pesquisa antes de tomar uma decisão. Não precisa decidir imediatamente. Se tiver dúvida em relação a alguma palavra ou quiser que seja explicada novamente, por favor, peça que lhe explicarei.

Se você concordar participar do estudo, será preenchida uma ficha com dados

pessoais, físicos e condição de saúde atual, agendado uma consulta com a nutricionista da FHEMOAM para avaliar o seu estado nutricional e um horário no Laboratório de Análises Clínicas ou na Sala de Procedimentos da FHEMOAM que está localizada na Avenida Constantino Nery, 4397-Chapada, CEP 69.050-002 Manaus-Amazonas, para coleta das amostras de sangue periférico para a pesquisa.

As coletas das amostras para o estudo serão realizadas após a consulta com médico triador ou hematologista e após preenchimento do Termo de Assentimento Informado.

Será feito a coleta de 3 ml de sangue em veia periférica para serem divididos da seguinte forma: 1 ml em tubo com anticoagulante-EDTA e, 2 ml em tubo sem anticoagulante. Esta coleta será feita no momento da coleta do exame solicitado pelo seu médico.

**Riscos e desconfortos:** Existem riscos como formação de hematomas, equimoses (manchas arroxeadas), no local da punção, próprios da coleta das amostras de sangue que fazem parte da rotina de seus exames.

**Benefícios:** Proporcionar para outras crianças com LLA a possibilidade de um melhor futuro tratamento no futuro.

**Confidencialidade:** A sua identidade não será revelada em publicações. Os registros do prontuário

também são confidenciais, ou seja será secreto e estará sob a responsabilidade do Hospital.

**Participação Voluntária:** A sua participação neste estudo é voluntária. A recusa na participação não leva a nenhum prejuízo para você.

**Você permite que sejam guardadas amostras de sangue para pesquisas futuras?**

Sim

Não

**Esclarecimento de dúvidas:** A qualquer momento, em caso de dúvidas, solicite a pesquisadora do Estudo esclarecimentos necessários. Abaixo estão os dados para contato.

Nome: **Maria do P. Socorro Sampaio Carvalho**

RG:541982 / CPF: 214668232-91

Endereço: Av. Constantino Nery, 4.397, Chapada, CEP: 69.002-50 /

Manaus – AM Telefone(s): (92) 3655 0100

Fax: (92) 3656 2066

e- mail: socorro\_sampaio@yahoo.com.br



## Autorização

Eu li este documento ou o mesmo foi lido para mim, a respeito do estudo “*Estudo do perfil imunológico em crianças com leucemia linfoide aguda no Amazonas*”. Fui informado sobre os riscos e benefícios. Decidi que participarei desta pesquisa de forma voluntária. Eu sei, também, que tenho a liberdade de recusar a participação neste estudo e, assim mesmo, continuarei a receber o atendimento médico usual. Eu receberei uma cópia deste consentimento.

Eu, \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ dou permissão para fazer parte de forma voluntária do estudo  
 “Estudo do Perfil imunológico em crianças com leucemia linfoide aguda no Amazonas”.

\_\_\_\_\_  
 Assin.da

criança/adolescente

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Testemunha

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Data

Eu expliquei a criança/ adolescente este estudo e, considero que ele teve suficiente informação com respeito aos riscos e benefícios, fazendo uma decisão embasada. Eu informarei ao mesmo, no momento oportuno, quaisquer modificações no procedimento.

\_\_\_\_\_  
 Assin. Médico

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Data

## **Apêndice P - Termo de Assentimento Informado (TAI) – Criança Saudável.**



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS-UEA  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA**



**DO AMAZONAS-FHEMOAM  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA-PPGH  
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA  
PROJETO: ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS**

**TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO- (TAI) PARA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA  
INTITULADA “ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS”.**

**(CRIANÇA SAUDÁVEL)**

Nome: \_\_\_\_\_

Este formulário de Assentimento Informado é para crianças/adolescentes saudáveis entre as idades de 6 anos (alfabetizadas) e menor de 18 anos que comparecerão a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-FHEMOAM.

