

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA**

**ESTEFÂNIA RODRIGUES BIOJONE**

**“Detecção de doença residual mínima através de técnica de PCR em amostras de líquido cefalorraquidiano de crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda”**

**Ribeirão Preto**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ESTEFÂNIA RODRIGUES BIOJONE**

**“Detecção de doença residual mínima através de técnica de PCR em amostras de líquido cefalorraquidiano de crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda”**

Dissertação apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

**Ribeirão Preto**

**2009**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DICULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Catálogo na Publicação  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Biojone, Estefânia Rodrigues.

Detecção de doença residual mínima através de técnica de PCR em amostras de líquido cefalorraquidiano de crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda / Estefânia Rodrigues Biojone; orientador Carlos Alberto Scrideli. – Ribeirão Preto, 2009.

113f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós Graduação em Medicina. Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Leucemia linfóide aguda em crianças. 2. Infiltração leucêmica no sistema nervoso central. 3. Doença residual mínima

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Estefânia Rodrigues Biojone

“Detecção de doença residual mínima através de técnica de PCR em amostras de líquido cefalorraquidiano de crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre.  
Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Aprovado em: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

**Ao Carlos**, meu esposo, todo meu amor, carinho e eterna gratidão por ter sido o estímulo nos momentos de incertezas e minha fortaleza nos momentos de cansaço. Por ter se mostrado sempre presente, mesmo (e principalmente) quando a execução do projeto exigiu que estivéssemos em cidades distantes.

**Ao Tiago**, pequeno companheiro que participou tão ativamente da fase final desse trabalho. Que me acompanhou e me encantou desde seus primeiros movimentos em meu ventre, durante as madrugadas de estudo.

**Aos meus pais**, por terem me educado e priorizado o conhecimento como ferramenta indispensável para o crescimento do ser humano. Graças a eles, estudar sempre foi algo muito prazeroso.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Alberto Scrideli, pelo apoio incondicional em todas as fases de desenvolvimento desse trabalho, pelos ensinamentos técnicos transmitidos, pela convivência agradável, e por ter sempre acreditado e me estimulado não só neste como em outros projetos de minha vida profissional.

Ao Professor Doutor Luiz Gonzaga Tone, homem sábio que faz do serviço de Oncologia e Hematologia Pediátrica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto um centro de excelência no ensino, na pesquisa e na assistência. Por proporcionar uma formação profissional de oncologistas pediátricos fundamentada não só no conhecimento técnico-científico, mas em valores éticos, morais e humanos.

À Rosane e à equipe do laboratório de biologia molecular por todo o apoio técnico na fase de desenvolvimento do trabalho.

À Sandra, secretária do Departamento de Puericultura e Pediatria, pela dedicação e carinho com que realiza seu trabalho, e por muitas vezes nos oferecer suporte e apoio maiores do que a sua função exige.

Ao Departamento de Puericultura e Pediatria por ter proporcionado a realização não só do trabalho de mestrado, mas toda a formação como pediatra e onco-hematologista pediátrica.

E, acima de tudo e por tudo, a Deus.

## EPÍGRAFE

*“Faz apenas o que amas e serás feliz. Aquele que faz o que ama está benditamente condenado ao sucesso, que chegará quando for a hora.”*

**Facundo Cabral**



## RESUMO

**BIOJONE, E. R. Detecção de doença residual mínima através de técnica de PCR em amostras de líquido cefalorraquidiano de crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda.** 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

**INTRODUÇÃO:** A tendência atual no manejo das neoplasias da infância é identificação de fatores de risco e adequação do tratamento. Entre fatores de mau prognóstico na LLA, destaca-se a infiltração do SNC, definida pela presença de 5 ou mais leucócitos/mm<sup>3</sup> no líquido cefalorraquidiano (LCR), com presença de blastos. Outra característica cujo significado prognóstico tem sido discutido é a ocorrência de acidente de punção lombar (APL), definida pela presença de mais de 10 hemácias/mm<sup>3</sup>. A análise morfológica pode ser difícil quando há baixa celularidade e depende da experiência do examinador. Portanto, é de grande importância a realização de pesquisas para definir critérios objetivos de infiltração do SNC e estabelecer seu significado prognóstico. Este estudo teve por objetivo avaliar correlação entre positividade de Doença Residual Mínima (DRM) no LCR e APL com as variáveis clínicas, biológicas e taxas de sobrevida livre de evento (SLE) em crianças com LLA

**PACIENTES E MÉTODOS:** Foram avaliadas amostras de LCR de 76 pacientes entre 0 e 18 anos, com LLA tratados no HCRP-USP, nos quais havia DNA de boa qualidade disponível para a análise. A pesquisa de infiltração de SNC foi realizada por análise morfológica convencional e de DRM através de PCR utilizando-se “*primers*” de consenso para rearranjos de imunoglobulina e de receptor de célula T e análise homo/heteroduplex em gel de poliacrilamida. Foram considerados como positivos pacientes que apresentavam o mesmo padrão de migração de banda dos encontrados em amostras de medula óssea (MO) ao diagnóstico para os rearranjos estudados. Foram analisadas amostras de MO e LCR do momento do diagnóstico. Pacientes que apresentaram APL foram analisados separadamente. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a correlação entre variáveis clínicas e laboratoriais e a presença de DRM no LCR. Curvas de Kaplan Meier do teste log rank utilizadas para análise de SLE.

**RESULTADOS:** Dos 76 pacientes avaliados, 32 foram tratados pelo GBTLI-93 e 44 pelo GBTLI-99. Quarenta e três pacientes (56,5%) foram classificados de alto risco e 33 (43,4%) de baixo risco. Infiltração no SNC foi encontrada em 4 casos (5,2%). Em 12/44 (27,9%) pacientes tratados pelo GBTLI-99 houve APL. A DRM no LCR do diagnóstico foi positiva 31/64 (48,4%) pacientes que não apresentaram APL. A leucometria do diagnóstico e o grupo de risco apresentaram correlação positiva com presença de DRM no LCR ao diagnóstico (p:0.02 e p:0.04 respectivamente). Não houve diferença significativa na SLE dos pacientes com DRM + ao diagnóstico quando comparados com pacientes com DRM negativa no grupo total de pacientes (60% versus 73,3%, p:0.20). Entre os pacientes tratados pelo GBTLI 93, a DRM no LCR determinou redução nas taxas de SLE (35,3% versus 73,3%, p:0.03), porém não houve diferença na SLE entre os tratados pelo protocolo GBTLI-99 (73,3% para DRM+ versus 92,3% para DRM-, p:0.38). A SLE dos pacientes nos quais houve APL foi inferior à SLE dos demais pacientes (58,3% versus 82,8%, p:0.04).

**CONCLUSÃO:** A detecção de DRM do SNC é evento frequente em crianças com LLA e sua presença ao diagnóstico apresentou impacto negativo na evolução dos pacientes tratados pelo protocolo GBTLI-93. A intensificação do tratamento pelo protocolo GBTLI-99, parece ter sido capaz de anular o efeito prognóstico desta variável. A ocorrência de APL esteve associada a maior taxa de evento desfavorável em pacientes tratados pelo protocolo GBTLI-99. Análise de um número maior de casos é necessária para a confirmação destes achados.

Palavras chave: Leucemia linfóide aguda. Doença residual mínima.

## ABSTRACT

**BIOJONE, E. R.** 2009. **Minimal residual disease detection by polymerase chain reaction (PCR) in cerebro spinal fluid samples of children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia.** Dissertation (Master Degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

**INTRODUCTION:** The current tendency in the management of childhood cancer is the identification of risk factors and treatment adaptation. Among factors of poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia (ALL), is the CNS infiltration, defined by presence of pleocytosis of more than 5 cells per cubic millimeters in the cerebrospinal fluid (CSF), with blast cells or the presence of cranial nerve palsies. There has been controversy about the prognostic significance of traumatic lumbar puncture (TLP) defined as 10 or more erythrocytes per microliter CSF. Conventional cytological analysis can be difficult when the cell count is low and depends on the examiner experience. Therefore, it is of great importance to conduct research to establish objective criteria of CNS leukemia and establish its prognostic significance. This study aimed to evaluate the correlation between Minimum Residual Disease (MRD) in the CSF and TLP with clinical, biological and rates of event-free survival (EFS) in children with ALL

**PATIENTS AND METHODS:** We analyzed CSF samples from 76 children with ALL admitted to our institution (HCRP-USP), in which there was good quality DNA available for analysis. The CNS infiltration diagnosis was made by morphological analysis and MRD detection was made by polymerase chain reaction (PCR) with homo/heteroduplex analysis using consensus primers to IgH and T cell receptor (TCR) gamma genes. The CSF samples were considered positive for molecular involvement when they had a clonal rearrangement identical to that found at diagnosis in the bone marrow (BM). We analyzed samples of BM and CSF at the time of diagnosis. Patients with TLP were analyzed separately. Fisher's exact test was used to assess the correlation between clinical and laboratory variables and the presence of MRD in the CSF. The Kaplan Meier curves and a log rank test was used to estimate 5-year event-free survival (EFS). Kaplan Meier curves of the log rank test used for analysis of SLE.

**RESULTS:** Of the 76 patients, 32 were treated by GBTLI-93 and 44 by GBTLI-99. Forty-three patients (56.5%) were classified as high risk and 33 (43.4%) of low risk. CNS infiltration was found in 4 cases (5.2%). In 12/44 (27.9%) patients treated by GBTLI99 there was TLP. The MRD in CSF sample of diagnosis was positive in 31/64 (48.4%) patients who did not APL. The leukocyte count at diagnosis and high-risk group showed positive correlation with the presence of MRD in the CSF sample at diagnosis (p: 0.02 p: 0.04 respectively). There was no significant difference in EFS of patients with the diagnosis MRD + when compared with patients with MRD negative in the total group of patients (60% versus 73.3%, p: 0.20). Among patients treated by GBTLI 93, the MRD positive in CSF determined reduction in of SLE (35.3% versus 73.3%, p: 0.03), but there was no difference in SLE between patients treated by the protocol GBTLI-99 (73, 3% in MRD + group versus 92,3% MRD negative group). EFS of patients in which there was TLP was lower than EFS of the other patients (58.3% versus 82.8%, p: 0.04).

**CONCLUSION:** MRD detection in CSF is a common event in children with ALL and their presence at diagnosis had a negative impact in the evolution of patients treated by the protocol GBTLI-93. The treatment intensification by GBTLI-99 protocol, appears to have been able to eliminate the negative effect of this variable. The presence of TLP was associated with higher rates of adverse events in patients treated by the protocol GBTLI-99. Analysis of a greater number of cases is needed to confirm these findings.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia. Minimal residual disease.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para realização de pesquisa de doença residual mínima por PCR .....	40
<b>Tabela 2</b> – Misturas de <i>primers</i> utilizados para amplificação dos genes TCR $\gamma$ , TCR $\delta$ incompleto e IgH. ....	41
<b>Tabela 3</b> – Protocolo para as reações de PCR de MO para rearranjos ao diagnóstico e ciclos de amplificação. ....	42
<b>Tabela 4</b> – Protocolo para as reações de PCR de MO para rearranjos em D14 e D28 e ciclos de amplificação. ....	43
<b>Tabela 5</b> – Protocolo para as reações de PCR de LCR para rearranjos ao diagnóstico, D14 e D28 e ciclos de amplificação. ....	44
<b>Tabela 6</b> – Preparo de gel de poliacrilamida. ....	45
<b>Tabela 7</b> – Tamanho esperado para o produto de PCR de cada mistura de primer .....	45
<b>Tabela 8</b> – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LLA.....	52
<b>Tabela 9</b> – Características dos pacientes com SNC 3 ao diagnóstico. Em destaque os fatores relacionados a maior risco de infiltração do SNC.....	56
<b>Tabela 10</b> - Pacientes com APL: Hemácias/mm <sup>3</sup> e resultado de DRM no LCR.....	56
<b>Tabela 11</b> -Resultado do PCR por mistura de primer na amostra da MO do diagnóstico.....	58
<b>Tabela 12</b> – Correlação entre variáveis: Resultado do teste exato de Fisher.....	63
<b>Tabela 13</b> – Taxas de incidência de pacientes com infiltração do SNC ao diagnóstico .....	89

<b>Tabela 14 - SLE de pacientes com LLA no SNC e com APL .....</b>	<b>98</b>
--	-----------

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Foto de eletroforese de produto de PCR multiplex .....	46
<b>Figura 2</b> - Foto de produto de PCR homoduplex (IGH mistura D).....	46
<b>Figura 3</b> – Foto de produto de PCR homoduplex .....	47
<b>Figura 4</b> – Desenho do estudo .....	49
<b>Figura 5</b> – Distribuição em relação às variáveis estudadas .....	60
<b>Figura 6</b> – Doença Residual Mínima no LCR do D14 .....	61
<b>Figura 7</b> – Doença Residual Mínima no LCR do D28 .....	62
<b>Figura 8</b> – Sobrevida global livre de evento.....	64
<b>Figura 9</b> – SLE: pacientes tratados com o GBTLI 93 .....	65
<b>Figura 10</b> - SLE: GBTLI 93, Alto Risco X Baixo Risco .....	66
<b>Figura 11</b> – SLE: pacientes tratados com o GBTLI 99 .....	67
<b>Figura 12</b> - SLE: GBTLI 99, Alto Risco X Baixo Risco.....	68
<b>Figura 13</b> – SLE: DRM LCR D0 + X DRM LCR D0 -. Todos os pacientes .....	69
<b>Figura 14</b> – SLE: DRM LCR D0 + X DRM LCR D0-. Pacientes tratados pelo GBTLI 93 ..	70
<b>Figura 15</b> – SLE: DRM LCR D0 + X DRM LCR D0-. Pacientes tratados pelo GBTLI 99...	71
<b>Figura 16</b> – SLE: DRM LCR D14 + X DRM LCR D14-. Todos os pacientes.....	72
<b>Figura 17</b> – SLE: DRM LCR D28+ X DRM LCR D28-. Todos os pacientes. ....	73
<b>Figura 18</b> - SLE: DRM LCR D28+ X DRM LCR D28-. GBTLI 93.....	74
<b>Figura 19</b> - SLE: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28-. GBTLI 99.....	75
<b>Figura 20</b> - SLE: APL + X APL -. Pacientes tratados pelo GBTLI 99 .....	76
<b>Figura 21</b> - SLD: DRM LCR D0+ X DRM LCR D0-. Todos os pacientes.....	78
<b>Figura 22</b> - SLD: DRM LCR D0 + X DRM LCR D0 -. GBTLI 93.....	79
<b>Figura 23</b> - SLD: DRM LCR D0 + X DRM LCR D0 -. GBTLI 99.....	80

