

MÔNICA APARECIDA GANAZZA

**ESTUDO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA  
EM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE**

CAMPINAS

21/08/09

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



MÔNICA APARECIDA GANAZZA

**ESTUDO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA  
EM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE**

Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas, departamento de  
genética médica, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Médicas, na área  
de Ciências Biomédicas

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes

CAMPINAS

UNICAMP

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ganazza, Mônica Aparecida

G15e            Estudo de doença residual mínima em leucemia linfóide aguda da  
criança e do adolescente / Mônica Aparecida Ganazza. Campinas, SP  
: [s.n.], 2009.

Orientador : José Andrés Yunes

Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

**Título em inglês : Minimal residual disease study in acute lymphoblastic  
leukemia of child and adolescent**

**Keywords:** • Acute lymphoblastic leukemia  
• Genes, T-cell receptor  
• Neoplasm, residual  
• Immunoglobulins

**Titulação: Mestre em Ciências Médicas**  
**Área de concentração: Ciências Biomédicas**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. José Andrés Yunes**  
**Prof. Dr. Martin Herman Bonamino**  
**Profa. Dra. Irene Lorand-Metze**

**Data da defesa: 21-08-2009**

## Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Mônica Aparecida Ganazza

---

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Andrés Yunes**

---

### Membros:

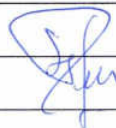
Professor (a) Doutor (a) Martin Hernan Bonamino



Professor (a) Doutor (a) Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze



Professor (a) Doutor (a) José Andrés Yunes



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 21/08/2009**

---



*Aos meus pais, José e Nécilda, que sempre me apoiaram em todas as decisões e momentos difíceis e a todas as crianças e adolescentes com leucemia e seus familiares que permitiram a realização deste trabalho.*





## *Agradecimentos*

*Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado meus caminhos e me dado forças para continuar na caminhada da vida.*

*Ao Prof. Dr. José Andrés Yunes que me aceitou como aluna mesmo sabendo de minha falta de experiência na área e por todos os seus ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.*

*Aos meus familiares e André que mesmo distantes sempre me deram apoio para que eu continuasse e que me acolheram de braços abertos nas minhas voltas para casa.*

*Às minhas queridas amigas Amanda, Aninha, Cíntia, Cleide, Cris, Jaira, Ju, Lilian, Lílíane, Marcela, Paty e Seleny que seja no laboratório ou em casa, foram de extrema importância para minha formação não só como profissional, mas como uma pessoa melhor, que me abraçaram forte quando necessário ou então puxaram minha orelha nos momentos de stress sem necessidade. Obrigada minhas amigas por tudo, pelo companheirismo, pelas risadas juntas e pelos choros também, pelas opiniões valiosas, pelos jantares e almoços, pelas caronas, pelas baladas e acima de tudo pela amizade de vocês. Saibam que serão inesquecíveis em minha vida.*

*Aos meus amigos do laboratório que prefiro não mencionar nomes para não correr o risco de esquecer algum, obrigada pelo apoio em todos os momentos, e pela paciência de muitas vezes dividir espaços apertados e compartilhar o uso de equipamentos em épocas conturbadas.*

*O meu muito obrigada ao Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli, à Prof. Dra. Juliana Assumpção e ao Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti pela colaboração de grande importância para a execução e correção deste trabalho .*

*Agradeço também, com muito carinho, aos meus pais que sempre me deram a chance de fazer as escolhas para minha vida e que sempre me apoiaram e passaram comigo por todas as dificuldades encontradas no caminho.*

*À Dra. Sílvia Regina Brandalise, a todos os funcionários do Centro Infantil Boldrini e a todas as crianças e adolescentes em tratamento de leucemia e seus familiares por permitirem o desenvolvimento de meu trabalho.*

*À CAPES pelo auxílio financeiro e a todos que por ventura tenha me esquecido de aqui citar.*



*"O segredo é não correr atrás das borboletas... É cuidar do jardim  
para que elas venham até você." [Mário Quintana]*



## RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é o câncer mais comum da infância. Os atuais protocolos de tratamento da LLA levam à cura em 70% dos casos e parte do sucesso se deve à aplicação de diferentes tratamentos para os pacientes estratificados em diferentes grupos de risco, segundo fatores prognóstico pré-tratamento (contagem leucocitária e idade ao diagnóstico). Contudo, pacientes considerados em remissão podem apresentar conteúdo substancial de células neoplásicas, chamada doença residual mínima (DRM), cuja proliferação está associada com a recaída da doença e que podem estar em níveis indetectáveis pelas técnicas convencionais de análise morfológica. Vários trabalhos têm mostrado que é possível prever a evolução clínica dos pacientes com base na DRM, porém, no protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI), a DRM não é utilizada como critério de realocação dos pacientes nos grupos de risco. Desta forma, o presente estudo objetivou (1) obter dados prospectivos de DRM com o uso de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de rearranjos de genes de imunoglobulina (Ig) e receptores de células T (TCR); (2) comparar resultados de DRM com fatores prognósticos ao diagnóstico e de resposta utilizados nos protocolos do GBTLI e (3) avaliar o valor preditivo da DRM em pacientes tratados pelo protocolo GBTLI-99. No total, foram estudadas 91 amostras de LLA pediátrica classificadas e tratadas pelo protocolo GBTLI-99. Duas metodologias foram empregadas, metodologia do grupo brasileiro (91 casos) e metodologia Biomed-1 (78 casos), as quais são baseadas em PCR com primers consenso para as regiões VDJ das imunoglobulinas e TCR seguido por análise de formação de homo/heteroduplex. Ambos métodos mostraram-se tecnicamente factíveis, reprodutíveis e capazes de detectar marcadores moleculares para a análise da DRM na maioria dos casos, a saber, 2 ou mais marcadores de DRM em 85,7 e 76,9% do total das amostras analisadas, respectivamente. As mesmas metodologias foram aplicadas para a análise da DRM nos dias 14 e 28 da terapia de indução e demonstraram concordância de 96% na detecção da DRM. Gênero masculino, idade  $<1$  e  $\geq 9$  anos, imunofenótipo LLA-T, classificação em alto risco, ausência de CD10, presença de blastos no dia 14, presença de mais de 5% de blastos leucêmicos na medula óssea (MO) do D14 e resposta ao tratamento associaram-se com DRM positiva no D14. Já DRM positiva no D28 mostrou estar associada com imunofenótipo LLA-T, ausência de calla (CD10), presença de mais de 5% de blastos leucêmicos na MO no D28 e resposta ao tratamento. O valor preditivo da DRM, nas condições testadas, mostrou-se pouco útil para casos classificados como sendo de risco baixo pelo GBTLI/99. Para casos de alto risco, entretanto, a ausência de DRM no D14 caracteriza um grupo de pacientes com sobrevida similar a pacientes de risco básico. Novos protocolos para análise da DRM foram propostos baseados nas metodologias aplicadas no presente estudo visando otimizar o tempo e minimizar os custos.



## ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer. The recent ALL treatment protocols can achieve the complete remission in 70% of cases and this success is due to different treatments for patients stratified into different risk groups, according to pre-treatment prognostic factors (white count cells and diagnosis age). Therefore, patients considered in remission may have substantial contents of neoplastic cells, the minimal residual disease (MRD). The proliferation of such neoplastic cells is associated with disease relapse and they can be undetected by conventional methods. It has been demonstrated that the clinical evolution of patients based on MRD can be forecasted. Therefore, in the Brazilian Group for Childhood Leukemia Treatment (GBTLI), MRD is not used as a reallocation criterion of patients in risk groups. The present study aimed to (1) obtain MRD data through the use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of immunoglobulin (Ig) and T cell receptor genes rearrangements (TCR); (2) compare the results of MRD with prognostic factors at diagnosis and response factors used in the GBTLI protocols and (3) estimate the predictive value of MRD in patients treated by the GBTLI-99 protocol. In total, 91 samples of pediatric ALL classified and treated with the GBTLI-99 protocol were studied using two methodologies: Brazilian group methodology (91 cases) and Biomed-1 methodology (78 cases), both using the consensus PCR primers for the immunoglobulin and TCR VDJ regions followed by homo/heteroduplex formation. These methods were feasible, reproducible and able to detect molecular markers for MRD analysis in most cases, since they provided the detection of two or more markers in 85,7% and 76,9% of the samples analyzed, respectively. The same methodologies were applied in the MRD analysis on days 14 and 28 of induction therapy and the results are in agreement in 96% of the MRD detection. Male, age ( $<1$  e  $\geq 9$  years), immunophenotyping (T-ALL), high risk classification, calla (CD10) absence, presence of blasts in peripheral blood on day 14, presence of more than 5% of leukemic blasts in the bone marrow (BM) on day 14 of treatment response were associated with positive MRD on D14. Already, positive MRD on day 28 of treatment were associated with immunophenotyping (T-ALL), CD10 absence, presence of more than 5% of leukemic blasts in the BM on D28 and treatment response. MRD predictive value on the conditions tested proved to be useful for the patients classified by GBTLI/99 as basic risk. However, for high risk cases, the absence of MRD on D14 defines a new group of patients with similar survival to basic risk patients. New protocols to the MRD analysis were proposed based on methodologies applied in this study to optimize the time and minimize the costs.





## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AIEOP-BFM ALL: Protocolo para tratamento de Leucemia Linfóide Aguda da Associação Italiana de Hematologia e Oncologia Pediátrica e grupo Berlin-Frankfurt-Muniqué

AR: Alto Risco

BR: Baixo Risco

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CLP: Célula Progenitora Linfóide

CMP: Célula Progenitora Mielóide

D14: Dia 14 da Terapia de Indução

D28: Dia 28 da Terapia de Indução

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DRM: Doença Residual Mínima

GB: Grupo Brasileiro

GBTLI: Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis

Ig: Imunoglobulina

IgH: Cadeia pesada da imunoglobulina

IgK: Cadeia leve da imunoglobulina

LLA B-derivada: Leucemia Linfóide Aguda B-derivada

LLA pré-B: Leucemia Linfóide Aguda pré-B

LLA pré-pré-B: Leucemia Linfóide Aguda pré-pré-B

LLA pró-B: Leucemia Linfóide Aguda pró-B

LLA: Leucemia Linfóide Aguda

LLA-T: Leucemia Linfóide Aguda T

MgCL<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio

MO: Medula Óssea

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RT-PCR: Reação da Transcriptase Reversa seguida por Reação em Cadeia da Polimerase

SG: Sobrevida Global

SLD: Sobrevida Livre de Doença

SLE: Sobrevida Livre de Eventos

TCR: Receptor de Célula T

TCRD: Receptor Delta de Célula T

TCRG: Receptor Gamma de Célula T

WBC: Contagem de Células Brancas



## LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

### FIGURAS

Figura 1 Esquema da hematopoiese.....	página 12
Figura 2 Esquema representativo de uma imunoglobulina.....	página 15
Figura 3 Amostras de DNA e gel de eletroforese.....	página 20
Figura 4 Foto de homo/heterodúplex para <i>TCRG</i> .....	página 26
Figura 5 Esquema da metodologia simplificada.....	página 27
Figura 6 Homo/heteroduplex de reações para <i>TCRG</i> .....	página 33
Figura 7 Homo/heterodúplex para <i>TCRG</i> e <i>TCRD</i> incompleto.....	página 34
Figura 8 Exemplos de homo/heterodúplex para mix B de <i>TCRG</i> .....	página 35
Figura 9 Exemplo de homo/heterodúplex de reações para <i>IgH</i> .....	página 35
Figura 10 Homo/heterodúplex de reações de <i>TCRD</i> incompleto.....	página 36
Figura 11 Teste de sensibilidade em amostras frescas.....	página 37
Figura 12 Teste de sensibilidade com primers para mix 1 de <i>IgH</i> .....	página 37
Figura 13 Alinhamento entre os primers V2 e V8.....	página 38
Figura 14 Freqüências para rearranjos em amostras de LLA-B derivada.....	página 40
Figura 15 Freqüências de rearranjos envolvendo cada segmento V de <i>TCRG</i> .....	página 40
Figura 16 Freqüências para rearranjos em amostras de LLA-T.....	página 41
Figura 17 Freqüências de rearranjos envolvendo cada segmento V de <i>TCRG</i> .....	página 42
Figura 18 Curvas de SG e SLE de acordo com presença ou ausência de DRM.....	página 50
Figura 19 Curvas de SG e SLE de acordo com estratificação de risco.....	página 51
Figura 20 Curvas de SG e SLE para pacientes classificados como alto risco.....	página 52
Figura 21 Curvas de SG e SLE para pacientes classificados como baixo risco.....	página 52
Figura 22 Fluxograma esquemático dos novos protocolos.....	página 61



## QUADROS

Quadro 1 Sequências dos primers utilizados.....	página 21
Quadro 2 Mixes de primers utilizados para amplificação dos genes.....	página 22
Quadro 3 Protocolo para as reações de PCR e ciclos de amplificação.....	páginas 23 e 24
Quadro 4 Protocolo para as reações de PCR e ciclos de amplificação.....	páginas 24 e 25
Quadro 5 Primers forward escolhidos para o sequenciamento.....	página 29
Quadro 6 Sequências dos primers utilizados no método Biomed.....	páginas 29 e 30
Quadro 7 Mixes de primers utilizados para amplificação dos genes.....	páginas 30 e 31
Quadro 8 Protocolo para as reações de PCR e ciclos de amplificação.....	página 31

## TABELAS

Tabela 1 Porcentagem de rearranjos detectados pelo método GB .....	página 39
Tabela 2 Número total de pacientes analisados e número e porcentagem de casos positivos para a presença da DRM nos dois pontos de tratamento estudados.....	página 43
Tabela 3 Número total de casos analisados para diferentes dados clínicos, número e porcentagem de casos positivos e valor de $p$ através do teste exato de Fisher para a DRM no D14.....	página 44
Tabela 4 Número total de casos analisados para diferentes dados clínicos, número e porcentagem de casos positivos e valor de $p$ através do teste exato de Fisher para a DRM no D28.....	página 45
Tabela 5 Porcentagem de rearranjos detectados ao diagnóstico no total de pacientes analisados em LLA B-derivada e em LLA-T para ambas as técnicas de PCR empregadas no estudo (GB e Biomed).....	página 55
Tabela 6 Porcentagem de rearranjos detectados para os rearranjos estudados ao diagnóstico no total de pacientes analisados, em LLA B-derivada e em LLA-T para ambas as técnicas de PCR empregadas no estudo (GB e Biomed).....	página 55
Tabela 7 Número total de pacientes analisados e número e porcentagem de casos positivos para a presença da DRM nos dois pontos de tratamento estudados.....	página 56
Tabela 8 Frequências encontradas em amostras de LLA B-derivada ao diagnóstico para os conjuntos de primers testados em ambas as metodologias.....	página 57
Tabela 9 Frequências encontradas em amostras de LLA-T ao diagnóstico para os conjuntos de primers testados por ambas as metodologias.....	página 58



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1 As Leucemias .....	25
1.2 Doença Residual Mínima.....	28
1.3 O impacto da DRM nas decisões clínicas.....	30
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1 Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos.....	35
3.2 Obtenção do DNA de células mononucleadas .....	36
3.3 Metodologia simplificada do grupo brasileiro para análise da DRM (método GB) ..	37
3.4 Seqüenciamento para confirmação da especificidade dos primers utilizados na metodologia do grupo brasileiro. ....	45
3.5 Metodologia Biomed-1 para análise da DRM (método Biomed) .....	46
3.6 Análise Estatística .....	50
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
4.1. Método do grupo brasileiro.....	51
4.1.1 Otimização da reação de PCR.....	51
4.1.2 Teste de sensibilidade .....	55
4.1.3 Confirmação da especificidade dos primers utilizados na técnica .....	56
4.1.4 Frequências dos diferentes rearranjos de imunoglobulinas e receptores de células T nas LLA pediátricas.....	57
4.1.5 Análise da presença de doença residual em amostras nos dias 14 e 28 da terapia de indução.....	62
4.1.6 Análise de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Eventos (SLE).....	69
4.2 Comparação da metodologia do grupo brasileiro com a metodologia Biomed-1 .....	74
4.2.1 Análise de clonalidade ao diagnóstico com a metodologia Biomed-1 .....	74
4.2.2 Análise da DRM em amostras do D14 e D28 pelo método Biomed-1.....	75
4.3 Sugestão de novo protocolo para análise simplificada da DRM.....	77
4.3.1 Protocolo para LLA B-derivada .....	79
4.3.2 Protocolo para LLA-T.....	80
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO 1 – Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética Local.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO 3 – PCR associado à formação de Homo/Heterodúplex .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO 4 – Comparação dos resultados encontrados por ambos métodos na análise da DRM nos dias 14 e 28 da terapia de indução.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE 1 - TCRG gene rearrangement patterns in Brazilian children with ALL: an update (in press Leukemia Research) .....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE 2 - A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups (publicado em maio de 2009 na revista Haematologica).....</b>	<b>109</b>





# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 As Leucemias

A leucemia consiste em uma doença heterogênea, caracterizada por uma disfunção das células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea, levando a uma proliferação clonal desordenada e sem controle de células precursoras de origem mielóide ou linfóide. Pode ser classificada como aguda ou crônica, sendo a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) o câncer mais comum na infância, correspondendo a cerca de um quarto de todos os distúrbios malignos nessa faixa etária e a 80% de todas as leucemias que ocorrem até os 15 anos de idade. Seu pico de incidência ocorre em crianças entre 2 e 5 anos, e meninos são mais comumente envolvidos que meninas, principalmente no período puberal (1, 2, 3).

Atualmente, a teoria mais aceita para a fisiopatologia da LLA é aquela que relaciona o seu desenvolvimento à transformação de uma única célula progenitora hematopoiética mutante, capaz de se expandir indefinidamente por auto-renovação, levando a produção de precursores hematopoiéticos malignos e pouco diferenciados. Os eventos que levam a este processo de mutação são complexos e multifatoriais, tendo sido proposto que a LLA se desenvolve como resultado de mutação que ocorreria em células progenitoras linfóides de linhagem T ou B (Figura 1).

Estudos das LLA têm confirmado que a transformação leucêmica pode ocorrer nos diversos estágios de maturação no processo de diferenciação linfóide, sendo que oitenta e cinco por cento dos casos são classificados como LLA B-derivada e 15% como LLA-T (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

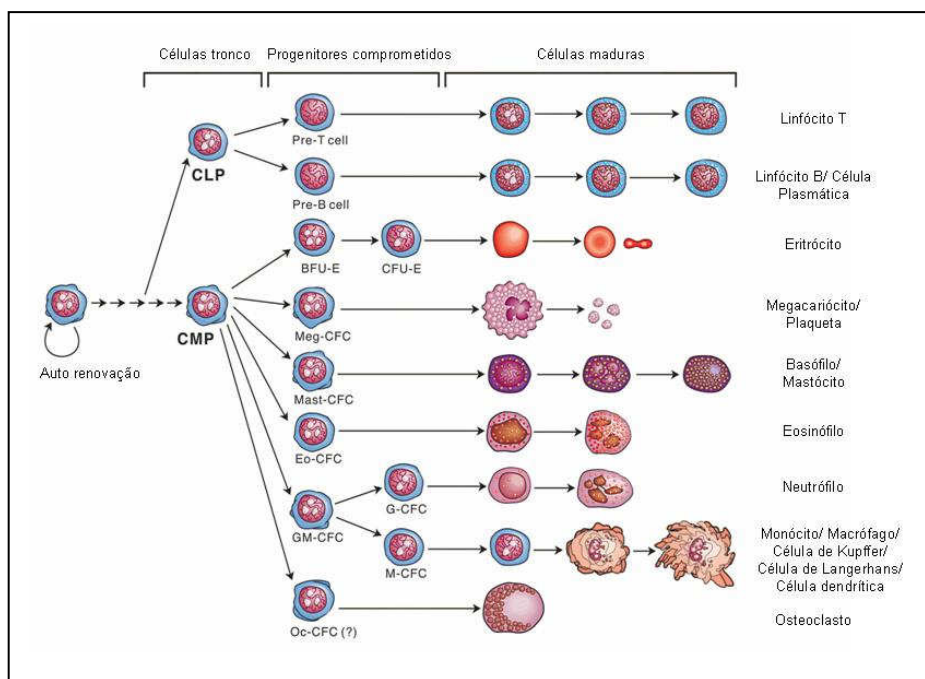


Figura 1. Esquema da hematopoiese onde é possível observar os diferentes estágios de maturação das células de linhagens linfóide e mielóide, e também as células tronco, progenitores comprometidos e células maduras da linhagem hematopoiética. CLP=célula progenitora linfóide e CMP célula progenitora mielóide<sup>1</sup>.

As LLA B-derivadas podem ainda ser divididas em quatro subgrupos (LLA pró-B, pré-B, pré-pré-B ou comum e LLA-B madura) de acordo com as expressões de antígenos de superfície celular que refletem o estágio da diferenciação do linfócito B precursor (9).

Com os atuais protocolos de tratamento, cerca de 95% das crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) alcançam remissão, definida por microscopia óptica como menos de 5% de blastos na medula óssea. Infelizmente cerca de 25% destes pacientes ainda apresentarão recaída (10), na maioria das vezes por um clone idêntico ou relacionado àquele presente no diagnóstico (11).

Diversos fatores prognóstico pré-tratamento têm sido usados na estratificação dos pacientes em diferentes grupos de risco, como por exemplo, a contagem leucocitária ao diagnóstico, a idade do paciente, o conteúdo de DNA da célula leucêmica, anormalidades

<sup>1</sup> <http://www.bloodlines.stemcells.com>

citogenéticas e imunofenotipagem (12, 13, 14). Entretanto, o significado prognóstico destas variáveis depende do tipo e intensidade do tratamento (15)

Nas crianças com LLA, os dados clínicos e laboratoriais convencionais, utilizados para definir a estratificação dos tratamentos nos diferentes grupos de risco, deixam de detectar 20 a 30% dos doentes, de início com bom prognóstico, e que recaem, apesar dos tratamentos já bem estabelecidos (14, 16, 17).

Diversos trabalhos têm mostrado que a resposta inicial ao tratamento, avaliada pela citoredução na medula óssea e/ou sangue periférico, é um fator prognóstico independente importante que permite identificar pacientes com maior ou menor risco de recaída (18, 19, 20). Uma das maneiras de avaliar a citoredução é através da contagem de blastos no sangue periférico após 7 dias de tratamento com prednisona. Pacientes com menos de 1.000 blastos por  $\text{mm}^3$  no sangue periférico apresentam uma sobrevida livre de eventos significativamente maior, e são categorizados como “bons respondedores” (17, 19, 20, 21). Em números absolutos, entretanto, a maior parte das recaídas ocorre no grupo dos “bons respondedores” a prednisona. Além disso, 16-32% dos pacientes com LLA não apresentam blastos no sangue periférico ao diagnóstico, de modo que não podem ser avaliados com base neste fator prognóstico (19).

A utilização da contagem global de glóbulos brancos no dia 8 (D8) da terapia de indução (que inclui vários quimioterápicos) parece também associada ao prognóstico destes pacientes. Dados do protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis-93 (GBTLI-LLA/93) (22), referentes à análise de 786 pacientes tratados no Brasil, mostraram que crianças com leucometria inferior a  $10.000/\text{mm}^3$  apresentaram uma taxa de Sobrevida Livre de Doença (SLD) significativamente maior que aqueles com leucometria superior a 10.000 ( $p:0,0003$ ). Atualmente, o protocolo GBTLI-99 vem utilizando leucometria  $>5.000/\text{mm}^3$  no D8 como critério de estratificação de risco.

Outra maneira de avaliar a citoredução é pela contagem de blastos em esfregaços de medula óssea. Pacientes que apresentam 5% ou menos de blastos na medula óssea do D7 (medula M1) apresentam melhor resposta à quimioterapia (21, 23), enquanto pacientes com medula M2 (5 a 25% de blastos) ou M3 ( $>25\%$  de blastos) no final da terapia de indução (D28) apresentam prognóstico adverso (21). A persistência de qualquer

quantidade de blastos (ainda que entre 1-5%) em medula óssea (MO) nos dias 15 e 25 tem sido associada com prognóstico reservado (24).

Infelizmente, exames morfológicos do sangue periférico e medula óssea dependem do reconhecimento morfológico das células neoplásicas, o que aumenta a imprecisão e subjetividade do resultado (25, 26). Além disso, a sensibilidade alcançada pela avaliação microscópica de esfregaços de medula é de 5%.

Nesta situação, entretanto, o paciente pode ainda apresentar até cem bilhões de células cancerosas, não detectadas pela análise ao microscópio. A estas células cancerosas remanescentes, as quais não são detectadas pelas técnicas convencionais de análise morfológica ao microscópio, dá-se o nome de Doença Residual Mínima (DRM) (27).

Desse modo a utilização de metodologias mais sensíveis para a detecção de células malignas residuais têm tido cada vez mais importância, bem como tem modificado o conceito de remissão.

## **1.2 Doença Residual Mínima**

Até o desenvolvimento dos métodos mais sensíveis, capazes de detectar e quantificar o número destas células residuais, a dinâmica (aumento ou decréscimo) da população de células cancerosas após a remissão era algo desconhecido para o clínico. A utilização de técnicas mais sensíveis, com poder de detecção de 1 célula leucêmica em  $10^3$  a  $10^6$  células normais, tem permitido acompanhar a dinâmica da DRM e refinado de forma importante a avaliação da evolução da resposta precoce ao tratamento. Diversos estudos têm procurado definir dois principais parâmetros: (i) tempo de tratamento e (ii) porcentagem de células leucêmicas residuais; e sua associação com a evolução clínica dos pacientes. Obviamente, estes parâmetros variam em função do protocolo de tratamento adotado. De maneira geral, a detecção de altos índices de DRM no D15 ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$ ) (28, 29) e nas semanas 5 e 12 (30, 31, 32, 33) da terapia de indução tem sido associada com prognóstico desfavorável.

A escolha da técnica particular de análise da DRM depende da questão a ser considerada e o contexto clínico no qual a amostra está sendo avaliada (34). Uma técnica clinicamente útil de DRM deve ser amplamente aplicável, específica, sensível o suficiente

para prever a evolução da doença e economicamente viável (33). As células leucêmicas residuais são usualmente detectadas (i) através de PCR, usando como marcador a sequência de DNA derivada de rearranjos dos genes (recombinação VDJ) de Imunoglobulinas (Ig) e Receptores de células-T (TCR) (figura 2), ou (ii) derivadas de transcritos quiméricos resultantes de translocações cromossômicas; ou (iii) através de citometria de fluxo pela análise de uma combinação específica de moléculas de superfície presente apenas nas células leucêmicas.

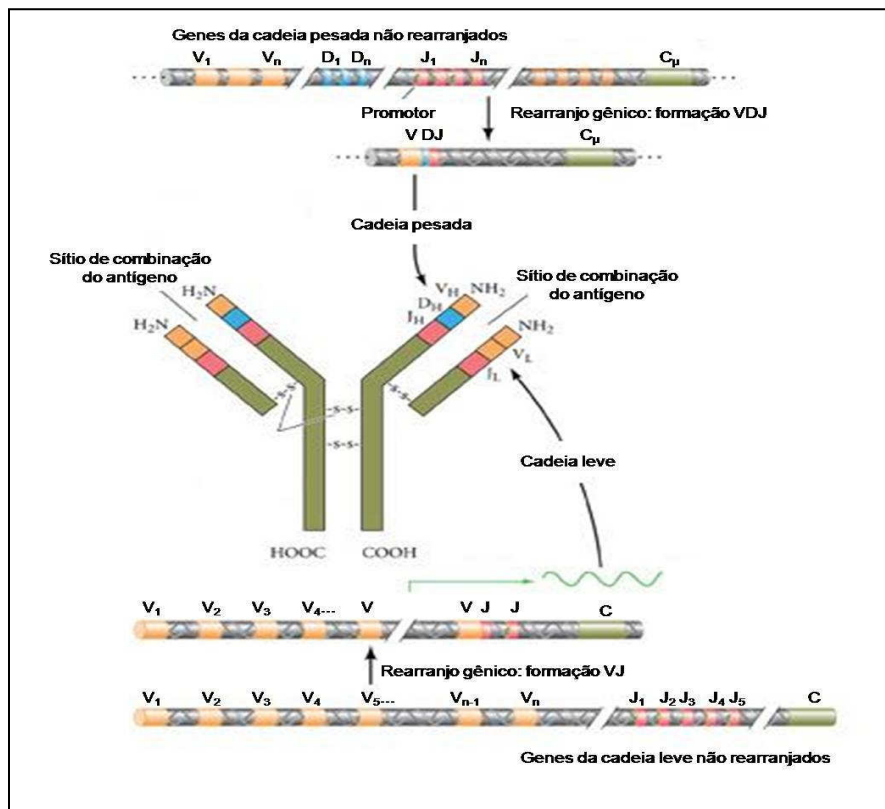


Figura 2. Esquema representativo de uma imunoglobulina e os rearranjos gênicos VDJ responsáveis pela formação das cadeias leve e pesada da Ig. Rearranjos gênicos semelhantes também ocorrem na formação dos receptores de células T<sup>2</sup>.

Entre os três marcadores da leucemia acima listados, o primeiro (rearranjos dos genes de TCR e Ig) tem sido mais amplamente utilizado nos estudos de DRM devido à sua alta frequência em leucemias linfóides tanto de origem B quanto T. Os rearranjos do *TCR*,

<sup>2</sup> <http://8e.devbio.com/images>

por exemplo, são observados em mais de 90% dos casos de LLA-T (35, 36) e em 50 a 80% dos casos de LLA-B (35, 37). A título de comparação, apenas 35-50% dos casos de LLA pediátrica apresentam transcritos quiméricos derivados de translocações cromossômicas.

Uma vez que a LLA é uma doença clonal, todas as suas células tendem a apresentar o mesmo padrão de rearranjos de *Ig* e/ou *TCR* e este padrão pode ser usado como marcador leucemia-específico para cada paciente.