Meu nome é Maria do Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho, sou médica pediatra e hematologista, e vou pesquisar sobre a baixa defesa do organismo, nos pacientes com diagnóstico de leucemia. Estas amostras de sangue permitirão os estudos das características da defesa do seu organismo através das células do sangue.

Neste estudo irão participar 16 crianças saudáveis e estou convidando-o a participar deste estudo, como uma dessas crianças saudáveis.

Você pode escolher se quer participar ou não. Discutimos esta pesquisa com seu (s) pai (s) ou responsável (is) e ele (s) sabe(m) que estamos conversando com você pedindo seu acordo.

Para você participar da pesquisa, seu (s) pai (s) ou responsável (is), deverão concordar. Mas se você não quiser fazer parte desta pesquisa, você não é obrigado a participar, mesmo se seus pais concordarem.

Você pode falar com qualquer pessoa que quiser sobre a pesquisa antes de tomar uma decisão. Você não precisa decidir imediatamente. Se tiver dúvida em relação a alguma palavra ou quiser que seja explicada novamente, por favor peça que lhe explicarei.

Se você concordar participar do estudo, será preenchida uma ficha com dados pessoais, físicos e condição de saúde atual, agendado uma consulta com a nutricionista da FHEMOAM para avaliar o seu estado nutricional e um horário no Laboratório de Análises Clínicas ou na Sala de Procedimentos da FHEMOAM que está localizada na Avenida Constantino Nery, 4397-Chapada, CEP 69.050-002 Manaus - Amazonas, para coleta das amostras de sangue periférico para a pesquisa.

As coletas das amostras para o estudo será realizada após a consulta com médico triador e após preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Será feito a coleta de 3 ml de sangue para serem divididos da seguinte forma: 1 ml em tubo com anticoagulante-EDTA e 2 ml em tubo sem anticoagulante. Esta coleta de amostras será realizada no momento da coleta de seu exame solicitado pelo médico da triagem.

**Riscos e desconfortos:** Existem riscos como formação de hematomas, equimoses (manchas arroxeadas), no local da punção, próprios da coleta das amostras de sangue que fazem parte da rotina de seus exames.

**Benefícios:** Proporcionar para crianças com leucemia linfóide aguda a possibilidade de um melhor tratamento no futuro.

**Confidencialidade:** A sua identidade não será revelada em publicações. Os registros do prontuário também são confidenciais, ou seja será secreto e estará sob a responsabilidade do Hospital.

**Participação Voluntária:** A sua participação neste estudo é voluntária. A recusa na participação não levará a nenhum prejuízo para você.

**Você permite que sejam guardadas amostras de sangue para pesquisas futuras?**

Sim

Não

**Esclarecimento de dúvidas:** A qualquer momento, em caso de dúvidas, solicite a pesquisadora do Estudo esclarecimentos necessários. Abaixo estão os dados para contato.

Nome: **Maria do P. Socorro Sampaio Carvalho**

RG:541982 / CPF: 214668232-91

Endereço: Av. Constantino Nery, 4.397 - Chapada, CEP: 69.002-50 /

Manaus – AM Telefone(s): (92) 3655 0100, Fax: (92) 3656 2066

e- mail: socorro\_sampaio@yahoo.com.br cxliv

**Autorização**

Eu li este documento ou o mesmo foi lido para mim, a respeito do estudo “**Estudo do perfil imunológico em crianças com leucemia linfóide aguda no Amazonas**”. Fui informado sobre os riscos e benefícios. Decidi que participarei desta pesquisa de forma voluntária. Eu sei, também, que tenho a liberdade de recusar de fazer parte neste estudo e, assim mesmo, continuarei a receber o atendimento médico usual nesse serviço, caso precise. Eu receberei uma cópia deste termo de assentimento.

Eu, \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ dou permissão para fazer parte de forma voluntária do estudo “*Estudo do Perfil imunológico em crianças com leucemia linfóide aguda no Amazonas*”.

\_\_\_\_\_  
 Assin. da criança/adolescente

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Testemunha

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Data

Eu expliquei a criança/ adolescente este estudo e, considero que ele teve suficiente informação com respeito aos riscos e benefícios, fazendo uma decisão embasada.