<b>Figura 24</b> - SLD: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28 -. Todos os pacientes.....	81
<b>Figura 25</b> - SLD: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28 -.GBTLI 93.....	82
<b>Figura 26</b> - SLD: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28 -.GBTLI 99.....	83
<b>Figura 27</b> - SLD: APL + X APL -. Pacientes tratados pelo GBTLI 99.....	84

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>APL –</b>	<b>Acidente de Punção Lombar</b>
<b>AR –</b>	<b>Alto Risco</b>
<b>D0 –</b>	<b>Dia de início do tratamento</b>
<b>D14 –</b>	<b>14º dia de tratamento</b>
<b>D28 –</b>	<b>28º dia de tratamento (corresponde ao fim da indução)</b>
<b>DRM –</b>	<b>Doença residual Mínima</b>
<b>GB-</b>	<b>Glóbulos Brancos</b>
<b>GBTLI-</b>	<b>Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemias na Infância</b>
<b>GBTLI 93 –</b>	<b>Protocolo brasileiro de tratamento de leucemia de 1993</b>
<b>GBTLI 99 –</b>	<b>Protocolo brasileiro de tratamento de leucemia de 1999</b>
<b>LCR –</b>	<b>Líquido cefalorraquidiano</b>
<b>LLA –</b>	<b>Leucemia Linfóide Aguda</b>
<b>MO –</b>	<b>Medula óssea</b>
<b>RB –</b>	<b>Risco Baixo</b>
<b>SLD –</b>	<b>Sobrevida Livre de Doença</b>
<b>SLE –</b>	<b>Sobrevida Livre de Evento</b>
<b>SNC –</b>	<b>Sistema Nervoso Central</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA .....	15
1.1.1 Diagnóstico .....	16
1.1.2 Tratamento .....	18
1.1.3 Fatores Prognósticos .....	19
1.1.4 Infiltração no Sistema Nervoso Central .....	21
1.2 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA .....	25
1.2.1 Técnicas de Detecção de DRM .....	26
1.3 JUSTIFICATIVA .....	27
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
3.1 CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO E DEFINIÇÕES.....	30
3.1.1 Diagnóstico .....	30
3.1.2 Estratificação de Risco.....	32
3.1.3 Tratamento .....	34
3.2 PACIENTES E MÉTODOS .....	36
3.2.1 Coleta de Medula Óssea .....	38
3.2.2 Extração de DNA e Armazenamento de Medula Óssea .....	38
3.2.3 Coleta de LCR .....	38
3.2.4 Estocagem e Preparo de LCR .....	39
3.3 ANÁLISE DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR PCR .....	40
3.4 ANÁLISE DE DADOS .....	47
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS (IDADE, SEXO, IMUNOFENÓTIPO E GRUPO DE RISCO).....	50
4.2 MORFOLOGIA DO LCR E ACIDENTE DE PUNÇÃO LOMBAR .....	56
4.3 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA NO LCR .....	57



4.4 CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVIES .....	62
4.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE EVENTO.....	63
4.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA.....	77
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
5.1 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES.....	85
5.2 MORFOLOGIA DO LCR E ACIDENTE DE PUNÇÃO LOMBAR .....	88
5.3 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA NO LCR .....	91
5.4 CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVIES .....	94
5.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE EVENTO.....	95
5.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA .....	98
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>111</b>
APÊNDICE A: FICHA CADASTRO/PESQUISA - LLA.....	111
APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	112

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é a neoplasia mais comum na faixa etária pediátrica, respondendo por 25% de todos os cânceres em pediatria e 75% de todos os casos de leucemia na infância. Pode ocorrer em qualquer período da infância e adolescência, mas o pico de incidência é entre 2 a 5 anos. (MARGOLIN *et al*, 2002; PUI *et al*, 2004; PUI *et al*, 2006).

A doença é caracterizada pela proliferação clonal de linfoblastos na medula óssea, que resulta em prejuízo da hematopoiese e em invasão do sangue periférico. É uma doença sistêmica e tem a capacidade de se disseminar para o sistema nervoso central, testículos, fígado, rins, linfonodos e baço. Manifesta-se clinicamente por sinais e sintomas decorrentes da pancitopenia e, caso exista, da infiltração extramedular. Febre, sangramentos, dor óssea, petéquias, equimoses, linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia são manifestações clínicas comumente observadas no momento do diagnóstico. (MARGOLIN *et al*, 2002)

A história da LLA em crianças é um verdadeiro exemplo de sucesso da medicina moderna. Atualmente, as taxas de cura, que na década de 60 eram quase nulas, são maiores que 80%. Isso se deve aos progressos nos métodos diagnósticos, no tratamento, na identificação de fatores prognósticos e no suporte hospitalar e domiciliar oferecido aos pacientes. (VILMER *et al*, 2000; PUI *et al*, 2001 e 2004)

### 1.1.1 Diagnóstico

Tradicionalmente o diagnóstico de LLA é definido a partir da análise morfológica de esfregaço de medula óssea. A presença de células blásticas de origem linfóide em contagem superior a 25% caracteriza o diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda.

Nas últimas décadas, novas técnicas laboratoriais evoluíram significativamente, contribuindo para um diagnóstico mais preciso e precoce, uma melhor compreensão do comportamento biológico da LLA e para o seguimento e monitoração da resposta terapêutica. Destacam-se as técnicas de citometria de fluxo, uso de biologia molecular e estudos de citogenética.

A transformação leucêmica e a expansão clonal de células progenitoras de linfócitos (linfoblastos) podem ocorrer em diferentes estágios de maturação da célula linfóide, e o comportamento clínico da leucemia varia de acordo com a célula de origem do clone (linfócito T ou B) e o grau de diferenciação dos blastos. A imunofenotipagem com anticorpos monoclonais para antígenos característicos de diferentes linhagens hematopoéticas e dos vários estágios de diferenciação dos linfócitos B é hoje ferramenta indispensável no momento do diagnóstico, permitindo estabelecer com precisão a origem da célula blástica e o seu grau de maturação. (UCKUN *et al*, 1997; BOROWITZ *et al*, 2005; COUSTAN-SMITH *et al*, 2006)

Mais de 95% dos pacientes com LLA apresentam, no momento do diagnóstico, algum rearranjo em gene de imunoglobulina ou receptor de célula T que pode ser detectado através de PCR. Estudos demonstram que 80 a 90% dos pacientes com LLA B apresentam rearranjos nos genes de imunoglobulinas de cadeia pesada (IGH) e que 60 a 80% deles têm rearranjos ou deleções de genes de receptores de células T (HARA *et al*, 1988; DYER *et al*, 1989; FELIX *et*

*al*, 1991; SZCZEPANSKI *et al*, 1998; SZCZEPANSKI *et al*, 1999; BRUMPT *et al*, 2000; GERMANO *et al*, 2003; VAN DER VELDEN *et al*, 2003; SCRIDELI *et al.*, 2004; MELESHKO *et al*, 2006)

Entre os pacientes com LLA T, mais de 90% têm rearranjos nos genes de receptores de células T (TCR) e apenas 15 a 20% apresentam rearranjos de imunoglobulina de cadeia pesada. (KITCHINGMAN *et al*, 1985; MOREAU *et al*, 1999; SZCZEPANSKI *et al*, 1999; SZCZEPANSKI *et al*, 2000; SZCZEPANSKI *et al*, 2001; PEHAM *et al*, 2002; SCRIDELI *et al.*, 2004).

Metodologias baseadas em reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção de rearranjos clonais de gene de imunoglobulina (Ig) e receptores de células T (TCR) são amplamente e facilmente aplicadas para a detecção de células leucêmicas. Este método de investigação laboratorial tem sido utilizado de forma crescente com o intuito de se rastrear a presença de células blásticas e tem uma sensibilidade de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ . (MELESHKO *et al* 2005 e 2006; SCRIDELI *et al*, 2002, 2004 e 2006)

O aperfeiçoamento da análise citogenética também contribuiu de forma considerável para o entendimento e o tratamento da LLA. Há um grande número de alterações cromossômicas descritas em pacientes com LLA, algumas das quais são associadas com características clínicas e laboratoriais específicas e podem ser utilizadas como marcadores diagnósticos e de prognóstico. Por exemplo, células blásticas que apresentam hiperdiploidia são mais sensíveis às ações de agentes quimioterápicos (metotrexato), o que pode indicar melhor prognóstico. As anormalidades citogenéticas são encontradas através de técnicas de bandagem cromossômica, FISH (standart fluorescent in situ hybridization), SKY (spectral karyotyping) e hibridização genômica comparativa (CGH). (MASTRANGELO *et al*, 1986; SMITH *et al*, 1996; PUI *et al*, 2001; MARGOLIN *et al*, 2002; PUI *et al*, 2004;; STANULLA *et al*, 2007)

### 1.1.2 Tratamento

Em relação ao tratamento quimioterápico, a partir da década de 1940, uma seqüência de descobertas marcantes contribuiu de forma decisiva para a melhor evolução e sobrevida dos pacientes (MARGOLIN *et al*, 2002; PUI *et al*, 2004; PUI *et al*, 2006):

- Década de 40: Descoberta da quimioterapia

- Décadas de 50 e 60: Uso de quimioterapia combinada

Instituição de quimioterapia de manutenção

- Década de 60 e 70: Profilaxia para doença no sistema nervoso central.

- Década de 90: Intensificação da quimioterapia.

Tratamento adaptado a grupos de risco.

Os regimes de tratamento atualmente utilizados são compostos por quatro importantes componentes: indução, consolidação, profilaxia da doença no sistema nervoso central e manutenção.

A fase de indução tem como objetivo atingir uma remissão inicial. É realizada através da utilização de uma combinação de quatro agentes anti-neoplásicos (vincristina, corticóide, antracíclico e L-asparaginase) e tem duração aproximada de 1 mês. Com este esquema, as taxas de remissão atingidas são de 95%.

A fase de consolidação visa à erradicação de células leucêmicas residuais em pacientes que atingiram remissão pelos critérios morfológicos. A profilaxia de doença no sistema nervoso central pode ser realizada através da administração de medicamentos quimioterápicos no espaço intra-tecal associada ou não ao uso de radioterapia. O período de manutenção é importante para a estabilização da remissão através da supressão de clones emergentes ou resistentes à quimioterapia. Baseia-se na utilização de mercaptopurina e metotrexato, podendo

ser complementada pela associação de outros agentes, como corticóides e vincristina. A duração total do tratamento varia entre os diferentes protocolos de 2 anos a 3 anos.

### **1.1.3 Fatores Prognósticos**

Nos protocolos modernos utilizados para tratamento de LLA, há uma tendência à adequação do tratamento de acordo com o risco de falha terapêutica. A identificação de fatores clínicos e laboratoriais preditores de prognóstico e a estratificação de pacientes em diferentes grupos de risco de acordo com estes fatores foram primordiais para a evolução favorável na abordagem da LLA.

Tradicionalmente, os sistemas utilizados para a classificação de risco de LLA na infância consideram parâmetros clínicos e laboratoriais como a idade do paciente, a contagem de glóbulos brancos no momento do diagnóstico, a presença de infiltração do SNC, características imunológicas, como imunofenótipo da leucemia, a velocidade de resposta ao tratamento de indução, e a ocorrência de alterações citogenéticas específicas (UCKUN *et al*, 1997; PUI *et al*, 2001; PUI *et al*, 2004).

A partir de 1983 o grupo de estudo alemão BFM (Berlin-Frankfurt-Munich) passou a incluir como fator prognóstico, a resposta ao uso de prednisona. Essa resposta é avaliada considerando-se a contagem de blastos leucêmicos em sangue periférico após 7 dias de monoterapia com prednisona associada à administração de uma dose de metotrexato intratecal no primeiro dia de tratamento. De acordo com esse critério, os pacientes podem ser classificados como bons ou maus respondedores, se apresentarem contagem de blastos inferiores a 1000/ $\mu$ l ou superiores a 1000/ $\mu$ l respectivamente. As taxas de sobrevida entre

bons e maus respondedores divergem significativamente (80% vs 30 a 40%). Desde 1986, o grupo BFM utiliza a resposta ao uso de prednisona para a estratificação de risco e após uma experiência de longo prazo, esse fator prognóstico permanece consistente como um forte preditor de evolução clínica. (REITER *et al*, 1994; SCHRAPPE *et al*, 2000; SCHRAPPE *et al*, 2000).

Estudos realizados em outros centros americanos e europeus confirmaram a importância da redução de blastos leucêmicos no sangue periférico na evolução clínica de pacientes com LLA (CHESSELLS *et al*, 1995; GAJJAR *et al*, 1995; STEINHERZ *et al*, 1996).