Até o advento da PCR em tempo real a maioria dos grupos utilizava PCR seguido de Southern blot com sondas junção-específicas radiomarcadas para a quantificação da DRM (30, 31, 38). Mais recentemente, o desenvolvimento das sondas fluorescentes (p.ex. TaqMan) tem levado à adoção de primers alelo-específicos e sondas TaqMan consensuais para os diferentes rearranjos de *Ig* e *TCR* (39, 40). Esta técnica permite a detecção de 1 célula leucêmica em  $10^4$ - $10^5$  células normais. Trata-se de um método verdadeiramente quantitativo, sensível, cujos resultados têm permitido diferenciar subgrupos de pacientes com prognóstico definido. Entretanto este método é extremamente laborioso e caro, o que dificulta a sua implantação na maioria dos serviços de tratamento no mundo (41).

A detecção de rearranjos clonais de *Ig* e *TCR* por PCR utilizando-se primers consenso e análise homo/heteroduplex tem se mostrado um método rápido, muito mais simples e barato quando comparado à utilização de sondas TaqMan ou citometria de fluxo e se mostrado útil na detecção de pacientes com níveis relativamente altos de DRM nas fases iniciais do tratamento (11, 42, 43). Este método, no entanto, não é verdadeiramente quantitativo e, devido à sua sensibilidade menor ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$ ), resultados de DRM negativos após a terapia de indução não necessariamente se traduzem em ausência de recaída. Em contrapartida, resultados de DRM positivos estão fortemente associados a prognóstico desfavorável (11, 42).

### **1.3 O impacto da DRM nas decisões clínicas**

A detecção de DRM durante o tratamento e após obtenção da remissão clínica tem sido descrita como fator prognóstico em LLA da infância (30, 31, 43) e pode auxiliar no planejamento de estratégias terapêuticas mais adequadas, através da identificação de

pacientes com alto risco de recidiva, como também, eventualmente na detecção precoce de recaída.

É consenso entre diversos autores que, ao final da terapia de indução, níveis de DRM com valores iguais ou menores que  $10^{-4}$  (1 célula leucêmica para cada 10.000 células normais) são associados a um baixo risco de recaída, enquanto que valores iguais ou superiores a  $10^{-3}$  são associados a um alto risco de recaída (30, 31, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49).

Sendo assim, os pacientes que atualmente não são curados poderiam ter melhores chances se fossem identificados ainda no início do tratamento e submetidos a regimes terapêuticos mais agressivos e/ou alternativos. Por outro lado, estima-se que aproximadamente 25% dos pacientes, os quais apresentam excelente resposta nos atuais regimes terapêuticos, poderiam receber um tratamento mais brando, com diminuição significativa das seqüelas e sem comprometimento da boa resposta clínica.

Portanto, torna-se extremamente relevante o estudo de métodos que possibilitem estabelecer melhor os riscos individuais, de forma que cada paciente receba o tratamento mais adequado.

Dadas as diferenças dos regimes terapêuticos e do método de quantificação da DRM adotados nos diferentes centros de tratamento, cada instituição deve definir o valor preditivo da DRM em suas próprias condições.





## 2. OBJETIVOS

- Otimizar uma técnica de PCR simples e de baixo custo, baseada na amplificação dos genes de imunoglobulinas (*Ig*) e receptores de células T (*TCR*), para detecção da doença residual mínima em crianças com LLA.
- Determinar a frequência dos rearranjos gênicos *Ig* e *TCR* em casos novos consecutivos de LLA pediátrica admitidos e tratados no Centro Infantil Boldrini.
- Comparar duas metodologias empregadas para a detecção e monitoramento da doença residual mínima.
- Estudar prospectivamente, utilizando os rearranjos *Ig* e *TCR* como marcadores, a presença de DRM nos dias 14 e 28 da terapia de indução para os casos de LLA infantil tratados de acordo com o protocolo GBTLI-LLA/99.
- Determinar o impacto prognóstico da presença ou ausência de DRM na sobrevida dos pacientes.
- Estabelecer relações entre a DRM e as características dos pacientes no momento do diagnóstico (idade, contagem leucocitária, linhagem das células leucêmicas, ploidia e citogenética).
- Estabelecer associação entre DRM e fatores de resposta precoce à terapia de indução, a saber: (i) estado da medula óssea (M1, M2 e M3) avaliada nos dias 14 e 28, (ii) leucometria  $\geq 5.000/\text{mm}^3$  no dia 7, e (iii) presença de blastos leucêmicos em sangue periférico no dia 14.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos**

Após aprovação do Comitê de Ética Local (CEP/ Boldrini) (Anexo 1), foram incluídas no estudo amostras prospectivas de 91 casos novos consecutivos de LLA admitidos para tratamento no Centro Infantil Boldrini (Campinas-SP) no período de Abril/2006 a Novembro/07. Embora no período descrito tenham sido admitidos para tratamento 101 pacientes com diagnóstico de LLA, 10 foram excluídos do estudo por estarem sendo tratados por protocolos diferentes ao GBTLI-LLA/99.

As amostras de medula óssea foram colhidas ao diagnóstico e nos dias 14 e 28 da terapia de indução, não havendo nenhuma punção extra além das programadas no protocolo de tratamento, e a participação foi voluntária e atestada em termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

O diagnóstico da leucemia consistiu de análise morfológica, imunofenotipagem por citometria de fluxo, cariotipagem por bandamento G, e análise das principais translocações cromossômicas por RT-PCR (50) sendo previamente realizada pela equipe dos laboratórios do Centro Infantil Boldrini.

Dados clínicos como gênero, idade, contagem leucocitária ao diagnóstico (WBC), imunofenótipo, grupo de risco, WBC no dia 7 da terapia de indução, presença ou ausência de blastos no dia 14 da terapia de indução, presença ou ausência de translocação t(12;21), índice de DNA, presença ou ausência de CD10, e estado da medula óssea nos dias 14 e 28 da terapia de indução; foram obtidos para os pacientes do estudo através de exames realizados pela equipe multidisciplinar dos laboratórios do Centro Infantil Boldrini (hemograma, mielograma, citometria de fluxo e RT-PCR). Todas as informações foram mantidas num banco de dados respeitando as normas éticas de sigilo para acesso a informação de pacientes.

Os pacientes também foram classificados, de acordo com a resposta inicial ao tratamento, em bons e maus respondedores. A classificação foi realizada de acordo com os critérios adotados pelo Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis (GBTLI) sendo considerados maus respondedores os pacientes com: WBC no D7 superior a  $5.000/\text{mm}^3$  e/ou medula óssea com mais de 25% de blastos no D14 e/ou medula óssea com

porcentagem de blastos superior a 5% no D28. Os demais pacientes foram estratificados no grupo de bons respondedores.

Monitoramento da evolução clínica e ocorrência de recaída e/ou óbito dos casos estudados ocorreu num período de até 33 meses após o início das atividades da pesquisa.

Todas as informações coletadas foram utilizadas para análises estatísticas envolvendo correlação entre presença ou ausência de doença residual mínima em dois pontos do tratamento e, análises de sobrevida global e livre de eventos também baseadas nas análises de DRM nos dias 14 e 28 da terapia de indução.

### 3.2 Obtenção do DNA de células mononucleadas

As amostras de medula óssea foram submetidas à separação através de gradiente por Ficcol Hypaque Plus (GE Healthcare), de acordo com especificações do fabricante, as células mononucleadas foram aliquotadas e o pellet foi utilizado logo em seguida para extração do DNA.

A extração do DNA foi realizada segundo o protocolo do fabricante do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Após a extração, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para quantificação e verificação de qualidade, sendo que nenhuma das amostras apresentou má qualidade do DNA (figura 3).

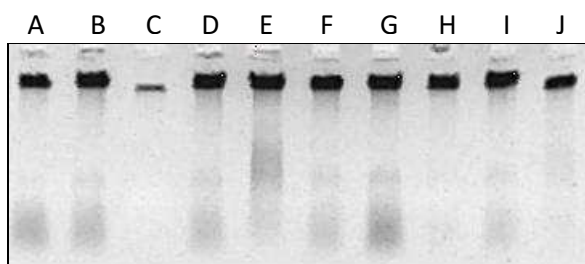


Figura 3. Amostras de DNA após eletroforese em gel de agarose para quantificação e verificação de sua qualidade. A e B: marcadores de massa molecular 400 ng e 1000ng, respectivamente. C a J: DNA de diferentes pacientes.

As amostras de DNA ao diagnóstico foram diluídas em tampão de Tris 10mM e EDTA 1M a uma concentração de 50ng/ $\mu$ L e as dos dias 14 e 28 da terapia de

indução (D14 e D28) a uma concentração de 100ng/μL, sendo todas armazenadas a -20°C para uso futuro.

### 3.3 Metodologia simplificada do grupo brasileiro para análise da DRM (método GB)

O DNA de cada paciente foi submetido à amplificação por PCR com primers consenso que flanqueiam a região CDR-3 do gene *IgH* (FR3A, LJH, VLJH) [primers de acordo com Brisco et al (51)], *TCRG* (famílias VγI-IV e Jγ1-3) [primers de acordo com Trainor et al. (52)], *TCRD* incompleto (Vδ2, Dδ3) [primers de acordo com Steward et al. (53)] e *IgK* [primers de acordo com Pongers-Willems et al.(54)] (quadro 1).

Quadro 1: Sequências dos primers utilizados

<i>Segmento</i>	<i>Sequência</i>
V3	5'-CTTCCTGCAGATGACGTCTCCACCGCAAGGGATG-3'
V2	5'-CTTCCTGCAGATGACTCCTACAACCTCCAAGGTTG-3'
V4	5'-CTTCCTGCAGATGACTCCTACACCTCCAGCGTTC-3'
V5	5' TTCCTGCAGATGACGTCTCCAACCTCAAAGGATG-3'
V8	5'-CTTCCTGCAGATGACTCCTACAACCTCCAGGGTTG-3'
V9	5'-GGNACTGCAGGAAAGGAATCTGGCATTCCG -3'
V10	5'-CTCTGCAGAATCCGCAGCTCGACGCAGCA -3'
V11	5'-CACTGCAGGCTCAAGATTGCTCAGGTGGG-3'
JGT1,2	5'-AAGTGTTGTTCCACTGCCAAA-3'
JGT3	5'-AGTTACTATGAGC(T/C)TAGTCCC-3'
JGT4	5'-TGTAATGATAAGCTTTGTTCC-3'
FR3A	5'ACACGGC(C/T)(G/C)TGTATTACTGT-3'
LJH	5'-TGAGGAGACGGTGACC-3'
VLJH	5'-GTGACCAGGGT(A/G/C/T)CCTTGGCCCCAG-3'
Vd2	5'-CTTGCACCATCAGAGAGAGA-3'
Dd3	5'-AGGGAAATGGCACTTTTGCC-3'
VKI-5'	5'-GTAGGAGACAGAGTCACCATCACT-3'
VKII-5'	5'-TGGAGAGCCGGCCTCCATCTC-3'
VKIII-3'	5'-GGGACAGACTTCACTCTCAC-3'
Kde-3'	5'-CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC-3'
Íntron-3'	5'-CGATTGAGTGGCTTTGGTGG-3'

O protocolo seguido para as reações de PCR para rearranjos *TCRG*, *TCRD* incompleto e *IgH* foi descrito por Scrideli et al. (11) e sofreu adaptação para alguns fatores, tais como: concentração de DNA para amostras ao diagnóstico, concentração de cloreto de magnésio e de primers e temperatura de anelamento no ciclo de PCR (ver resultados). Para

os rearranjos *IgK* o protocolo seguido foi adaptado a partir de Nakao (55). Para os rearranjos *TCRG*, *TCRD*, *IgH* e *IgK* de amostras ao diagnóstico foi utilizada a enzima Platinun Taq, já para amostras D14 e D28 a enzima Tth DNA polimerase foi utilizada para todos os rearranjos pois demonstrou ser mais sensível.

Para o gene *TCRG* foi aplicada inicialmente uma reação de PCR multiplex com vários primers de segmentos V e J simultaneamente (mixes A e B, quadro 2). Caso obtida amplificação na reação multiplex, a amostra foi testada em reações de PCR individuais para cada primer de segmento V (mixes F a M). Para os genes *TCRD* incompleto e *IgH* não houve o uso de multiplex e a combinação dos primers utilizados encontra-se na tabela 2. Para cada reação de PCR foram usados dois controles negativos: um sem DNA e outro contendo mistura de DNA de vários doadores sem doença hematológica.

Os ciclos de amplificação diferiram entre os rearranjos e encontram-se descritos nos quadros 3 e 4.

Quadro 2: Mixes de primers utilizados para amplificação dos genes *TCRG*, TCR D incompleto, *IgH* e *IgK*.

<i>Gene</i>	<i>Designação</i>	<i>Primers</i>	<i>Tamanho Esperado</i>
TCR G	A	V2+V3+V4+V8+V9 (s)+JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	170 a 210 pb
	B	V5+V10+V11 (s)+JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
	F	V2 (s) + JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
	G	V3 (s) + JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
	H	V4 (s) + JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
	I	V8 (s) + JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
	J	V9 (s) + JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
	K	V5 (s) + JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
	L	V10 (s) + JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
	M	V11 (s) + JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
TCR D	C	Vd2 (s) + Dd3 (as)	80 a 100pb
<i>IgH</i>	D	FR3A (s) + LJH (as)	80 a 120 pb
	E	FR3A (s) + VLJH (as)	
<i>IgK</i>	N	VKI-5' + íntron-5' + Kde-3'	364 a 433pb
	O	VKII-5' + VKIII-5' + Kde-3'	175 a 443pb

Quadro 3: Protocolo para as reações de PCR e ciclos de amplificação para rearranjos ao diagnóstico.

<b>Reação (concentrações finais)</b>	<b>TCRG Mix A</b>	<b>Ciclo de PCR</b>	
DNA	50 ng	94°C - 5 minutos	35X } }
Tampão 10X*	1X	56°C - 2 minutos	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	72°C - 2 minutos	
dNTP	80 µM	94°C - 1 minuto	
Mix Oligos	15 µM	55°C por 1 minuto	
Platinum Taq polimerase	1 U	72°C por 1 minuto	
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 10 minutos	
<b>Reação (concentrações finais)</b>	<b>TCRG Mix B</b>	<b>Ciclo de PCR</b>	
DNA	50 ng	94°C - 5 minutos	35X } }
Tampão 10X*	1X	55°C - 2 minutos	
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	72°C - 2 minutos	
dNTP	80 µM	94°C - 1 minuto	
cada Oligo	15 µM	55°C - 1 minuto	
Platinum Taq polimerase	1 U	72°C - 1 minuto	
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 10 minutos	
<b>Reação (concentrações finais)</b>	<b>TCRD Mix C</b>	<b>Ciclo de PCR</b>	
DNA	50 ng	94°C - 5 minutos	35X } }
Tampão 10X*	1X	57°C - 2 minutos	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	72°C - 2 minutos	
dNTP	80 µM	94°C - 1 minuto	
cada Oligo	15 µM	55°C - 1 minuto	
Platinum Taq polimerase	1 U	72°C - 1 minuto	
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 10 minutos	
<b>Reação (concentrações finais)</b>	<b>IgH Mixes D e E</b>	<b>Ciclo de PCR</b>	
DNA	50 ng	94°C - 5 minutos	35X } }
Tampão 10X*	1X	55°C - 2 minutos	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	72°C - 2 minutos	
dNTP	80 µM	94°C - 1 minuto	
cada Oligo	30 µM	55°C - 1 minuto	
Platinum Taq polimerase	1U	72°C - 1 minuto	
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 10 minutos	
<b>Reação (concentrações finais)</b>	<b>TCRG Mixes F a M</b>	<b>Ciclo de PCR</b>	
DNA	50 ng	94°C - 5 minutos	
Tampão 10X*	1X	55°C - 2 minutos	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	72°C - 2 minutos	



dNTP	80 $\mu$ M	94°C - 1 minuto	35X	}	
cada Oligo	15 $\mu$ M	55°C - 1 minuto			
Platinum Taq polimerase	1 U	72°C - 1 minuto			
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 $\mu$ l	72°C - 10 minutos			
<b>Reação (concentrações finais)</b>		<b>IgK Mix N</b>	<b>Ciclo de PCR</b>		
DNA	50 ng	94°C - 4 minutos	27X	}	
Tampão 10X*	1X	94°C - 45 segundos			
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	66°C - 1 minuto (-0,5°C a cada ciclo)			
dNTP	80 $\mu$ M	72°C - 1 minuto			
cada Oligo	15 $\mu$ M	94°C - 45 segundos	10X	}	
Platinum Taq polimerase	1 U	55°C - 1 minuto			
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 $\mu$ l	72°C - 1 minuto			
		72°C - 10 minutos			
<b>Reação (concentrações finais)</b>		<b>IgK Mix O</b>	<b>Ciclo de PCR</b>		
DNA	50 ng	94°C - 4 minutos	27X	}	
Tampão 10X*	1X	94°C - 45 segundos			
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM	66°C - 1 minuto (-0,5°C a cada ciclo)			
dNTP	80 $\mu$ M	72°C - 1 minuto			
cada Oligo	15 $\mu$ M	94°C - 45 segundos	10X	}	
Platinum Taq polimerase	1 U	55°C - 1 minuto			
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 $\mu$ l	72°C - 1 minuto			
		72°C - 10 minutos			

\*Tampão da enzima Platinum Taq polimerase 10X sem MgCl<sub>2</sub>

Quadro 4: Protocolo para as reações de PCR e ciclos de amplificação para rearranjos em D14 e D28.

<b>Reação (concentrações finais)</b>		<b>TCR G Mix A</b>	<b>Ciclo de PCR</b>		
DNA	100 ng	94°C - 5 minutos	35x	}	
Tampão 10X*	1X	56°C - 2 minutos			
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	72°C - 2 minutos			
dNTP	80 $\mu$ M	94°C - 1 minuto			
Cada Oligo	15 $\mu$ M	55°C - 1 minuto			
Tth DNA polimerase	1 U	72°C - 1 minuto			
H <sub>2</sub> O milliQ	q.s.p 25 $\mu$ l	72°C - 10 minutos			
<b>Reação (concentrações finais)</b>		<b>TCR G Mix B</b>	<b>Ciclo de PCR</b>		
DNA	100 ng	94°C - 5 minutos			
Tampão 10X*	1X	55°C - 2 minutos			

MgCl <sub>2</sub>	1 mM	72°C - 2 minutos		
dNTP	80 µM	94°C - 1 minuto		}
Cada Oligo	15 µM	55°C - 1 minuto	35X	
Tth DNA polimerase	1 U	72°C - 1 minuto		
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 10 minutos		
<b>Reação (concentrações finais)</b>		<b>TCR D Mix C</b>	<b>Ciclo de PCR</b>	
DNA	100 ng	94°C - 5 minutos		
Tampão 10X *	1X	57°C - 2 minutos		
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	72°C - 2 minutos		
dNTP	80 µM	94°C - 1 minuto		}
cada Oligo	15 µM	55°C - 1 minuto	35X	
Tth DNA polimerase	1,0 U	72°C - 1 minuto		
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 10 minutos		
<b>Reação (concentrações finais)</b>		<b>IgH Mixes D e E</b>	<b>Ciclo de PCR</b>	
DNA	100 ng	94°C - 5 minutos		
Tampão 10X*	1X	55°C - 2 minutos		
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	72°C - 2 minutos		
dNTP	80 µM	94°C - 1 minuto		}
cada Oligo	30 µM	55°C - 1 minuto	35X	
Tth DNA polimerase	1 U	72°C - 1 minuto		
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 10 minutos		
<b>Reação (concentrações finais)</b>		<b>TCRG Mixes F a M</b>	<b>Ciclo de PCR</b>	
DNA	100 ng	94°C - 5 minutos		
Tampão 10X*	1X	55°C - 2 minutos		
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	72°C - 2 minutos		
dNTP	80 µM	94°C - 1 minuto		}
cada Oligo	15 µM	55°C - 1 minuto	35X	
Tth DNA polimerase	1 U	72°C - 1 minuto		
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 10 minutos		
<b>Reação (concentrações finais)</b>		<b>IgK Mix N</b>	<b>Ciclo de PCR</b>	
DNA	100 ng	94°C - 4 minutos		}
Tampão 10X*	1X	94°C - 45 segundos		
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	66°C - 1 minuto (-0,5°C a cada ciclo)	27X	
dNTP	80 µM	72°C - 1 minuto		
cada Oligo	15 µM	94°C - 45 segundos		}
Tth DNA polimerase	1 U	55°C - 1 minuto	10X	
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 1 minuto		
		72°C - 10 minutos		

<i>Reação (concentrações finais)</i>	<i>IgK Mix O</i>	<i>Ciclo de PCR</i>	
		94°C - 4 minutos	
DNA	100 ng	94°C - 45 segundos	} 27X
Tampão 10X*	1X	66°C - 1 minuto (-0,5°C a cada ciclo)	
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM	72°C - 1 minuto	
dNTP	80 µM	94°C - 45 segundos	} 10X
cada Oligo	15 µM	55°C - 1 minuto	
Tth DNA polimerase	1 U	72°C - 1 minuto	
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 25 µl	72°C - 10 minutos	

\*Tampão da enzima Tth DNA polimerase 10X sem MgCl<sub>2</sub>

As amostras foram analisadas através de homo-heterodúplex de acordo com Langerak et al. (56), sendo o produto de PCR do diagnóstico denaturado a 95°C por 5 minutos e renaturado a 4 °C por uma hora (na geladeira) (Anexo 3). A seguir o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% não denaturante, que foi corado com brometo de etídeo (1µg/mL) por 30 minutos para verificação de bandas de DNA homoduplex predominantes, características da existência de um rearranjo clone-específico (56). Um marcador de tamanho conhecido foi usado para comparação das amostras e foi considerado resultado positivo a banda homoduplex que apresentou o tamanho esperado correspondente a cada rearranjo testado pela PCR (quadro 2).

A mesma metodologia foi seguida para a análise das amostras nos dias 14 e 28 de indução, sendo testadas apenas as reações onde houve amplificação dos rearranjos ao diagnóstico. As amostras foram consideradas positivas para DRM quando as bandas resultantes da PCR mostravam o mesmo padrão de migração daquele das amostras diagnóstico (figura 4).

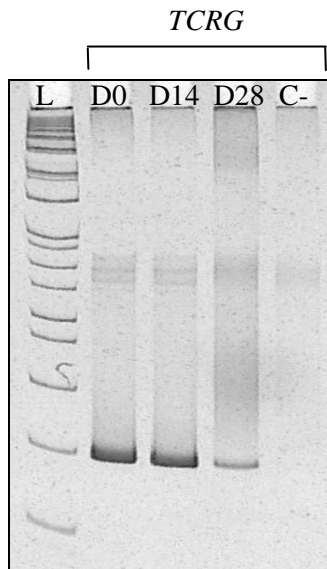


Figura 4. Foto de Homo/Heteroduplex para *TCRG* em amostras D0, D14 e D28 de um único paciente. Nota-se que pela semelhança no padrão de migração e peso molecular das amostras o paciente é considerado DRM positivo nos dias 14 e 28 da indução para esse marcador molecular. Um controle negativo (DNA policlonal de células mononucleadas de sangue periférico – C-) é apresentado na última amostra, e um padrão de peso molecular (L) pode ser observado na primeira amostra.

A sensibilidade do método foi testada através de diluições seriadas da medula óssea obtida ao diagnóstico contendo mais de 90% de células blásticas em um pool de medula óssea obtida de pacientes sem doença hematológica. Esse teste foi realizado tanto para amostras frescas (pellet de células) quanto para amostras congeladas por um período longo.

Um esquema do método utilizado no presente trabalho se encontra representado na figura 5.

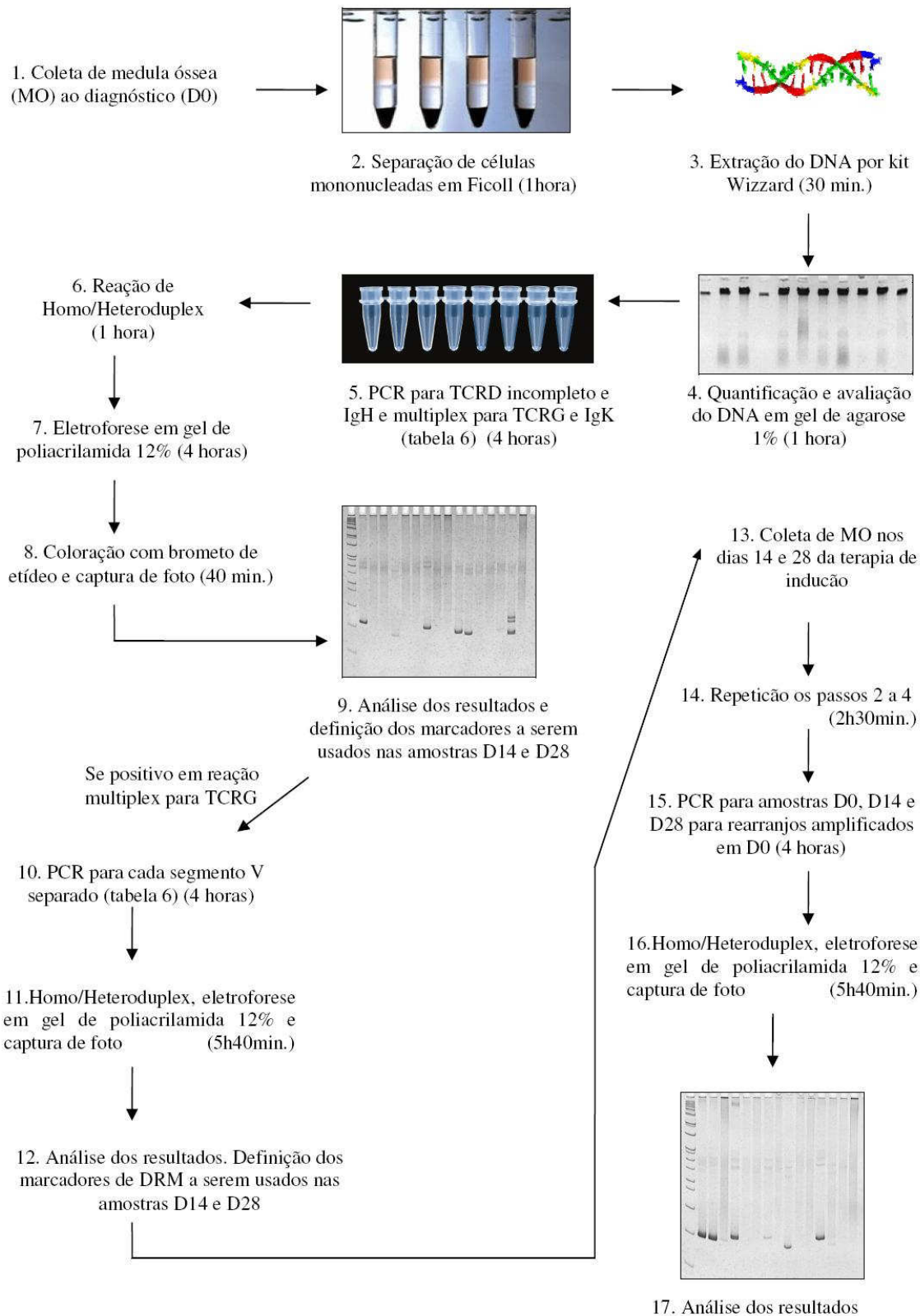


Figura 5. Esquema da metodologia simplificada empregada ao diagnóstico e nos dias 14 e 28 da terapia de indução para análise da DRM.

### **3.4 Seqüenciamento para confirmação da especificidade dos primers utilizados na metodologia do grupo brasileiro.**

Pelo fato do multiplex ser propenso a bandas inespecíficas, decidiu-se confirmar se as bandas encontradas e tidas como resultados positivos eram de fato específicas para os genes de *TCR* e *IgH*. Sendo assim, realizamos o seqüenciamento de pelo menos uma amostra com resultado positivo para *TCRD* incompleto (Vd2-Dd3), *IgH* (FR3A-LJH), *TCRG* (V2-JGT1,2/ JGT3/ JGT4, V3- JGT1,2/ JGT3- JGT1,2/ JGT3/ JGT4/ JGT4, V8- JGT1,2/ JGT3/ JGT4, V9- JGT1,2/ JGT3/ JGT4, V10- JGT1,2/ JGT3/ JGT4) e *IgK*( VKI- íntron/ Kde, VKII-VKIII/Kde).

As amostras foram submetidas à PCR multiplex de acordo com o protocolo seguido para as reações de PCR ao diagnóstico.

O produto de PCR foi submetido à denaturação e renaturação (homo/heteroduplex descrito previamente) e em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%. As bandas foram retiradas do gel e purificadas de acordo com o protocolo do fabricante do GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) para obtenção do DNA para a reação de seqüenciamento. O produto obtido da purificação foi submetido à nova eletroforese em agarose 0,8% para verificação de qualidade e quantificação do DNA.

As amostras que se apresentaram bem concentradas foram então diluídas numa concentração 1:5 e as demais foram utilizadas sem diluição.

Para a reação de seqüenciamento foi montada uma placa contendo 5 pmoles de primer (quadro 5) e 1 $\mu$ L de DNA (diluído 1:5 ou não diluído, conforme explicado acima). A placa foi enviada para o Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG-Unicamp) e as amostras foram seqüenciadas por PCR assimétrica usando o ABI-Prism Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Read Reaction Kit, conforme especificação do fabricante, em um aparelho de sequenciamento ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer).

Quadro 5: Primers forward escolhidos para o seqüenciamento das amostras.

<i>Gene</i>	<i>Designação</i>	<i>Primer forward utilizado</i>
<i>TCR D</i>	C	VD2
<i>IgH</i>	D	FR3A
	F	V2
<i>TCR G</i> (multiplex)	G	V3
	I	V8
	J	V9
	L	V10
	N	VKI
<i>IgK</i>	O	VKII

A análise do seqüenciamento foi realizada através dos programas ABI Sequence Analysis V3 e Chromas 1.5. Em seguida as seqüências obtidas foram submetidas ao BLAST<sup>3</sup> para a determinação do seguimento gênico seqüenciado de acordo com as seqüências depositadas nesse banco de dados.