\_\_\_\_\_  
 Assin. Médico

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Data

---

# ANEXOS

**ANEXOS****Anexo A - Ficha do Serviço Social da FHEMOAM**

## FICHA SOCIAL DO

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_

Nacionalidade: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_ Identidade: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_ CNS: \_\_\_\_\_

## FILIAÇÃO

Mãe: \_\_\_\_\_

Pai: \_\_\_\_\_

Responsável \_\_\_\_\_

## RESIDÊNCIA

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Acesso: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

## RESIDÊNCIA

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Acesso: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Data	Diagnóstico
	cxlii

Situação Econômica: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Escolar: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Profissional: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Parecer Social: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Proposta: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

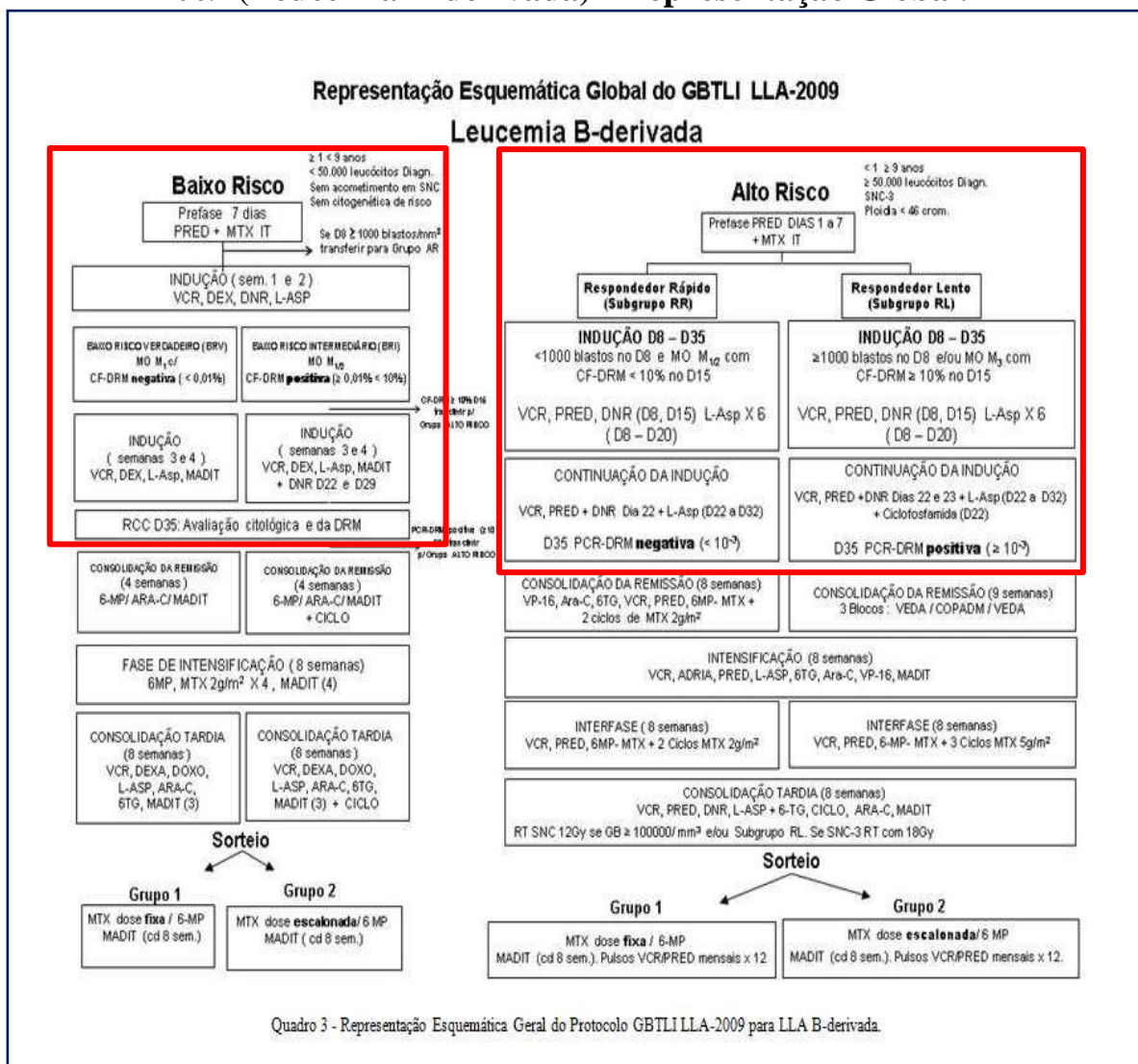
Situação Socio-econômica: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