Apesar de uma má resposta ao tratamento inicial ser um fator altamente preditivo de falha terapêutica, a maioria das recidivas ocorre no grupo de pacientes com resposta morfológica adequada ao tratamento. Tal fato motivou a realização de estudos com a utilização de análises moleculares para avaliar o valor prognóstico de avaliação de resposta ao tratamento para LLA. Esses métodos são conhecidos como Doença Residual Mínima (DRM) e permitem a detecção de rearranjos gênicos de imunoglobulinas e receptores de células T que são específicos de clones leucêmicos, com o uso de PCR. Essa análise é aproximadamente 1000 a 10000 vezes mais sensível quando comparada aos métodos que se baseiam na detecção morfológica. Os resultados mostraram que a resposta ao tratamento medida através da detecção de DRM foi um fator preditor de evolução mais forte do que a resposta ao tratamento avaliada por morfologia. (CAVE *et al*, 1998; CIUDAD *et al*, 1998; FORONI *et al*, 1999; SZCZEPAN SKI *et al*, 2002; CAZZANIGA *et al*, 2005; STANULLA *et al* 2007; ZHOU *et al*, 2007; JÓLKOWSKA *et al*, 2007)

A detecção de antígenos específicos de clones leucêmicos através da citometria de fluxo é outra forma sensível e confiável para a análise de doença residual mínima, e os estudos que analisaram esse método encontraram resultados semelhantes àqueles descritos

quando se utilizavam técnicas baseadas em PCR. (COUSTAN-SMITH *et al*, 2000; DWORZAK *et al*, 2002; STANULLA *et al*, 2007)

A grande importância da classificação de risco nos pacientes com LLA está na adaptação do tratamento, permitindo uma abordagem mais agressiva para pacientes com pior prognóstico. Por outro lado, é possível proporcionar aos pacientes com fatores prognósticos favoráveis uma redução da intensidade do tratamento e, conseqüentemente, uma redução dos efeitos adversos do tratamento a curto e longo prazo.

#### **1.1.4 Infiltração no Sistema Nervoso Central**

A infiltração leucêmica do sistema nervoso central (SNC<sup>3</sup>), definida pela presença de cinco ou mais leucócitos por milímetro cúbico no LCR, com presença de células blásticas, é um fator bem estabelecido de mau prognóstico em pacientes com LLA (BLEYER *et al*, 1988; SMITH *et al*, 1996; SCHRAPPE *et al*, 2000; SILVERMAN *et al*, 2000; PUI *et al*, 2000; NACHMAN *et al*, 2002).

Antes do uso dos tratamentos direcionados à prevenção ou controle da doença no sistema nervoso central, as taxas de recidiva no SNC eram superiores a 75%. Atualmente, com a introdução das técnicas como a radiação intra-craniana e quimioterapia intra-tecal, mais de 80% dos pacientes são considerados curados e as taxas de recidiva no sistema nervoso central são de apenas 5%. Entretanto, mais de 60% dos pacientes nos quais ocorre recidiva da LLA com acometimento do SNC não apresentavam evidência clínica e morfológica de envolvimento de SNC no diagnóstico inicial (EVANS *et al*, 1970; ODOM *et al*, 1990; PUI *et*



*al*, 2000; BOSTROM *et al*, 2003; SCHRAPPE *et al*, 2000; SILVERMAN *et al*, 2000; NACHMAN *et al*, 2002).

Assim como ocorre para o tratamento quimioterápico sistêmico da LLA, há uma preocupação crescente em identificar fatores associados com risco aumentado de infiltração de leucemia no SNC e conseqüente adaptação do tratamento direcionado à profilaxia de envolvimento neurológico (quimioterapia intra-tecal e radioterapia) (MATLOUB *et al*, 2006). Já foi demonstrado que, nas leucemias de células T, a ocorrência de hiperleucocitose, alterações genéticas como presença de cromossomo Philadelphia e t(4;11) e a existência de células leucêmicas no LCR (mesmo quando originadas a partir de introdução iatrogênica devido punção lombar traumática), são fatores que oferecem risco aumentado de recidiva de LLA no SNC (PUI *et al*, 2003)

Vários aspectos relacionados ao diagnóstico de leucemia no SNC têm sido questionados nos últimos anos:

- Primeiro: a análise morfológica do LCR, método utilizado para o diagnóstico, pode ser de difícil interpretação quando há baixa celularidade e o resultado depende muitas vezes da experiência do examinador. (CHESSELS *et al*, 2001)
- Segundo: a presença de célula blástica em uma amostra de LCR com contagem de leucócitos inferior a 5 por microlitro (situação definida como SNC2), não é diagnóstica de leucemia no SNC. Todavia, em 1993 pesquisadores do St Jude Children's Research Hospital publicaram um estudo no qual se concluiu que pacientes com SNC2 (<5leucócitos/ $\mu$ l com blastos) apresentam um maior risco de recidiva e deveriam receber quimioterapia intra-tecal mais intensiva. No ano seguinte, pesquisadores do Children's Cancer Group encontraram taxas de recidiva (medular ou no SNC) semelhantes entre pacientes com SNC2 e pacientes com SNC1 (ausência de células blásticas no LCR); tais achados foram confirmados em estudo realizado em 85 centros da Alemanha, Áustria e Suíça. Sabe-se que o impacto de muitos fatores

prognósticos pode ser reduzido ou eliminado com a intensificação do tratamento. Essa disparidade entre os resultados pode se devida a diferenças na eficácia do tratamento direcionado à leucemia no SNC entre os grupos de estudo (MAHMOUD *et al*, 1993; GILCHRIST *et al*, 1994; LAUER *et al*, 1994; TUBERGEN *et al*, 1994; BURGER *et al*, 2003).

- Terceiro: define-se como Acidente de Punção Lombar ou Punção Lombar traumática, aquela na qual encontram-se 10 ou mais eritrócitos por microlitro de LCR. A maioria dos estudos com o objetivo de identificar fatores de risco para recidiva no SNC não avaliam os pacientes nos quais houve acidente de punção lombar no momento da coleta. Em 2000, Gajjar e colaboradores publicaram um artigo demonstrando que a ocorrência de punção lombar traumática, combinada com a detecção de blastos na amostra do LCR, afeta negativamente o prognóstico dos pacientes. Este achado estimulou novas pesquisas com o intuito de confirmar esta associação. Em 2003, Burger e colaboradores publicaram um estudo demonstrando que nos pacientes nos quais havia ocorrido acidente de punção lombar, a sobrevida livre de evento (SLE) foi inferior à SLE dos pacientes sem acidente de punção e superior à SLE encontrada entre os pacientes com envolvimento leucêmico do SNC. Os achados foram confirmados por estudos subsequentes. Assim como ocorre nos casos de SNC2, o risco aumentado de recidiva no SNC e a pobre sobrevida livre de doença associada com a ocorrência de acidente de punção lombar podem ser suplantados por um tratamento mais efetivo (BÜRGER *et al*, 2003; TE LOO *et al*, 2006; GAJJAR *et al*, 2000; RECH *et al*, 2005).

Diante dos aspectos acima citados, a detecção de células leucêmicas no LCR por técnicas precisas e sensíveis poderia proporcionar uma classificação mais detalhada e a identificação de um subgrupo de pacientes com maior risco de recidiva.

As técnicas de imunocitoquímica e citometria de fluxo são hoje amplamente utilizadas para a pesquisa de neoplasias linfo-hematopoiéticas. Entretanto estes métodos requerem

material fresco e um número adequado de células para o exame. Um estudo preliminar, com uma pequena casuística (35 pacientes), sugeriu que a detecção de células blásticas através da técnica PCR, em amostras de LCR que não apresentavam critérios morfológicos de infiltração, pode estar associada a um pior prognóstico (SCRIDELI *et al*, 2003).

## 1.2 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA

Remissão completa é tradicionalmente definida pela presença de menos que 5% de blastos no esfregaço de medula óssea e é alcançada em 95% dos pacientes após a terapia de indução. Apesar de a análise morfológica ser uma técnica de fácil aplicabilidade em qualquer centro de tratamento, ela não é uma técnica precisa, pois cerca de 20% dos pacientes com uma boa resposta inicial ao tratamento apresentam recidiva e 1/3 dos pacientes com pobre resposta evoluiu satisfatoriamente para cura apenas com tratamento quimioterápico intensivo.

Quando se baseia apenas na análise morfológica, pacientes com aproximadamente 5% de células blásticas na medula óssea (que podem possuir um pool de células neoplásicas de até  $10^{10}$ ) recebem o mesmo tratamento que aqueles que tiveram uma redução muito mais expressiva do clone leucêmico. Por outro lado, progenitores hematopoiéticos normais, que representam 5% ou mais das células da medula em recuperação, podem ser interpretadas de forma errônea como células leucêmicas residuais (CHESSELS *et al*, 2001).

Portanto, há uma tendência crescente de se associar novas técnicas de detecção de células neoplásicas e de utilização de novos critérios de remissão no seguimento dos pacientes, proporcionando uma melhor estratificação de risco, com aplicabilidade clínica (PUI *et al*, 2000; SCRIDELI *et al*, 2006).

A essa detecção de células neoplásicas através de técnicas mais sensíveis em pacientes em remissão morfológica completa, chama-se doença residual mínima. Diversos métodos de avaliação, caracterizados por uma sensibilidade de detecção de DRM aumentada, têm sido desenvolvidos recentemente. Essas técnicas têm uma capacidade de detecção de 1 célula neoplásica em  $10^4$  a  $10^6$  células normais, o que as torna 100 a 1000 vezes mais sensíveis que

as técnicas citomorfológicas atualmente utilizadas para definir remissão. (PUI *et al*, 2000; CAZZANIGA *et al*, 2005; SCRIDELI *et al*, 2006; STANULLA *et al*, 2007).

As técnicas de detecção de doença residual mínima permitem avaliação da eficácia do tratamento, bem como representam um importante fator prognóstico que auxilia na previsão da evolução clínica (CIUDAD *et al*, 1998; CAMPANA *et al*, 1999; MALEC *et al*, 2004).

### 1.2.1 Técnicas de Detecção de DRM

Uma vez que a DRM significa a presença de células leucêmicas, as técnicas utilizadas para a sua detecção devem basear-se em marcadores específicos que possam diferenciar as células neoplásicas das normais.

Há várias técnicas aplicáveis para a detecção de DRM que diferem entre si pela especificidade dos marcadores utilizados e pelos níveis de detecção. Algumas dessas técnicas são limitadas por sua baixa especificidade: análise morfológica, ensaios clonais, citogenética convencional. A citogenética convencional tem sido suplantada por outras técnicas como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ou RT-PCR (KAEDA *et al*. 2002).

Atualmente, os métodos modernos altamente sensíveis utilizados na detecção de DRM são reação de cadeia em polimerase quantitativa (RQ-PCR), reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa quantitativa (QRT-PCR) e citometria de fluxo (MUNOZ *et al*, 2000; SZCZEPANSKI, 2001; CAZZANIGA *et al*, 2005; STANULLA *et al*, 2007).

Na LLA os métodos utilizados para a detecção de doença residual mínima incluem a identificação de imunofenótipos aberrantes através de citometria de fluxo, PCR de fusão de transcritos e pontos de quebra de cromossomos, genes de receptores de antígenos, genes aberrantes. Estas técnicas são amplamente utilizadas na detecção de doença residual mínima

porque são sensíveis ( $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ), específicas e de aplicabilidade relativamente fácil. (CAMPANA *et al*, 2003; CAZZANIGA *et al* 2003; CAZZANIGA *et al*, 2005)

Em aproximadamente 95% dos casos de pacientes com LLA há a presença de rearranjo de genes de Imunoglobulina e de genes de receptores de células T (TCR). Portanto, pode-se aplicar técnica de detecção de DRM baseada em reação em cadeia de polimerase. Genes de imunoglobulinas e de receptores de células T são considerados “alvos” universais para a detecção de DRM em LLA na infância. Como resultado de rearranjos somáticos de genes de Ig e TcR, um marcador clonal único é formado a partir da junção dos segmentos de genes das regiões variáveis, de junção e diversidade. Assim, a exclusividade de cada rearranjo depende da inserção e deleção randômicas de nucleotídeos nos sítios de junção dos segmentos de genes de junção, variabilidade e diversidade, fazendo as regiões juncionais de genes de Ig e TcR as seqüências específicas do clone neoplásica, que servem como sua “impressão digital” (HARA *et al*, 1988; DYER *et al*, 1989; FELIX *et al*, 1991; SZCZEPANSKI *et al*, 1998; SZCZEPANSKI *et al*, 1999; BRUMPT *et al.*, 2000; CAZZANIGA *et al*, 2005; GERMANO *et al*, 2003; VAN DER VELDEN *et al*, 2003; SCRIDELI *et al.*, 2004 e 2006; CAZZANIGA *et al*, 2005; STANULLA *et al*, 2007; JÓLKOWSKA *et al*, 2007).

### **1.3 JUSTIFICATIVA**

Por se tratar de uma neoplasia com altos índices de cura, a tendência e desafio atual no manejo das Leucemias é a utilização de informações clínicas e laboratoriais com a finalidade de estabelecer estratificações de riscos e adaptação do tratamento a cada um destes grupos de riscos. O objetivo maior é intensificar o tratamento dos pacientes de alto risco visando incrementar as taxas de cura e ao mesmo tempo proporcionar aos pacientes de menor risco

uma terapêutica eficaz com a mínima toxicidade possível (ARICO *et al*, 2005) (PINKERTON *et al*, 2005) (MASTRANGELO *et al*, 1986) (PUI *et al*, 2005). A ocorrência de acidente de punção lombar no momento do diagnóstico tem sido questionada como fator de mau prognóstico, mas os resultados dos estudos que avaliam sua influência, são controversos. (GAJJAR *et al*, 2000; BÜRGER *et al*, 2003; ; TE LOO *et al*, 2006).