### 3.5 Metodologia Biomed-1 para análise da DRM (método Biomed)

Além do método acima descrito foi realizada também a análise das amostras através de PCR singleplex para DRM com primers e protocolos desenvolvidos e utilizados pelo estudo europeu BIOMED-1 Concerted Action (54) e por Willems et al. (57). Nesta metodologia o DNA de cada paciente foi submetido à amplificação por PCR com pares de primers consenso que flanqueiam os genes *IgH*, *TCRG*, *TCRD* e *IgK* descritos por Willems et al. (57) e Pongers-Willems et al. (54) (quadro 6).

<sup>3</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Quadro 6: Sequências dos primers utilizados no método Biomed

<i>Segmento</i>	<i>Seqüência</i>
VD1-5'	5'-ACTCAAGCCCAGTCATCAGTATCC-3'
VD2-5'	5'-ACCAAACAGTGCCTGTGTC AATAGG-3'
VD3-5'	5'-GACCAGACGGTGGCGAGTGGC-3'
DD2-5'	5'-ACTCCATGTTCAAATAGATATAGTATT-3'
JD1-3'	5'-ACCTCTTCCCAGGAGTCCTCC-3'
DD3-3'	5'-GAAATGGCACTTTTGGCCCTGCAG-3'
VGI-5'	5'-CAGGCCGACTGGGTCATCTGC-3'
VGII-5'	5'-CAGCCCGCCTGGAATGTGTGG-3'
VGIII-5'	5'-GACATACCTTGCAAGATATCGAGC-3'
VGIV-5'	5'-CTGAAATATCTATTTCCAGACCAGC-3'
JG1.1/2.1-3'	5'-TTACCAGTGAAGTTACTATGAGC-3'
JG1.2-3'	5'-AAGAAAACCTTACCTGTAATGATAAGC-3'
JG1.3/2.3-3'	5'-CCGTATATGCACAAAGCCAAATC-3'
VKI-5'	5'-GTAGGAGACAGAGTCACCATCACT-3'
VKII-5'	5'-TGGAGAGCCGGCCTCCATCTC-3'
VKIII-5'	5'-GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG-3'
VKIV-5'	5'-GGCGAGAGGGCCACCATCAAC-3'
Íntron-5'	5'-GTTATTCCCAAAGCTCAATCTCAAAG-3'
Kde-3'	5'-CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC-3'
Íntron-3'	5'-CGATTGAGTGGCTTTGGTGG-3'
VH1/7-5'	5'-TCTGGGGCTGAGGTGAAGAA-3'
VH2-5'	5'-ACCTTGAAGGAGTCTGGTCCT-3'
VH3-5'	5'-GGGGTCCCTGAGACTCTC-3'
VH4-5'	5'-GCCAGTGGTGAAGC-3'
VH5-5'	5'-CTGGTGCAGTCTGGAGCAG-3'
JH21-3'	5'-ACCTGAGGAGACGGTGACC-3'

Inicialmente as amostras obtidas ao diagnóstico foram submetidas a 24 reações de PCR utilizando um único par de primers por reação (PCR singleplex) (quadro 7) seguindo o protocolo adaptado de Pongers-Willemsse et al. (54) e Willems et al. (57) (quadro 8). O produto da PCR foi então submetido à análise em gel de agarose 2%. As amostras que demonstraram amplificação de produto gênico no gel de agarose foram então submetidas à análise de homo/heteroduplex por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% não denaturante. Este gel foi corado em brometo de etídeo (1µg/mL) por 30 minutos e fotografado, sendo que para determinação do tamanho das amostras foi utilizado um



marcador de peso molecular e a clonalidade foi novamente caracterizada pela presença de banda de tamanho esperado (quadro 7).

Quadro 7: Mixes de primers utilizados para amplificação dos genes *TCRG*, TCR D incompleto, *IgH* e *IgK*.

<i>Gene</i>	<i>Reação de PCR</i>	<i>Primers</i>	<i>Tamanho esperado</i>
<i>TCRD</i>	1	VD1-5' + JD1-3'	452pb
	2	VD2-5' + DD3-3'	501pb
	3	VD2-5' + JD1-3'	443pb
	4	VD3-5' + JD1-3'	440pb
	5	DD2-5' + DD3-3'	608pb
	6	DD2-5' + JD1-3'	550pb
<i>TCRG</i>	7	VGI-5' + JG1.1/2.1-3'	329pb
	8	VGII-5' + JG1.2-3'	337pb
	9	VGI-5' + JG1.3/2.3-3'	533pb
	10	VGII-5' + JG1.1/2.1-3'	318pb
	11	VGII-5' + JG1.2-3'	326pb
	12	VGII-5' + J1.3/2.3-3'	522pb
	15	VGIII-5' + JG1.3/2.3-3'	522pb
	18	VGIV-5' + JG1.3/2.3-3'	558pb
<i>IgK</i>	19	VKI-5' + Kde-3'	433pb
	20	VKII-5' + Kde-3'	443pb
	21	VKIII-5' + Kde-3'	429pb
	22	VKIV-5' + Kde-3'	445pb
	23	íntron-5' + Kde-3'	511pb
<i>IgH</i>	26	VH1/7-5' + JH21-3'	300 a 350pb
	27	VH2-5' + JH21-3'	
	28	VH3-5' + JH21-3'	
	29	VH4-5' + JH21-3'	
	30	VH5-5' + JH21-3'	

Quadro 8: Protocolo para as reações de PCR e ciclos de amplificação para a metodologia Biomed-1

<b>Reação (concentrações finais)</b>	<b>TCRD e TCRG</b>	<b>Ciclo de PCR</b>		
DNA	100 ng	94°C - 3 minutos		
Tampão 10X	1 X	60°C - 2 minutos		
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	72°C - 3 minutos		
dNTP	400 µM	94°C - 1 minuto	} 35X	
cada Oligo	5,5 µM	60°C - 1 minuto		
Tth Taq DNA polimerase	1 U	72°C - 3 minutos		
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 50 µl	72°C - 10 minutos		
<b>Reação (volume final = 50 µl) IgK</b>				
DNA	100 ng	92°C - 3 minutos		} 6X
Tampão 10X	1 X	92°C - 45 segundos		
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	63°C - 1:30 minutos (-1°C a cada ciclo)		
dNTP	400 µM	72°C - 2 minutos		
cada Oligo	5,5 µM	92°C - 45 segundos		
TMCA	0,1M	56°C - 1:30 minutos	} 27X	
Tth Taq DNA polimerase	1 U	72°C - 2 minutos		
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 50 µl	72°C - 10 minutos.		
<b>Reação (concentrações finais) IgH</b>				
DNA	100 ng		} 35X	
Tampão 10X	1X	94°C - 4 minutos		
MgCl <sub>2</sub>	2mM	94°C - 30segundos		
dNTP	400 µM	60°C - 45segundos		
cada Oligo	5,5 µM	72°C - 45segundos		
TMCA	0,1 M	72°C - 10 minutos		
Tth Taq DNA polimerase	1 U			
H <sub>2</sub> O milli Q	q.s.p 50 µl			

As amostras dos dias 14 e 28 foram analisadas por PCR para os rearranjos considerados positivos ao diagnóstico, seguindo o mesmo protocolo aplicado às amostras do diagnóstico (quadro 8). Os produtos da PCR para as amostras do seguimento também foram submetidos à análise de homo-heterodúplex e, aqueles que apresentavam o mesmo padrão de migração de bandas no gel de poliacrilamida em relação às amostras ao diagnóstico, foram considerados positivos para a DRM.

Para cada reação de PCR, tanto ao diagnóstico quanto no seguimento, foram usados dois controles negativos: um sem DNA e outro contendo DNA policlonal obtido de células mononucleadas.

### **3.6 Análise Estatística**

O teste exato de Fisher foi aplicado para analisar possível correlação entre o resultado da DRM nos dias 14 e 28 da terapia de indução e variáveis clínicas e biológicas como: gênero, idade, contagem leucocitária (WBC) ao diagnóstico, imunofenótipo, grupo de risco, índice de DNA, presença ou ausência de translocação t(12;21), presença ou ausência de CD10, WBC no dia 7, presença ou ausência de blastos no dia 14, estado da medula óssea nos dias 14 e 28 e resposta ao tratamento.

Foram realizadas análises estatísticas para sobrevida global (SG) (definida como o tempo entre o diagnóstico e a ocorrência de óbito de qualquer causa) e sobrevida livre de eventos (SLE) (definida como o tempo entre a remissão e a ocorrência de recidiva ou óbito por qualquer causa) para 67 pacientes estudados em D14 e 71 em D28. As análises foram feitas utilizando-se o software SPSS 17.0 através de curvas de Kaplan-Meier foram comparadas de acordo com o teste de log-rank.

As análises estatísticas foram feitas com o uso dos softwares WinStat for Excel e SPSS Statistics 17.0 com um nível de significância  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Método do grupo brasileiro

#### 4.1.1 Otimização da reação de PCR

##### 4.1.1.1 Concentração de DNA

O protocolo original previa o uso de 100ng de DNA na reação de PCR. Foi feita amplificação do DNA das amostras obtidas ao diagnóstico nas concentrações 10, 25, 50 e 100ng. A figura 6 representa dois pacientes positivos para rearranjos do gene *TCRG* testados, observa-se que para o primeiro paciente não há diferença entre as concentrações, porém para o segundo paciente as concentrações 10 e 25ng apresentaram-se mais fracas em relação a 50 e 100ng. Foi demonstrado que a concentração de 50ng pode ser utilizada para as análises de marcadores ao diagnóstico com a mesma resolução do uso de 100ng, sendo importante na economia de material utilizado na pesquisa.

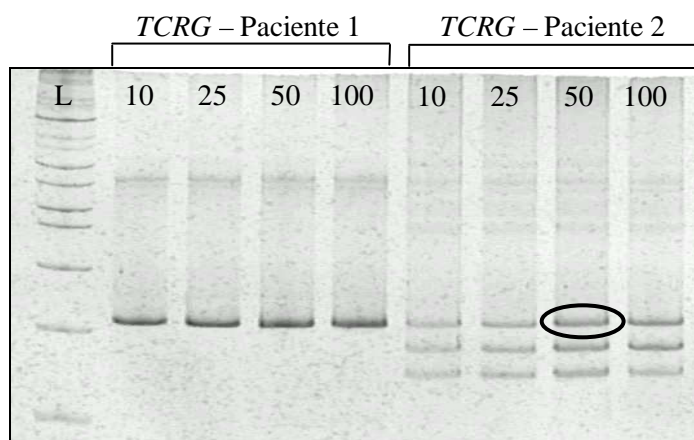


Figura 6. Homo/Heteroduplex de reações para *TCRG* utilizando diferentes concentrações de DNA (10, 25, 50 e 100ng). Observa-se que 50ng (em destaque) no paciente 2 apresenta a mesma qualidade na reação do que 100ng (a direita). L= padrão de peso molecular.

Para amostras analisadas nos dias 14 e 28 da terapia de indução utilizou-se 100ng de DNA por reação de PCR devido à menor quantidade de blastos leucêmicos presentes nas amostras de MO.

#### 4.1.1.2 Amplificação inespecífica

Nos primeiros ensaios as reações de PCR foram realizadas conforme descrito por Scrideli et al. (11), contudo, o aparecimento de bandas inespecíficas de tamanho próximo ao produto esperado gerou dúvida quanto à interpretação dos resultados (figura 7).

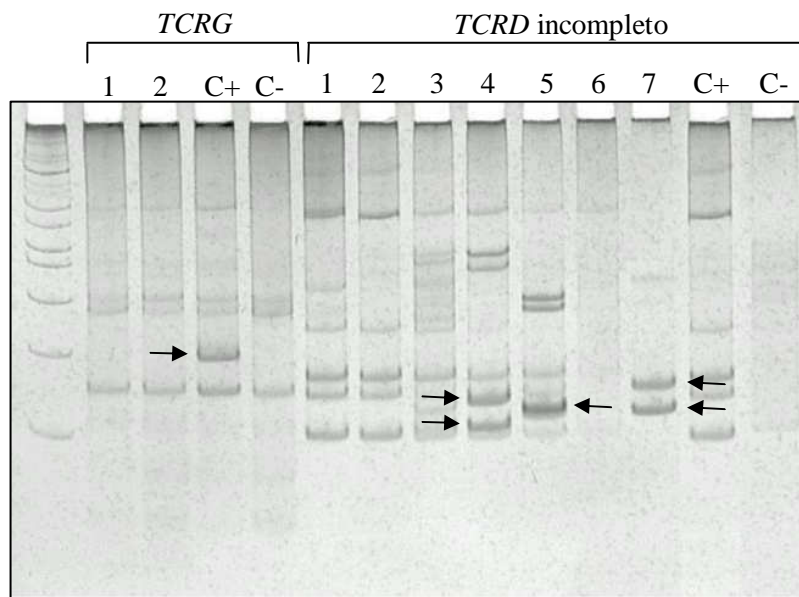


Figura 7. Homo/Heteroduplex para *TCRG* e *TCRD* incompleto, nota-se a presença de bandas inespecíficas de tamanho próximo ao produto esperado. Na foto as setas indicam as bandas específicas, 1 a 7 representam amostras de pacientes testadas por PCR, sendo que as amostras 1 e 2 são dos mesmos pacientes para ambos marcadores testados, C+ e C- representam os controles utilizados, sendo C+ controle positivo e C- controle negativo (DNA policlonal de células mononucleadas de sangue periférico).

Para solucionar este problema alguns experimentos foram realizados para posterior modificação do protocolo original.

##### 4.1.1.2.1 Concentração de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ):

Originalmente estava previsto o uso de 2mM para as reações de PCR, porém, testes utilizando  $MgCl_2$  numa concentração de 1,5mM mostraram que para todas as reações houve diminuição do aparecimento de bandas inespecíficas. Passou-se então a utilizar  $MgCl_2$  a 1,5mM. Porém, para o mix de primers, denominado B, utilizado para o gene *TCRG*, houve a persistência de muitas bandas inespecíficas. Um protocolo com  $MgCl_2$  1,0 mM foi testado e observou-se melhora na qualidade da reação (figura 8). A partir

desses testes o protocolo original foi modificado, passando a utilizar-se  $MgCl_2$  a 1,0mM na reação para o segundo mix de *TCRG* e  $MgCl_2$  a 1,5mM para as demais reações.

Para o protocolo das PCR de *IgK* [descrito por Pongers-Willemse et al. (54)] a mudança da concentração inicial prevista (2mM) também foi testada devido à presença de bandas inespecíficas e alterada para 1,5mM para o mix denominado N e 1,2mM para o mix O.

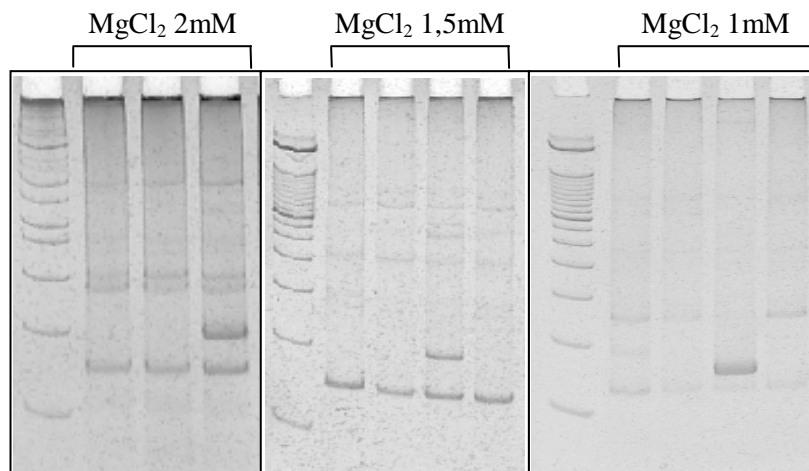


Figura 8. Exemplos de Homo/Heteroduplex de reações para mix B de *TCRG* em diferentes amostras de pacientes com: a)  $MgCl_2$  2mM b)  $MgCl_2$  1,5mM c)  $MgCl_2$  1,0mM. Nota-se que com o uso de  $MgCl_2$  1,0mM apenas a banda específica ficou forte. Nas fotos as setas indicam as bandas específicas. L= padrão de peso molecular.

#### 4.1.1.2.2 Concentração de primer

Testes utilizando o dobro da concentração de primers (de 15 $\mu$ M para 30 $\mu$ M) para reações envolvendo o gene *IgH* foram realizados e os produtos foram comparados com aqueles feitos de acordo com o protocolo original. Observou-se que o uso do dobro de concentração de primers para esse gene melhorou a qualidade das bandas específicas obtidas, diante disso adotou-se 30 $\mu$ M como a concentração de primer utilizado para a reação de PCR para rearranjos do gene *IgH* (figura 9).

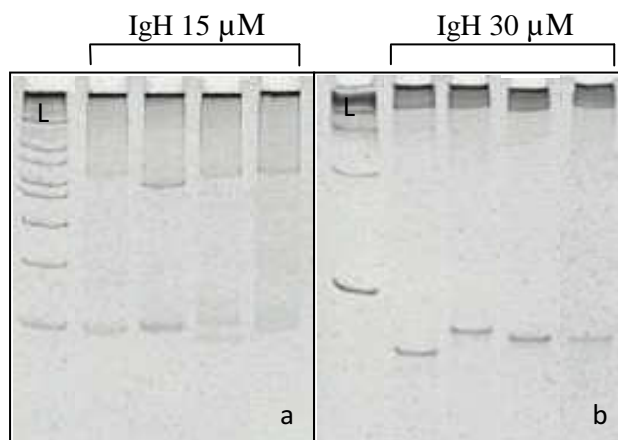


Figura 9. Exemplo de Homo/Heteroduplex de reações para *IgH* com amostras de diferentes pacientes. A) 15 $\mu$ M de primers por reação b)30 $\mu$ M de primers por reação. Observa-se que nas reações onde foi utilizado 30 $\mu$ M de primers as bandas de interesse ficaram mais fortes. L= padrão de peso molecular.

#### 4.1.1.2.3 Temperatura de annealing

As reações envolvendo o gene *TCRD* incompleto e o mix de primers denominado A para *TCRG* foram testadas com aumento da temperatura de pareamento do primer, para diminuir o número de bandas inespecíficas. Os testes foram feitos com o protocolo já modificado em relação à concentração de DNA, MgCl<sub>2</sub> e volume de primers e constatou-se que um aumento de 1°C na temperatura de annealing na reação para o primeiro mix do *TCRG* (dados não apresentados) e de 2°C na temperatura de annealing para a reação referente ao gene *TCRD* incompleto foram favoráveis para diminuição das bandas inespecíficas, podendo então ser aplicadas no protocolo utilizado no presente estudo (figura 10).

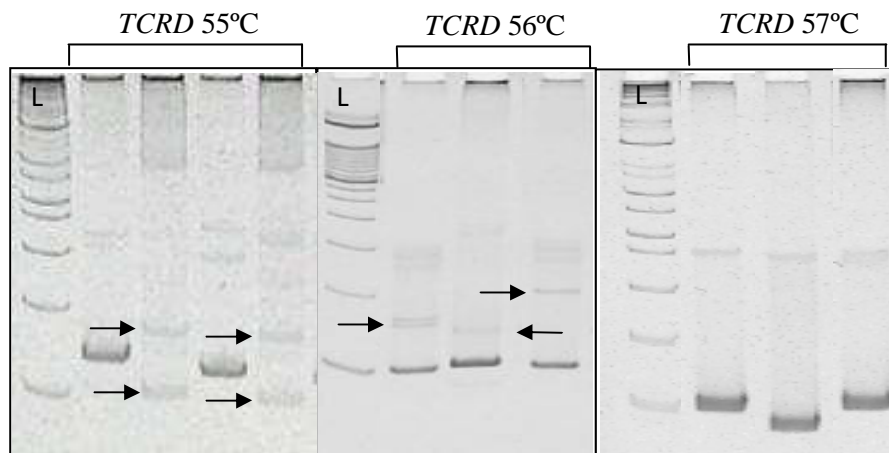


Figura 10. Homo/Heteroduplex de reações para *TCRD* incompleto em diferentes pacientes. a) com temperatura de anelamento de acordo com o protocolo original (55°C) b) com aumento de 1°C na temperatura de annealing (56°C) c) com aumento de 2°C na temperatura de anelamento do primer (57°C). Observa-se que com o aumento de 2°C na temperatura de annealing as bandas inespecíficas de tamanho próximo às bandas de interesse desaparecem. Nas fotos as setas indicam as bandas inespecíficas de tamanho próximo às de interesse. L= padrão de peso molecular.

#### 4.1.2 Teste de sensibilidade

A sensibilidade da PCR tanto para amostras de células frescas quanto para amostras de células congeladas na forma de pellet, por um longo período, foi determinada por diluições seriadas de DNA de diferentes amostras em um pool de DNA de medula óssea obtida de pacientes sem doença hematológica. A sensibilidade do método simplificado variou de um mínimo  $10^{-2}$  até um máximo de  $10^{-3}$  para amostras frescas, sendo coincidente com resultados obtidos previamente (11, 42). Confirmou-se que a sensibilidade dos primers para *IgH* é maior do que a dos primers para *TCRG*. Exemplos de testes de sensibilidade são mostrados na figura 11.

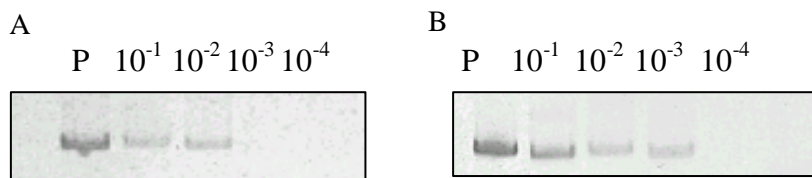


Figura 11. Teste de sensibilidade em amostras frescas. (A) *TCRG*, com sensibilidade de  $10^{-2}$  e (B) *IgH*, com sensibilidade de  $10^{-3}$ .

Observou-se também que a sensibilidade da PCR nas amostras de DNA de células congeladas por um período longo foi menor do que aquela observada em amostras



frescas, atingindo um máximo de 1 célula leucêmica em 100 células normais ( $10^{-2}$ ) para os primers de *IgH*. Exemplo de teste de sensibilidade em amostra congelada encontra-se na figura 12 (comparar com resultados da figura 11 para amostras frescas).

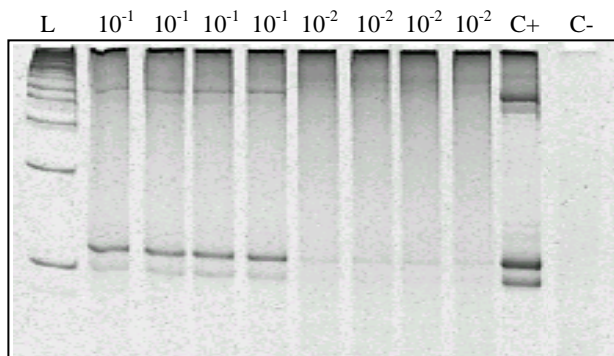


Figura 12. Teste de sensibilidade com primers para mix 1 de *IgH*. L: 1kb plus DNA ladder, C+: controle positivo e C-: controle negativo.

O fato da amplificação ser mais eficiente em DNA extraído de amostras frescas já havia sido relatado anteriormente (58) e pode explicar diferenças na proporção de DRM positiva entre estudos retrospectivos e prospectivos.

#### 4.1.3 Confirmação da especificidade dos primers utilizados na técnica

As seqüências obtidas pelo seqüenciamento das bandas obtidas nas PCR foram submetidas ao programa BlastN<sup>3</sup> e confirmou-se que se tratavam de genes de imunoglobulina e receptores de células T. Contudo verificou-se que o primer VG8 aplicado no PCR multiplex amplificou seqüências do tipo VG2. Isto se deve provavelmente ao fato dos primers V2 e V8 utilizados nesse projeto terem um único nucleotídeo diferente (figura 13). Por este motivo esses dois rearranjos não puderam ser diferenciados um do outro sendo incluídos no mesmo grupo. Todos os outros rearranjos se mostraram específicos para o gene de interesse.

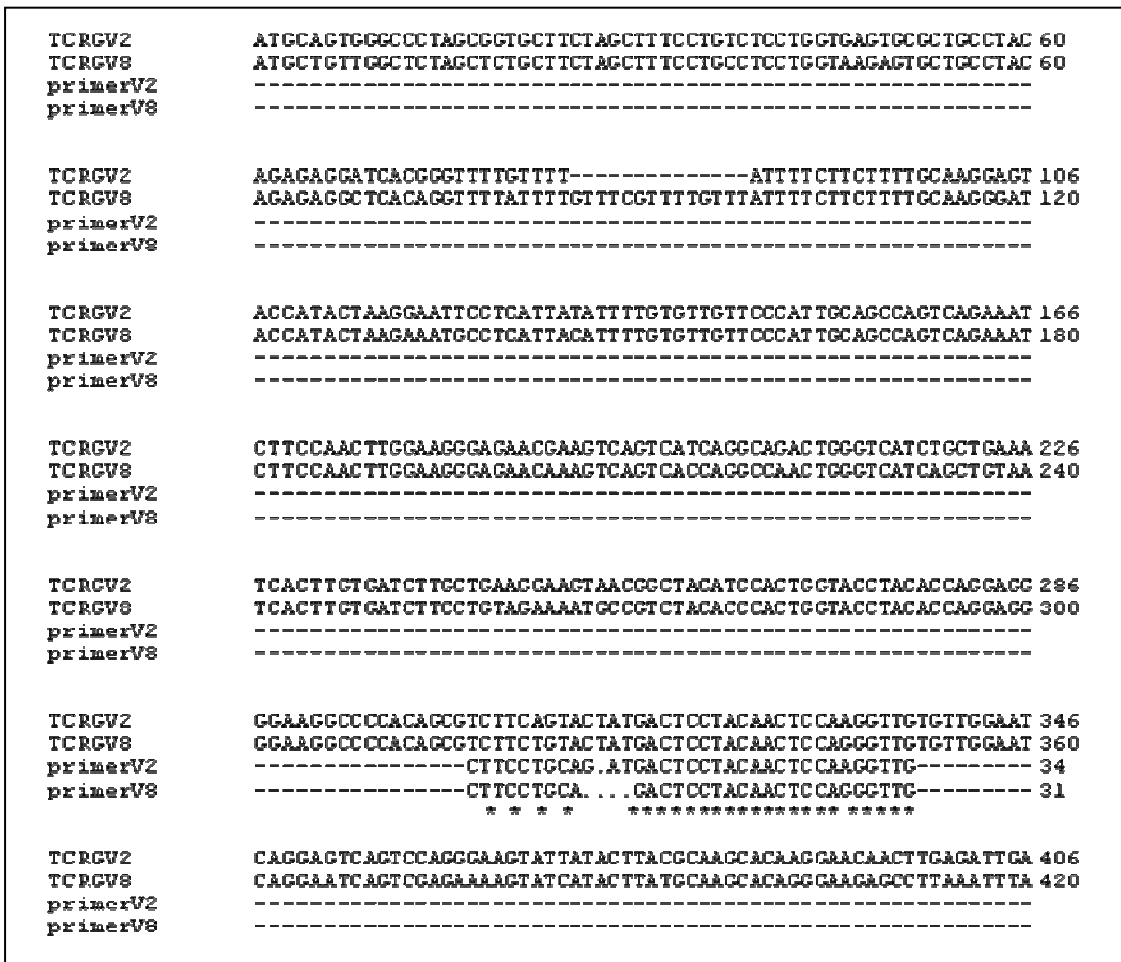


Figura 13. Alinhamento entre os primers V2 e V8 utilizados na metodologia brasileira e os segmentos V2 e V8 de *TCRG*.

#### 4.1.4 Frequências dos diferentes rearranjos de imunoglobulinas e receptores de células T nas LLA pediátricas.

Atualmente, rearranjos de cadeia pesada de imunoglobulina (*IgH*), cadeia leve de imunoglobulina (*IgK*), receptor de célula T gamma (*TCRG*) e receptor de célula T delta incompleto (*TCRD* inc.), são os marcadores moleculares para PCR mais usados no estudo da doença residual mínima (DRM) em leucemia linfóide aguda (LLA) infantil (59). De posse dessas informações, amostras de MO coletadas ao diagnóstico, foram inicialmente analisadas por PCR com primers consenso para rearranjos gênicos *TCRG*, *TCRD* incompleto e *IgH*. No decorrer das análises verificou-se a necessidade de inclusão de um maior número de marcadores para os pacientes com LLA derivada de linhagem B, uma vez que o uso de pelo menos dois marcadores é de extrema importância em estudos de DRM

para que se previna resultados falso-negativos naqueles pacientes que apresentam evolução clonal (30, 31, 43). Sendo assim, PCR para rearranjos gênicos *IgK* também foram utilizados para a análise de marcadores de DRM das amostras ao diagnóstico dos pacientes com LLA B-derivada.

De posse dessas informações amostras obtidas ao diagnóstico de 91 casos consecutivos de LLA infantil admitidos para tratamento no Centro Infantil Boldrini, Campinas – SP, no período de abril de 2006 a novembro de 2007, foram analisadas através de PCR multiplex e singleplex com primers consenso para rearranjos gênicos *TCRG*, *TCRD* incompleto, *IgH* e *IgK*.

Dentre os 91 casos, 86,8% (79) eram derivados de linhagem B e 13,2% (12) eram derivados de linhagem T. Pelo menos um rearranjo clonal foi identificado em 98,9% dos pacientes estudados (98,7% para as LLA de linhagem B e 100% para as LLA-T) estando de acordo com dados preliminares descritos para esta técnica (60). Dois ou mais marcadores clonais foram detectados em 85,7% dos casos, sendo 75% para os casos de LLA-T e 87,3% para os casos de LLA B-derivada, demonstrando que a técnica empregada pode ser utilizada no estudo da DRM na grande maioria das crianças com LLA.

O único caso que não apresentou amplificação para qualquer dos rearranjos testados, apresentava DNA de boa qualidade, segundo confirmado pela PCR para o gene da beta globina. A porcentagem de rearranjos detectados ao diagnóstico encontra-se demonstrada na tabela 1.

Tabela 1: Porcentagem de rearranjos detectados pelo método GB ao diagnóstico no total de pacientes analisados, em LLA de linhagem B e em LLA-T.