---

**Fonte:** Serviço Social de Atendimento aos Pacientes da FHEMOAM.

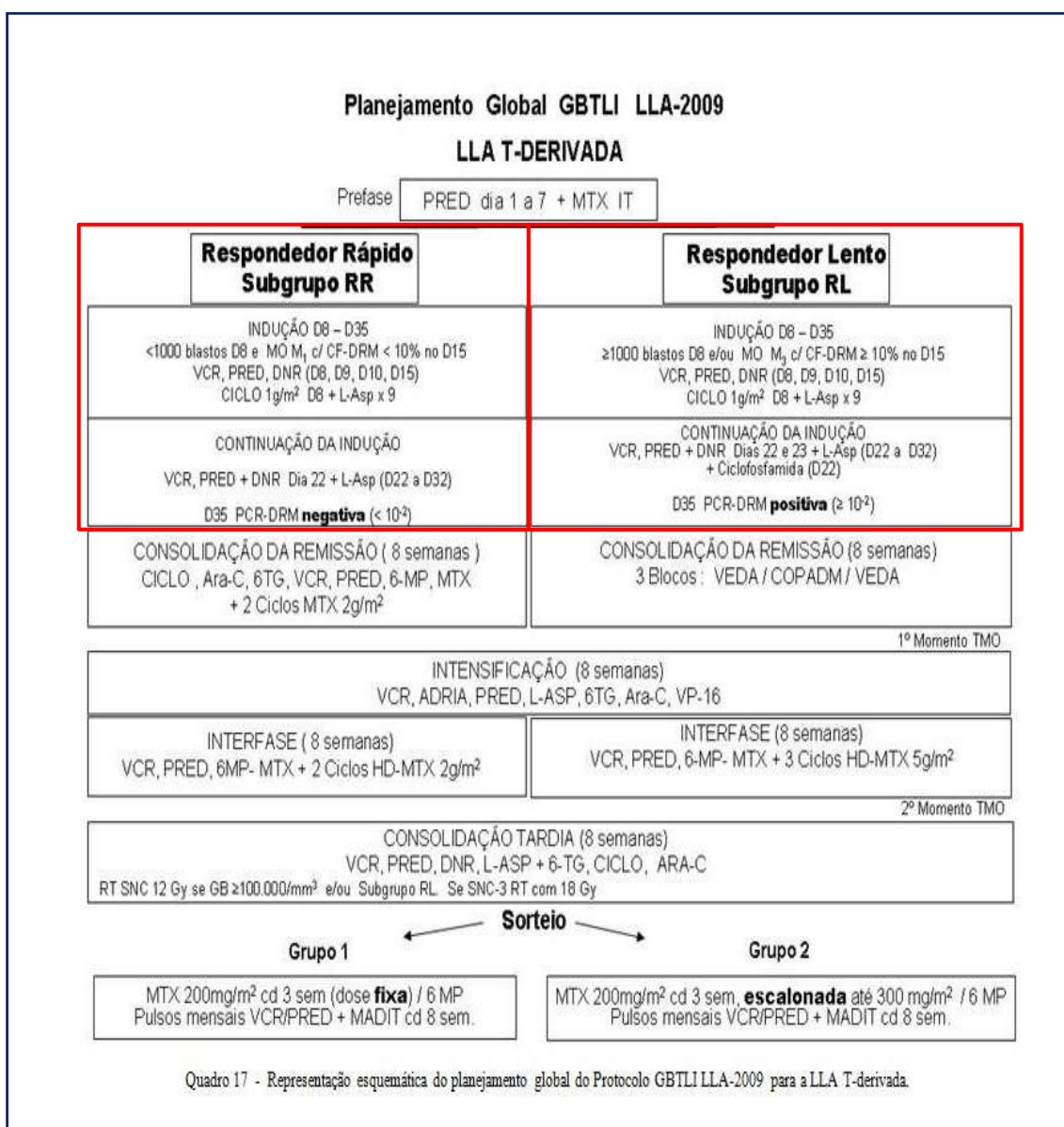
## Anexo B - Representação esquemática da Indução do Protocolo GBTLI-2009 (Leucemia B-derivada) - Representação Global.