Diante deste quadro, e como a disseminação extra-medular afeta negativamente a evolução dos pacientes com LLA, faz-se de grande importância a realização de pesquisas com a finalidade de definir critérios objetivos de infiltração do sistema nervoso central, estabelecer seu real significado prognóstico, bem como, avaliar se a ocorrência de acidente de punção lombar aumenta as possibilidades de infiltração no SNC (definida por métodos mais sensíveis e objetivos) e, conseqüentemente, interfere na evolução dos pacientes

## 2. OBJETIVOS

1. Padronizar técnica de detecção de células leucêmicas no LCR através de PCR utilizando *primers* de consenso para IgH e receptor  $\gamma$  de células T em pacientes com LLA.
2. Estudar a correlação entre positividade de Doença Residual Mínima no LCR ao diagnóstico com as taxas de sobrevida livre de evento (SLE) e sobrevida livre de doença (SLD).
3. Avaliar a velocidade de clareamento do LCR após o tratamento quimioterápico sistêmico e intra-tecal, bem como avaliar a correlação entre essa velocidade e a sobrevida livre de evento e sobrevida livre de doença.
4. Identificar fatores de risco associados com a detecção de doença residual mínima no LCR.
5. Avaliar se a ocorrência de acidente de punção no momento da coleta do LCR influencia as taxas de recaída e sobrevida.
6. Comparar os resultados obtidos em grupos de pacientes submetidos a tratamentos distintos (GBTLI 93 e GBTLI 99)



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO E DEFINIÇÕES

##### 3.1.1 Diagnóstico de LLA

Realizado através de análise morfológica de medula óssea, sendo definido pela presença de 25% ou mais de linfoblastos. O diagnóstico é complementado pela imunofenotipagem com anticorpos monoclonais.

###### a) Infiltração do SNC

A leucemia em SNC é definida pela presença de 5 ou mais células por milímetro cúbico no LCR e a demonstração de linfoblastos através da câmara de sedimentação ou a presença de sinais clínicos sugestivos de infiltração, como paralisia de nervo craniano (BLEYER *et al*, 1998).

###### b) Acidente de Punção Lombar

Situação na qual ao exame morfológico do LCR por microscopia óptica, encontram-se 10 (dez) ou mais eritrócitos por mm<sup>3</sup> (GAJJAR *et al*, 2000; BÜRGEUR *et al*, 2003; RECH *et al*, 2005; TE Loo *et al*, 2006).

###### c) Aspecto da Medula Óssea

De acordo com a percentagem de células blásticas, a medula óssea pode ser classificada em:

- Medula M1: Menos que 5% de blastos, independente da proporção de células maduras.
- Medula M2: Entre 5 e 25% de blastos, independente da proporção de células maduras.
- Medula M3: Mais que 25% de blastos.

d) Estadiamento da Doença no Sistema Nervoso Central

De acordo com os achados morfológicos no LCR, a LLA pode ser estadiada em:

- SNC1: Ausência de blastos.
- SNC2: Cinco ou menos leucócitos/mm<sup>3</sup> e presença de blastos.
- SNC3: Mais que 5 leucócitos/mm<sup>3</sup> e presença de blastos.

e) Conceitos

Remissão Medular

Ocorre quando há menos que 5% de células blásticas (M1) no aspirado de medula óssea e as três linhagens hematopoéticas estão bem representadas.

Remissão Clínica Completa

Ocorre quando há remissão medular associada à ausência de sintomas relacionados à leucemia. O hemograma deverá conter  $\geq 500/\text{mm}^3$  de neutrófilos e  $\geq 75.000/\text{mm}^3$  de plaquetas.

Recaída Medular

Ocorre quando após ter sido alcançado uma remissão medular (M1), há aparecimento de blastos em quantidade superior a 5% na medula óssea (M2 ou M3).

Recaída no SNC

Ocorre quando se observa, em um paciente que havia entrado em remissão, presença de infiltração do SNC por células leucêmicas e/ou sinais e sintomas neurológicos decorrentes da leucemia.

### **3.1.2 Estratificação de Risco**

Os pacientes do estudo foram tratados segundo dois protocolos distintos e consecutivos propostos pelo Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância (GBTLI). Até setembro de 1999 foi adotado o protocolo GBTLI 93 e, a partir de outubro de 1999 até JUNHO DE 2007, foi utilizado o GBTLI 1999.

O protocolo GBTLI 93 preconiza a estratificação dos pacientes em três diferentes grupos de risco, de acordo com a idade, a leucometria do diagnóstico, a presença de massa mediastinal e organomegalia, o acometimento do SNC, o imunofenótipo e alterações citogenéticas:

#### Risco Básico Verdadeiro:

Idade > a 1 ano e < de 10 anos,

Leucometria inicial <10.000/mm<sup>3</sup>,

Hepatoesplenomegalia inferior a 5 cm do rebordo costal

Ausência de massa mediastinal

Ausência envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) pela doença.

#### Risco Básico

Idade > 1 ano e < que 10 anos

Contagem leucocitária inicial > a 10.000/mm<sup>3</sup> e <50.000/mm<sup>3</sup>,

Presença de massa mediastinal,

Fígado e/ou baço com aumento superior a 5 cm do rebordo costal.

Alto Risco

Idade < 1 ano ou > 10 anos e/ou

Contagem de leucócitos > a 50.000/mm<sup>3</sup> e/ou

Envolvimento do SNC.

Imunofenótipo T e/ou

Achados desfavoráveis na citogenética (hipodiploidia, pseudodiploidia, cromossomo Philadelphia)

O protocolo GBTLI 1999, estratifica os pacientes em dois diferentes grupos de acordo com a idade, a leucometria no momento do diagnóstico e com a resposta ao tratamento de indução.

Baixo risco:

Idade entre 1 e 9 anos

Contagem de glóbulos brancos < 50.000/mm<sup>3</sup> no diagnóstico.

Ausência de blastos no sangue periférico do D14 da indução e medula M1 ou M2.

Ausência de blastos no sangue periférico do D14 e medula M1 no D28.

Alto Risco:

Idade < 1 ou >9 anos

Contagem de glóbulos brancos > 50.000/mm<sup>3</sup>

Contagem de GB > 5.000/mm<sup>3</sup> no D7 da indução.

Presença de blastos leucêmicos no sangue periférico no D14 da indução.

Medula M3 no D14.

Medula M2 ou M3 no D28 da indução

Blastos positivos no LCR avaliado no D14, nos pacientes que tinham envolvimento do SNC no momento do diagnóstico.

Para análises comparativas de incidência e de taxas de sobrevida em nosso estudo, dividimos os pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 93 em apenas dois grupos: baixo risco (que incluiu pacientes de risco básico verdadeiro e risco básico) e alto risco.

### **3.1.3 Tratamento**

Os pacientes foram tratados com esquema de quimioterapia proposto pelos GBTLI 93 e GBTLI 99.

Todos os pacientes, independente do grupo de risco ou do protocolo de tratamento utilizado, receberam regime de indução com duração de 4 semanas (28 dias) que consiste na combinação de prednisona, vincristina, doxorrubicina e L-asparaginase e uso de metotrexato, aracytin e dexametasona intra-tecal (MADIT). O protocolo GBTLI 93 preconiza a administração de quimioterapia intra-tecal no primeiro (D0) e vigésimo oitavo dia (D28) de indução para os grupos de risco básico ou risco básico verdadeiro e no primeiro (D1), décimo quarto dia (D14) e vigésimo oitavo dia (D28) para o grupo de alto risco. Todos os pacientes tratados pelo GBTLI 99 (baixo risco e alto risco) receberam MADIT no D1, D14 e D28.

Os regimes de tratamento pós indução propostos pelos dois protocolos são:

GBTLI93-

Risco básico verdadeiro:

Consolidação (ciclofosfamida, aracytin e 6-mercaptopurina),

Intensificação (4 ciclos de metotrexato 2g/m<sup>2</sup>, 6MP e MADIT),

Re-indução (dexametasona, vincristina, L-asparaginase, 6MP e MADIT) e

Manutenção (6MP, metotrexato e MADIT).

Risco básico:

Consolidação (ciclofosfamida, aracityn e 6-mercaptopurina),

Intensificação (4 ciclos de metotrexato 2g/m<sup>2</sup>, 6MP e MADIT),

Re-indução (dexametasona, vincristina, L-asparaginase, 6MP e MADIT) e

Manutenção (6MP, metotrexato, vincristina, dexametasona e MADIT).

Alto risco:

Indução tardia (6 cursos de aracityn 750mg/m<sup>2</sup> e L-asparaginase),

Intensificação (4 ciclos de metotrexato 2g/m<sup>2</sup>, 6MP e MADIT),

Re-indução (dexametasona, vincristina, L-asparaginase, ciclofosfamida, aracityn, 6MP e MADIT) e

Manutenção (6MP, metotrexato, L-asparaginase, aracityn, vincristina, dexametasona, MADIT),

Radioterapia cranio-espinhal.

GBTLI 99-

Risco básico:

Consolidação (ciclofosfamida, aracityn e 6-mercaptopurina),

Intensificação (4 ciclos de metotrexato 2g/m<sup>2</sup>, 6MP e MADIT),

Consolidação tardia (dexametasona, vincristina, doxorubicina, L-asparaginase, ciclofosfamida, 6 tioguanina e MADIT) e

Manutenção (6MP, metotrexato, vincristina, dexametasona e MADIT).

Alto risco:

Bloco A (metotrexato 2g/m<sup>2</sup>, 6 tioguanina, duas doses de aracytyn 2g/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida),

Bloco B (metotrexato 2g/m<sup>2</sup>, 6 mercaptopurina, 4 doses de aracytyn 1g/m<sup>2</sup> e MADIT),

Intensificação (dexametasona, vincristina, daunorrubicina, ciclofosfamida, aracytyn, 6-tioguanina e MADIT),

Bloco C (metotrexato 2g/m<sup>2</sup>, 6-mercaptopurina, duas doses de aracytyn 2g/m<sup>2</sup>, vepeside e MADIT),

Bloco D (ifosfamida, vepeside e MADIT),

Consolidação tardia (dexametasona, vincristina, daunorrubicina, L-asparaginase, ciclofosfamida, aracytyn, 6-tioguanida e MADIT), e

Manutenção (6-mercaptopurina, metotrexato, vincristina, dexametasona e MADIT).

As principais diferenças entre os dois protocolos distintos são a intensidade da quimioterapia (maior no GBTLI 99) e a profilaxia de doença no SNC, que no GBTLI 93 é feita com a combinação de radioterapia e quimioterapia intra-tecal e no GBTLI 99 é baseada apenas na quimioterapia intra-tecal.

### **3.2 PACIENTES E MÉTODOS**

Foram incluídos no estudo todos os pacientes (n=124) na faixa etária de 0 a 18 anos, com Leucemia Linfóide Aguda diagnosticada e tratada no Hospital das Clínicas de Ribeirão

Preto no período de junho de 1995 a junho de 2007. A data de início de inclusão dos pacientes coincide com o período em que foi regulamentado e instituído um banco de guarda de material biológico de pacientes com neoplasias.

Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais foram obtidos retrospectivamente através de revisão dos prontuários médicos. A coleta de dados foi padronizada através da utilização de um formulário previamente elaborado (APÊNDICE A).

O material estudado foi obtido a partir de um banco de material biológico previamente existente e cujo funcionamento foi autorizado e regulamentado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (Processos 9375/2003, 9374, 9373/2003). Há amostras estocadas desde 1996. Os responsáveis pelos pacientes assinaram termo de consentimento autorizando o armazenamento do material (medula ou LCR) no momento da coleta. Antes da realização do presente estudo, foi solicitada nova autorização dos familiares, através de termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B), para que as amostras de LCR e de medula pudessem ser utilizadas.

Foram excluídos do estudo:

- Pacientes com LLA L3: 4 (esse tipo de leucemia tem um comportamento biológico distinto e os pacientes são tratados com esquemas quimioterápicos diferentes).
- Pacientes dos quais não havia amostra de LCR do diagnóstico disponível: 13
- Pacientes em cujas amostras de LCR não foi possível obter DNA: 10
- Pacientes em que a pesquisa de rearranjo de IgH ou TCR na amostra de medula óssea do diagnóstico foi negativa (ou seja, todos os *primers* pesquisados foram negativos): 1.



### **3.2.1 Coleta de Medula Óssea**

As amostras de medula óssea são colhidas através de punção aspirativa de medula óssea. Tais punções são realizadas na crista ílíaca anterior ou posterior.

Nos pacientes que foram tratados segundo o protocolo GBTLI 93, são colhidas amostras no momento do diagnóstico (D0) e no 28º dia de tratamento (D28) de LLA. Naqueles submetidos ao tratamento proposto pelo GBTLI 99, as amostras são colhidas no diagnóstico (D0), no 14º dia (D14) e no 28º dia (D28) de tratamento.

### **3.2.2 Extração de DNA e Armazenamento de Medula Óssea**

As células mononucleadas das amostras de medula óssea foram separadas através de Ficoll. O DNA destas amostras foi extraído com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) e ressuspensão em tampão TE 1X. Cada amostra de DNA foi quantificada em espectrofotômetro (Biophotometer – Eppendorf ou equivalente). As amostras de DNA das células colhidas ao diagnóstico foram diluídas para uma concentração final de 50ng/μl.

### **3.2.3 Coleta de LCR**

Foram analisadas amostras de LCR de todos os pacientes.

O material é colhido através de punção lombar realizada com o intuito de administração de QT intra-tecal. Nenhum paciente foi submetido à realização de punção lombar que não fosse para fins diagnósticos e terapêuticos previstos pelo protocolo de tratamento.

Nos pacientes incluídos no protocolo de tratamento GBTLI 93 foram colhidas amostras de LCR (e realização de quimioterapia intra-tecal) no diagnóstico (D0) e no 28º dia de tratamento (D28). Amostras do 14º dia de tratamento (D14) foram colhidas apenas no grupo de alto risco. Amostras de LCR dos pacientes tratados pelo GBTLI 93 provenientes de coletas com acidente de punção lombar foram descartadas (rotina do laboratório).