	<i>Total</i>	<i>LLA linhagem B</i>	<i>LLA-T</i>
0 rearranjo	1,1%	1,3%	0%
1 rearranjo	98,9%	98,7%	100%
2 ou mais rearranjos	85,7%	87,3%	75,0%
3 ou mais rearranjos	65,9%	68,3%	50,0%

Para os casos de LLA B-derivada, o rearranjo mais freqüente foi *IgH* (74,7%), seguido por *TCRG* (55,7%), *IgK* (51,9%) e *TCRD* incompleto (50,6%) (figura 14). Scrideli et al. (42) também observaram prevalência de rearranjos *IgH* nas LLA B-derivada

e frequências semelhantes às nossas para *TCRG* e *TCRD* incompleto. Beishuizen et al. (61, 62), Stolz et al. (63) e van der Velden et al. (59) encontraram frequência de *IgK* semelhantes à do presente trabalho, demonstrando concordância entre os dados aqui apresentados e aqueles anteriormente relatados.

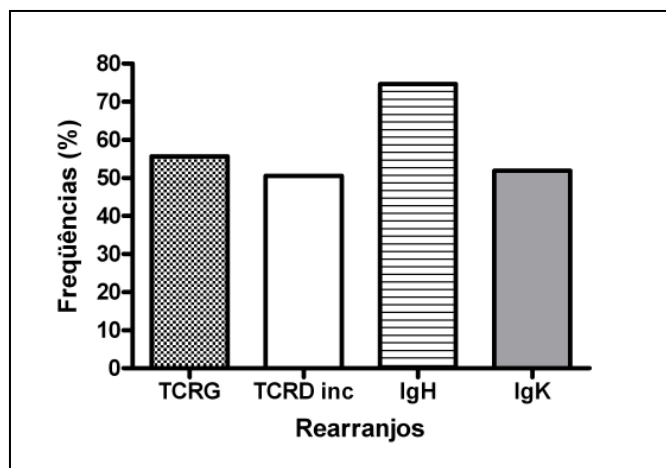


Figura 14. Frequências para rearranjos *TCRG*, *TCRD* incompleto, *IgH* e *IgK* em amostras de LLA B-derivada ao diagnóstico.

Ainda para os casos de LLA B-derivada a análise realizada para os segmentos V do gene *TCRG*, revelou que os segmentos mais frequentes foram V2/V8 (31,6%), V9 (25,3%), V3 (24,0%), V5 (16,0%) e V11 (4,0%) (figura 15). Esses dados demonstram concordância com aqueles descritos na literatura os quais relatam que os rearranjos mais comuns para a região V de *TCRG* em LLA B-derivada envolvem a família  $V\gamma I$  que contém os segmentos V2, V3, V4, V5 e V8 (36, 37, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72). Em relação à frequência encontrada para o segmento V9 (família  $V\gamma II$ ) (25,3%), esta se encontra dentro dos padrões esperados descritos na literatura por Scrideli et al. (42).

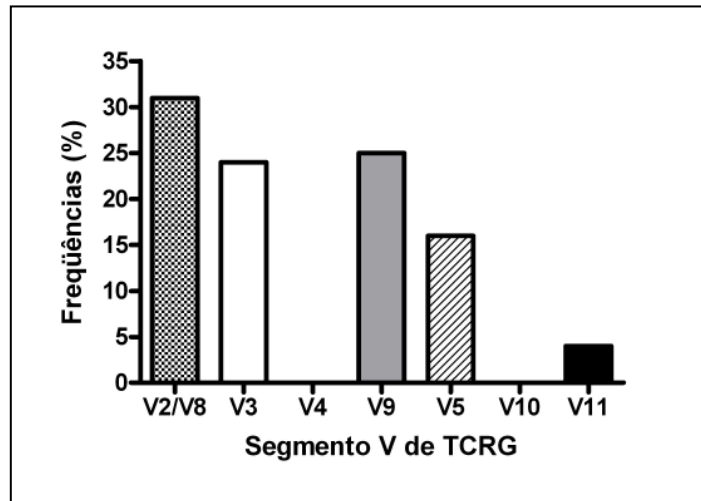


Figura 15. Frequência de rearranjos envolvendo cada segmento V do gene *TCRG* em pacientes com LLA B-derivada.

Devido ao fato da metodologia dos “primers consenso” descrita por Trainor et al. (52), empregada no presente estudo, prever a investigação de todos os segmentos gênicos V funcionais do locus *TCRG* (V2, V3, V4, V5, V8, V9) e ainda os pseudogenes  $\psi$ V10 e  $\psi$ V11, a detecção de rearranjos clonais deste gene em LLA-T foi possível em 100% dos casos (figura 16).

Nas LLA derivadas de linhagem T o segundo rearranjo mais freqüente foi o do *TCRD* incompleto (16,7%). Rearranjos para *IgH* foram encontrados em 8,3% dos pacientes e *IgK* em nenhum paciente (figura 16). Estes valores foram semelhantes àqueles observados em estudo anterior (42) com o emprego dos mesmos primers.

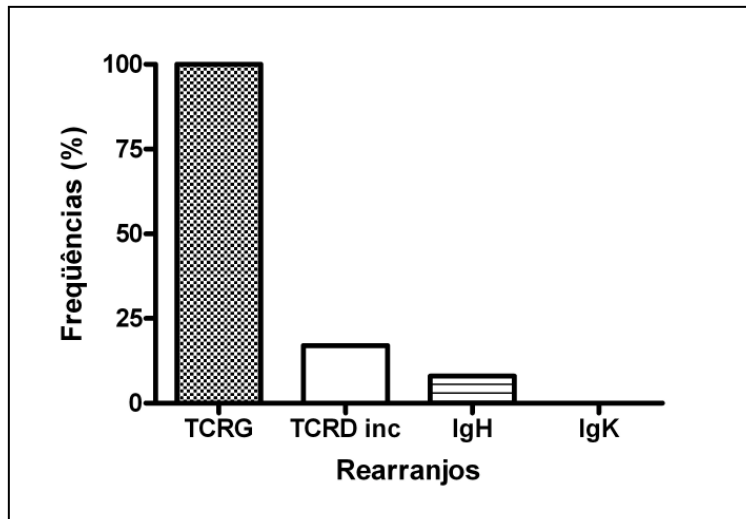


Figura 16. Frequências para rearranjos *TCRG*, *TCRD* incompleto, *IgH* e *IgK* em amostras de LLA-T ao diagnóstico.

Nas LLA-T, os rearranjos clonais de *TCRG* continham os segmentos V2/V8 em 91,7% dos casos, V3 em 50,0%, V9 em 26,4%, V5 em 25,0%, V10 em 17,0% e V11 8,3% (figura 17). Novamente marcadores clonais para a família V $\gamma$ I foram os mais frequentes e, segundo a literatura, esse resultado provavelmente reflete o fato de que os segmentos dessa família sejam usados em aproximadamente todos os rearranjos *TCRG* em LLA-T, bem como em muitos casos de LLA B-derivada (65, 73, 74).

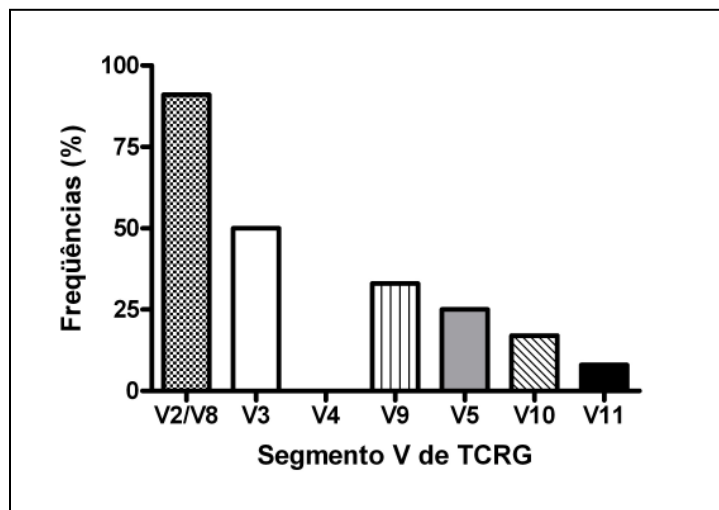


Figura 17. Frequência de rearranjos envolvendo cada segmento V do gene *TCRG* em pacientes com LLA-T.

#### **4.1.5 Análise da presença de doença residual em amostras nos dias 14 e 28 da terapia de indução.**

Tradicionalmente, os protocolos de tratamento da LLA infantil têm usado medidas simples de características clínicas ao diagnóstico para a estratificação dos pacientes em grupos de risco (21, 75). Os mais novos protocolos europeus para LLA (como o protocolo AIEOP-BFM ALL 2000) são principalmente baseados em dados da resposta à DRM em dias específicos da terapia (dias 33 e 78) (76). Já no Brasil, a estratificação dos pacientes em grupos de risco no protocolo brasileiro GBTLI-99 adota, em combinação com fatores pré-tratamento, dados de resposta inicial ao tratamento. São considerados pacientes alto risco aqueles que apresentam contagem WBC ao diagnóstico  $\geq 50.000/\text{mm}^3$  e/ou idade  $<1$  ano e  $\geq 9$  anos, os pacientes risco baixo apresentam WBC ao diagnóstico  $<50.000/\text{mm}^3$  e/ou idade  $\geq 1$  ano e  $<9$  anos. Ao longo do tratamento alguns pacientes considerados de baixo risco podem ser reclassificados como alto risco por apresentarem um ou mais dos seguintes critérios: WBC no dia 7  $>5.000/\text{mm}^3$ , medula óssea M3 ( $>25\%$  de blastos) no D14 ou medula óssea M2 ou M3 ( $>5$  e  $25\%$  de blastos, respectivamente) em D28 (77).

No presente estudo, os dados clínicos de resposta inicial ao tratamento foram comparados com os resultados de DRM obtidos para amostras do D14 e D28. Dados clínicos como gênero, idade, contagem leucocitária ao diagnóstico (WBC), imunofenótipo, grupo de risco, WBC no dia 7 da terapia de indução e presença ou ausência de blastos no D14, foram obtidos para todos os casos analisados. Outros dados clínicos como presença ou ausência de translocação (t12;21), índice de DNA, positividade ou negatividade para CD10 e estado da medula óssea no D14 e D28, foram obtidos para a maioria dos pacientes do presente estudo. Sendo assim, foi possível a execução de análise estatística através do Teste Exato de Fischer para busca de associações entre os dados clínicos descritos acima e os resultados de DRM nos dias 14 e 28 da terapia de indução.

A classificação em bons e maus respondedores ao tratamento foi feita de acordo com os critérios adotados pelo GBTLI-99. Foram considerados maus respondedores aqueles que apresentavam WBC no D7  $>5.000/\text{mm}^3$  e/ou MO M3 ( $>25\%$  de blastos) no D14 e/ou MO M2/M3 ( $>5\%$  blastos) no D28; os demais foram considerados bons respondedores.

Em relação aos dados de DRM, 77 dos 91 casos analisados ao diagnóstico, foram também analisados para amostras nos dias 14 e/ou 28 da terapia de indução (D14 e D28). A exclusão de 14 casos foi devida à falta de coleta de amostras ao longo da terapia de indução (13 pacientes) e ausência de marcadores moleculares ao diagnóstico (1 paciente). Vale esclarecer também que para 10 dos 77 casos incluídos no seguimento não houve amostra coletada no D14 e, para 5 casos não houve amostra para análise no D28.

A tabela 2 resume os resultados encontrados para a DRM em ambos os pontos do tratamento analisados.

Tabela 2: Número total de pacientes analisados e número e porcentagem de casos positivos para a presença da DRM nos dois pontos de tratamento estudados (dias 14 e 28 da terapia de indução).

Ponto do tratamento	Total analisado	Casos positivos
D14	67	18 (26,9%)
D28	71	14 (19,4%)
D14 e D28	62	10 (16,1%)

Dos 18 pacientes positivos em D14, 8 (44,4%) estavam negativos em D28 e 10 (55,6%) permaneceram positivos. Um caso foi observado como sendo D14 negativo e se tornou positivo em D28, o que pode ter ocorrido devido à contaminação com sangue periférico da amostra D14, diluindo assim o clone leucêmico em células normais. Os casos DRM D14 positivos e D28 negativos representam um grupo de provável melhor prognóstico em relação àqueles DRM D14 e D28 positivos.

As tabelas 3 e 4 resumem os dados clínicos, resultados da DRM nos dias 14 e 28 e valores da estatística realizada para os casos estudados. Embora o número total de amostras analisadas tenha sido 67 em D14 e 71 em D28, para algumas características clínicas o número de dados disponíveis (*N*) ficou abaixo desse total.



Tabela 3. Número total de casos analisados para diferentes dados clínicos, número e porcentagem de casos positivos e valor de *p* através do teste exato de Fisher para a DRM no D14.

	Nº casos analisados	DRM D14+/Total analisado	Teste de Fisher (valor de <i>p</i> )
<b>Gênero (n=67)</b>			
Masculino	37	14/37 (37,8%)	<b>0,022*</b>
Feminino	30	4/30 (13,3%)	
<b>Idade (n=67)</b>			
≥1 ano e <9 anos	48	8/48 (16,7%)	<b>0,004*</b>
<1 ano e ≥9 anos	19	10/19 (52,6%)	
<b>WBC ao diagnóstico (n=67)</b>			
<50.000/mm <sup>3</sup>	50	13/50 (26,0%)	0,727
≥50.000/mm <sup>3</sup>	17	5/17 (29,4%)	
<b>Imunofenótipo (n=67)</b>			
LLA B-derivada	59	13/59 (22,0%)	<b>0,028*</b>
LLA-T	8	5/8 (62,5%)	
<b>Grupo de risco (n=66)</b>			
Alto risco (AR)	35	12/35 (35,3%)	<b>0,043*</b>
Baixo risco (BR)	31	4/31 (12,9%)	
<b>Índice de DNA (n=65)</b>			
<1.16	51	15/51 (29,4%)	0,217
>1.16	14	2/14 (14,3%)	
<b>Translocação (RT-PCR) (n=67)</b>			
t(12;21) presente	12	1/12 (8,3%)	0,366
t(12;21) ausente	55	10/55 (18,2%)	
<b>CD10 (n=66)</b>			
Positivo	61	14/61 (22,9%)	<b>0,017*</b>
Negativo	5	4/5 (80,0%)	
<b>WBC dia 7 (n=67)</b>			
<5.000/mm <sup>3</sup>	62	15/62 (24,2%)	0,115
>5.000/mm <sup>3</sup>	5	3/5 (60,0%)	
<b>Blastos dia 14 (n=67)</b>			
Presença	4	4/4 (100,0%)	<b>0,004*</b>
Ausência	63	14/63 (22,2%)	
<b>Medula óssea dia 14 (n=58)</b>			
<5% de blastos	48	10/48 (20,8%)	<b>0,0007*</b>
>5% de blastos	10	8/10 (80,0%)	
<b>Medula óssea dia 28 (n=64)</b>			
<5% de blastos	63	16/63 (25,3%)	0,266
>5% de blastos	1	1/1 (100,0%)	

	Nº casos analisados	DRM D14+/Total analisado	Teste de Fisher (valor de <i>p</i> )
<b>Resposta ao tratamento (n=67)</b>			
Bons respondedores	60	13/60 (21,7%)	<b>0,013*</b>
Maus respondedores	7	5/7 (71,4%)	

Tabela 4. Número total de casos analisados para diferentes dados clínicos, número e porcentagem de casos positivos e valor de *p* através do teste exato de Fisher para a DRM no D28.

	Nº casos analisados	DRM D28+/Total analisado	Teste de Fisher (valor de <i>p</i> )
<b>Gênero (n=71)</b>			
Masculino	31	10/31 (32,2%)	0,166
Feminino	40	4/40 (10,0%)	
<b>Idade (n=71)</b>			
≥1 ano e <9 anos	49	7/49 (14,3%)	0,977
<1 ano e ≥9 anos	22	7/22 (31,8%)	
<b>WBC ao diagnóstico (n=71)</b>			
<50.000/mm <sup>3</sup>	49	7/49 (14,3%)	0,977
≥50.000/mm <sup>3</sup>	22	7/22 (31,8%)	
<b>Imunofenótipo (n=71)</b>			
LLA B-derivada	61	8/61 (13,1%)	<b>0,003*</b>
LLA-T	10	6/10 (60,0%)	
<b>Grupo de risco (n=71)</b>			
Alto risco (AR)	41	9/41 (21,9%)	0,353
Baixo risco (BR)	30	4/30 (13,3%)	
<b>Índice de DNA (n=69)</b>			
<1.16	56	13/56 (23,2%)	0,196
>1.16	13	1/13 (7,7%)	
<b>Translocação (RT-PCR) (n=67)</b>			
t(12;21) presente	12	1/12 (8,3%)	0,366
t(12;21) ausente	55	10/55 (18,2%)	
<b>CD10 (n=70)</b>			
Positivo	63	10/63 (15,9%)	<b>0,026*</b>
Negativo	7	4/7 (57,1%)	
<b>WBC dia 7 (n=71)</b>			
<5.000/mm <sup>3</sup>	62	9/62 (14,5%)	<b>0,012*</b>
>5.000/mm <sup>3</sup>	9	5/9 (55,6%)	
<b>Blastos dia 14 (n=71)</b>			
Presença	7	5/7 (71,4%)	<b>0,002*</b>
Ausência	64	9/64 (14,1%)	

	Nº casos analisados	DRM D28+/Total analisado	Teste de Fisher (valor de <i>p</i> )
<b>Medula óssea dia 14 (n=60)</b>			
<5% de blastos	49	5/49 (10,2%)	<b>0,00006*</b>
>5% de blastos	11	8/11 (72,7%)	
<b>Medula óssea dia 28 (n=68)</b>			
<5% de blastos	67	13/67 (19,4%)	0,206
>5% de blastos	1	1/1 (100,0%)	
<b>Resposta ao tratamento (n=71)</b>			
Bons respondedores	60	7/60 (11,7%)	<b>0,0006*</b>
Maus respondedores	11	7/11 (63,6%)	

O sexo masculino tem sido associado a um pobre prognóstico (78), sendo assim, a fim de reduzir a diferença na resposta ao tratamento entre o sexo masculino e o feminino, a duração do tratamento tem sido aumentada para meninos, mas não para meninas em alguns protocolos de tratamento (79). Porém, o impacto prognóstico adverso do sexo masculino tem sido descartado em alguns tratamentos clínicos nos quais a taxa de sobrevida livre de eventos é 80% ou mais (80, 81). Observando os resultados por nós obtidos verificamos que houve uma associação significativa entre o gênero e a presença de DRM no dia 14 da terapia de indução ( $p= 0,022$ ), onde 37,8% dos meninos estavam positivos para DRM no D14 enquanto apenas 13,3% das meninas encontravam-se na mesma situação. Por outro lado, não foi descartada uma possível associação entre imunofenótipo, gênero e DRM.

Estudos indicam que freqüentemente ocorre doença resistente em LLA-T (82) e sugerem que se a estratificação nos grupos de risco usasse como critério a DRM, a maioria dos pacientes com LLA-T seria classificada como alto risco. Em nossos estudos o imunofenótipo apresentou valor estatístico significativo com relação à DRM tanto no D14 como no D28 ( $p=0,028$  e  $p=0,003$ , respectivamente), estando associada a presença da DRM em ambos os pontos do tratamento com o imunofenótipo LLA-T. Uma vez que a maior parte (>70%) das LLA-T são do gênero masculino, é possível que haja uma correlação entre LLA-T, gênero e DRM, podendo explicar o resultado positivo de associação entre DRM e gênero masculino.

Com relação à idade ao diagnóstico, pacientes com idade inferior a 1 ano ou igual ou superior a 9 anos, apresentaram associação com DRM+ no dia 14 da terapia de

indução ( $p= 0,004$ ). Porém, contrariamente aos achados de Scrideli et al. (58) e Coustan-Smith et al. (32) não foi encontrada associação entre essa faixa etária e a presença de DRM no dia 28 do tratamento. Esses dados parecem sugerir que embora os pacientes com idade  $<1$  e  $\geq 9$  anos apresentem uma resposta inicial ao tratamento mais lenta em relação aos pacientes entre 1 e 9 anos, de certa forma esse grupo de pacientes possui uma resposta eficiente ao tratamento no geral, uma vez que apenas uma minoria de seus casos não se encontra negativa para a DRM no dia 28 (apenas 14,3% ). Deve-se considerar, porém, que nossa metodologia é pouco sensível ( $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ ) e podemos ter considerado negativos alguns casos com DRM ainda positiva.

Shurtleff et al. (83) relataram que os pacientes portadores da  $t(12;21)$  fazem parte de um grupo com excelente prognóstico. Em nosso grupo de pacientes a translocação  $t(12;21)$  mostrou-se presente em 16,4% dos casos analisados, incidência compatível com dados publicados na literatura (83). Os dados de DRM não apresentaram associação estatisticamente significativa com esta variável, porém, nos casos sem a translocação a frequência de DRM positiva foi mais elevada em ambos os tempos de seguimento (18,2 x 8,3% tanto em D14 quanto em D28); sugerindo que a ausência da translocação pode estar associada a pior resposta ao tratamento.

A presença de CD10 é tida como um indicativo de melhor prognóstico para os pacientes, embora estudos como os de Scrideli et al. (42) demonstraram que a presença de DRM positiva no final da terapia de indução é o fator prognóstico mais importante nas análises multivariadas com outros fatores, incluindo presença ou ausência de CD10. Em nosso trabalho, a ausência de CD10 apresentou-se associada à positividade da DRM em ambos os dias de tratamento analisados ( $p= 0,017$  e  $p= 0,026$ ).

Embora o conteúdo de DNA  $\geq 1,16$  da célula leucêmica seja tido como indicativo de bom prognóstico (14), nossos dados não demonstraram associação estatisticamente significativa entre o índice de DNA e a DRM. Esse resultado também foi obtido por Coustan-Smith et al. (32) quando monitoraram a DRM em LLA infantil utilizando um método mais sensível que o aplicado em nosso estudo (a citometria de fluxo), demonstrando assim que nossos dados mais uma vez concordam com aqueles da literatura.

Os trabalhos de Scrideli et al. (58) encontraram associação entre WBC no D7  $>5.000/\text{mm}^3$  e baixa sobrevida livre de eventos em 5 anos. Além disso, WBC  $>5.000/\text{mm}^3$  no D7 mostrou-se estatisticamente associado a uma pior resposta dos pacientes brasileiros tratados com um protocolo anterior ao atual (GBTLI-93) (22). Nos casos analisados no presente estudo, associação significativa também foi encontrada entre WBC no dia 7 de terapia de indução e DRM no D28 ( $p= 0,012$ ) sugerindo que os pacientes que apresentam WBC no D7  $>5.000/\text{mm}^3$  podem possuir um pior prognóstico quando comparado com aqueles que possuem WBC no D7  $<5.000/\text{mm}^3$ .

A presença de blastos no sangue periférico no dia 14 mostrou-se significativamente associada com a DRM nos dias 14 e 28 da terapia de indução ( $p= 0,004$  e  $0,002$ , respectivamente). A análise da DRM no D14 foi capaz de identificar 14 casos com blastos presentes na medula óssea cuja avaliação morfológica havia identificado como amostras sem blastos presentes no sangue periférico, o que indica que essas amostras provavelmente contêm blastos também no sangue periférico. Sendo assim, a análise da DRM mostrou-se uma importante ferramenta para a detecção de pacientes com presença de blastos que se apresentaram imperceptíveis durante a análise morfológica.

Analisando-se o estado da medula óssea no dia 14, pode-se observar uma associação entre a presença de mais de 5% de blastos na medula óssea (medulas M2 e M3) com a positividade para a DRM em ambos os pontos do tratamento estudados. O que novamente chamou a atenção é que 10 pacientes no D14 considerados como M1 (menos que 5% de blastos na MO) apresentavam DRM positiva sendo essas células leucêmicas residuais não detectadas por métodos de microscopia convencional.

Com relação ao estado da medula óssea no D28, ao contrário dos trabalhos anteriores (42) nossos dados não demonstraram associação entre a presença de mais de 5% de blastos na MO no dia 28 e a presença de DRM. A única amostra que apresentava mais do que 5% de blastos presentes na medula (M2/M3) no D28 apresentou-se positiva para DRM tanto no D14 como no D28, significando que a não remissão detectada por microscopia convencional foi também confirmada pelos resultados da DRM. Um fato de grande importância foi que pela análise de DRM foi possível a detecção de 13 pacientes

considerados como medula em remissão pela análise morfológica, porém com presença de células leucêmicas residuais ao final da terapia de indução (D28).

No GBTLI-99, a classificação dos pacientes em grupos de risco é feita de acordo com os seguintes critérios: idade, WBC ao diagnóstico e presença ou ausência de alterações cariotípicas desfavoráveis. Pacientes com idade abaixo de 1 ano e acima de 9 anos, WBC ao diagnóstico  $>50.000/\text{mm}^3$  ou presença de alterações cariotípicas desfavoráveis são alocados no grupo de alto risco (AR) de recaída; os demais são alocados no grupo de baixo de risco (BR) de recaída (77). Ao longo do tratamento três pacientes considerados de baixo risco foram reclassificados como alto risco pelos parâmetros de resposta inicial ao tratamento. Esses três pacientes foram alocados no grupo de baixo risco para análise estatística. Embora a frequência de casos DRM positivos para pacientes alto risco tenha sido maior do que aquela detectada para pacientes baixo risco, tanto em D14 como em D28 (35,3 x 12,9% e 21,9 x 13,3%, respectivamente), correlação estatisticamente significativa só foi encontrada entre o grupo de alto risco e a presença de DRM no D14 ( $p=0,022$ ). Esse resultado pode ser devido ao fato de que dois dos três pacientes alocados posteriormente como alto risco e que estavam positivos para DRM no D28 tenham sido incluídos no grupo de baixo risco para análise estatística.

A positividade da DRM nos dias 14 ou 28 também se mostrou associada à resposta inicial ao tratamento (análises de WBC no D7 e estado da medula óssea nos dias 14 e 28) ( $p= 0,013$  e  $p= 0,0006$ , respectivamente). O grupo considerado como bons respondedores apresentou frequências de positividade para DRM inferiores em relação ao grupo de maus respondedores. A DRM novamente se mostrou uma ferramenta importante para avaliar a resposta do paciente ao tratamento e seu risco de recaída, uma vez que, no grupo de amostras analisadas em D14 13 pacientes considerados como bons respondedores apresentaram-se DRM positivos e o mesmo aconteceu em 7 casos de bons respondedores analisados no D28.

#### **4.1.6 Análise de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Eventos (SLE)**

Diversos trabalhos têm demonstrado a associação da DRM com o tempo de sobrevida dos pacientes com LLA (30, 31, 39, 84). Sendo assim, foram realizadas análises

estatísticas para sobrevida global (SG) (definida como o tempo entre o diagnóstico e a ocorrência de óbito por qualquer causa) e sobrevida livre de eventos (SLE) (definida como o tempo entre a remissão e a ocorrência de recidiva ou óbito por qualquer causa) para os 77 pacientes estudados em D14 e D28. O tempo de seguimento variou de 14 a 33 meses, com mediana em 21 meses, para 67 pacientes ainda vivos.

Os pacientes DRM positivos apresentaram SG e SLE menores em relação aos pacientes DRM negativos, tanto nas análises para D14 quanto para D28 (figura 18), embora as diferenças não tenham alcançado significância estatística.

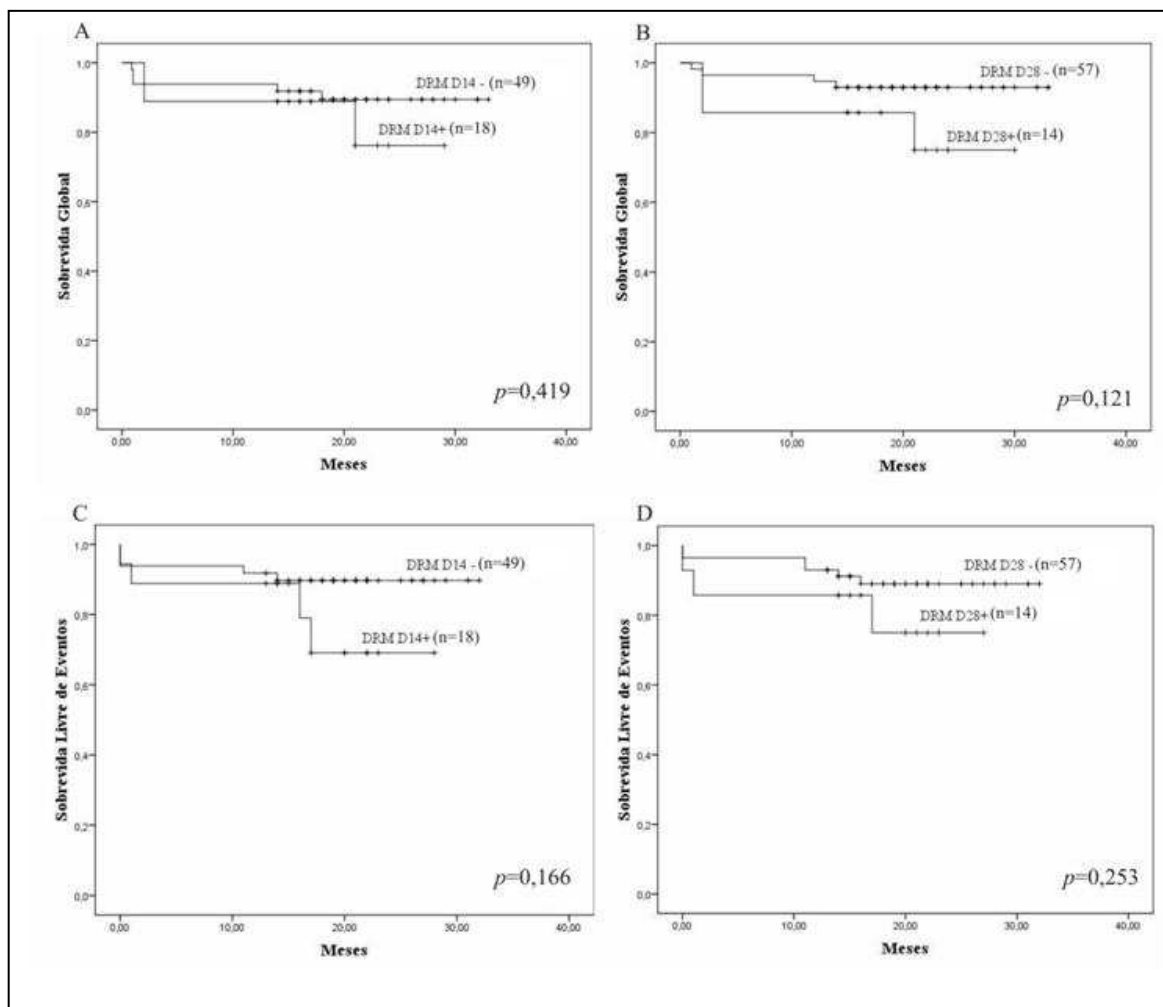


Figura 18. Curvas de SG e SLE de acordo com presença ou ausência de DRM nos dias 14 e 28. A= SG para DRM D14, B= SG para DRM D28, C= SLE para DRM D14 e D=SLE para DRM D28.