Fonte: Protocolo GBTLI-LLA (2009).



## Anexo C - Representação esquemática da Indução do



### Protocolo GBTLI-2009 (Leucemia T-derivada) - Planejamento Global.

Fonte: Protocolo GBTLI-LLA (2009).

## Anexo D - Representação esquemática da Indução do

Protocolo GBTLI LLA-2009 LLA Ph <sup>+</sup>	
Prefase <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PRED dias 1 a 7 + MTX IT</span>	
Respondedor Rápido Subgrupo RR	Respondedor Lento Subgrupo RL
<p style="text-align: center;"><b>INDUÇÃO D8 – D35</b> Blast. &lt;1000/mm<sup>3</sup> no D8 e MO M<sub>1/2</sub> c/ CF-DRM &lt; 10% no D15 VCR, PRED, DNR (D9, D10) L-Asp X 6 (D16 – 28)</p>	<p style="text-align: center;"><b>INDUÇÃO D8 – D35</b> Blast: ≥ 1000/mm<sup>3</sup> no D8 e/ou MO M<sub>2</sub> c/ CF-DRM ≥ 10% no D15 VCR, PRED, DNR (D9, D10) L-Asp X 6 (D16 – 28)</p>
<p style="text-align: center;">Continuação da indução VCR, PRED + DNR D22 + L-Asp x 9 (D16 a 33) D35 PCR-DRM <b>negativo</b> (&lt; 10<sup>-3</sup>)</p>	<p style="text-align: center;">Continuação da indução VCR, PRED + DNR D22, 23, 24 + L-Asp x 3 (D22 a 26) + Imatinibe (D16-33) + Ciclofosfamida D22 D35 PCR-DRM <b>positivo</b> (≥ 10<sup>-3</sup>)</p>
<p style="text-align: center;">CONSOLIDAÇÃO DA REMISSÃO (3 semanas) VP-16, Ara-C, 6TG + Imatinibe D1- 21</p>	<p style="text-align: center;">BLOCO 1 IFO, VP-16 + Imatinibe D1 - 14</p>
<p style="text-align: center;">BLOCO 2 MTX 2g/m<sup>2</sup>, 6TG, CICLO, Ara-C</p>	<p style="text-align: center;">BLOCO 2 MTX 5g/m<sup>2</sup>, 6TG, CICLO, Ara-C</p>
<p style="text-align: center;">BLOCO 3 MTX 2g/m<sup>2</sup>, 6MP, Ara-C, L-ASP</p>	<p style="text-align: center;">BLOCO 3 MTX 5g/m<sup>2</sup>, 6MP, Ara-C, L-Asp</p>
1º Momento TMO	
Intensificação (8 semanas) VCR, PRED, ADRIA, L-ASP, Ara-C, 6TG + Imatinibe (dias 1- 22 e 30 – 51)	
<p style="text-align: center;">BLOCO 2 MTX 2g/m<sup>2</sup>, 6TG, CICLO, Ara-C</p>	<p style="text-align: center;">BLOCO 3 MTX 5g/m<sup>2</sup>, 6MP, Ara-C, L-Asp</p>
<p style="text-align: center;">BLOCO 3 MTX 2g/m<sup>2</sup>, 6MP, 6TG, Ara-C, L-Asp</p>	<p style="text-align: center;">BLOCO 2 MTX 5g/m<sup>2</sup>, 6TG, CICLO, Ara-C</p>
	<p style="text-align: center;">BLOCO 1 IFO, VP-16 + Imatinibe D1- 14</p>
2º Momento TMO	
CONSOLIDAÇÃO TARDIA (8 semanas) VCR, PRED, DNR, L-ASP, CICLO, 6-TG, VP-16, ARA-C + Imatinibe (dias 1 - 14 e 29 – 50) RT SNC 12Gy se ≥ 100.000/mm <sup>3</sup> e/ou Subgrupo RL. Se SNC-3 RT com 18Gy	
MANUTENÇÃO (18 meses) 6MP + MTX Intermitente dose fixa 200 mg/m <sup>2</sup> . Pulsos a cd 6 semanas c/ VCR/DEXA, Imatinibe (PULSO A) alternando c/ CICLO/Ara-C/Imatinibe (PULSO B). MADIT a cd 8 sem. durante toda a Terapia de Manutenção (exceto p/ os pacientes irradiados).	