O protocolo GBTLI 99 preconiza a administração de quimioterapia intra-tecal no D0, D14 e D28 independente do grupo de risco. Nesse grupo de pacientes, foram colhidas amostras do D0, D14 e D28, de todos os pacientes e mesmo as amostras obtidas de coletas com APL foram estocadas.

### **3.2.4 Estocagem e Preparo de LCR**

O LCR fresco foi congelado a uma temperatura de -80°C.

Para a extração de DNA as amostras foram descongeladas e centrifugadas por 30 minutos em rotação máxima (3.200). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 30µl de H<sub>2</sub>O pura. A mistura foi posteriormente desnaturada por 5 minutos a uma temperatura de 94°C.

A integridade do DNA extraído foi testada através de reação em cadeia de polimerase utilizando o gene GAPDH como gene de controle.

### 3.3 ANÁLISE DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA POR PCR

O DNA de cada paciente (medula óssea e LCR) foi submetido à amplificação por PCR com *primers* consenso que flanqueiam a região CDR-3 do gene IgH (FR3A, LJH, VLJH), TCRG (famílias V $\gamma$ I-IV e J $\gamma$ 1-3) e TCRD incompleto (V $\delta$ 2, D $\delta$ 3) (TRAINOR *et al.*, 1991, STEWARD *et al.*, 1994).

As seqüências dos *primers* utilizados são mostradas na tabela 1.

**Tabela 1:** Sequências dos *primers* utilizados

<i>Segmento</i>	<i>Seqüência</i>
V2	5'-CTTCCTGCAGATGACTCCTACAACCTCCAAGGTTG-3'
V3	5'-CTTCCTGCAGATGACGTCTCCACCGCAAGGGATG-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'-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)CCTTGCCCCAG-3'
Vd2	5'-CTTGCACCATCAGAGAGAGA-3'
Dd3	5'-AGGGAAATGGCACTTTTGCC-3'

Para o gene *TCRG* foi aplicada uma reação de PCR multiplex com vários *primers* de segmentos V e J simultaneamente (misturas A e B, tabela 2). Para o gene *TCR $\delta$*  incompleto e IgH não houve o uso de multiplex e a combinação dos *primers* utilizados também se encontra

na tabela 2. Em cada reação de PCR foram usados dois controles negativos: um sem DNA e outro contendo DNA policlonal obtido de células mononucleadas.

**Tabela 2:** Misturas de *primers* utilizados para amplificação dos genes TCRG, TCR D incompleto e IgH.

<i>Gene</i>	<i>Designação</i>	<i>Primers</i>
TCR G	A	V2+V3+V4+V8+V9 (s)+JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)
	B	V5+V10+V11 (s)+JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)
TCR D incompleto	C	Vd2 (s) + Dd3 (as)
IgH	D	FR3A (s) + LJH (as)
	E	FR3A (s) + VLJH (as)

As reações de PCR foram realizadas no termociclador da marca Applied Biosystems, modelo 9700 gene amp.

Os ciclos de amplificação diferiram entre os rearranjos e encontram-se descritos para cada rearranjo nas tabelas 3, 4 e 5. Para os rearranjos TCR $\gamma$ , TCR $\delta$ , IgH de amostras de MO ao diagnóstico e das amostras de LCR do diagnóstico, D14 e D28 foi utilizada a enzima Platinun Taq®. Para amostras de medula óssea do D14 e D28 a enzima Tth DNA polimerase foi utilizada para todos os rearranjos pois demonstrou ser mais sensível.

Para as amostras de LCR, foram utilizados 2 $\mu$ l do concentrado com DNA e 40 ciclos de amplificação.

**Tabela 3:** Protocolo para as reações de PCR em amostra medula óssea para rearranjos ao diagnóstico e ciclos de amplificação.

<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>TCR G Mistura A</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos Pareamento a 56°C por 2 minutos Extensão a 72°C por 2 minutos 35 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min. Extensão final: 72°C por 10 minutos.
DNA	50 ng	
H <sub>2</sub> O milli Q	15,55 µl	
Tampão 10X	2,5 µl	
Cada dNTP	2,0 mM	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
Mistura Oligos	60 pmol	
Platinun Taq polimerase	0,2 U	
<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>TCR G Mistura B</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos Pareamento a 55°C por 2 minutos Extensão a 72°C por 2 minutos 35 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min. Extensão final: 72°C por 10 minutos.
DNA	50 ng	
H <sub>2</sub> O milli Q	16,8 µl	
Tampão 10X	2,5 µl	
Cada dNTP	2,0 mM	
MgCl <sub>2</sub>	1,0 mM	
Mistura Oligos	45 pmol	
Platinun Taq polimerase	0,2U	
<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>TCR D Mistura C</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos Pareamento a 57°C por 2 minutos Extensão a 72°C por 2 minutos 35 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min. Extensão final: 72°C por 10 minutos.
DNA	50 ng	
H <sub>2</sub> O milli Q	18,55 µl	
Tampão 10X	2,5 µl	
Cada dNTP	2,0 mM	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
Mistura Oligos	15 pmol	
Platinun Taq polimerase	0,2U	
<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>IgH Misturas D e E</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos Pareamento a 55°C por 2 minutos Extensão a 72°C por 2 minutos 35 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min. Extensão final: 72°C por 10 minutos.
DNA	50 ng	
H <sub>2</sub> O milli Q	17,55 µl	
Tampão 10X	2,5 µl	
Cada dNTP	2,0 mM	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
Mistura Oligos	30 pmol	
Platinun Taq polimerase	0,2U	

**Tabela 4:** Protocolo para as reações de PCR em amostra medula óssea para rearranjos em D14 e D28 e ciclos de amplificação.

<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>TCR G Mistura A</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos
DNA	100 ng	Pareamento a 56°C por 2 minutos
H <sub>2</sub> O milli Q	16,3 µl	Extensão a 72°C por 2 minutos
Tampão 10X com MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	35 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.
Cada dNTP	2,0 mM	Extensão final: 72°C por 10 minutos.
Mistura Oligos	60 pmol	
Tth Taq DNA polimerase	0,2 U	

<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>TCR G Mistura B</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos
DNA	100 ng	Pareamento a 55°C por 2 minutos
H <sub>2</sub> O milli Q	17,3 µl	Extensão a 72°C por 2 minutos
Tampão 10X com MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	35 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.
Cada dNTP	2,0 mM	Extensão final: 72°C por 10 minutos.
Mistura Oligos	45 pmol	
Tth Taq DNA polimerase	0,2U	

<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>TCR D Mistura C</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos
DNA	100 ng	Pareamento a 57°C por 2 minutos
H <sub>2</sub> O milli Q	19,3 µl	Extensão a 72°C por 2 minutos
Tampão 10X com MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	35 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.
Cada dNTP	2,0 mM	Extensão final: 72°C por 10 minutos.
Mistura Oligos	15 pmol	
Tth Taq DNA polimerase	0,2U	

<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>IgH Misturas D e E</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos
DNA	100 ng	Pareamento a 55°C por 2 minutos
H <sub>2</sub> O milli Q	18,3 µl	Extensão a 72°C por 2 minutos
Tampão 10X com MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	35 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.
Cada dNTP	2,0 mM	Extensão final: 72°C por 10 minutos.
Mistura Oligos	30 pmol	
Tth Taq DNA polimerase	0,2U	

**Tabela 5:** Protocolo para as reações de PCR em amostra de líquido cefalorraquidiano para rearranjos ao diagnóstico, D14 e D28 e ciclos de amplificação.

<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>TCR G Mistura A</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos
DNA	2µl	Pareamento a 56°C por 2 minutos
H <sub>2</sub> O milli Q	15,55 µl	Extensão a 72°C por 2 minutos
Tampão 10X	2,5 µl	40 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.
Cada dNTP	2,0 mM	Extensão final: 72°C por 10 minutos.
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
Mistura Oligos	60 pmol	
Platinun Taq polimerase	0,2 U	

<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>TCR G Mistura B</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos
DNA	2µl	Pareamento a 55°C por 2 minutos
H <sub>2</sub> O milli Q	16,8 µl	Extensão a 72°C por 2 minutos
Tampão 10X	2,5 µl	40 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.
Cada dNTP	2,0 mM	Extensão final: 72°C por 10 minutos.
MgCl <sub>2</sub>	1,0 mM	
Mistura Oligos	45 pmol	
Platinun Taq polimerase	0,2U	

<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>TCR D Mistura C</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos
DNA	2µl	Pareamento a 57°C por 2 minutos
H <sub>2</sub> O milli Q	18,55 µl	Extensão a 72°C por 2 minutos
Tampão 10X	2,5 µl	40 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.
Cada dNTP	2,0 mM	Extensão final: 72°C por 10 minutos.
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
Mistura Oligos	15 pmol	
Platinun Taq polimerase	0,2U	

<b>Reação (volume final = 25 µl)</b>	<b>IgH Misturas D e E</b>	<b>Programa</b>
	1X	Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos
DNA	2µl	Pareamento a 55°C por 2 minutos
H <sub>2</sub> O milli Q	17,55 µl	Extensão a 72°C por 2 minutos
Tampão 10X	2,5 µl	40 ciclos: 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min.
Cada dNTP	2,0 mM	Extensão final: 72°C por 10 minutos.
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
Mistura Oligos	30 pmol	
Platinun Taq polimerase	0,2U	

Para análise de homo-heteroduplex o produto de PCR das amostras foi desnaturado a 95°C por 5 minutos e renaturado a 4 °C por uma hora. A seguir, o produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (vide tabela 6) não denaturante para verificação de bandas de DNA homoduplex predominantes, características da existência de um rearranjo clone-específico. Um marcador de peso molecular foi usado para comparação das amostras (LANGERAK *et al.*, 1997).

**Tabela 6.** Preparo de gel de poliacrilamida.

	Volume
H2O	14,4ml
Poliacrilamida 10%	10ml
TBE 10x	3,0ml
Glicerina	2,1ml
Persulfato de Amônia 10%	455µl
Tetrametiletilenediamine	22,5µl

O gel de poliacrilamida foi corado em solução com brometo de etídeo (200ml de H<sub>2</sub>O + 40µl de Brometo de Etídio a 10mg/ml) por 40 minutos.

Posteriormente o gel foi fotografado para análise e comparação das amostras.

As amostras do diagnóstico foram consideradas positivas quando apresentaram bandas com o tamanho do produto de PCR esperado para o mistura estudado (tabela 7).

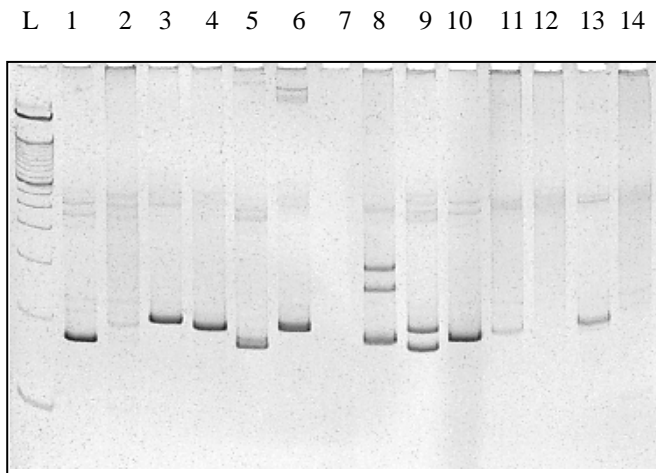
**Tabela 7.** Tamanho esperado para o produto de PCR de cada mistura de *primer*

<i>Gene</i>	<i>Designação</i>	<i>Primers</i>	<i>Tamanho (pb)</i>
TCR $\gamma$	A	V2+V3+V4+V8+V9(s)+JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	170 a 210
	B	V5+V10+V11 (s)+JGT1,2+JGT3+JGT4 (as)	
TCR $\delta$ incompleto	C	Vd2 (s) + Dd3 (as)	80 a 100
IgH	D	FR3A (s) + LJH (as)	80 a 120
	E	FR3A (s) + VLJH (as)	