É sabido que a maioria dos eventos (óbito ou recidiva) ocorre em sua grande maioria nos três primeiros anos consecutivos ao diagnóstico da leucemia. Apenas a minoria dos pacientes estudados (5 casos), estavam próximos a completar três anos de seguimento. Considerando que há pacientes que podem ainda vir a sofrer algum tipo de evento, acreditamos que a tendência visualizada na figura 18, alcançará valor estatístico no futuro.

Apesar do pouco tempo de seguimento, perguntamo-nos se os resultados de DRM seriam melhores que os critérios atuais para a estratificação dos pacientes nos diferentes grupos de risco. Como já mencionado, a estratificação dos pacientes no protocolo GBTLI-LLA/99 leva em conta a idade do paciente, a contagem leucocitária ao diagnóstico e a resposta inicial ao tratamento (WBC no dia 7 e % blastos na medula do dia 14 e 28). Como mostra a figura 19, pacientes classificados como sendo de alto risco têm sobrevida inferior àqueles classificados no grupo de baixo risco. Apesar de não serem significativos, os dados sugerem que o grupo de pacientes DRM positivos, e, portanto com pior evolução clínica, não é o mesmo e possui número reduzido de pacientes em relação à classificação inicial pelo GBTLI como alto risco (figura 18). Ou seja, a DRM parece ser capaz de definir melhor o grupo de pacientes com maior risco de recaída/óbito do que os atuais critérios de estratificação. Entretanto, quando os dados de DRM foram analisados separadamente para os diferentes grupos de risco (figuras 20 e 21), as curvas sugerem que os dados de DRM apenas serviram para definir grupos de sobrevida diferenciada nos pacientes AR, apesar das diferenças não serem significativas.

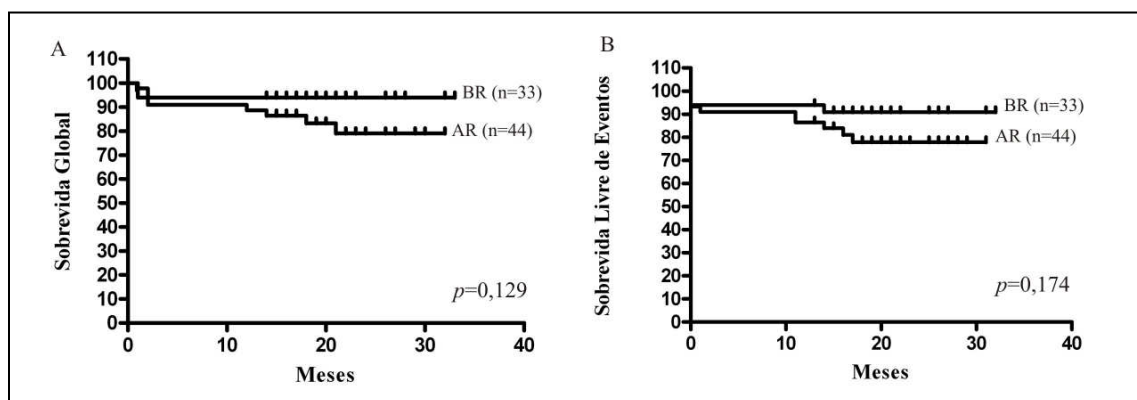


Figura 19. Curvas de SG (A) e SLE (B) de acordo com a estratificação de risco proposta pelo GBTLI-LLA/99 (idade e contagem leucocitária ao diagnóstico e resposta inicial ao tratamento) AR: pacientes classificados como alto risco de recaída e BR: pacientes com baixo risco de recaída.



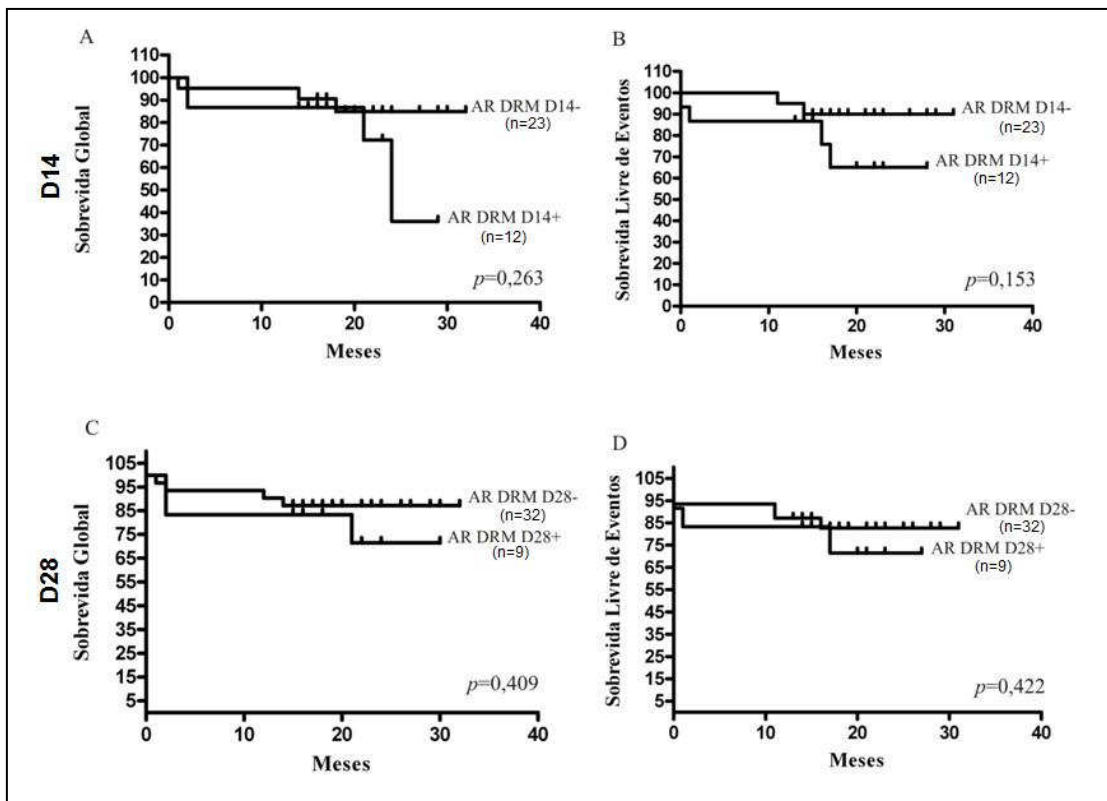


Figura 20. Curvas de SG e SLE para pacientes classificados como alto risco (AR) segundo o GBTLI e dados de DRM nos dias 14 e 28. A=SG para DRM D14, B= SLE para DRM D14, C= SG para DRM D28 e D=SLE para DRM D28.

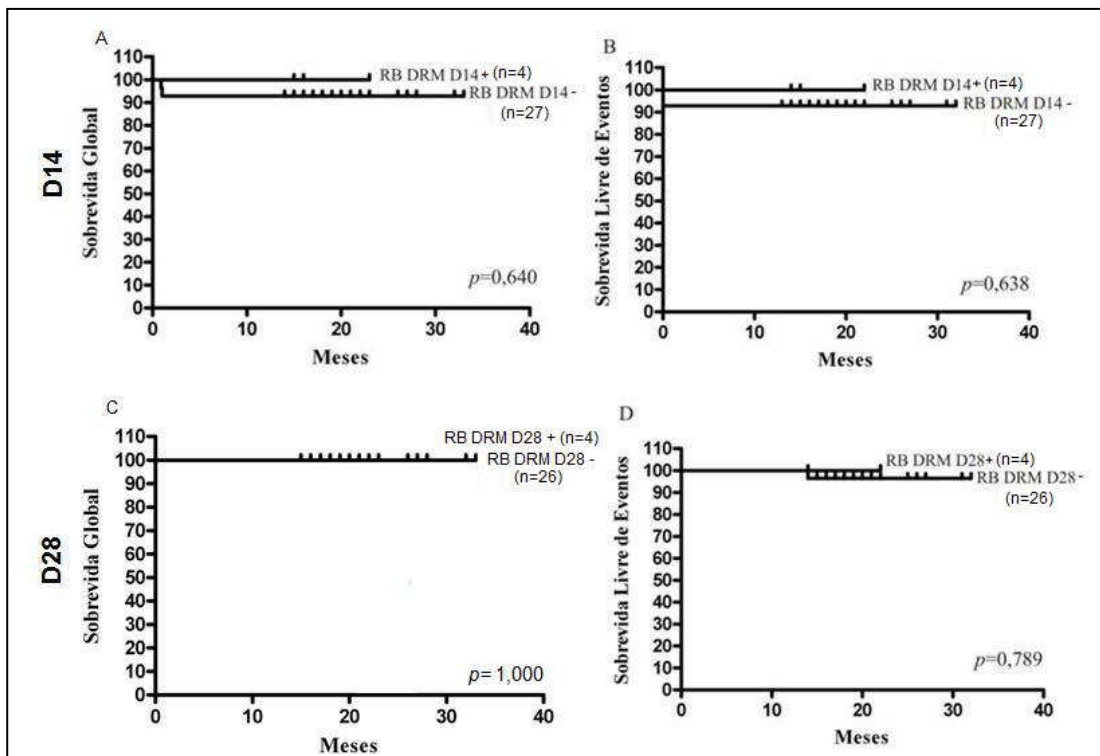


Figura 21. Curvas de SG e SLE para pacientes classificados como baixo risco (BR) segundo o GBTLI e dados de DRM nos dias 14 e 28. A=SG para DRM D14, B= SLE para DRM D14, C= SG para DRM D28 e D=SLE para DRM D28.

Apesar das diferenças obtidas não serem significativas, as curvas analisadas sugerem que os dados de DRM não parecem ter significado prognóstico para o grupo de pacientes classificados como sendo de BR segundo critérios GBTLI/99. E para os casos AR, a DRM no D14 parece ter maior significado do que a DRM no D28. Isto parece razoável se for levado em consideração a baixa sensibilidade do método utilizado na detecção da DRM ( $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ ). Dada a baixa sensibilidade do método, apenas pacientes com altos níveis de doença residual seriam identificados, o que é mais comum no D14 do que no D28. Com um método mais sensível poderíamos ter identificado pacientes com nível intermediário de risco, os quais poderiam ser ou não positivos no D28, e assim teríamos um método mais eficiente para a identificação dos pacientes. Sendo assim, na atual situação o método qualitativo aqui descrito apenas se mostra válido para definir pacientes com risco elevado de recaída dentro do grupo de pacientes AR.

No entanto, vale salientar que a detecção da DRM em pacientes com LLA pediátrica tem um importante valor preditivo e é capaz de estratificar os pacientes em diferentes grupos de risco. Trabalhos têm demonstrado que a estratificação pode ser feita tanto por métodos qualitativos (como utilizado no presente estudo) quanto por métodos quantitativos (85, 86). Scrideli et al (85) utilizando um método qualitativo similar ao utilizado em nossas análises e estudando um grupo maior de pacientes com LLA pediátrica por um maior período de tempo, pode verificar que a presença da DRM no dia 28 esteve associada com recaída ou morte e foi o fator prognóstico independente mais importante quando comparado aos fatores clássicos para estratificação de risco. De acordo com os trabalhos de Scrideli et al. (85), através de uma técnica menos sensível, os pacientes puderam ser estratificados em grupos de risco de acordo com a DRM podendo ser observados grupos de pacientes com bom, intermediário e mau prognóstico. Os resultados obtidos foram similares àqueles com o uso de técnicas mais complexas e sensíveis, assim como real-time PCR e citometria e fluxo (com um poder de detecção de uma célula blástica em  $10^3$  até  $10^6$  células normais), principalmente para os casos inicialmente classificados como AR. Uma vantagem da técnica qualitativa empregada foi o custo reduzido e a baixa complexidade, o que pode ser fundamental para se tornar acessível a grande maioria dos centros de tratamento especialmente em países em desenvolvimento, já as técnicas

quantitativas, embora mais sensíveis e capazes de permitir uma estratificação mais refinada, possuem alto custo, elevada complexidade e exigem mão de obra com maior nível de especialização bem como equipamentos mais complexos, o que as torna pouco viáveis para a aplicação em rotinas laboratoriais de países em desenvolvimento (85).

#### **4.2 Comparação da metodologia do grupo brasileiro com a metodologia Biomed-1**

Sabendo-se que a técnica utilizada, pelo fato de aplicar PCR multiplex, pode ser menos sensível, decidiu-se estudar a DRM para o mesmo grupo de pacientes utilizando PCR singleplex com primers desenvolvidos pelo consórcio europeu Biomed-1 (54).

Essa análise teve como objetivo estabelecer qual a técnica mais adequada e de menor custo para aplicação nos exames de rotina de um laboratório de biologia molecular para detecção da doença residual mínima em leucemia linfóide aguda pediátrica.

##### **4.2.1 Análise de clonalidade ao diagnóstico com a metodologia Biomed-1**

Das 91 amostras de diagnóstico analisadas pela metodologia anterior, 78 foram também analisadas, para alguns rearranjos, pelo método Biomed-1, cujos primers são listados nos quadros 6 e 7. Dentre os 78 casos, 88,5% (69) eram derivados de linhagem B e 12,8% (10) eram derivados de linhagem T.

Como mostra a tabela 5, a metodologia do grupo brasileiro permitiu identificar pelo menos 2 marcadores clonais em 87,3% dos pacientes de LLA B-derivada enquanto que os primers selecionados a partir do estudo Biomed permitiram identificar dois marcadores em apenas 80,9% dos casos, e 75% versus 57,3% em relação aos pacientes de LLA-T.

O par de primers utilizados pelo grupo Biomed-1 para detecção do rearranjo *TCRD* incompleto Vd2+Dd3 em LLA-B foi bastante eficiente visto que não gerou a amplificação de bandas inespecíficas e permitiu a detecção de marcadores clonais em 66,7% dos pacientes, enquanto o par de primers adotado pelo grupo brasileiro possibilitou a detecção de marcadores em 46,1% dos pacientes e ainda gerou o aparecimento de bandas inespecíficas que prejudicam a avaliação do resultado. Para o gene *TCRG*, usando apenas duas reações de PCR multiplex que incluíram primers para os rearranjos dos segmentos Vg1, Vg2, Vg3, Vg4, Vg5, Vg8, Vg9, Vg10 e Vg11 e J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2 foi possível

identificar marcador clonal em 61,5% dos pacientes. Já pelo método do Biomed, para identificar esses mesmos rearranjos foi necessário fazer 4 reações de PCR por paciente e foram identificados marcadores clonais em 53,8% dos casos (tabela 6).

O padrão de maior detecção pelo método do grupo brasileiro também foi observado para rearranjos de *IgH* e *IGK*, onde através do método GB para *IgH* com apenas duas reações de PCR foram encontrados rearranjos em 65,9% dos pacientes e para *IgK* também com apenas duas reações de PCR detectou-se rearranjos em 45% dos pacientes. Por outro lado, com a metodologia Biomed, foram necessárias 5 reações de PCR para detectar rearranjos de *IgH* em 56,4% dos pacientes e 3 reações de PCR para detectar 37,1% de rearranjos de *IgK* nos casos analisados (tabela 6).

Tabela 5: Porcentagem de rearranjos detectados ao diagnóstico no total de pacientes analisados, em LLA B derivada e em LLA-T para ambas as técnicas de PCR empregadas nos estudo (GB e Biomed).

	<i>0 rearranjo</i>		<i>1 ou mais rearranjos</i>		<i>2 ou mais rearranjos</i>		<i>3 ou mais rearranjos</i>	
	<i>GB</i>	<i>Biomed</i>	<i>GB</i>	<i>Biomed</i>	<i>GB</i>	<i>Biomed</i>	<i>GB</i>	<i>Biomed</i>
Total	1,10%	2,60%	98,90%	97,40%	85,70%	76,90%	65,90%	55,10%
LLA B-derivada	1,30%	2,90%	98,70%	97,10%	87,30%	80,90%	68,30%	57,30%
LLA-T	0,00%	0,00%	100,00%	100,00%	75,00%	57,30%	50,00%	40,00%

Tabela 6: Porcentagem de rearranjos detectados para os rearranjos estudados ao diagnóstico no total de pacientes analisados, em LLA B-derivada e em LLA-T para ambas as técnicas de PCR empregadas no estudo (GB e Biomed).

	<i>TCRG</i>		<i>TCRD</i>		<i>IgH</i>		<i>IgK</i>	
	<i>GB</i>	<i>Biomed</i>	<i>GB</i>	<i>Biomed</i>	<i>GB</i>	<i>Biomed</i>	<i>GB</i>	<i>Biomed</i>
Total	61,50%	53,80%	46,10%	66,70%	65,90%	56,40%	45%	37,10%
LLA B-derivada	55,70%	48,50%	50,60%	69,10%	74,70%	63,20%	51,90%	42,60%
LLA-T	100,00%	90,00%	16,70%	50,00%	8,30%	10,00%	0%	0%

Assim como realizado para a metodologia do grupo brasileiro, amostras dos dias 14 e 28, de 74 dos 78 pacientes estudados ao diagnóstico, foram também analisadas através da metodologia Biomed-1 para os rearranjos encontrados ao diagnóstico. A exclusão de 4 dos pacientes analisados ao diagnóstico foi devido à mudança de protocolo

de tratamento durante a terapia de indução (2 casos) e ausência de marcador molecular para a PCR (2 casos).

O mesmo parâmetro de positividade do método GB foi utilizado para interpretar os resultados da DRM através do método Biomed, ou seja, a amostra foi considerada positiva quando seu padrão de migração apresentava-se semelhante àquele apresentado pela amostra do diagnóstico.

Para 9 dos 74 casos não houve coleta de MO no D14 e para 5 não houve coleta no D28, portanto foi possível analisar 65 pacientes para DRM no D14 e 69 para DRM no D28. A tabela 7 resume os resultados encontrados para a DRM em ambos os pontos do tratamento analisados.

Tabela 7: Número total de pacientes analisados e número e porcentagem de casos positivos para a presença da DRM nos dois pontos de tratamento estudados (dias 14 e 28 da terapia de indução).

Ponto do tratamento	Total analisado	Casos positivos
D14	65	16 (24,6%)
D28	69	13 (18,9%)
D14 e D28	59	10 (16,7%)

Dos 16 pacientes DRM positivos em D14, 7 apresentaram-se negativos no D28 (43,7%) e 9 permaneceram positivos (56,2%), indicando que o primeiro grupo possa ter prognóstico mais favorável quando comparado com o outro grupo (DRM positiva em D14 e D28).

Comparando-se os resultados obtidos pela análise do método Biomed com aqueles obtidos para o mesmo grupo de pacientes estudados pela metodologia do grupo brasileiro, pode-se observar que a concordância na detecção da DRM nos dois pontos estudados do tratamento foi de 82,3% para as análises do D14, 60% para o D28 e 77,8% para D14 e D28 (Anexo 4).

Dessa forma pode-se concluir que os métodos são igualmente eficientes para o acompanhamento da DRM nos pacientes com LLA pediátrica, ou seja, não parece haver diferença de sensibilidade entre os primers adotados por ambos.

### 4.3 Sugestão de novo protocolo para análise simplificada da DRM

Com os resultados da comparação entre os primers utilizados pelo GB e Biomed, resolvemos propor um novo conjunto de reações de PCR para estudo da DRM. Embora soubéssemos que os rearranjos de *IgH* representam o mais sensível grupo de alvos moleculares para DRM, alcançando usualmente sensibilidade menor ou igual a  $10^{-4}$  (86, 87) e que os rearranjos de *TCRG* são menos aplicáveis na detecção da DRM em casos de LLA B-derivada, por possuírem sensibilidade limitada ( $>10^{-4}$ ) devido às suas pequenas regiões juncionais (71); critérios como maior frequência na população brasileira e boa amplificação com ausência de bandas inespecíficas foram utilizados para selecionarmos o conjunto de primers a serem utilizados no novo protocolo.

Os valores para cada conjunto de primers em LLA B-derivada e LLA-T encontram-se nas tabelas 8 e 9. Pacientes com LLA B-derivada foram analisados separadamente daqueles com LLA-T.

Tabela 8: Frequências encontradas em amostras de LLA B-derivada ao diagnóstico para os conjuntos de primers testados por ambas as metodologias (método do grupo brasileiro – GB e método Biomed).

<b>TCRG</b>			
<i>Método GB</i>		<i>Método Biomed</i>	
Rearranjo	Frequência	Rearranjo	Frequência
Vg2+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2	45,60%	Vg2-Vg3-Vg4-Vg5-Vg7+Jg1.1/2.1	36,80%
Vg3+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2		Vg9+Jg1.2/2.1	20,00%
Vg4+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2		Vg10+J1.3/2.3	2,90%
Vg5+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2		Vg11+J1.3/2.3	1,50%
Vg8+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2			
Vg9+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2	25,30%		
Vg10+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2	0,00%		
Vg11+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2	4,00%		
<b>TCRD</b>			
<i>Método GB</i>		<i>Método Biomed</i>	
Rearranjo	Frequência	Rearranjo	Frequência
Vd2+Dd3	50,60%	Vd2+Dd3	55,90%
		Vd1+Jd1	1,50%
		Vd2+Jd1	9,00%
		Vd3+Jd1	0,00%
		Dd2+Dd3	31,00%
		Dd2+Jd1	4,00%

<b>IgH</b>			
<i>Método GB</i>		<i>Método Biomed</i>	
Rearranjo	Frequência	Rearranjo	Frequência
FR3A+LJH	70,00%	VH1/7+JH21	13,00%
FR3A+VLJH	71,00%	VH2+JH21	4,00%
		VH3+JH21	45,00%
		VH4+JH21	23,00%
		VH5+JH21	0,00%

<b>IgK</b>			
<i>Método GB</i>		<i>Método Biomed</i>	
Rearranjo	Frequência	Rearranjo	Frequência
VKI+íntron+Kde	19,00%	VKI+íntron+Kde	20,60%
VKII+VKIII+Kde	48,00%	VKII+VKIII+Kde	27,90%
		VKIV+Kde	16,20%

Tabela 9: Frequências encontradas em amostras de LLA-T ao diagnóstico para os conjuntos de primers testados por ambas as metodologias (método do grupo brasileiro – GB e método Biomed). Em ambos os métodos não foram encontrados rearranjos para genes de *IgK*.

<b>TCRG</b>			
<i>Método GB</i>		<i>Método Biomed</i>	
Rearranjo	Frequência	Rearranjo	Frequência
Vg2+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2	100,00%	Vg2-Vg3-Vg4-Vg5-Vg7+Jg1.1/2.1	70,00%
Vg3+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2		Vg9+Jg1.2/2.1	40,00%
Vg4+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2		Vg10+J1.3/2.3	10,00%
Vg5+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2		Vg11+J1.3/2.3	10,00%
Vg8+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2			
Vg9+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2	33,00%		
Vg10+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2	17,00%		
Vg11+J1.2/2.3+J1.1/2.1+J1.2	8,00%		

<b>TCRD</b>			
<i>Método GB</i>		<i>Método Biomed</i>	
Rearranjo	Frequência	Rearranjo	Frequência
Vd2+Dd3	16,70%	Vd2+Dd3	10,00%
		Vd1+Jd1	10,00%
		Vd2+Jd1	20,00%
		Vd3+Jd1	10,00%
		Dd2+Dd3	0,00%
		Dd2+Jd1	0,00%

<b>IgH</b>			
<i>Método GB</i>		<i>Método Biomed</i>	
Rearranjo	Frequência	Rearranjo	Frequência
FR3A+LJH	8,00%	VH1/7+JH21	0,00%
FR3A+VLJH	8,00%	VH2+JH21	0,00%
		VH3+JH21	10,00%
		VH4+JH21	0,00%
		VH5+JH21	0,00%

### 4.3.1 Protocolo para LLA B-derivada

Analisando os resultados obtidos pelas duas técnicas de PCR para cada rearranjo estudado ao diagnóstico, nos casos de LLA B-derivada pode-se propor um protocolo onde serão testados rearranjos de *IgH*, *TCRD*, *TCRG* e *IgK* em apenas 7 reações de PCR por paciente. Sendo que para *IgH*, *TCRG* e *IgK* a metodologia a ser aplicada é a da PCR do método GB e para *TCRD* serão utilizados os primers propostos pelo Biomed-1.

Os rearranjos escolhidos para cada gene foram selecionados de acordo com as frequências encontradas nas amostras analisadas ao diagnóstico. Os primers utilizados para os rearranjos de *IgH* e *TCRG* são os publicados por Brisco et al. (51) e Trainor et al. (52), respectivamente e os dos rearranjos de *IgK* e *TCRD* são os de Pongers-Willemse et al. (54).

Para *IgH* será utilizado apenas um par de primers que amplifica o rearranjo FR3A+VHJH, presente em 71% dos casos analisados. Para *TCRD* serão utilizados dois pares de primers que amplificam os rearranjos Vd2+Dd3 e Dd2+Dd3 (55,9% e 31% dos casos, respectivamente). Para *TCRG* serão utilizadas reações multiplex contendo um ou dois primers para o segmento V e três primers para o segmento J, amplificando os seguintes rearranjos: V3+J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2 (50%), V2+V8+J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2 (31,6%), V9+ J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2 (25,3%). Para *IgK* serão utilizados 3 primers que amplificam os rearranjos VKII+VKIII+Kde (encontrados em 48% das amostras).

A aplicação dessas 7 reações de PCR para as amostras ao diagnóstico permite encontrar pelo menos um marcador clonal em 100% dos casos estudados e pelo menos 2 marcadores clonais em 83,4% dos casos de LLA B-derivada.

Embora a probabilidade de encontrar pelo menos um rearranjo clonal seja de 100%, a possibilidade de nenhum marcador molecular ser encontrado não pode ser descartada e caso isso ocorra alguns outros rearranjos, embora raros, podem ser testados. Esses rearranjos compreendem V11+V8+J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2 (*TCRG*), VKI+íntron\_Kde (*IgK*) e Dd2+Jd1 (*TCRD*), sendo que para *TCRG* e *IgK* deve ser aplicada a metodologia do grupo brasileiro [primers de acordo com Trainor et al., (52) e Pongers-Willemse et al. (54), respectivamente] e para *TCRD* a metodologia Biomed-1 [primers de acordo com Pongers-Willemse et al., (54)].



### 4.3.2 Protocolo para LLA-T

Da mesma forma que foi feito para os casos de LLA B-derivada pode-se sugerir um protocolo específico de rearranjos a serem procurados como marcadores moleculares de DRM para os pacientes com LLA-T.

Sendo assim, referente ao gene *TCRG*, os rearranjos selecionados para o novo protocolo foram V2+V8+J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2, V9++J1.3/2.3+J1.1/2.1, V5+J1.3/2.3+J1.1/2.1 e V3+J1.3/2.3+J1.1/2.1, estando esses presentes em 91,7%, 33%, 25% e 24% dos casos respectivamente e devendo ser testados de acordo com o método GB [primers de acordo com Trainor et al. (52)].

Além dos rearranjos de *TCRG*, selecionamos os rearranjos para Vd2+Jd1 (20% das amostras) e Vd2+Dd3 (10% das amostras) de *TCRD*, através da metodologia da PCR Biomed-1 [primers de acordo com Pongers-Willemse et al., (54)].

Com essas seis reações de PCR por paciente, espera-se que pelo menos 1 rearranjo clonal seja detectado em 100% dos casos e pelo menos 2 rearranjos clonais em 90% dos casos. Porém, assim como para os casos de LLA B-derivada, há a possibilidade desses rearranjos não estarem presentes na amostra de interesse, sendo assim, mais algumas PCRs podem ser usadas na busca de um marcador clonal, sendo elas: V10+J1.3/2.3+J1.1/2.1 e V11+J1.3/2.3+J1.1/2.1 para *TCRG*, Vd1+Jd1 e Vd3+Jd1 para *TCRD* e FR3A+VLJH para *IgH*, sendo que para *TCRG* e *IgH* deve ser adotada a metodologia do grupo brasileiro e para *TCRD* a da PCR Biomed-1 [primers de acordo com Trainor et al. (52) para *TCRG*, Brisco et al. (51) para *IgH* e Pongers-Willemse et al. (54) para *TCRD*]. Outra opção consiste no estudo dos rearranjos do gene *TCRB* conforme protocolo do Biomed-1; esse gene não foi avaliado pelo grupo brasileiro devido à alta complexidade da região V, o que exigiria um grande número de primers para testes.

No caso da entrada de uma amostra sem definição imunofenotípica (LLA B-derivada ou LLA-T) reações de ambos os protocolos devem ser aplicadas (V2+V8+J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2, V9++J1.3/2.3+J1.1/2.1, V5+J1.3/2.3+J1.1/2.1 e V3+J1.3/2.3+J1.1/2.1 para *TCRG*, Vd2+Jd1, Vd2+Dd3 e Dd2+Dd2 para *TCRD*, FR3A+VLJH para *IgH* e VKII+VKII+Kde para *IgK* . Vale lembrar que o protocolo de PCRs aqui proposto é útil também na avaliação da DRM em amostras de seguimento.

A figura 22 representa um esquema simplificado para o protocolo de PCR proposto para o estudo da DRM as LLA B-derivadas e LLA-T.