Quadro 24 - Representação esquemática geral do Protocolo GBTLI LLA-2009 para a LLA Ph<sup>+</sup>

## Protocolo GBTLI-2009 (Leucemia Ph<sup>+</sup>) - Planejamento Global

Fonte: Protocolo GBTLI-LLA (2009).

## Anexo D - Carta de Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DO PERFIL IMUNOLÓGICO EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA NO AMAZONAS

**Pesquisador:** MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO SAMPAIO CARVALHO

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 18309913.6.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 739.563

**Data da Relatoria:** 24/07/2014

#### Apresentação do Projeto:

É um estudo não experimental, longitudinal de coorte e prospectivo, onde os pacientes serão acompanhados de acordo com o intervalo de tempo compreendido entre o diagnóstico e o dia 35 da indução. A hipótese já formulada pela pesquisadora irá procurar demonstrar a intensidade da imunossupressão do tratamento em pacientes na faixa etária de 0 a 18 anos com LLA, nos diferentes grupos de risco de tratamento, na fase de indução do protocolo GBTLI-LLA 2009.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar a resposta imune de acordo com os grupos de risco do tratamento com o protocolo GBTLI-LLA 2009, em pacientes na faixa etária de 0 a 18 anos portadores de LLA durante a terapia de indução.

Objetivo Secundário:

1. Caracterizar as populações celulares de LT (LTCD4+ LTCD8+, NK e LTreg CD4/CD25/FoxP3) em pacientes na faixa etária de 0 a 18 anos portadores de LLA ao diagnóstico, D15 e final da terapia de indução (D35) do protocolo GBTLI-LLA 2009;
2. Determinar o perfil de citocinas séricas (Th1, Th2, Treg e Th17) na população de pacientes durante o protocolo de indução (D0, D15 e D35);

**Endereço:** Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq

**Bairro:** Chapada

**CEP:** 69.050-002

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3655-0113

**Fax:** (92)3655-0112

**E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 739.563

3. Relacionar o perfil da resposta imune com os grupos de risco de tratamento da terapia de indução em pacientes na faixa etária de 0 a 18 anos portadores de LLA em uso do protocolo GBTLI-LLA 2009.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Existem riscos como formação de hematomas, ecimoses (manchas arroxeadas), no local da punção, próprios da coleta das amostras de sangue que fazem parte da rotina de seus exames.

Benefícios:

Proporcionar para outras crianças com LLA a possibilidade de um melhor tratamento no futuro.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Esta pesquisa se mostra muito interessante do ponto de vista científico pois nos proporcionará conhecer o perfil imunológico dos pacientes antes do início do tratamento e acompanhar sua alteração no decorrer do mesmo; fornecendo informações muito valiosas para o sucesso do tratamento e uma eventual intervenção caso algum exame aponte uma infecção.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado após as devidas correções.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir. Ens. Pesq  
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3655-0113 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 739.563

MANAUS, 05 de Agosto de 2014

---

**Assinado por:**  
**Elisa Brosina de Leon**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq  
**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3655-0113 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

Página 03 de 03