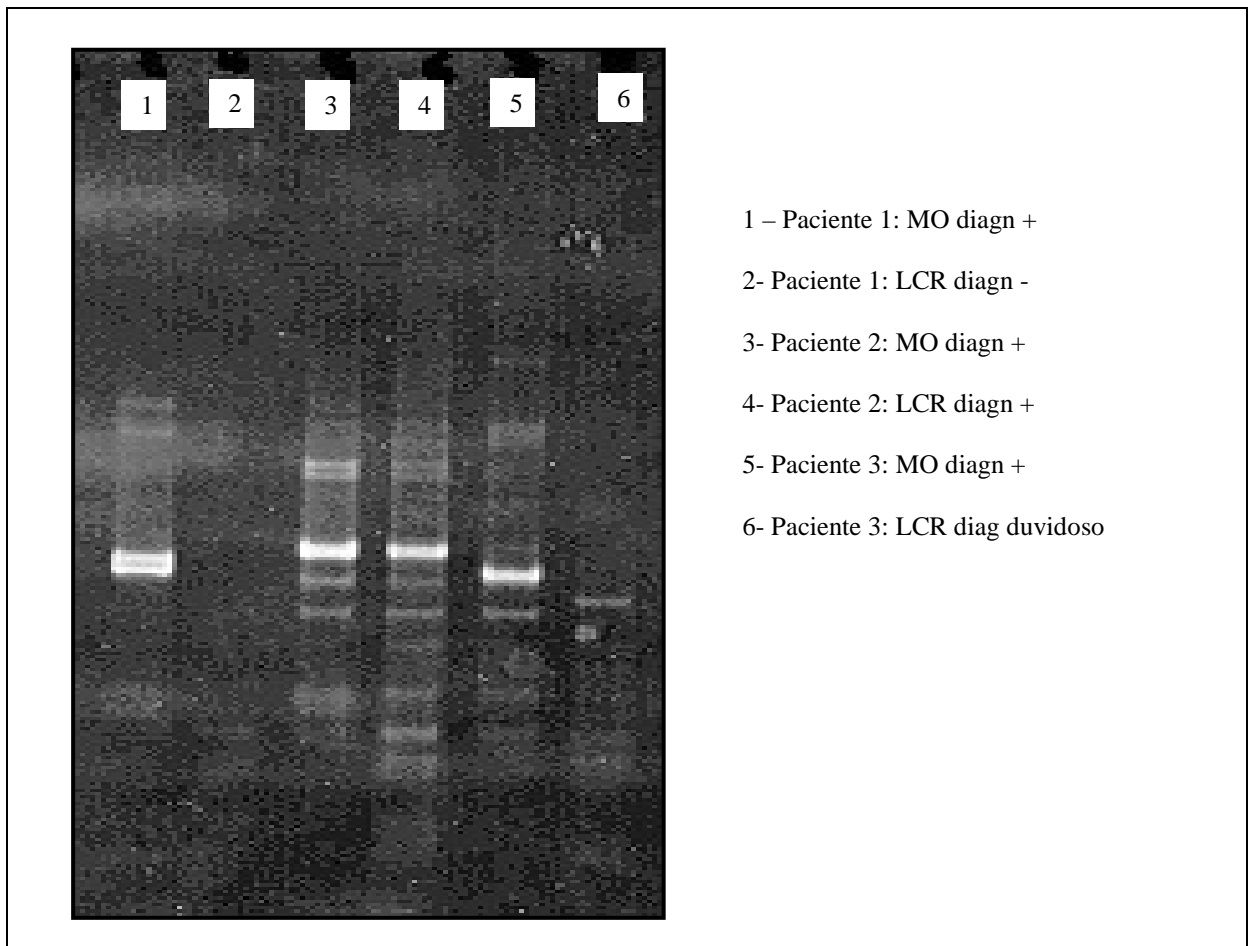
As amostras de medula óssea dos dias 14 e 28 de indução e as amostras de LCR dos dias 1, 14 e 28 de indução foram consideradas positivas quando mostravam o mesmo padrão de migração e bandas com tamanhos iguais às das amostras obtidas ao diagnóstico e amplificadas na mesma reação. (Figuras 1, 2 e 3).

Quando as amostras do LCR do D0, D14 ou do D28 apresentaram bandas com padrão de migração diferente daquele observado nas amostras de medula óssea do diagnóstico, o resultado foi considerado duvidoso e as amostras foram submetidas a sequenciamento pra confirmação ou exclusão de positividade.



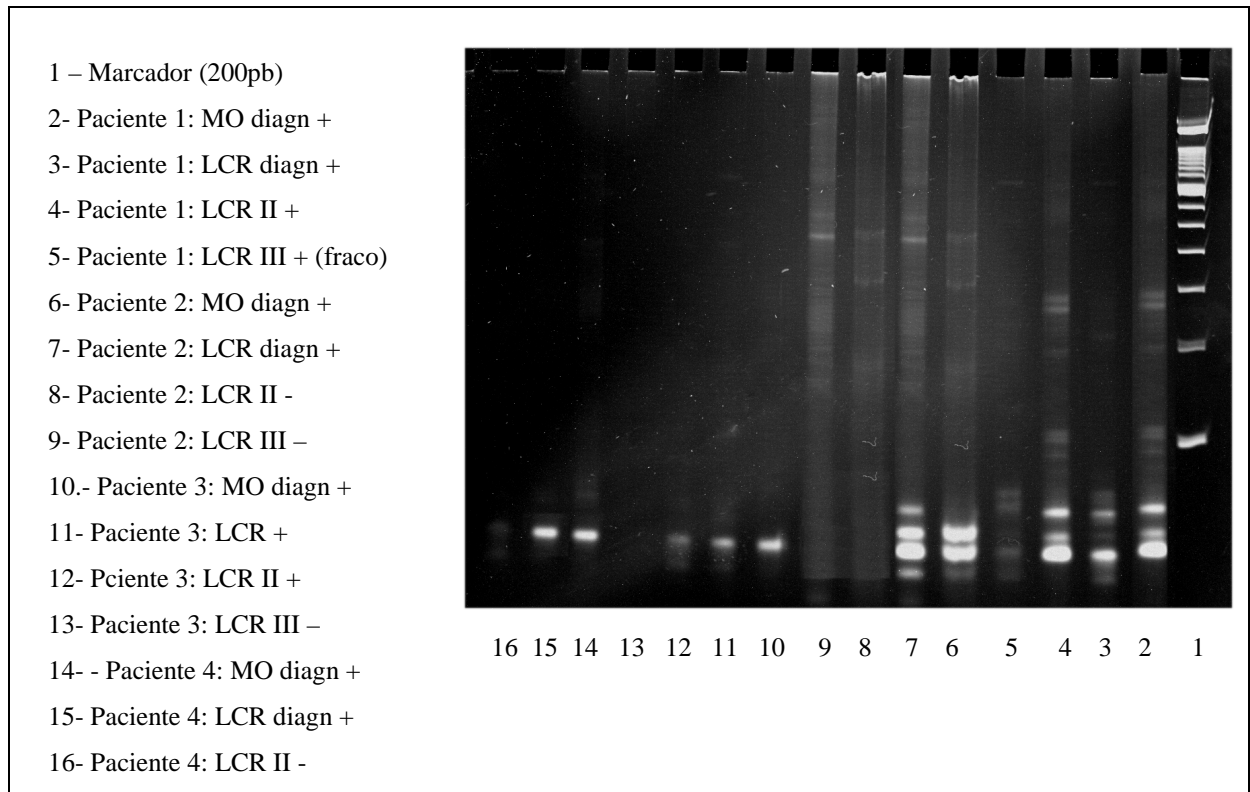


**Figura 1.** Foto de eletroforese de produto de PCR multiplex (TCR $\gamma$  multiplex mistura A) submetido previamente a denaturação/renaturação. L:1kb DNA ladder plus (Invitrogen); 1-13: amostras D0 de diferentes pacientes; 14: mistura de DNA de doadores normais.



- 1 – Paciente 1: MO diagn +
- 2- Paciente 1: LCR diagn -
- 3- Paciente 2: MO diagn +
- 4- Paciente 2: LCR diagn +
- 5- Paciente 3: MO diagn +
- 6- Paciente 3: LCR diag duvidoso

**Figura 2.** Foto de produto de PCR homoduplex (IGH mistura D) submetido previamente a denaturação/renaturação



**Figura 3.** Foto de produto de PCR homoduplex (IGH mistura D) submetido previamente a denaturação/renaturação.

### 3.4 ANÁLISE DE DADOS

As variáveis clínicas analisadas foram: idade, leucometria ao diagnóstico, grupo de risco, morfologia de medula óssea no D14 e D28, presença de DRM de medula óssea no D14 e D28, morfologia do LCR no diagnóstico, ocorrência de acidente de punção lombar, presença de doença residual mínima no LCR do D0, D14 e D28 e evolução clínica.

A ocorrência de recidiva da doença ou óbito caracterizaram eventos desfavoráveis. Foi definido como sobrevida livre de evento (SLE), o período de tempo em meses decorrido desde o diagnóstico até a ocorrência de evento desfavorável, caso este tenha ocorrido, ou até a última avaliação (junho de 2008). Nos casos de pacientes que não atingiram remissão ou morreram durante a fase de indução foi considerada SLE no tempo zero.

Foi definido como sobrevida livre de doença (SLD), o período de tempo em meses, a partir do diagnóstico, durante o qual o paciente manteve remissão clínica e hematológica completa. Para esta avaliação, foram excluídos os pacientes que foram a óbito em remissão clínica.

Dependendo do resultado da análise morfológica de LCR (feita rotineiramente ao longo do tratamento) e da ocorrência de acidente de punção, os pacientes foram inicialmente estratificados em três grupos: (vide desenho do estudo na figura 4):

1. Infiltração no Sistema Nervoso Central (LLA SNC);
2. Ausência de acidente de punção lombar
3. Ocorrência de acidente de punção lombar (APL +).

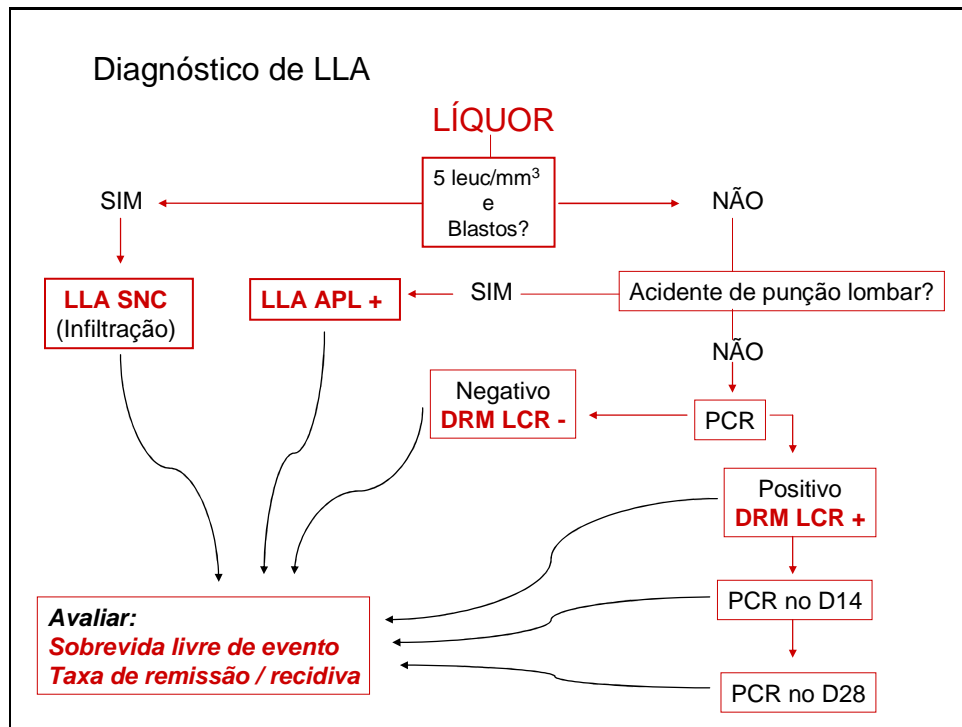
Em seguida, os pacientes de cada grupo foram subdivididos de acordo com o resultado da pesquisa de DRM no LCR.

Para análise comparativa de SLE e SLD foram considerados os seguintes grupos de pacientes:

- DRM LCR -: Pacientes nos quais não houve acidente de punção e cujo resultado da pesquisa de DRM no LCR foi negativo.
- DRM LCR +: Pacientes nos quais não houve acidente de punção e cujo resultado da pesquisa de DRM no LCR foi positivo.
- APL: Pacientes nos quais houve acidente de punção lombar.

(Vide figura 4).

A pesquisa de DRM no LCR do diagnóstico dos pacientes que sofreram acidente de punção lombar (APL) só foi realizada no grupo tratado pelo GBTLI 99 (devido a rotina do laboratório, que até o ano de 2000 desprezava amostras de LCR provenientes de punções com APL).



**Figura 4.** Desenho do estudo

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa SPSS versão 15.0

A correlação entre a ocorrência de doença residual mínima e as variáveis clínicas estudadas (idade, imunofenótipo, grupo de risco, leucometria do D0, leucometria do D7, DRM na medula óssea do D14 e DRM na medula óssea do D28) foi analisada através do teste exato de Fisher.

As taxas de sobrevida livre de evento e sobrevida livre de doença nos diferentes grupos de pacientes (LCR +, DRM LCR + e DRM LCR-, APL +) foram avaliada com a utilização das curvas de Kaplan Meier do teste log rank.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS (IDADE, SEXO, IMUNOFENÓTIPO E GRUPO DE RISCO)**

No período de junho de 1995 a junho de 2007 foram diagnosticados 104 casos novos de LLA, sendo 64 (62%) LLA B calla +, 20 (19,4%) LLA T, 12 (11,6%) LLA pró B, 4 (3,8%) LLA L3. A idade média foi de 73,6 meses, variando de 2 a 189 meses. Cinquenta e oito pacientes foram do sexo masculino e 45 do sexo feminino.

Os pacientes com LLA L3 foram excluídos do estudo.

Do total de 100 pacientes restantes, não foi possível realizar pesquisa de doença residual mínima nas amostras de LCR do diagnóstico em 23 pacientes. Isso ocorreu ou por falta de amostra estocada (13 pacientes) ou por ausência de DNA na amostra (10 pacientes). Outro paciente foi excluído da análise porque a pesquisa de DRM na medula óssea do diagnóstico foi negativa para todos os primers estudados.

Portanto, fizeram parte do estudo um total de 76 pacientes, sendo 38 do sexo masculino e 38 do sexo feminino. A idade média encontrada no grupo analisado foi de 63,4 meses, variando de 7 a 204 meses. Trinta e dois pacientes foram tratados pelo protocolo GBTLI 93 e quarenta e quatro pelo GBTLI 99.

Em relação ao imunofenótipo, foi observada a seguinte distribuição: 56 (73,6%) LLA B calla+; 13 (17,1%) LLA T; 7 (9,2%) LLA pró B. Dos setenta e seis pacientes estudados, quarenta e três (56,5%) pacientes preencheram critérios de alto risco e trinta e três (43,4%) foram classificados como de baixo risco. (Vide tabela 8)

A presença de doença residual mínima em amostra de medula óssea do D28 foi estudada em 69 pacientes. O resultado foi positivo em 18 pacientes (26%).