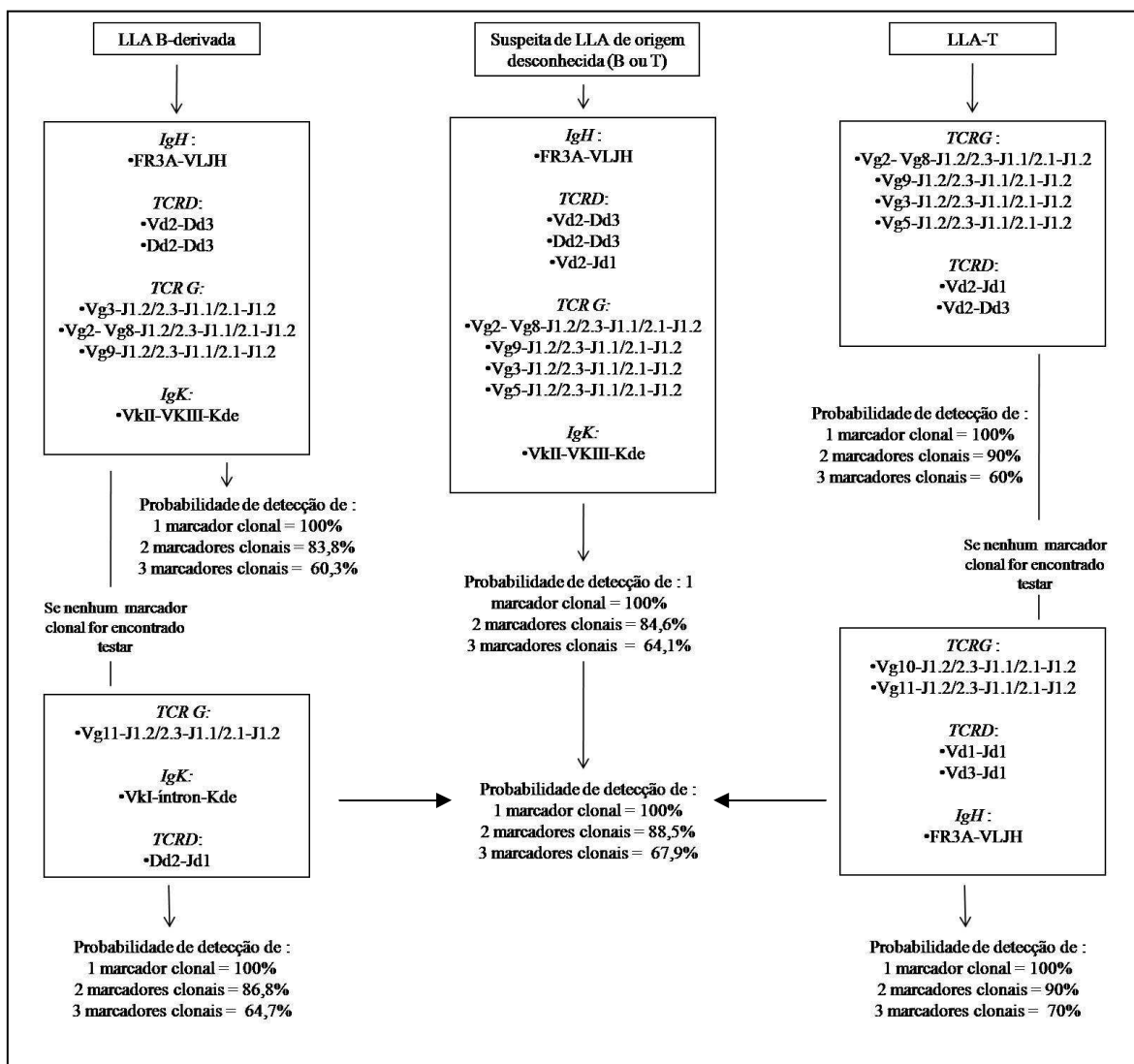


Figura 22. Fluxograma esquemático dos novos protocolos para análise de doença residual mínima em LLA B-derivada e LLA-T. Para os rearranjos de *TCRG*, *IgH* e *IgK* o método GB deve ser aplicado e para *TCRD* a metodologia Biomed-1 deve ser seguida. Os primers para os rearranjos gênicos estão de acordo com Trainor et al. (52) para *TCRG*, Brisco et al (51) para *IgH* e Pongers-Willemse et al. (54) para *TCRD* e *IgK*.

Com o uso da nova metodologia sugerida espera-se otimizar o tempo gasto para a análise da DRM, bem como diminuir seus custos, e maximizar o número de casos nos quais a análise da DRM seja possível através de dois marcadores moleculares para

rearranjos de TCR e Ig, minimizando a eventual ocorrência de falso negativo devido a evolução clonal.

Espera-se também que uma avaliação mais sensível e específica da remissão e da resposta inicial ao tratamento possa resultar numa melhor estratificação dos pacientes em grupos de risco e conseqüentemente no aumento das taxas de cura para crianças com LLA. Sendo assim, a simplificação e o aperfeiçoamento dos métodos de detecção de DRM poderão permitir que os benefícios do monitoramento da DRM sejam estendidos a todas as crianças com leucemia.

Os estudos de DRM estão se tornando parte integral do moderno cuidado dos pacientes com leucemia, o desafio é o de como incorporar as informações de DRM nas decisões terapêuticas e no desenho de novos protocolos de tratamento (76).

## 5. CONCLUSÕES

1. A análise de rearranjos FR3A+VHJH, Vd2+Dd3, Dd2+Dd3, V3+J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2, V2+V8+J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2, V9+J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2, VKII+VKIII+Kde permite detectar 1, 2 e 3 marcadores clonais em 100%; 83,8% e 60,3% das LLA B-derivadas, respectivamente.

2. A análise de rearranjos V2+V8+J1.3/2.3+J1.1/2.1+J1.2, V9++J1.3/2.3+J1.1/2.1, V5+J1.3/2.3+J1.1/2.1, V3+J1.3/2.3+J1.1/2.1, Vd2+Jd1 e Vd2+Dd3 permite detectar 1, 2 e 3 marcadores clonais em 100%, 90% e 60% das LLA-T respectivamente.

3. Para o grupo de 67 pacientes consecutivos, tratados segundo o protocolo GBTLI-LLA/99, a DRM no dia 14 da terapia de indução mostrou-se associada com o gênero masculino, idade inferior a 1 ano e igual ou superior a 9 anos, imunofenótipo LLA-T, grupo de alto risco, ausência de CD10, presença de blastos no sangue periférico no D14, medula óssea com mais de 5% de blastos no D14 e má resposta ao tratamento, podendo ser características indicativas de maior risco de recidiva. Além disso, pacientes com resultado DRM positivo no D14 apresentaram SG e SLE inferiores àqueles DRM negativos, embora as diferenças não tenham alcançado valor estatisticamente significativo ( $p=0,419$  e  $0,166$ , para SG e SLE respectivamente).

4. Para o grupo de 71 pacientes consecutivos, tratados com o GBTLI-LLA/99, a DRM no D28 mostrou-se associada com imunofenótipo LLA-T, ausência de CD10, contagem leucocitária (WBC) no dia 7 superior a  $5.000/\text{mm}^3$ , presença de blastos no sangue periférico no D14, medula óssea com mais de 5% de blastos no D14 e má resposta ao tratamento, o que também pode representar maior risco de recidiva. Assim como para os resultados da DRM no D14, a SG e SLE dos pacientes positivos no D28 foram inferiores em relação aos negativos, porém suas diferenças também não alcançaram valor estatisticamente significativo ( $p=0,121$  e  $0,253$  SG e SLE, respectivamente).

5. A DRM mensurada pelo método qualitativo, principalmente no D14, demonstrou ser um fator prognóstico importante apenas para os pacientes classificados

como alto risco pelo GBTLI/99. Para aqueles classificados como baixo risco os dados de DRM não apresentaram valor prognóstico.

## 6. REFERÊNCIAS

- (1) Sinnet D, Labuda D, Krajcinovic M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers – the childhood leukemia experience. *Familial Cancer*. 2006; 5: 35-47.
- (2) Smith MT, McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Wiencke JK, Zheng S et al. Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 206: 237-245.
- (3) Margolin JF, Poplack DG. Acute lymphoblastic leukemia. In: Pizzo AP, Poplack DG. *Principles and practices of pediatric oncology*. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1997. p. 409-462.
- (4) Fonn KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphomas. *Blood* 1986; 68(1): 1-31.
- (5) Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biological relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993; 82(2): 343-362.
- (6) Rowan RM, Brain BJ, England JM, Hyde K, Matutes E, Reilly JT et al. Immunophenotyping in the diagnosis of acute leukaemias. *J Clin Pathol*. 1994; 47: 777-781.
- (7) Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med*. 1995; 332(24): 1618-1630.
- (8) Stassi R. Contribution of immunophenotypic and genotypic analysis to the diagnosis of acute leukemia. *Ann Hematol*. 1995; 71:13-27.
- (9) van Dongen JJ, Szczepanski T, Adriaansen H. Immunobiology of acute lymphoblastic leukemia. In: Szczepanski T. *Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia*. Rotterdam: Ridderprint, Ridderkerk; 2002. p.85-129.
- (10) Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004; 118-145.
- (11) Scrideli CA, Kashima S, Cipolotti R, Defavery R, Bernardes JE, Tone LG. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoid leukemia: comparison of three detection methods by PCR. *Leuk Res*. 2002; 26(5): 431-8.
- (12) Greaves, M.F. (1997). Aetiology of acute leukemia. *Lancet*. 349: 344-349.
- (13) Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. 278: 1959-1064.
- (14) Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998; 1998; 339: 605-15.
- (15) Schrappe M, Arico M, Harbott J, Biondi A, Zimmermann M, Conter V et al. Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood*. 1998; 15; 92(8):2730-41
- (16) Brandalise S, Odone V, Pereira W, Andrea M, Zanichelli M, Aranega V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. *ALL Brazilian Group. Leukemia*. 1993; 7 Suppl 2:S142-5
- (17) Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G, et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood*. 1994;84(9):3122-33.
- (18) Schrappe M, Reiter A, Riehm H. Cytoreduction and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14(8):2403-6.

- (19) Gajjar A, Ribeiro R, Hancock ML, Rivera GK, Mahmoud H, Sandlund JT et al. Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995;86(4):1292-5.
- (20) Donadieu J, Hill C. Early response to chemotherapy as a prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a methodological review. *Br J Haematol*. 2001;115(1):34-45.
- (21) Schappe M. Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Ann Hematol*. 2004, 83. Suppl 1:S121:3
- (22) GBTLI. Grupo Brasileiro para o Tratamento de Leucemia Infantil. Protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, 1994.
- (23) Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN et al. Augmented post-induction therapy for children with *hIgh*-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. *N Engl J Med*. 1998;338(23):1663-71
- (24) Sandlund JT, Harrison PL, Rivera G, Behm FG, Head D, Boyett J et al. Persistence of lymphoblasts in bone marrow on day 15 and days 22 to 25 of remission induction predicts a dismal treatment outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(1):43-7.
- (25) Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(1):52-8.
- (26) Rubnitz JE, Pui CH. Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Treat Rev*. 2003;29(1):31-44.
- (27) Katz F, Ball L, Gibbons B, Chessells J. The use of DNA probes to monitor minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1989; 73:173-180.
- (28) Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(3):790-4.
- (29) Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, Seyfarth J, Svejgaard A, Clausen N et al. Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood*. 2002; 99(4):1253-8.
- (30) Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 1998; 339: 591-598.
- (31) van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998; 352: 1731-1738.
- (32) Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000; 96: 2691-2696.
- (33) Moppett J, Burke GA, Steward CG, Oakhill A, Goulden NJ. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol*. 2003; 56(4):249-53

- (34) Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003; 102-31.
- (35) Scrideli CA, Queiroz RG, Kashima S, Sankarankutty BO, Tone LG. T cell receptor gamma (*TCRG*) gene rearrangements in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: analysis and implications for the study of minimal residual disease. *Leuk Res*. 2004; 28(3): 267-73.
- (36) Szczepanski T, Langerak AW, Willemse MJ, Wolvers-Tettero IL, van Wering ER, van Dongen JJ. T cell receptor gamma (*TCRG*) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2000; 14(7): 1208-14.
- (37) Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hahlen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ et al. Cross-lineage T cell gene rearrangements in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999; 13: 196-205.
- (38) Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K et al. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia*. 2000; 14(11): 1939-43.
- (39) Eckert C, Scrideli CA, Taube T, Songia S, Wellmann S, Manenti M et al. Comparison between TaqMan and LightCycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2517-24.
- (40) Cazzaniga G, d'Aniello E, Corral L, Biondi A. Results of minimal residual disease (MRD) evaluation and MRD-based treatment stratification in childhood ALL. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002; 15(4): 623-38.
- (41) Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Diltz K, Coustan-Smith E et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol*. 2005; 128(6): 774-782.
- (42) Scrideli CA, Queiroz RG, Bernardes JE, Valera ET, Tone LG. PCR detection of clonal IgH and TCR gene rearrangements at the end of induction as a non-remission criterion in children with ALL: comparison with standard morphologic analysis and risk group classification. *Med Pediatr Oncol*. 2003; 41(1): 10-6.
- (43) Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Neoh SH, Snell LE, Dolman G et al. Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; 15(3): 385-90.
- (44) Wasserman R, Galili N, Ito Y, Silber JH, Reichard BA, Shane S et al. Residual disease at the end of induction therapy as a predictor of relapse during therapy in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 1992; 10(12):1879-1888.
- (45) Brisco MJ, Condon J, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, Seshadri T et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet*. 1994; 343: 196-200.
- (46) Jacquy C, Delepaut B, van Deale S, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B et al. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic



- leukemia: MRD level at the end of induction is a strongest predictive factor of relapse. *Br J Haematol.* 1997; 98: 140-146.
- (47) Goulden NJ, Knechtli CJC, Garland RJ, Langlands K, Hancock JP, Potter MN et al. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1998; 100: 235.
- (48) Gruhn B, Hongeng S, Yi H, Hancock ML, Rubnitz JE, Neale GA et al. Minimal residual disease after intensive induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts outcome. *Leukemia.* 1998; 12: 675.
- (49) Campana D, Neale GAM, Coustan-Smith E, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: the St Jude experience. *Leukemia.* 2001; 15:278-279.
- (50) van Dongen JJM, Langerak AW. Immunoglobulin and T-cell receptor rearrangements. In: Pui CH. *Childhood leukemias.* Cambridge: Cambridge University Press; 1999. p. 145-167.
- (51) Brisco MJ, Tan W, Orsborn AM, Morley AA. Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br J Haematol.* 1990; 75:163-167.
- (52) Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangements in B-and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood.* 1991; 78:192-196.
- (53) Steward CG, Goulden NJ, Katz F, Baines D, Martin PG, Langlands K, et al. A polymerase chain reaction study of the stability of Ig heavy-chain and T-cell receptor delta gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994; 83:1355-62.
- (54) Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and T<sub>h</sub>1 deletions as PCR targets. Report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia.* 1999; 13: 110-118.
- (55) Nakao M. Duplex PCR facilitates the identification of immunoglobulin kappa (*IGK*) gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1999; 14: 218-219.
- (56) Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia.* 1997;11(12):2192-9.
- (57) Willems P, Verhagen O, Segeren C, Veenhuizen P, Guikema J, Wiemer E et al. Consensus strategy to quantitate malignant cells in myeloma patients is validated in a multicenter study. *Blood.* 2000; 96 (1): 63-70.
- (58) Roberts W.M, Estrov Z, Ouspenskaia MV, Johnston DA, McClain KL, Zipf TF. Measurement of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 317.
- (59) van der Velden VH, Szczepanski T, Wijkhuijs JM, Hart PG, Hoogeveen PG, Hop WC et al. Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia.* 2003; 17: 1834-1844.

- (60) Scrideli CA, Queiróz RP, Bernardes JE, Defavery R, Valera ET, Tone LG. Use of simplified strategies to evaluate early treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*. 2006; 30: 1049-1052
- (61) Beishuizen A, de Bruijn MA, Pongers-Wilemse MJ, Verhoeven MA, van Wering ER, Hahlen K et al. Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemias: a new molecular target for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1997; 11: 2200-2207.
- (62) Beishuizen A, de Bruijn MA, Pongers-Willems MJ, Verhoeven MA, van Wering ER, Hahlen K et al. Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemia: a new molecular target for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1997; 11: 2200-2207.
- (63) Stolz F, Panzer S, Panzer-Grumayer Er. Multiplex PCR reaction for the detection and identification of immunoglobulin kappa deleting elements rearrangements in B-lineage leukemias. *Br J Haematol*. 1999; 106:486-490.
- (64) Brumptet C, Delabesse E, Beldjord K, Davi F, Cayuela JM, Millien C et al. The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. *Blood*. 2000; 96:2254-2261.
- (65) Boehn TLJ, Werle A, Ganser A, Kornhuber B, Drahovsky D. T cell receptor  $\gamma$  chain variable gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemias of T and B lineage. *Eur J Immunol*. 1987; 17:1593-1597.
- (66) Chen Z, Font MP, Loiseau P, Bories JC, Degos L, Lefrane MP et al. The human T-cell V $\gamma$  gene locus: cloning of new segments and study of V $\gamma$  rearrangements in neoplastic T and B cells. *Blood*. 1998; 72:776-783.
- (67) Hara J, Benedict SH, Yumura K, Ha-Kawa K, Gelfand EW. Rearrangement of variable region T cell receptor  $\gamma$  genes in acute lymphoblastic leukemia. V $\gamma$  gene usage differs in mature and immature T cells. *Clin Invest*. 1989; 83:1277-1283.
- (68) Gonzalez-Sarmiento R, Greemberg JM, Kersey JH. Usage of  $\gamma$  chain variable regions in human acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 1988; 72:2038-2041.
- (69) Cavé H, Guidal C, Rohrlich P, Delfau MH, Broyart A, Lescouer B et al. Prospective monitoring and quantification of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of  $\delta$  and  $\gamma$  T-cell receptor genes. *Blood*. 1994; 83:1892-1902.
- (70) Kneba M, Bolz I, Linke B, Bertam J, Routhaupt D, Hiddemann W. Characterization of clone-specific rearranged T-cell receptor  $\gamma$ -chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Blood*. 1994; 84:574-581.
- (71) van der Velden VH, Wijkhuijs JM, Jacobs DC, van Wering ER, van Dongen JJ. T-cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative analysis. *Leukemia*. 2002; 16:1372-1380.
- (72) Nirmala K, Rajalekshmy KR, Raman SG, Shanta V, Rajkumar T. PCR-heteroduplex analysis of TCR gamma, delta and TAL-1 deletions in T-acute lymphoblastic leukemias: implications in the detection of minimal residual disease. *Leuk Res*. 2002; 26:335-343.
- (73) Brisco MJ, Tan LW, Orsborn AM, Morley AA. Development of a IgH sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population. *Br J Haematol*, 1990; 75:163.

- (74) d'Auriol L, Macintyre E, Galibert F, Sigaux F. In vitro amplification of T cell  $\gamma$  rearrangements: a new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia*. 1989; 3:155.
- (75) Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1535-1548.
- (76) Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica*. 2005; 90: 382-390.
- (77) GBTLI. Grupo Brasileiro para o Tratamento de Leucemia Infantil. Protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, 2000.
- (78) Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia: current status and future prospective. *Lancet Oncol*. 2001; 2: 507-607.
- (79) Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann M et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*. 2000; 95:3310–3322.
- (80) Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood*. 2001; 97:1211–1218.
- (81) Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Rivera GK, Howard SC, Ribeiro RC et al. Results of therapy for acute lymphoblastic leukemia in black and white children. *JAMA*. 2003; 290:2001–2007
- (82) Willemsse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grumayer Er et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood*. 2002; 99:4386-4393.
- (83) Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995; 9:1985-1989.
- (84) Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Linda S et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group. *Blood*. 2008; 111(12):5477-5485.
- (85) Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza MA, Araújo M, Toledo SR, Lee MLM et al. A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica*. 2009; 94(6):781-789.
- (86) Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008; 22:771-782.

(87) Bruggemann M, Droese J, Bolz I, Luth P, Pott C, von Neuhoff N et al. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2000; 14:1419-1425.



## ANEXO 1 – Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética Local



Centro Infantil  
Boldrini

Campinas, 28 de Março de 2007

Ilmo. Sr.  
JOSÉ ANDRES YUNES

Prezado Senhor,

Informamos que seu projeto intitulado "ESTUDO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini) em 23/02/2007.

Adicionalmente informamos que, conf. estabelecido no "item VIII. c da Resolução CNS Nº 196/96" e no "Fluxograma para pesquisas envolvendo seres humanos", o CEP/Boldrini encaminhou seu projeto à CONEP/MS para apreciação, estando o início do estudo vinculado à aprovação deste pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa).

Colocamo-nos à disposição para maiores esclarecimentos.

Cordialmente,

Prof. Dr. Flávio César de Sá  
Vice - Coordenador do CEP/Boldrini

P.S.: Pedimos a gentileza de acusar o recebimento desta.

Util. Públ. Municipal Lei nº 496  
Util. Públ. Estadual Dec. nº 22.018  
Util. Públ. Federal Dec. nº 88.747  
Registro no CNSS nº 23.002.000.591/84-0  
Inscr. Estadual - Isento  
CNPJ: 50.046.887/0001-27

CENTRO INFANTIL DR. DOMINGOS A. BOLDRINI  
Dr. Gabriel Porto, 12  
Cid. Universitária - Campinas  
Cep. 13083-2  
Tel. (55 19) 3787-50



## **ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes**

### **Estudo prospectivo da Doença Residual Mínima em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda tratados segundo protocolo do GBTLI.**

Para obter um maior conhecimento clínico e científico sobre o câncer e doenças hematológicas, os pesquisadores e corpo clínico deste hospital desenvolvem pesquisa científica, através de projetos analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Através desta pesquisa, que pretende detectar a presença de células leucêmicas na medula óssea do paciente no 14º e 28º dias do tratamento (chamada de Doença Residual Mínima), será possível identificar os pacientes que respondem ou não satisfatoriamente na fase de indução e, portanto, oferecer a possibilidade de realocá-los no protocolo terapêutico em vigência.

Seu filho(a) foi submetido a tratamento para leucemia linfóide aguda neste hospital. O tratamento inclui coletas de sangue e medula óssea para o diagnóstico e acompanhamento da doença. Parte da amostra colhida, não usada nos diagnósticos, representa material muito útil para pesquisa científica.

Por isso, você está sendo convidado a colaborar com a pesquisa científica, autorizando a utilização de parte das amostras de sangue/medula óssea já coletadas nos procedimentos rotineiros de diagnóstico. Apenas o restante do material colhido, não usado para diagnóstico, será aproveitado na pesquisa. Assim sendo, não será feita nenhuma coleta adicional de sangue/medula óssea àquela que já foi feita para o diagnóstico, portanto, a sua colaboração na pesquisa não acarreta risco nem desconforto adicional algum.

Solicitamos também sua autorização para a consulta do prontuário clínico, a fim de estudar a ocorrência de eventuais associações entre os dados laboratoriais encontrados e a evolução clínica da doença. Os dados individuais, resultados de exames e testes, bem como do prontuário, somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, etc).

Além disso, solicitamos autorização para armazenar a parte da amostra não utilizada para a consecução deste projeto de pesquisa. Na eventualidade de novo projeto de pesquisa, o material só será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo CEP e, se for o caso, pela CONEP.

Todo o material utilizado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, a privacidade e identidade do seu filho(a) serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.



Concordando com o uso deste material, conforme descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em permitir o uso deste material para pesquisa, ou se futuramente, em qualquer fase da pesquisa, vier a retirar seu consentimento, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no tratamento de seu filho(a), nem incorrerá em discriminação ou penalização alguma.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado no prontuário do paciente.

Caso você tenha questões a fazer sobre este termo de consentimento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, bem como se desejar a qualquer momento retirar seu consentimento, por gentileza, entre em contato com o pesquisador responsável pelo projeto, Dr. José Andrés Yunes: andres@boldrini.org.br ou pelo endereço: R. Gabriel Porto, 1270, CEP 13083 210. Campinas, SP.

---

Autorizo que o material coletado seja armazenado para uso em outras pesquisas após sua aprovação como novo projeto, mediante nova avaliação pelo CEP

Assinatura do doador(a) ou Representante Legal: \_\_\_\_\_

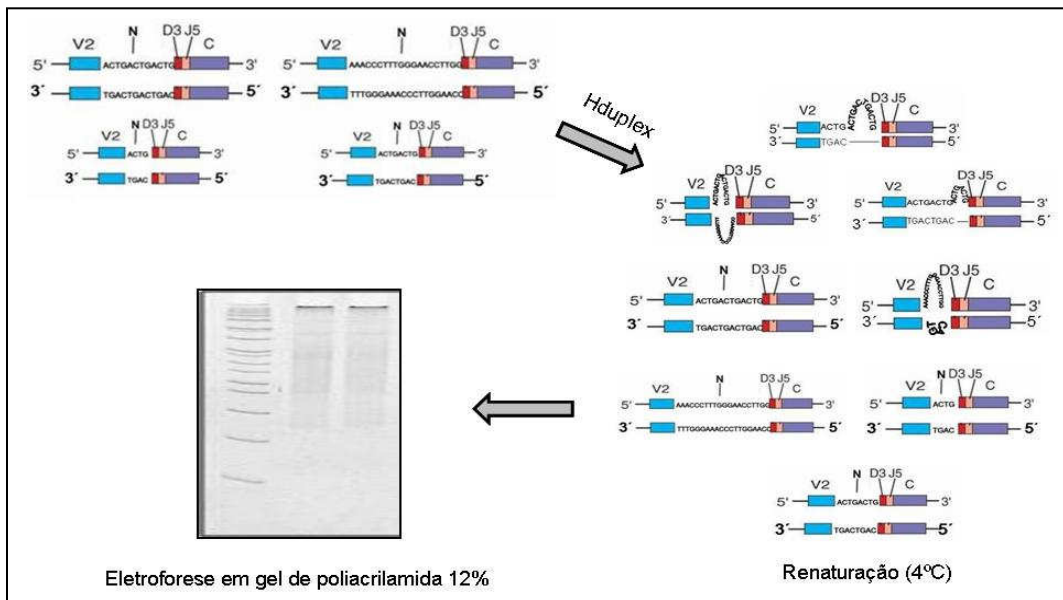
Nome do doador(a) : \_\_\_\_\_

RG do Prontuário Médico: \_\_\_\_\_

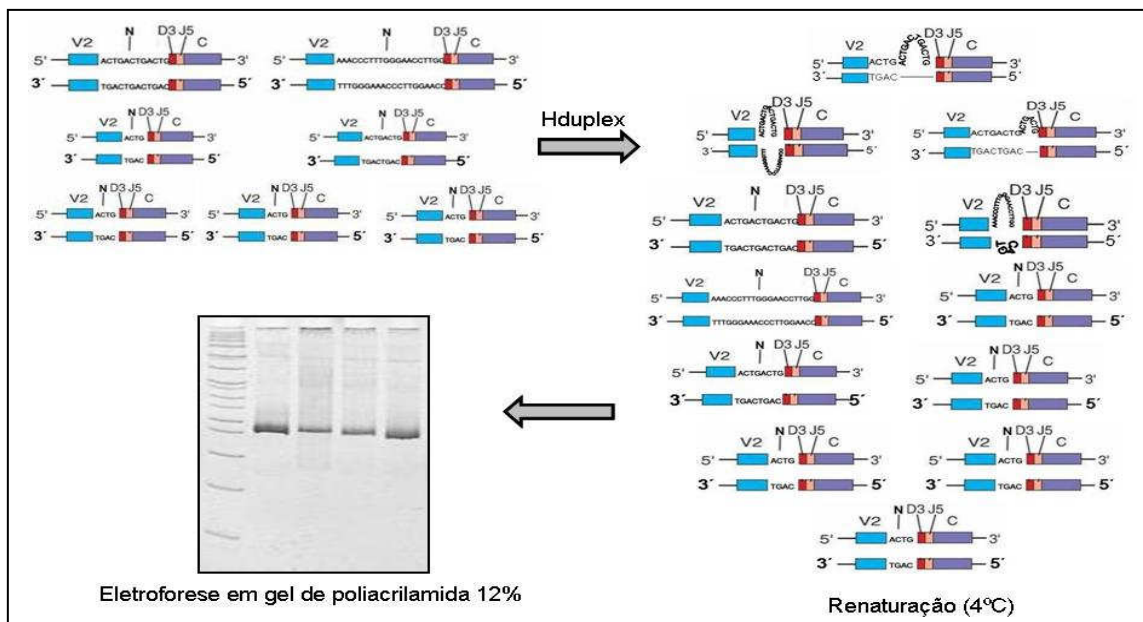
Médico Responsável: \_\_\_\_\_

Presidente do Centro Infantil Boldrini: \_\_\_\_\_

### ANEXO 3 – PCR associado à formação de Homo/Heterodúplex



PCR associado à formação de Homo/Heterodúplex em uma população de linfócitos normais. Observa-se que após a desnaturação e renaturação do produto de PCR, não são visíveis bandas distintas no gel de poliacrilamida.