**Tabela 8.** Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LLA.

Paciente	Idade	Sexo	Imunofenótipo	G. Risco	GB D0	GB D7	MO D28	DRM D14	DRM D28	LCR Morf	LCR DRM	LCR14	LCR28	Acid.	Evolução	SLE
310	65	M	CALLA +	RB	19600	1	1	.	1	1	1	1	1	1	1	163
336	44	M	CALLA +	AR	92700	1	1	.	1	1	1	1	1	1	2	2
339	53	F	CALLA +	RB	3100	1	1	.	1	1	1	.	.	1	1	159
341	111	M	T	AR	10000	1	1	.	2	1	2	.	2	1	2	4
360	112	M	CALLA +	AR	1300	1	1	.	1	1	1	.	.	1	2	32
389	11	F	CALLA +	AR	442000	2	1	.	2	1	2	.	2	1	2	6
390	12	F	T	AR	3500	1	1	.	1	1	1	.	.	1	1	149
478	44	M	CALLA +	RB	8400	1	1	.	1	1	1	.	1	1	1	148
481	21	F	CALLA +	AR	90900	2	1	.	1	1	1	.	1	1	1	146
523	72	M	T	AR	8500	1	1	.	1	2	2	.	1	1	2	22
559	31	M	T	AR	41200	1	1	.	2	1	2	.	1	1	2	21
604	61	M	CALLA +	RB	24800	1	.	.	.	1	1	.	.	1	2	4
628	60	F	CALLA +	RB	1500	1	1	.	2	1	1	.	.	1	1	137
707	93	F	CALLA +	RB	4700	1	1	.	2	1	1	.	.	1	2	30
722	72	M	CALLA +	RB	12200	1	1	.	.	1	1	.	.	1	1	125
726	106	F	T	AR	61900	1	1	.	.	1	2	.	1	1	1	125
732	35	M	CALLA +	RB	16600	1	1	.	1	1	2	.	2	1	2	3
751	129	M	T	AR	45500	.	.	.	.	1	1	.	.	1	1	122
753	29	F	T	AR	36700	2	1	.	2	1	2	.	1	1	2	15
798	42	F	CALLA +	AR	60000	1	1	.	1	1	2	.	2	1	1	120
834	164	M	pro-B	AR	29700	2	1	.	1	1	2	.	1	1	1	119
857	130	M	CALLA +	AR	3100	1	1	.	1	1	2	.	2	1	1	115
871	19	F	CALLA +	AR	78800	2	1	.	2	1	2	.	2	1	2	17
874	7	F	pro-B	AR	404000	1	2	.	2	1	2	.	.	1	2	13
931	41	F	CALLA +	RB	8100	1	1	.	1	1	2	.	2	1	2	90
960	54	M	CALLA +	RB	5200	1	1	.	2	1	2	.	1	1	1	108

Continua

Paciente	Idade	Sexo	Imunofenótipo	G. Risco	GB D0	GB D7	MO D28	DRM D14	DRM D28	LCR Morf	LCR DRM	LCR14	LCR28	Acid.	Evolução	SLE
972	32	M	CALLA +	AR	52100	1	1	.	1	1	1	.	.	1	1	107
1015	146	M	T	AR	254000	1	1	.	2	2	2	.	2	1	2	1
1022	50	M	CALLA +	RB	3200	1	1	.	1	1	1	.	.	1	1	103
1030	66	M	CALLA +	RB	2500	1	1	1	1	1	1	.	.	1	1	102
1055	14	F	CALLA +	RB	2100	1	1	1	1	1	2	.	1	1	1	101
1069	7	F	pro-B	AR	606400	1	2	.	2	1	2	.	1	1	2	1
1104	20	M	CALLA +	RB	34600	2	1	2	2	1	1	.	.	1	2	96
1111	79	F	T	RB	17700	1	2	1	1	1	1	.	.	1	1	96
1163	77	F	CALLA +	RB	3100	1	1	2	1	1	1	.	.	1	1	91
1191	43	M	CALLA +	RB	21700	1	1	2	2	1	1	.	.	1	2	19
1259	55	F	CALLA +	RB	1200	1	1	1	1	1	2	2	.	1	.	.
1276	76	F	CALLA +	RB	2000	1	1	1	1	1	1	.	.	2	1	80
1292	150	F	pro-B	AR	630000	1	.	.	.	1	1	.	.	1	2	1
1325	11	M	CALLA +	AR	800	1	.	.	.	2	2	.	.	2	2	1
1328	151	M	CALLA +	AR	790000	2	2	2	2	1	2	.	2	1	2	1
1385	8	F	pro-B	AR	68600	1	1	2	2	3	1	.	.	2	2	1
1390	43	M	CALLA +	RB	10300	1	1	1	1	1	1	.	.	1	1	73
1418	26	F	CALLA +	RB	3100	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	70
1434	46	F	CALLA +	AR	68900	2	1	2	1	1	2	.	.	1	1	69
1474	80	F	CALLA +	RB	15700	1	1	1	1	1	1	.	.	2	1	67
1498	157	F	CALLA +	AR	15700	1	1	1	1	1	1	.	.	1	1	67
1512	41	M	CALLA +	RB	31500	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	66
1521	52	M	CALLA +	RB	14100	1	1	1	1	1	1	.	.	1	1	64
1535	189	M	CALLA +	AR	2800	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	63
1572	26	F	CALLA +	RB	20800	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	61
1574	30	M	CALLA +	AR	86800	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	61
1617	42	M	CALLA +	RB	2200	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	60
1622	58	M	CALLA +	RB	12900	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	58

Continua



Paciente	Idade	Sexo	Imunofenótipo	G. Risco	GB D0	GB D7	MO D28	DRM D14	DRM D28	LCR Morf	LCR DRM	LCR14	LCR28	Acid.	Evolução	SLE
1654	81	F	CALLA +	RB	13800	2	1	2	1	1	1	.	.	2	2	50
1683	35	F	CALLA +	RB	6700	2	1	1	2	1	1	.	.	1	.	.
1692	117	F	CALLA +	AR	12600	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	53
1693	46	M	CALLA +	AR	51000	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	53
1700	51	M	CALLA +	RB	3600	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	52
1704	52	F	CALLA +	AR	64100	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	51
1711	170	F	CALLA +	AR	5200	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	8
1715	139	F	T	AR	1200	1	1	.	1	1	1	1	1	1	.	.
1730	65	M	T	AR	80700	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	51
1741	82	F	CALLA +	AR	2800	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	21
1748	79	M	CALLA +	AR	800	.	.	.	.	1	2	.	.	2	2	1
1837	35	F	pro-B	AR	31300	1	1	2	1	1	1	.	.	1	1	46
1934	51	M	pro-B	AR	5100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	43
2044	76	F	CALLA +	RB	30600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26
2089	165	M	CALLA +	AR		1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	25
2090	26	M	CALLA +	RB	33800	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	25
2101	37	F	CALLA +	RB	6700	1	1	1	1	1	1	.	.	1	1	24
2296	125	M	T	AR		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	24
2441	204	F	CALLA +	AR	202900	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	17
2492	192	F	CALLA +	AR	2100	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	16
2558	60	M	T	AR	104000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
2781	9	F	CALLA +	AR	172000	2	1	.	1	1	1	1	1	2	1	14

**LEGENDA TABELA 8**

Imunof: Imunofenótipo

G. Risco: Grupo de Risco

RB → Risco Básico

AR → Alto Risco

GB D0: Glóbulos Brancos no diagnóstico

GB D7: Glóbulos Brancos no 7º dia de tratamento

< 5000 → 1

≥ 5000 → 2

MO D28: Morforlogia da medula óssea no 28º dia de tratamento

M1 → 1

M2 → 1

M3 → 2

DRM D14: Resultado de pesquisa de doença residual mínima em amostra de medula óssea no 14º dia de tratamento

Negativo → 1

Positivo → 2

DRM D28: Resultado de pesquisa de doença residual mínima em amostra de medula óssea no 28º dia de tratamento

Negativo → 1

Positivo → 2

LCR Morf: Presença de células blásticas no LCR no diagnóstico

< 5 células/mm<sup>3</sup> → 1

> 5 células/mm<sup>3</sup> com presença de blastos → 2

> 5 células/mm<sup>3</sup> sem a presença de blastos → 3

LCR DRM: Resultado de pesquisa de doença residual mínima em amostra de LCR no diagnóstico

Negativo → 1

Positivo → 2

LCR D14: Resultado de pesquisa de doença residual mínima em amostra de LCR no 14º dia de tratamento

Negativo → 1

Positivo → 2

LCR D28: Resultado de pesquisa de doença residual mínima em amostra de LCR no 28º dia de tratamento

Negativo → 1

Positivo → 2

Acid: Acidente de Punção

Negativo (< 10 hemácias/mm<sup>3</sup>) → 1

Positivo (>10 hemácias/mm<sup>3</sup>) → 2

Evolução

Remissão Clínica Completa → 1

Evento desfavorável (óbito ou recidiva) → 2

SLE: Sobrevida livre de evento em meses

## 4.2 MORFOLOGIA DO LCR E ACIDENTE DE PUNÇÃO LOMBAR

Dos 76 pacientes incluídos no estudo, 4 (5,2%) tiveram diagnóstico de infiltração leucêmica no SNC no momento do diagnóstico. (tabela 9)

**Tabela 9.** Características dos pacientes com SNC 3 ao diagnóstico. Em destaque os fatores relacionados a maior risco de infiltração do SNC. (RCC: remissão clínica completa)

Paciente	Idade	Leucometria	Imunofenótipo	Evolução
523	72	8500	<i>T</i>	óbito
1015	146	<b>254000</b>	<i>T</i>	óbito
1325	<i>II</i>	800	CALLA +	óbito
1574	30	<b>86800</b>	CALLA+	RCC

A ocorrência de acidente de punção lombar foi pesquisada apenas entre os 44 pacientes tratados pelo GBTLI 99. O evento ocorreu em 12 (27%) pacientes, um dos quais pertencente ao grupo com infiltração leucêmica do SNC. (figura 5)

A tabela 10 nos mostra a contagem de hemácias por milímetro cúbico encontrada no LCR dos pacientes que sofreram acidente de punção lombar e o resultado da pesquisa de doença residual mínima no LCR desses pacientes.

**Tabela 10:** Pacientes com APL- Hemácias/mm<sup>3</sup> e resultado de DRM no LCR

Paciente	Hemácias/mm <sup>3</sup>	DRM
1276	2225	-
1325	315	+
1385	10	-
1474	campo tomado	-
1617	193.3	+
1654	710	-
1692	89.3	+
1741	28	+
1748	570	+
2090	23.6	+
2441	12	-
2781	10	-

### **4.3 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA NO LCR**

A tabela 11 mostra os *primers* que foram positivos nas amostras de medula óssea do diagnóstico de cada paciente. Esses *primers* foram utilizados para a pesquisa de DRM no LCR.

Tabela 11. Resultado do PCR por mistura de primer na amostra da MO do diagnóstico

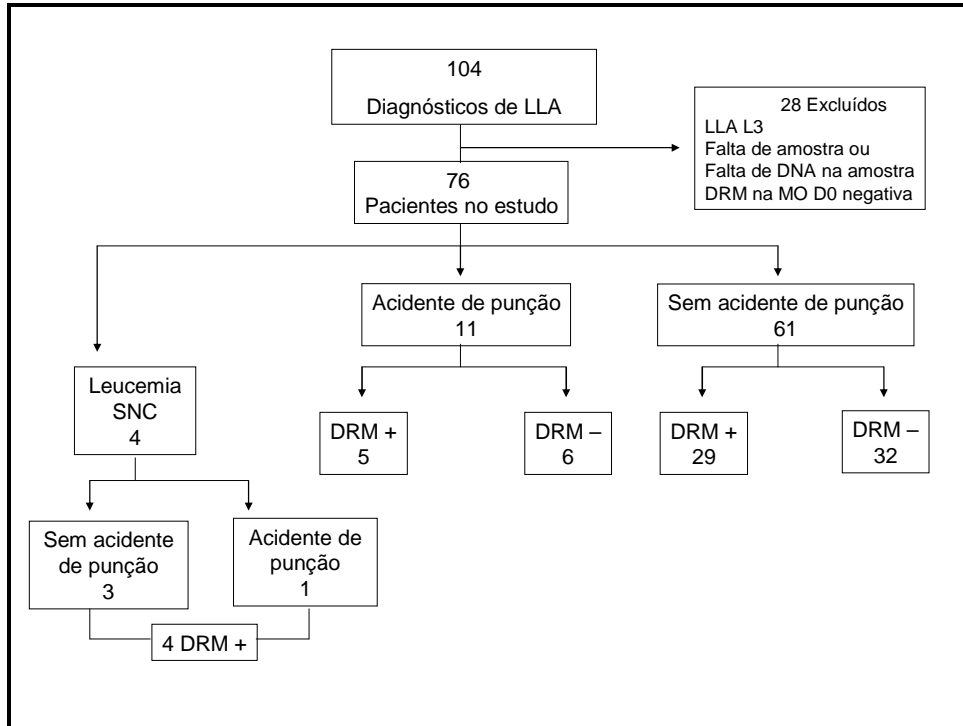
PACIENTE	LJH/FR3A	VLJH/FR3A	VD2DD3	MISTURA A	MISTURA B
310	+	+	+	+	-
336	+	-	-	+	-
339	+	-	-	-	+
341	-	-	+	-	-
360	+	+	-	+	-
389	+	+	+	+	+
390	-	-	-	+	-
478	+	-	-	+	-
481	+	+	-	-	-
523	-	-	-	+	+
559	-	-	+	+	-
604	-	-	-	+	-
628	+	+	+	-	-
707	+	+	+	-	+
722	+	+	+	-	+
726	-	-	-	+	+
732	+	+	+	+	+
751	+	-	-	-	-
753	+	+	-	-	-
798	+	+	-	+	-
834	+	+	+	-	-
857	+	-	-	+	-
871	+	+	+	-	-
874	-	-	-	-	+
931	+	-	+	+	-
960	+	-	+	+	-
972	-	-	+	+	-
1015	-	-	-	+	-
1022	-	-	-	+	-
1030	+	+	-	-	-
1055	+	+	-	+	-
1069	+	+	-	+	-
1104	+	+	+	+	-
1111	-	-	-	+	+
1163	+	-	-	+	-
1191	+	+	+	-	-
1259	+	+	+	-	-
1276	+	+	-	-	-
1292	-	-	-	+	+
1325	+	-	+	-	+
1328	+	-	-	+	+
1385	-	-	+	-	-
1390	+	-	+	+	-
1418	+	+	-	-	-
1434	-	-	-	+	+
1474	+	+	+	-	+

continua

PACIENTE	LJH/FR3A	VLJH/FR3A	VD2DD3	MISTURA A	MISTURA B
1498	+	+	-	+	+
1512	-	-	-	+	-
1521	+	+	-	-	-
1535	+	+	-	-	-
1572	+	+	-	-	-
1574	+	+	+	+	-
1617	+	+	+	-	-
1622	+	+	+	-	+
1654	-	-	+	+	-
1683	+	+	-	-	+
1692	+	+	+	+	-
1693	+	+	+	+	-
1700	+	+	+	+	-
1704	-	+	-	+	-
1711	-	-	-	+	-
1715	-	-	-	-	+
1730	-	-	-	+	+
1741	-	-	+	+	+
1748	+	+	-	-	-
1837	+	+	+	+	-
1934	+	+	-	+	-
2044	-	-	-	+	-
2089	+	+	+	-	-
2090	+	+	+	-	-
2101	+	+	+	-	-
2296	+	-	-	-	+
2441	-	+	-	-	-
2492	+	+	+	-	-
2558	-	-	-	-	-
2781	+	+	-	-	-

A pesquisa de DRM no LCR do diagnóstico foi positiva em 38 e negativa em 38 pacientes.