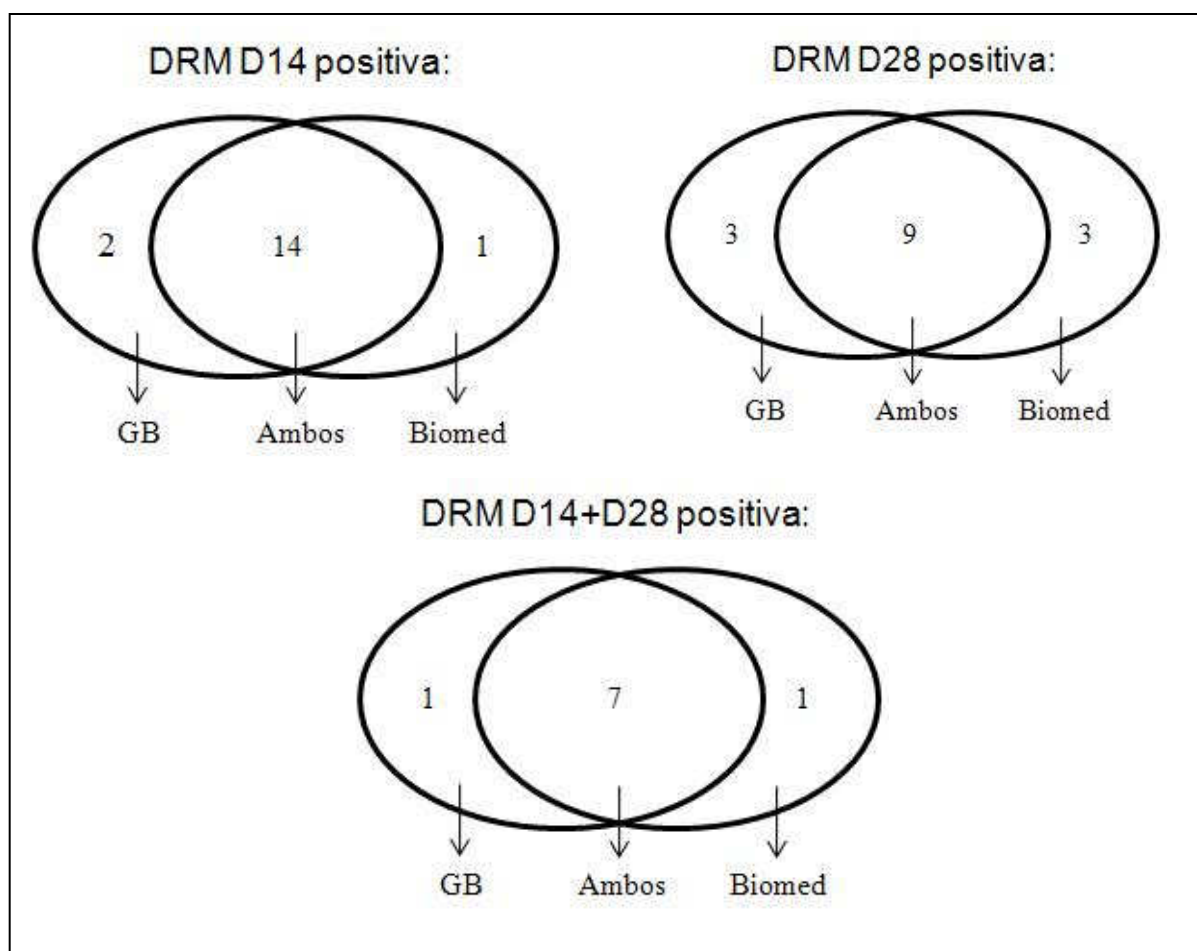
PCR associado à formação de Homo/Heterodúplex em uma população leucêmica. Observa-se que após a denaturação e renaturação do produto de PCR, é possível a identificação de bandas distintas no gel de poliacrilamida devido à presença de uma população de células leucêmicas com o mesmo padrão de rearranjos gênicos.



## ANEXO 4 – Comparação dos resultados encontrados por ambos métodos na análise da DRM nos dias 14 e 28 da terapia de indução

<i>DRM positiva</i>	<i>Total positivos</i>	<i>GB</i>	<i>Biomed</i>	<i>Ambos Métodos</i>	<i>Concordância entre métodos</i>
D14	17	16	15	14	82,30%
D28	15	12	12	9	60%
D14+D28	9	8	8	7	77,8%

Número de casos DRM positivos dos dias 14 e/ou 28 encontrados por ambos métodos e porcentagem de concordância entre os métodos.



Esquema representativo do número de pacientes DRM positivos no D14 e/ou D28 nos método GB e/ou Biomed.



## **APÊNDICE 1 - TCRG gene rearrangement patterns in Brazilian children with ALL: an update (in press Leukemia Research)**

### ***TCRG* gene rearrangement patterns in Brazilian children with ALL: an update**

Mônica Aparecida Ganazza <sup>a</sup>, Juliana Godoy Assumpção <sup>a</sup>, Marcela de Araújo <sup>a</sup>, Carlos Alberto Scrideli <sup>b</sup>, Luiz Gonzaga Tone <sup>b</sup>, Silvia Regina Brandalise <sup>a,c</sup>, José Andrés Yunes <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brazil;

<sup>b</sup> Department of Pediatrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil;

<sup>c</sup> Department of Pediatrics, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil;

Correspondence to: José Andrés Yunes, Laboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil Boldrini, Rua Dr Gabriel Porto 1270, Campinas, SP 13083-210, Brazil

Phone: 55 19 3787-5070

Fax: 55 19 3289-3571

E-mail: [andres@boldrini.org.br](mailto:andres@boldrini.org.br)

**To the editor:** As a clonal disease, acute lymphoblastic leukemia (ALL) carries unique markers in the context of rearranged immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor genes (*TCR*) that serve as targets to quantitate the levels of minimal residual disease (MRD), which is currently the most reliable prognostic factor in ALL [1-4].

Patient-specific Ig and/or *TCR* gene rearrangements can be identified in most cases (95%) at diagnosis with the use of limited sets of PCR primers [5,6]. *TCR gamma (TCRG)* gene rearrangements occur in half precursor-B-ALL and the vast majority of T-ALL cases [7], being one of the principal molecular targets for MRD monitoring. The human *TCRG* gene consists of 15  $V\gamma$  gene segments and two  $C\gamma$  gene segments, preceded by three  $J\gamma 1$  or two  $J\gamma 2$  gene segments.  $V$  gene segments are usually divided into four families:  $V\gamma$  I ( $V\gamma 2$ ,  $V\gamma 3$ ,  $V\gamma 4$ ,  $V\gamma 5$ ,  $V\gamma 8$ ,  $\psi V\gamma 1$ ,  $\psi V\gamma 5$ ,  $\psi V\gamma 6$ , and  $\psi V\gamma 7$ ),  $V\gamma$  II ( $V\gamma 9$ ),  $V\gamma$  III ( $V\gamma 10$ ), and  $V\gamma$  IV ( $V\gamma 11$ ) [8]. The available V, D, and J gene segments are not used randomly. In childhood ALL, V gene segments of the  $V\gamma$  I family are used most frequently, followed by  $V\gamma$  II ( $V\gamma 9$ ) (Table 1) [5,9]. In a previous study by Scrideli et al. [10], 103 Brazilian children with ALL were found to present an unexpectedly high incidence of *TCRG* gene rearrangements involving  $V\gamma$  II ( $V\gamma 9$ ) (48% in precursor-B-ALL; 37% in T-ALL). Authors suggested that the preferential use of  $V\gamma 9$  was related to racial differences and/or increased exposure to pathogens in comparison to children from developed countries [10,11].

We now report the incidence of *TCRG* rearrangements in 203 pediatric ALL patients admitted to treatment at a different Brazilian institution. Primers for PCR analysis of *TCRG* gene rearrangement were as described [10]. Separate PCR reactions were performed using one of the forward primer:  $V\gamma 2$ ,  $V\gamma 3$ ,  $V\gamma 4$ ,  $V\gamma 5$ ,  $V\gamma 8$ ,  $V\gamma 9$ ,  $V\gamma 10$ , or  $V\gamma 11$ , in combination with a mix of three reverse primers:  $J\gamma 1.3/2.3$ ,  $J\gamma 1.1/2.1$ , and  $J\gamma 1.2$ . A

subgroup of 78 out of the 203 samples was analyzed in parallel by using primers and protocol from the BIOMED-1 Concerted Action [6]. Clonality was characterized by the presence of a band of the expected size in the homo/heteroduplex analysis on 12% polyacrylamide gel [12]. Institutional review board approval was obtained from the Research Ethics Committee, Centro Infantil Boldrini (Campinas, SP, Brazil).

We detected *TCRG* gene rearrangements in 54% (92/171) of precursor-B-ALL: 60% (55/92) were monoallelic rearrangements, 35% (32/92) biallelic rearrangements, and 4% (4/92) had more than two rearrangements. The V gene segments of the V $\gamma$ I family were used most frequently (65%), followed by V $\gamma$ II (V $\gamma$ 9) (33%) and V $\gamma$ IV (V $\gamma$ 11) (4%). In T-ALL, *TCRG* gene rearrangements were detected in 100% (32/32) of patients: 44% (14/32) were monoallelic rearrangements, 47% (15/32) biallelic rearrangements, and 9% (3/32) had more than two rearrangements. Frequencies for *TCRG* V segments were 68%, 18%, 7%, and 6% for V $\gamma$ I family, V $\gamma$ II (V $\gamma$ 9), V $\gamma$ IV (V $\gamma$ 11), and V $\gamma$ III (V $\gamma$ 10), respectively (Table 1). In general, these frequencies for the different *TCRG* gene configurations are similar to those described in the literature [5,9,13, reviewed in 9].

The frequencies of rearrangements involving the V $\gamma$ 9 segment in this study were lower than those reported by Scrideli et al. [10] (Table 1). This is in part because we found higher frequencies of V $\gamma$ 2 and V $\gamma$ 8 rearrangements in comparison to the previous Brazilian study (data not shown). It is not clear whether patients admitted to treatment in these institutions come from different ethnic or socio-economic regions of Brazil, even though Campinas (this study) is only 200 km distant from Ribeirão Preto. On the other hand, our data showed a higher incidence of V $\gamma$ 9 rearrangements in comparison to reports from other



countries, especially in precursor-B-ALL which is 20% on average [9]. Importantly, equally higher V $\gamma$ 9 rearrangements were also obtained with a different set of PCR primers (Table 1). In any case, our data shows prevalence of *TCRG* V $\gamma$ I family segments, followed by V $\gamma$ II (V $\gamma$ 9), in convergence with *TCRG* gene rearrangement patterns reported by other countries.

## References

1. Jacquy C, Delepaut B, Van Daele S, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B, Vermynlen C, Cornu G, Martiat P. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol* 1997; 98:140-146.
2. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group N Engl J Med. 1998; 339:591-598.
3. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998; 351:550-554.
4. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den

- Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; 352:1731-1738.
5. Szczepański T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hählen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ, Tibbe GJ, De Bruijn MA, Van Dongen JJ. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13:196-205.
  6. Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13: 110-118.
  7. Flohr T, Scrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fisher S et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEO-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008; 22:771-782.
  8. van Dongen JJM, Langerak AW. Immunoglobulin and T-cell receptor rearrangements. In: Pui CH, editor. *Childhood Leukemias*. Cambridge: Cambridge University Press; 1999. p. 145-167.

9. Szczepanski T, Langerak AW, Willemse MJ, Wolvers-Tettero ILM, van Wering ER, van Dongen. T-cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2000; 14:1208-1214.
10. Scrideli CA, Queiróz RG, Kashima S, Sankarankutty BO, Tone LG. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: analysis and implications for the study of minimal residual disease. *Leuk Res* 2004; 28(3):267-273.
11. Scrideli CA, Tone LG. *Ig* and *TCR* gene rearrangements in childhood ALL Is there ethnic and socio-economic diversity of rearrangement patterns? *Leuk Res* 2006; 30:1065-1066.
12. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangements in B-and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1991;78:192-196.
13. Dawidowska M, Derwich K, Szczepański T, Jólkowska J, van der Velden VH, Wachowiak J, Witt M. Pattern of immunoglobulin and T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangements in Polish pediatric acute lymphoblastic leukemia patients-implications for RQ-PCR-based assessment of minimal residual disease. *Leuk Res* 2006;30: 1119-1125.

**Table 1.** Incidence of *TCRG* V segments rearrangements in 203 Brazilian children with ALL<sup>a</sup>.

	Rearranged alleles	V $\gamma$ I	V $\gamma$ II	V $\gamma$ III	V $\gamma$ IV
<i>Precursor-B-ALL</i>					
This study (171 patients)	131	66%	33%	<1%	4%
(68 patients) - Biomed-1 method <sup>b</sup>	56	63%	36%	4,0%	2,0%
Scrideli et al. [9] (81 patients)	77	49%	48%	3%	ND <sup>c</sup>
Szczepáński et al. [5] (62 patients) <sup>d</sup>	84	74%	19%	0%	6%
<i>T-ALL</i>					
This study (32 patients)	54	69%	19%	6%	7%
(10 patients) - Biomed-1 method <sup>b</sup>	12	67%	8%	0%	0%
Scrideli et al. [9] (18 patients)	27	62%	37%	0%	ND <sup>c</sup>
Szczepáński et al.[8] (90 patients) <sup>d</sup>	234	74%	13%	7%	4%

<sup>a</sup> A total of 203 patients were included, being 112 retrospective patients admitted to treatment from 2000 to 2004, plus 91 consecutive patients admitted to treatment from 2006 to 2007 and analyzed prospectively. No significant differences were found between these two groups of patients (data not shown).

<sup>b</sup> 78 of the prospective samples were also analyzed by using primers and protocol from the BIOMED-1 Concerted Action [6]

<sup>c</sup> Not determined

<sup>d</sup> Frequencies corresponding to results obtained by PCR analysis using primers and protocol from the BIOMED-1 Concerted Action [6]

## **Acknowledgements**

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP), grant no.2005/02279-6. MAG and JGA were recipient of a research fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), respectively.

## **Contribution**

Mônica A. Ganazza and Juliana G. Assumpção performed research, analyzed data, and wrote the paper; Carlos Scrideli and Luiz G. Tone designed research and performed manuscript revision; Silvia R. Brandalise was responsible for patient enrolment and treatment and performed manuscript revision; José A. Yunes, designed research, analyzed data and wrote the manuscript.

## **Conflict of Interest**

Authors declare no conflict of interest.

**APÊNDICE 2 - A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups (publicado em maio de 2009 na revista Haematologica)**

**A simplified minimal residual disease (MRD) PCR approach at early treatment points stratifies children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups**

CA Scrideli<sup>1</sup>, JG Assumpção<sup>2</sup>, MA Ganazza<sup>2</sup>, M Araújo<sup>2</sup>, SR Toledo<sup>3</sup>, MLM Lee<sup>3</sup>, E Delbuono<sup>3</sup>, AS Petrilli<sup>3</sup>; RP Queiróz<sup>1</sup>, A Biondi<sup>4</sup>, MB Viana<sup>5</sup>, JA Yunes<sup>2</sup>, SR Brandalise<sup>2</sup>, LG Tone<sup>1</sup>

*<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirao Preto, Brazil; <sup>2</sup> Centro Infantil Boldrini, Campinas, Brazil; <sup>3</sup> Pediatric Oncology Institute, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>4</sup> Pediatric Clinic, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy, <sup>5</sup> Department of Pediatrics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil*

Correspondence to: Carlos Alberto Scrideli, Department of Pediatrics, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil

E-mail: [scrideli@fmrp.usp.br](mailto:scrideli@fmrp.usp.br)

Phone: 55 16 3602-2672

Fax: 55 16 3602-2700

**Aknowledgements**

We thank Maria Angélica Abdala Cortez, Estefania Bijone and Kleiton Silva Borges for excellent technical assistance. This collaborative study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP), grant no.2005/02279-6.

## Abstract

Minimal residual disease (MRD) is an important independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). The classical detection methods such as multiparameter flow cytometry (FC) and real-time quantitative PCR are expensive, time-consuming and complex, and require considerable technical expertise to be performed. We analyzed the prognostic significance of MRD detection in bone marrow samples from 229 consecutive ALL children on days 7, 14 and 28, using a simplified approach with consensus primers for Ig and TCR gene rearrangements and homo/heteroduplex analysis (sensitivity: 1 to 0.1%). FC was simultaneously used in 59 patients as a standard control method. At least one marker was detected in 96.4% of the patients. By combining the MRD results obtained on days 14 and 28, it was possible to identify 3 different prognostic groups: MRD negative on D14/D28, positive on D14/negative on D28, and positive on both D14/D28. Five-year event-free survival was 85%, 75,6%, and 27,5%, respectively ( $P < 0.0001$ ). These results were similar to those obtained for the FC-MRD control group. In multivariate analysis MRD positivity on D28 was the most important prognostic factor ( $P < 0.0001$ ). This simplified strategy for MRD detection was feasible, reproducible, cheaper and simpler when compared with other methods, and allowed powerful discrimination between ALL children with a good and poor outcome.

## Introduction

Criteria for the determination of early response to treatment based on the rate of disappearance of leukemic cells in bone marrow are being used by several groups for the stratification of risk-adapted therapy and have proved to be an independent prognostic factor in childhood acute lymphoid leukemias (ALL).<sup>1,2</sup> Morphological analysis, although useful and applicable at any center, has proved to be subjective, of limited sensitivity and imprecise for the study of early response to treatment.<sup>2-4</sup> Sequential monitoring of minimal residual disease (MRD) using more sensitive and specific techniques such as the polymerase chain reaction (PCR) and flow cytometry, with a detection power of one blast cell in  $10^3$  to  $10^6$  normal cells, has importantly refined the assessment of the evolution of early response to treatment.<sup>2,5-14</sup> These methods, however, are expensive and complex and require considerable technological availability,<sup>8,10,15,16</sup> thus being inaccessible to most treatment centers, especially in developing countries.

Simplified methodologies for the assessment of the early response, including the evaluation of MRD, may represent a good predictive criterion of an unfavorable course in children with ALL and could be used to identify patients with a high risk of relapse.<sup>15,17</sup>

The objective of the present study was to determine the prognostic impact of the presence of MRD on days 7, 14 and 28 of induction therapy in children with ALL treated according to the protocol of the Brazilian Group of Treatment of Acute Leukemias (GBTLI-99) using a simplified PCR methodology with consensus primers for the detection of rearrangements in the immunoglobulin (Ig) and T cell receptor (TCR) genes.

## Patients, materials and methods

### *Patients and diagnosis*

Samples were obtained from 229 patients with childhood ALL aged 1 to 18 years, classified and treated according to the GBTLI-99 protocol at 3 different treatment centers and presenting frozen DNA samples of good quality for PCR. Of the non-infant 340 patients submitted to treatment at the participating institutions during the study period, 111 were excluded due to the absence of DNA at diagnosis or at any of the time points analyzed, 3 due to major violation of the protocol, and 2 because of loss to follow-up at the service of origin. Overall and event-free survival (EFS) and the biological and clinical-laboratory characteristics were similar for the total group of patients and for the group of patients analyzed (data not shown). We also analyzed consecutive samples from 59 children with ALL treated according to the same protocol (GBTLI-99) regarding MRD by flow cytometry for comparison of the MRD data obtained by PCR, with 26 of them being analyzed by both PCR and flow cytometry. The study was approved by the National Research Ethics Committee (CONEP, No. 1971/2005) and was based on the Helsinki convention criteria and the persons responsible for the children gave written informed consent to participate.

The diagnosis was made by standard morphological analysis and by flow cytometry immunophenotyping. Of the 299 patients studied, 192 (83.8%) had B-derived ALL (pro-B ALL in 6 cases and common-ALL/pre-B ALL in 186), and 37 (16.2%) had T cell-derived ALL; 139 were boys and 90 were girls (ratio: 1.5:1) ranging in age from 13 months to 17 years (mean: 6.3 years). The presence of t(12;21) was investigated by reverse transcription PCR (RT-PCR) in 201 patients, as proposed by the BIOMED-1 Concerted Action.<sup>18</sup>

Patients younger than one year and older than 9 years and/or with a white blood cell (WBC) count at diagnosis  $>50.000/\text{mm}^3$  were assigned to the group at high risk for relapse and the remaining ones were assigned to the low risk group, which received a less intense treatment. Patients were denoted as poor responders, regardless of the initial risk group, if they met one or more of the following criteria during the phase of induction of remission: WBC  $>5,000/\text{mm}^3$  on day 7 (D7), M3 bone marrow ( $>25\%$  blasts) on D14 or M2 or M3 bone marrow ( $>5$  and  $25\%$  blasts, respectively) on D28. If they belonged to the low risk group at the time of diagnosis, they were then assigned to the treatment protocol of the high risk group. All patients, regardless of risk group, received an induction regimen of 4 weeks including prednisone, vincristine, doxorubicin, L-asparaginase, and MADIT (methotrexate, Ara-C and dexametasone intrathecal).

### *Cell samples and DNA isolation*

Bone marrow samples were obtained from the patients at diagnosis and at the following three time points: on the 7th (D7) and 14th (D14) day of induction and at the end of the induction therapy (D28). Mononucleated cells were separated by a Ficoll-Paque centrifugation gradient and DNA was extracted with the Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA.) according to manufacturer instructions. DNA was quantitated by spectrophotometry and tested for quality by standard PCR amplification for the beta-globin gene.

### *MRD determined by PCR*



DNA samples (50 ng/μl) from the cells collected at diagnosis were amplified by PCR with consensus primers flanking the CDR-3 region of the *IgH* gene (*FR3A*, *LJH*, *VLJH*), *TCRG* (*Vγ1-IV* and *Jγ1-3* families),<sup>19,20</sup> incomplete *TCRD* (*Vδ2Dδ3*)<sup>21</sup> and *IgK* rearrangements<sup>22,23</sup> (Table 1).

Multiplex PCR was initially applied for gene *TCRG* with various primers of the V and J segments simultaneously (A and B mixes, Table 2). Once amplification was obtained in the multiplex reactions, each sample was tested separately by PCR with a primer for segment V. Two negative controls were used in each PCR assay: one without DNA and the other containing polyclonal DNA obtained from mononucleated cells. The PCR protocols for the various primers are shown in Table 3.

The PCR product was submitted to homo/heteroduplex analysis as previously described<sup>24</sup>. Clonality was characterized by the presence of a band of the expected size in the homo/heteroduplex analysis on 12% polyacrylamide gel. The expected fragment sizes are: 80 to 120 bp for CDR 3 (*IgH*), 80 to 100 bp for *TCRδ*, 170 to 210 bp for *TCRγ*<sup>19-21,25</sup>, 364 to 433 bp for *IgK* mix 1, and 175 to 443 bp for mix *IgK* mix 2<sup>23</sup>.

The samples analyzed on D7, D14 and D28 of induction therapy were used at a DNA concentration of 500 ng/μl and were considered to be positive when they presented the same migration pattern and molecular weight as the samples obtained at diagnosis and amplified in the same reaction for *IgH*, *IgK* and/or *TCR* rearrangements (see, e.g., Figure 1). Samples of each amplicon were sequenced with an ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA) in order to validate the assay using the ABI-Prism Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Read Reaction kit (Applied Biosystems, CA, USA) according to manufacturer instructions. PCR sensitivity ranged from 10<sup>-2</sup> to 10<sup>-3</sup> and was determined from serial dilutions of bone marrow DNA obtained at diagnosis and containing more than 90% blast cells in a pool of bone marrow DNA obtained from six patients with no hematological disease.

The cost of the reagents and consumables used in this methodology was calculated to be about € 10 for the samples obtained at diagnosis and € 8 for those obtained at each time point analyzed.

#### *MRD determined by flow cytometry*

Leukemic blasts were immunophenotyped using a two or three color combination of monoclonal antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin chlorophyll protein (PerCp) or CyChrome: IgG1-FITC/PE/CyChrome; CD1a-FITC; CD2-PE; CD3-PE/CyChrome; CD4-FITC; CD7-PE; CD8-PE; CD10-PE; CD15-FITC; CD19-FITC/CyChrome; CD20-FITC; CD33-FITC/PE; CD45-FITC; CD79a-PE (Becton Dickinson - Pharmingen, San Jose, CA); CD10-FITC; CD22-PE; CD34-FITC/PE; CD45-PerCp; MPO-FITC; terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-FITC (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA); CD13-PE; IgM-FITC (Dako, Carpinteria, CA). The stain and lyse/wash technique was used as previously reported.<sup>26</sup> Data acquisition was performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with the Cell Quest software program. A total of 15 x 10<sup>3</sup> non-gated events were acquired. At least one useful aberrant marker combination was identified at diagnosis and then used to monitor MRD in the follow-up samples.

Matched non-reactive fluorochrome-conjugated antibodies and the CD4-FITC/CD8-PE/CD3-CyChrome combination were used as negative and positive controls, respectively. A two-step acquisition procedure was applied. In the first step, a total of  $15 \times 10^3$  non-gated events were acquired. In the second step, a live gate (LG) based on the lineage marker expression was set: CD19 for BCP-ALL and cytoplasmic (cy) CD3 for T-ALL, and low/ intermediate side scatter characteristics (SSC - lymphoid scatter). The total numbers of cells, usually  $10^5$ - $10^6$  events passing through the flow cytometer, were recorded for each LG acquisition.<sup>26-28</sup>

The expression of all markers was analyzed within the CD19<sup>+</sup> or cyCD3<sup>+</sup>/ lymphocyte SSC gate to determine the presence of any cell subset with the aberrant marker.<sup>26-28</sup> In patients with no aberrant marker, MRD was monitored by the three triple-stainings CD45/CD10/CD19; CD34/CD22/CD19; CD20/CD10/CD19.<sup>26,27</sup> Data analysis was performed with the Paint-a-Gate Pro software (Becton Dickinson, San Jose, CA). A cluster of at least 10-20 events with the patients' aberrant marker expression and adequate SSC was considered to be MRD. For comparison with the PCR results, "FC-detectable MRD" was defined as the expression of the leukemia-associated immunophenotype in 0.1% or more of the total events present in the sample.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was carried out using Kaplan-Meier curves for EFS, with the presence of relapse and/or death due to any cause being considered an unfavorable event. Curves for different groups were compared by the log-rank test. The Cox proportional regression model was used for multivariable analysis of prognostic factors. The Fisher test was also used to assess the association between presence of MRD at the time points studied (D7, D14 and D28) and the following clinical and biological variables: age, number of WBC at diagnosis, presence of infiltration of the central nervous system at diagnosis, immunophenotype, risk group, as well as the following response variables: number of WBC at D7 and bone marrow status at D14 and D28 after the beginning of induction therapy. All statistical analyses were performed using the SPSS software version 15.0, with the level of significance set at  $P \leq 0.05$ .

## **Results**

#### *Analysis of clonality in the samples obtained at diagnosis*

At least one clonal rearrangement was identified in 96.4% of the patients studied (96.2% for B lineage ALL and 97.5% for ALL-T). Two or more clonal markers were detected in 89.1% of cases, 82.9% for ALL-T cases and 89.4% for ALL-B cases. The samples that did not present amplification for any of the rearrangements tested contained DNA of good quality, as confirmed by the positive amplification of the beta globin gene. The frequencies of detection of rearrangements were closely similar in the different services participating (data not shown), confirming the reproducibility of the assays.

For cases of B-lineage ALL, the most frequent rearrangement was *IgH* (77.4%), followed by *TCRG* (58.3%), incomplete *TCRD* (50%), and *IgK* (48.4%). For T lineage-derived ALL, the most frequent rearrangement was *TCRG* (97.5%), followed by incomplete *TCRD* (9.7%).

### *MRD determined by PCR and flow cytometry*

The clinical and biological data for the 229 patients evaluated in the present study are listed in Table 4. Unfavorable events (relapse or death) occurred in 43 patients (18.7%), with death during induction or during clinical remission occurring in 13 patients (5.6%). Of the 121 patients initially classified as low risk, 11 were considered to be poor responders and were reclassified as high risk according to TLI-99 criteria. The time of follow-up of patients in complete clinical remission ranged from 9 to 92 months, with a median observation of 50 months and a cut-off date in March 2007.

Bone marrow was available on D7 for 50 of the 229 patients and all samples were analyzed. Negative MRD on D7 was detected in 14/50 samples (28%), 3 of which (21%) presented an unfavorable event (1 relapse and 2 deaths of patients in complete clinical remission). Of the 36 patients with a positive MRD on D7, 16 suffered a relapse (44.4%), with a nonsignificant difference compared to D7-negative children. Also, no significant association was detected between presence of MRD on D7 and any of the clinical and response criteria analyzed. With the technique used, the presence of MRD on D14 and D28 was detected in 26.2% and 13.2% of cases, respectively. The clinical and biological variables that usually predict a poor response to treatment were significantly associated with the detection of MRD on D14 and D28 of induction therapy (Table 5). There was no association between patient age or presence of cerebrospinal fluid infiltrate at diagnosis and MRD data on D14, or between age or immunophenotype and MRD on D28.

As shown in Table 6, several prognostic factors for EFS were statistically significant, including the presence of MRD on D14 and D28 (Figure 2B and 2C). The MRD result permitted patient classification into three groups of differentiated prognosis: (i) MRD-negative patients on D14 and D28 (5y-EFS: 85%), (ii) MRD-positive patients on D14 and negative on D28 (5y-EFS: 75.6%), and (iii) MRD-positive patients on D28 (5y-EFS: 27.5%) ( $P < 0.0001$ , Figure 2D).

Multivariable analysis demonstrated that the presence of MRD on D28 was the independent factor of highest impact on EFS ( $P < 0.0001$ ), with only child age in addition to MRD remaining in the final model ( $P = 0.004$ ). WBC at diagnosis was nonsignificant ( $P = 0.4$ ).

In the bone marrow samples from patients analyzed by flow cytometry ( $n = 59$ ), MDR was detected in 35.8% of cases on D14 and in 15.8% on D28. Five-year EFS for children stratified according to MRD on D14 was 81.7% for negative cases and 38.9% for positive cases ( $P = 0.005$ ). On D28, EFS was 77.5% and zero, respectively ( $P < 0.0001$ ). When the patients were stratified into three groups according to (i) absence of MRD on D14 and D28, (ii) presence of MRD on D14 but absence on D28, and (iii) presence of MRD on D28, the result was similar to that obtained by PCR, i.e., a progressively lower EFS, with separation into distinct groups with a good prognosis, intermediate prognosis and poor prognosis (82.4%, 71.1% and 0.00, respectively,  $P < 0.0001$ ). The survival curves are shown in Figure 2E.

When the 26 cases studied by the two methods were analyzed using the same 0.1% cut-off point to define the presence or absence of MRD, the data agreed in 24 of them (92%) on D14. In 2 cases, MRD was found to be positive when determined by flow cytometry and negative when determined by PCR. For the cases analyzed on D28, there was 100% agreement, with 2 patients presenting positive MRD.

### *MRD according to risk group, immunophenotyping and presence of TEL/AML1*

The predictive value of MRD was also analyzed within some subgroups of patients classified as being at high risk on D28, at low risk at diagnosis, as patients with B-derived ALL CD10+, patients with ALL-T, and *TEL/AML1*+ patients (Table 7). The detection of MRD on D7, D14 and D28 was more frequent among high risk and ALL-T patients. When analyzed according to the presence or absence of MRD in bone marrow on D7, D14 and D28 in subgroups of patients classified as low risk at diagnosis, positive B-derived CD10, T, and presence of the *TEL/AML1* transcript, EFS was found to be lower in patients with MRD on D14 and D28. Five-year EFS was also significantly lower in patients reclassified as high risk on D28 according to GBTLI-99 criteria. When these high risk patients were stratified into 3 groups according to (i) absence of MRD on D14 and D28, (ii) presence of MRD on D14 and absence of MDR on D28, and (iii) presence of MRD on D28, again a progressively lower 5-year EFS was observed with the separation into distinct groups with good prognosis, intermediate prognosis and poor prognosis (81.9%, 60.4% and 31.2%, respectively,  $P<0.0001$ ).

## Discussion

MRD monitoring by flow cytometry and by real time quantitative PCR (RQ-PCR) has been significantly correlated with clinical prognosis, being particularly useful for the evaluation of the early response and thus permitting a refined stratification of treatment of both children<sup>2,7,10-15,29-32</sup> and adults.<sup>33-35</sup> Stratification into risk groups according to criteria not based on MRD has proved to be less accurate compared to criteria based on MDR, especially for low risk patients.<sup>36</sup>

With the technique used in the present study, the presence of at least one clonal rearrangement for the study of MRD was identified in 96.4% of the patients studied. The presence of two or more markers was detected in 88.4% of the cases investigated, showing that the simplified technique can be used for the study of MRD in most children with ALL and confirming the preliminary data obtained with a similar methodology.<sup>17</sup> Although this method is less sensitive, the results obtained were similar to those reported with the use of more complex techniques such as RQ-PCR and flow cytometry.<sup>2,8-15</sup>

In addition, the frequency of detection of the rearrangements at diagnosis and the frequency of positivity for MRD during the phases analyzed were closely similar at the three treatment centers (data not shown), showing good reproducibility of the technique used. When compared to the results for the group of 59 patients analyzed by flow cytometry, simplified PCR was able to discriminate in a similar manner three groups of children with significantly different EFS after 5 years of observation. Comparison of the two methods in the 26 patients for whom both methods were used showed 92% agreement of the results obtained on D14 and 100% agreement of the results obtained on D28, suggesting a good correlation between them despite the small number of cases investigated.

The frequency of MRD cases that were positive on both D14 and D28 was significantly higher among patients classified as being at high risk and in patients with ALL-T, in agreement with data reported by others.<sup>30,31,36,37</sup> MRD positivity on D14 and D28 was also found to be associated with the initial response to treatment. The group of patients considered to be good responders had a lower frequency of positive MRD results compared to the group of poor responders ( $P<0.0001$ ).

The presence of MRD on D14 and D28 was also strongly associated with unfavorable events ( $P < 0.0001$  for both time points).

When EFS was determined with respect to MRD positivity on D7, it was observed that, despite a longer survival of patients with negative MRD, this difference was not statistically significant ( $P = 0.13$ ). However, it should be pointed out that bone marrow was collected on D7 from only 50 children, a fact that recommends the use of this analysis in a larger number of patients.

In the present study, the absence of MRD on D14 was associated with a longer EFS both in the patient group as a whole and in the high and low risk subgroups, with B-derived CD10+, ALL-T and positive *TEL/AML1*. The presence of MRD on D28 was associated with relapse and/or death rates in all groups studied and was the most important independent adverse prognostic factor compared to the classical stratification factors used by the GBTLI-99. The present data demonstrate that the combination of MRD data obtained on D14 and D28 was able to define 3 groups of distinct prognosis: (i) patients with negative MRD on D14 and D28 who presented EFS rates higher than 85%, (ii) patients with positive MRD on D14 and negative MRD on day 28 who had an intermediate prognosis, and (iii) patients with positive MRD on D28 who presented a high relapse rate. These data support previously published preliminary results concerning a small number of patients submitted to two different treatment protocols<sup>17</sup> and suggest that positive MRD detection by a simplified technique at the end of induction therapy may be the most important prognostic factor in children with ALL. As also observed in the present study, the detection of high MRD rates ( $10^{-2}$  to  $10^{-3}$ ) on D15<sup>30,31</sup> or D19<sup>15</sup> and between weeks 4 and 12<sup>5-14</sup> of induction therapy has been associated with an unfavorable prognosis. It should be pointed out that in the cited studies the patients were submitted to different induction schemes with or without a pre-phase with corticosteroids, a fact that may impair comparison of the results.

The choice of the method for MRD detection based on patient stratification is highly relevant in terms of adherence to the study on the part of the various institutions. In addition to simplicity and accuracy, the choice of the laboratory method should also consider the cost, especially when financial resources are limited. The cost of the reagents and consumables needed to establish MRD markers at diagnosis in Europe has been estimated at €190.00 for flow cytometry and €250.00 for real time quantitative PCR (RT-PCR) and € 55.00 for each sample analyzed during follow-up with both methods.<sup>8</sup> These costs may become even higher in developing countries such as Brazil since part of the reagents used must be imported. In addition to being very expensive, these methods are quite labor intensive and require more sophisticated technological equipment, thus being beyond the reach of most services of pediatric oncology and hematology, especially in developing countries.

The cost of this simplified technique was 10 to 15 times lower than that of flow cytometry or RT-PCR (€10.00 at diagnosis and €8.00 for each time point analyzed). The method proved to be highly reproducible and relatively simple, requiring only a standard thermocycler and a system for polyacrylamide gel runs.

Simplified techniques using standard PCR<sup>38,39</sup>, RQ-PCR<sup>40</sup> or fingerprinting<sup>41</sup> have proved to be valid for the study of MRD in acute lymphoid leukemias. Recently, a simplified and relatively inexpensive technique of MRD detection on day 19 of induction therapy by flow cytometry using a panel of only 3 monoclonal antibodies was able to identify children with B lineage ALL with a very good response to treatment.<sup>15</sup>

However, it should be pointed out that this methodology may have deficiencies that should be considered to guarantee the results obtained. In order to obtain better sensitivity, in the present study we used a large amount of DNA (500 ng) in the tests carried out on days 14 and 28, when the number of blasts in bone marrow was reduced. In addition, in order to prevent the occurrence of nonspecific bands, which may lead to false-positive results, we used the simultaneous amplification of a normal control containing bone marrow cells without hematological disease and a run on homo/heteroduplex gel for the unequivocal identification of clonal amplification.<sup>24</sup>

## Conclusion

The detection of MRD is already part of modern care for patients with leukemia. The challenge is how to incorporate the information obtained in studies on MRD into the therapeutic scheme and the design of new treatment protocols. The expectation is that a more sensitive and specific evaluation of remission and of the initial response to treatment will result in conducts that will increase the cure rate for children with ALL. The refinement of methods for MRD detection and the use of simpler techniques of lower cost such as that developed in the present study may permit us to extend the benefit of MRD monitoring to all children with leukemia.

## References

- 1 Stanulla M, Cario G, Meissner B, Schrauder A, Moricke A, Riehm H, et al. Integrating molecular information into treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia--a perspective from the BFM Study Group. *Blood cells, molecules & diseases* 2007; **39**: 160-163.
- 2 Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica* 2005; **90**: 382-390.
- 3 Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; **100**: 52-58.
- 4 Rubnitz JE, Pui CH. Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer treatment reviews* 2003; **29**: 31-44.
- 5 Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med* 1998; **339**: 591-598.
- 6 van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; **352**: 1731-1738.
- 7 Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; **96**: 2691-2696.

- 8 Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Coustan-Smith E, et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol* 2005; **128**: 774-782.
- 9- van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007; **21**: 604-611.
- 10 Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia* 2007; **21**: 622-626.
- 11- Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberger D, Wang H, et al. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood* 2007; **110**: 1607-1611
- 12 Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 2007; **109**: 926-935.
- 13 Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008; **111**: 5477-5485.
- 14 Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, van der Velden V, Fischer S, et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008; **22**: 771-782.
- 15 Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, Zhou Y, Pui CH, Rivera GK, et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006; **108**: 97-102.
- 16- van der Velden VH, Panzer-Grumayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007; **21**: 706-713.
- 17 Scrideli CA, de Paula Queiroz R, Bernardes JE, Defavery R, Valera ET, Tone LG. Use of simplified strategies to evaluate early treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2006; **30**: 1049-1052.
- 18 van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; **13**: 1901-1928.
- 19 Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; **78**: 192-196.

- 20 Trainor KJ, Brisco MJ, Story CJ, Morley AA. Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 1990; **75**: 2220-2222.
- 21 Steward CG, Goulden NJ, Katz F, Baines D, Martin PG, Langlands K, et al. A polymerase chain reaction study of the stability of Ig heavy-chain and T-cell receptor delta gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994; **83**: 1355-1362.
- 22 Nakao M, Janssen JW, Bartram CR. Duplex PCR facilitates the identification of immunoglobulin kappa (IGK) gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; **14**: 218-219.
- 23 Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; **13**: 110-118.
- 24 Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997; **11**: 2192-2199.
- 25 Scrideli CA, Simoes AL, Defavery R, Bernardes JE, Duarte MH, Tone LG. Childhood B lineage acute lymphoblastic leukemia clonality study by the polymerase chain reaction. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; **19**: 516-522.
- 26 Bjorklund E, Mazur J, Soderhall S, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003; **17**: 138-148.
- 27 Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, van Wering ER, Porwit-MacDonald A, Faria T, et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 2001; **15**: 1185-1192.
- 28 Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A, et al. BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000; **14**: 816-825.
- 29 Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willems MJ, Fasching K, et al. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia* 2000; **14**: 1939-1943.
- 30 Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; **95**: 790-794.



- 31 Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, Seyfarth J, Svejgaard A, Clausen N, et al. Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood* 2002; **99**: 1253-1258.
- 32 Moppett J, Burke GA, Steward CG, Oakhill A, Goulden NJ. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol* 2003; **56**: 249-253.
- 33 Bruggemann M, Raff T, Flohr T, Gokbuget N, Nakao M, Droese J, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; **107**: 1116-1123.
- 34 Specchia G, Liso A, Pannunzio A, Albano F, Mestice A, Pastore D, et al. Molecular detection of minimal residual disease is associated with early relapse in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2004; **89**: 1271-1273.
- 35 Raff T, Gokbuget N, Luschen S, Reutzel R, Ritgen M, Irmer S, et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. *Blood* 2007; **109**: 910-915.
- 36 Fronkova E, Mejstrikova E, Avigad S, Chik KW, Castillo L, Manor S, et al. Minimal residual disease (MRD) analysis in the non-MRD-based ALL IC-BFM 2002 protocol for childhood ALL: is it possible to avoid MRD testing? *Leukemia* 2008; **22**: 989-997.
- 37-Willems MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grumayer ER, et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002; **99**: 4386-4393.
- 38 Sykes PJ, Snell LE, Brisco MJ, Neoh SH, Hughes E, Dolman G, et al. The use of monoclonal gene rearrangement for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Leukemia* 1997; **11**: 153-158.
- 39 Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Neoh SH, Snell LE, Dolman G, et al. Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001; **15**: 385-390.
- 40 Donovan JW, Ladetto M, Zou G, Neuberg D, Poor C, Bowers D, et al. Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; **95**: 2651-2658.
- 41 Owen RG, Goulden NJ, Oakhill A, Shiach C, Evans PA, Potter MN, et al. Comparison of fluorescent consensus IgH PCR and allele-specific oligonucleotide probing in the detection of minimal residual disease in childhood ALL. *Br J Haematol* 1997; **97**: 457-459.

**Table 1** Sequences of the primers used

<i>Segment</i>	<i>Sequence</i>
V3	5'-CTTCCTGCAGATGACGTCTCCACCGCAAGGGATG-3'
V2	5'-CTTCCTGCAGATGACTCCTACAACCTCCAAGGTTG-3'
V4	5'-CTTCCTGCAGATGACTCCTACACCTCCAGCGTTC-3'
V5	5' TTC CTGCAG ATG ACG TCT CCA ACT CAA AGGATG-3'
V8	5'-CTTCCTGCAGATGACTCCTACAACCTCCAGGGTTG-3'
V9	5'-GGNACTGCAGGAAAGGAATCTGGCATTCCG -3'
V10	5'-CTCTGCAG AAT CCG CAG CTC GAC GCA GCA -3'
V11	5'- CA CTGCAG GCT CAA GAT TGC TCA GGT GGG-3'
JGT1,2	5'-AAGTGTGTTCCACTGCCAAA-3'
JGT3	5'-AGTTACTATGAGC(T/C)TAGTCCC-3'
JGT4	5'-TGTAATGATAAGCTTTGTTCC-3'
FR3A	5'ACACGGC(C/T)(G/C)TGTATTACTGT-3'
LJH	5'-TGAGGAGACGGTGACC-3'
VLJH	5'-GTGACCAGGGT(A/G/C/T)CCTTGGCCCCAG-3'
Vd2	5'-CTTGCACCATCAGAGAGAGA-3'
Dd3	5'-AGGGAAATGGCACTTTTGCC-3'
VKI-5'	5'-GTAGGAGACAGAGTCACCATCACT-3'
VKII-5'	5'-TGGAGAGCCGGCCTCCATCTC-3'
VKIII-3'	5'-GGGACAGACTTCACTCTCAC-3'
Kde-3'	5'-CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC-3'
Intron-3'	5'-CGATTGAGTGGCTTTGGTGG-3'

**Table 2:** Mixes of primers used for the amplification of genes TCRG, incomplete TCRD, IgH and IgK.

<i>Gene</i>	<i>Designation</i>	<i>Primers</i>
TCRG	A	V2+V3+V4+V8+V9 (s)+JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)
	B	V5+V10+V11 (s)+JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)
Incomplete TCR D		Vd2 (s) + Dd3 (as)
IgH		FR3A (s) + LJH (as)
		FR3A (s) + VLJH (as)
IgK		VKI-5' + íntron-3' + Kde-3'
		VKII-5' + VKIII-3' + Kde-3'

**Table 3** Protocol for PCR assays for the *IgH*, *IgL*, *TCR gamma* and *TCR delta* rearrangements

	<i>TCRG A</i>	<i>Program</i>
dNTP	2.0 mM	Initial denaturation at 94°C for 5 minutes
Oligo mix	60 pmol	Annealing at 56°C for 2 minutes
Tth Taq DNA polymerase	0.2 U	Extension at 72°C for 2 minutes
MgCl <sub>2</sub>	1.5mMol	35 cycles: 94°C for 1 min., 55°C for 1 min., 72°C for 1 min. Final extension: 72°C for 10 minutes.
	<i>TCRG B</i>	<i>Program</i>
dNTP	2.0 mM	Initial denaturation at 94°C for 5 minutes
Oligo mix	45 pmol	Annealing at 55°C for 2 minutes
Tth Taq DNA polymerase	0.2U	Extension at 72°C for 2 minutes
MgCl <sub>2</sub>	1.0mMol	35 cycles: 94°C for 1 min., 55°C for 1 min., 72°C for 1 min. Final extension: 72°C for 10 minutes.
	<i>TCRD</i>	<i>Program</i>
dNTP	2.0 mM	Initial denaturation at 94°C for 5 minutes
Oligo mix	15 pmol	Annealing at 57°C for 2 minutes

Tth Taq DNA polymerase	0.2U	Extension at 72°C for 2 minutes
MgCl <sub>2</sub>	1.5mMol	35 cycles: 94°C for 1 min., 55°C for 1 min., 72°C for 1 min. Final extension: 72°C for 10 minutes.
<b><i>IgH</i></b>		<b><i>Program</i></b>
EachdNTP	2.0 mM	Initial denaturation at 94°C for 5 minutes
Oligo mix	30 pmol	Annealing at 55°C for 2 minutes
Tth Taq DNA polymerase	0.2U	Extension at 72°C for 2 minutes
MgCl <sub>2</sub>	1.5mMol	35 cycles: 94°C for 1 min., 55°C for 1 min., 72°C for 1 min. Final extension: 72°C for 10 minutes.
<b><i>IgK</i></b>		<b><i>Program</i></b>
Each dNTP	4.0 mM	Initial denaturation at 94°C for 4 minutes
Oligo Mix	30pMol	27 cycles: 94°C for 45 sec., 66°C for 1 min. (-0.5°C for each cycle), 72°C for 1 min.
Tth Taq DNA polymerase	0.2U	10 cycles: 94°C for 45 sec., 55°C for 1 min., 72°C for 1 min.
MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM	Final extension: 72°C for 10 minutes.

**Table 4** Clinical and biological variables of the patient group as a whole

Variable	Percentage
Age	
1-9 years	73.4%
(n:229)	
>9 years	26.6%
Diagnostic WBC	
<50000/mm <sup>3</sup>	69%
(n:229)	
>50000/mm <sup>3</sup>	31%
Diagnostic SNC	
SNC 3	4.1%
(n:220)	
SNC ½	95.9%
WBC on day 7	
>5000/mm <sup>3</sup>	92.4%
(n:225)	
>5000/mm <sup>3</sup>	7.6%

MO on day 14	M1/2	95.5%
(n:201)	M3	4.5%
MO on day 28	M1	97.8%
(n:224)	M2/M3	2.2%
Response	Good responder	87.7%
(n: 204)	Poor responder*	12.3%
Risk group	Low risk	52.8%
(n:229)	High risk	47.2%
Immunophenotype	Pre-B/common	81.2%
(n:229)	T	16.2%
	Pro-B	2.6%
<i>TEL/AML1</i>	Positive	25.4%
(n:201)	Negative	74.6%
MRD on day 7	Negative	28%
(n:50)	Positive	72%
MRD on day 14	Negative	73.8%
(n:210)	Positive	26.2%
MRD on day 28	Negative	86.8%
(n:220)	Positive	13.2%
MRD	Negative on D14	72%
	Positive on D14 and negative on D28	14.2%
	Positive on D28	13.7%
Event	RCC	81.3%
(n:229)	Relapse	13.1%
	Induction death/RCC	5.6%

\* Poor responder: patients who fulfilled one or more of the following criteria during the phase of induction of remission: WBC on day 7 >5.000/mm<sup>3</sup>, bone marrow M3 (>25% blasts) on D14 or bone marrow M2 or M3 (>5 and 25% blasts, respectively) on D28.

**Table 5** Association between the clinical and biological variables of the group of patients analyzed as a whole and the presence of MRD on days 7, 14 and 28 determined by the Fisher exact test

	MRD D7	MRD D14	MRD D28
Age	0.78	0.47	0.26
Diagnostic WBC	0.17	0.01	0.05
SNC	1.00	0.21	0.02
WBC on D7	1.00	0.001	0.002
MO on D14	0.54	<0.0001	<0.0001
MO on D28	NA	0.001	0.01
Response*	0.31	<0.0001	<0.0001
Immunophenotype **	1.00	0.04	0.31
Risk group	0.05	<0.0001	<0.0001
TEL/AML1	0.49	0.26	1.00
Relapse	0.17	0.001	<0.0001
Event	0.19	<0.0001	<0.0001

NA, not analyzed due to the small number of patients for the statistical tests.

\* Response: good responders *versus* poor responders

\*\* Immunophenotype: pre-B/common *versus* ALL-T and pro-B

**Table 6** Mean 5-year event-free survival (EFS) ( $\pm$ SD) according to the clinical and biological variables analyzed in the group of children as a whole

Variable		EFS 5a $\pm$ DP*	P*
Age (n:229)	1-9 years (n:168)	80.2 $\pm$ 3.5	0.01
	>9 years (n:61)	70.4 $\pm$ 6.1	
Diagnostic WBC (n:229)	<50000/mm <sup>3</sup> (n:158)	78 $\pm$ 3.7	0.75
	>50000/mm <sup>3</sup> (n:71)	77 $\pm$ 5.5	
Diagnostic SNC (n:219)	SNC ½ (n:211)	79.4 $\pm$ 3.1	< 0.0001
	SNC 3 (n:8)	40 $\pm$ 17.4	
WBC day 7 (n:225)	<5000/mm <sup>3</sup> (n:208)	80.3 $\pm$ 3.0	0.001
	>5000/mm <sup>3</sup> (n:17)	34.9 $\pm$ 17.4	
BM on day 14 (n:198)	M1/2 (n:189)	81.7 $\pm$ 3.1	<0.0001
	M3 (n:9)	18.8 $\pm$ 17.3	
BM on day 28 (n:224)	M1 (n:219)	79.4 $\pm$ 3.1	NA
	M2/M3 (n:5)	53.3 $\pm$ 24.8	
Response (n:203)	Good responder (n:178)	83.7 $\pm$ 3.1	<0.0001
	Poor responder† (n:25)	33.4 $\pm$ 13.1	
Risk group at diagnosis (n:229)	Low risk (n:121)	80 $\pm$ 4.2	0.13
	High risk (n:108)	75 $\pm$ 4.5	
Risk group day 28¶ (n:229)	Low risk (n:110)	84 $\pm$ 4.0	0.01
	High risk (n:119)	71 $\pm$ 4.6	
Immunophenotype (n:229)	Pre-B (n:186)	77.6 $\pm$ 3.4	0.78
	T (n:39)	77 $\pm$ 6.8	
	Pro-B (n:4)	NA	
MRD on day 7 (n:50)	Negative (14)	78.6 $\pm$ 11	0.13
	Positive (36)	55.6 $\pm$ 8.0	
MRD on day 14 (n:210)	Negative (n:155)	84.6 $\pm$ 3.2	<0.0001

	Positive (n:55)	57.3%±7.5	
MRD on day 28 (n:220)	Negative (n:191)	82.9%±3.0	<0.0001
	Positive (n:29)	27.8%±12.0	
MRD on days 14/28 (n:212)	Negative D14 (n:153)	85%±3.2	<0.0001
	Positive D14 e negativa D28 (n:32)	75.6%±8.1	
	Positive D28 (n:27)	27.8%±12.0	

NA, not analyzed due to the small number of patients for the statistical tests.

\* Kaplan-Meier method and logrank test.

† Poor responder: patients who fulfilled one or more of the following criteria during the phase of induction of remission: WBC on day 7 >5.000/mm<sup>3</sup>, bone marrow M3 (>25% blasts) on D14 or bone marrow M2 or M3 (>5 and 25% blasts, respectively) on D28.

¶ Patients reclassified on day 28 according to WBCTLI-99 criteria.

**Table 7** Mean five-year event-free survival (EFS) (±SD) according to MRD on days 7, 14 and 28 and according to risk group, immunophenotyping and presence of *TEL/AML1*

Variable	Percent	EFS 5a (±DP)	P
<b>High risk at day 28</b>			
MRD on day 7	Negative (n:3)	13%	NA
(n:23)	Positive (n:20)	87%	*
MRD on day 14	Negative (n:65)	67%	86.2%±4.4
(n:97)	Positive (n:32)	33%	50.2%±9.6
MRD on day 28	Negative (n:90)	83,7%	78.8%±4.6
(n:104)	Positive (n:24)	16,3%	42.4%±14.2
<b>Standard risk at diagnosis</b>			
MRD on day 7	Negative (n:11)	40.7%	72.7%±13.4
(n:27)	Positive (n:16)	59.3%	68.8%±11.6
MRD on day 14	Negative (n:90)	79.6%	83%±4.5
(n:113)	Positive (n:23)	20.4%	65.6%±11.7



MRD on day 28	Negative (n:104)	89.7%	86%±3.9	<0.0001
(n:111)	Positive (n:12)	10.3%	14.3%±13.2	
<b>B lineage CD10+</b>				
MRD on day 7	Negative (n:11)	27.5%	72.7%±13.4	0.40
(n:40)	Positive (n:29)	72.5%	58.6%±9.1	
MRD on day 14	Negative (n:131)	77.1%	82.8%±3.8	0.002
(n:170)	Positive (n:39)	22.9%	54.7%±9.1	
MRD on day 28	Negative (n:156)	88.1%	83.8%±3.3	<0.0001
(n:177)	Positive (n:21)	11.9%	21.9%±11.2	
<b>T-ALL</b>				
MRD on day 7	Negative (n:3)	33.3%	NA	*
(9)	Positive (n:6)	66.7%		
MRD on day 14	Negative (n:21)	60%	90.5%±6.4	0.04
(35)	Positive (n:14)	40%	54.5%±15.0	
MRD on day 28	Negative (n:31)	83.8%	NA	*
(n:37)	Positive (n:6)	16.2%		
<b>TEL/AML1</b>				
MRD on day 7	Negative (n:5)	35.7%	NA	*
(n:14)	Positive (n:9)	64.3%		
MRD on day 14	Negative (n:39)	79.6%	93%±5.2	0.02
(n:49)	Positive (n:10)	20.4%	64%±24.9	
MRD on day 28	Negative (n:43)	86%	88.8%±5.2	<0.0001
(n:50)	Positive (n:7)	14%	0.00%±0.0	

NA, not analyzed due to the small number of patients for the statistical tests.

Figure legends

**Figure 1** Example of homo/heteroduplex PCR for TCRG in the D0, D14 and D28 samples from a single patient. (L) molecular weight marker; (D0), diagnostic sample; (D14), sample obtained on day 14 of induction; (D28), sample obtained on day 28 of induction therapy; (C-), negative control (polyclonal DNA from bone marrow mononuclear cells without hematological disease). Note that, because of the similarity of the migration pattern and molecular weight of the sample, the patient is considered to be MRD positive on days 14 and 28 of induction for this molecular marker.

**Figure 2** Event-free survival (EFS) according to (A) risk group on day 28 of induction, (B) MRD on day 14 by PCR, (C) MRD on day 28 by PCR, (D) MRD on days 14 and 28 by PCR, and (E) MRD on days 14 and 28 by flow cytometry.

Figure 1.

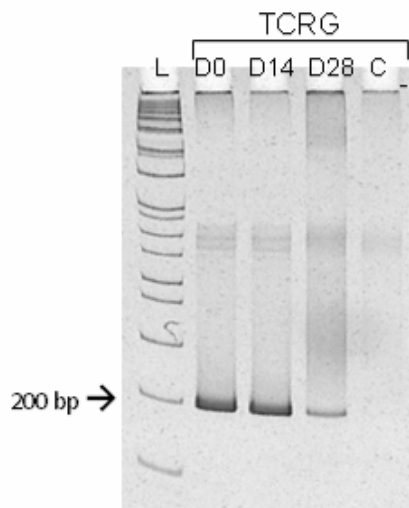
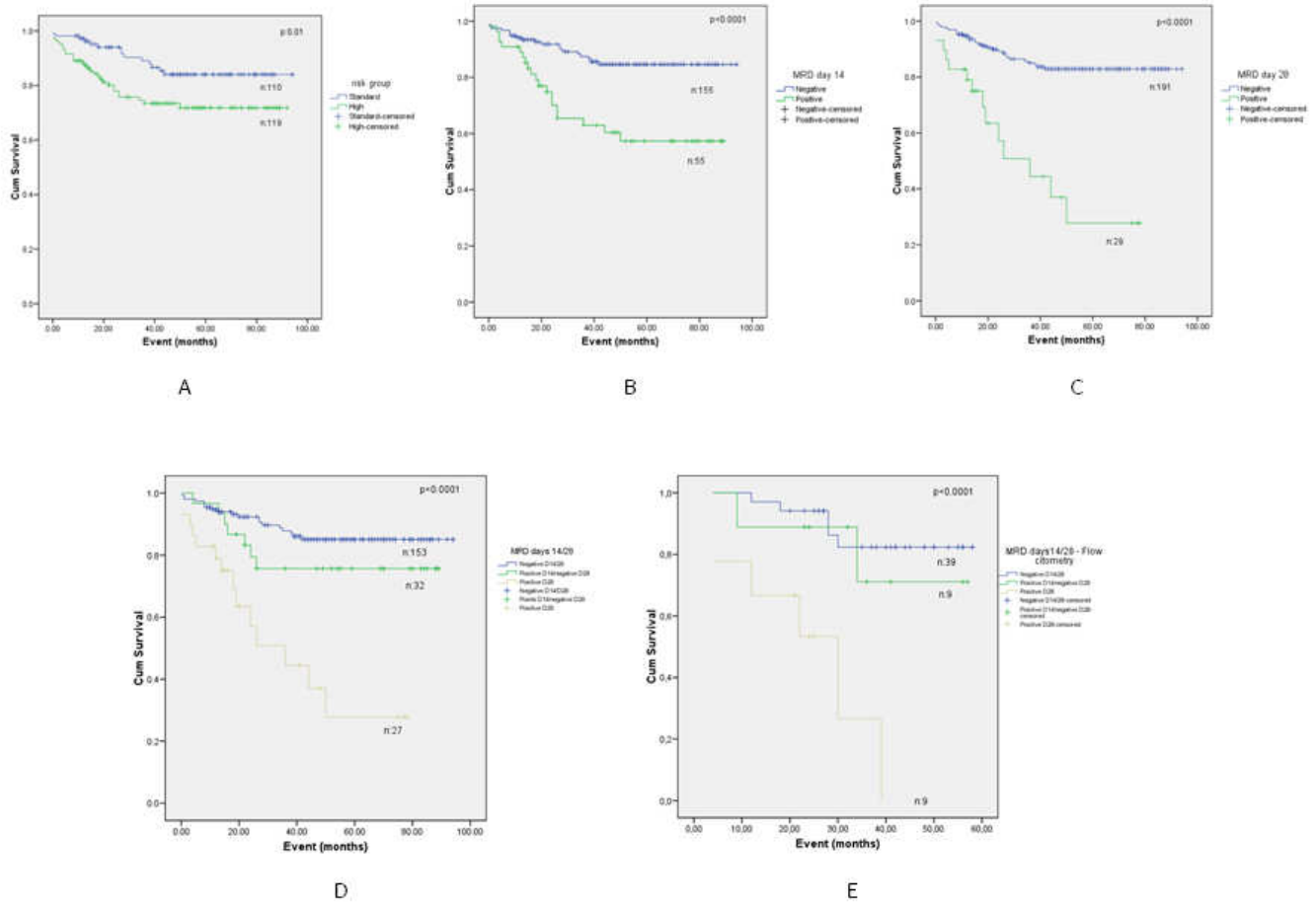


Figure 2



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)