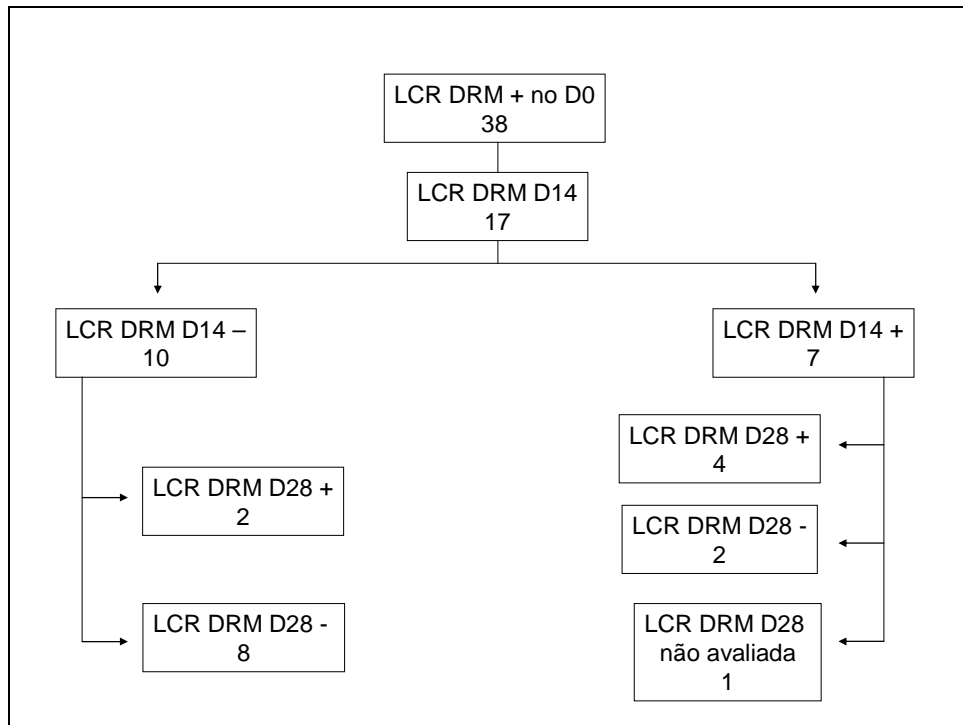
Todos os pacientes com SNC III tiveram pesquisa de doença residual mínima positiva no diagnóstico. No grupo de pacientes com acidente de punção e sem infiltração leucêmica no SNC (n=11) foi detectada DRM no LCR de 5 pacientes. Entre os 61 pacientes do grupo sem infiltração leucêmica e sem acidente de punção lombar, os resultados da DRM no LCR foram positivos em 29 e negativos em 32 pacientes. (Figura 5).



**Figura 5.** Pacientes com LLA: Distribuição em relação às variáveis estudadas

Em 21 dos 38 casos com PCR positivo no LCR no diagnóstico, não foi realizada análise da amostra do D14. Em 17 pacientes isso se deveu ao fato de que o protocolo de tratamento utilizado até o ano 2000 não previa coleta de LCR nesta ocasião. Em outros três casos não foi obtido DNA a partir da amostra de LCR estocada. Em 1 caso, não foi colhido LCR porque o paciente encontrava-se em choque séptico, instável hemodinamicamente, plaquetopênico e a punção lombar foi contra-indicada.

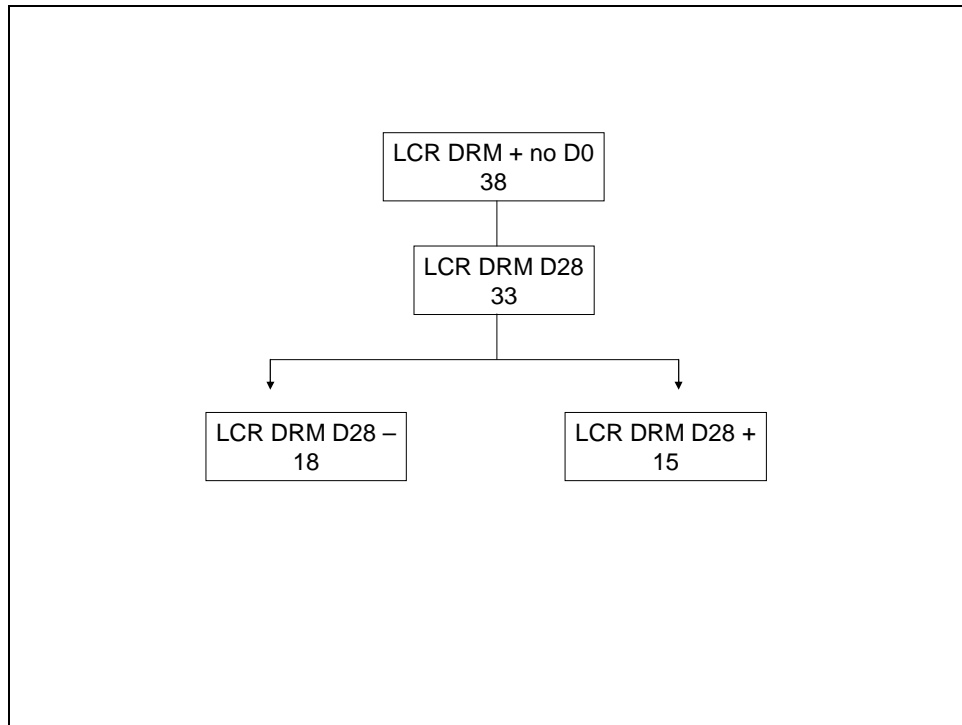
Portanto, foram analisadas 17 amostras de LCR do 14º dia de tratamento. Destas, 7 foram positivas (41,2%), 10 negativas (58,8%). (Figura 6)



**Figura 6.** Pacientes com LLA: Doença Residual Mínima no LCR do D14

A pesquisa de DRM no LCR do D28 foi realizada em 33 pacientes, sendo positiva em 15 (45,4%) e negativa em 18 pacientes (Figura 7). Em cinco pacientes do grupo com DRM no LCR do diagnóstico positiva, não foi possível extrair DNA a partir da amostra de LCR estocada.





**Figura 7.** Pacientes com LLA: Doença Residual Mínima no LCR do D28

#### 4.4 CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVIES

A detecção de doença residual mínima na amostra de LCR do diagnóstico dos pacientes nos quais não houve acidente de punção lombar apresentou correlação positiva com o Grupo de Risco dos pacientes e com a leucometria do diagnóstico.

Não houve correlação estatisticamente significativa entre DRM no LCR e a idade, o imunofenótipo, a leucometria do D7, a morfologia de MO do D28 e a presença de DRM na medula do D14 e do D28. (tabela 12)

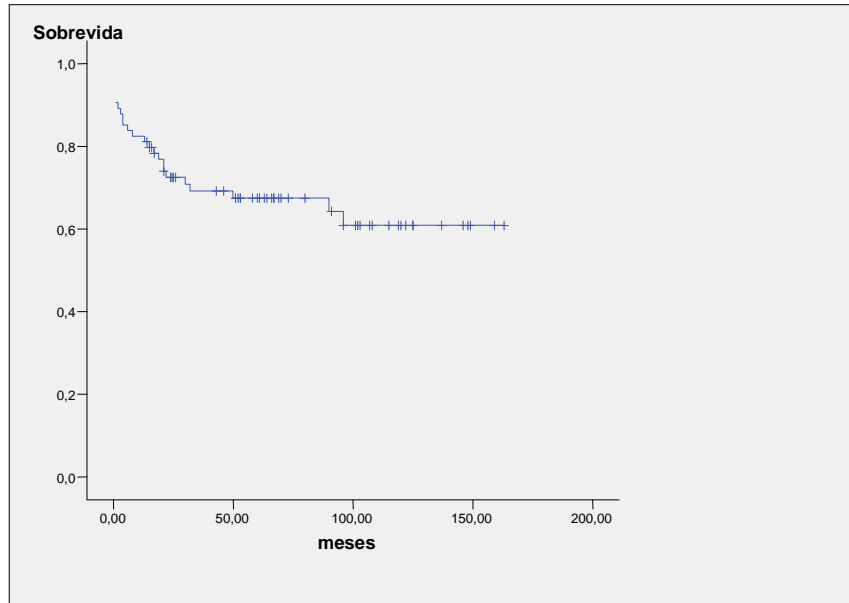
Tabela 12. Análise de correlação entre variáveis (Teste exato de Fisher)

Variável Clínica	DRM LCR D0 (p value)	DRM LCR D14 (p value)	DRM LCR D28 (p value)	APL (p value)
Idade	0.40	0.67	1.0	0.16
Imunofenotipagem	0.78	0.28	0.16	1.0
Grupo de Risco	<b>0.04</b>	0.36	0.74	1.0
GB no D0	<b>0.03</b>	0.63	0.10	1.0
GB no D7	0.73	1.0	1.0	1.0
MO no D28	0.61	-	1.0	1.0
DRM MO D14	0.65	1.0	1.0	0.66
DRM MO D28	0.08	0.46	0.14	0.27
LCR morfologia	0.11	0.25	0.25	0.17
Evol. favorável	0.41	0.55	0.17	0.74
Recidiva	0.09	1.0	0.16	1.0

#### 4.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE EVENTO

A sobrevida global livre de evento no grupo estudado foi de 66,2%. (figura 8).

### CURVA DE SLE Todos os Pacientes

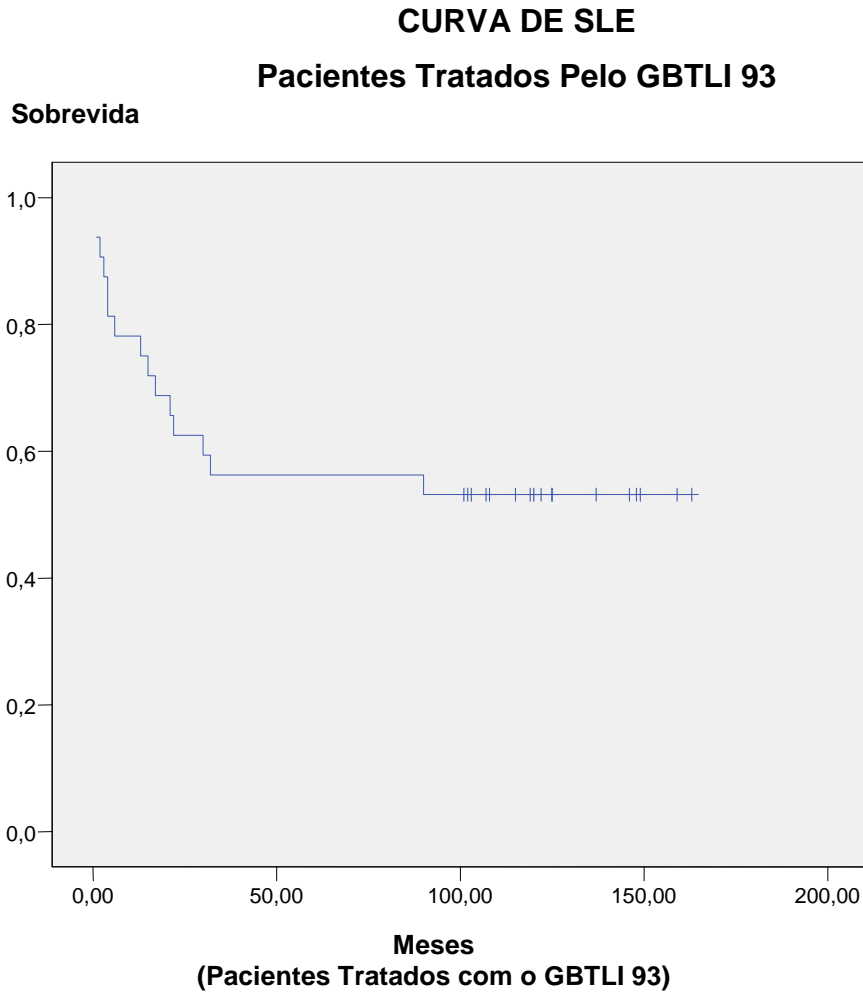


**Figura 8.** Sobrevida global livre de evento (n=77)

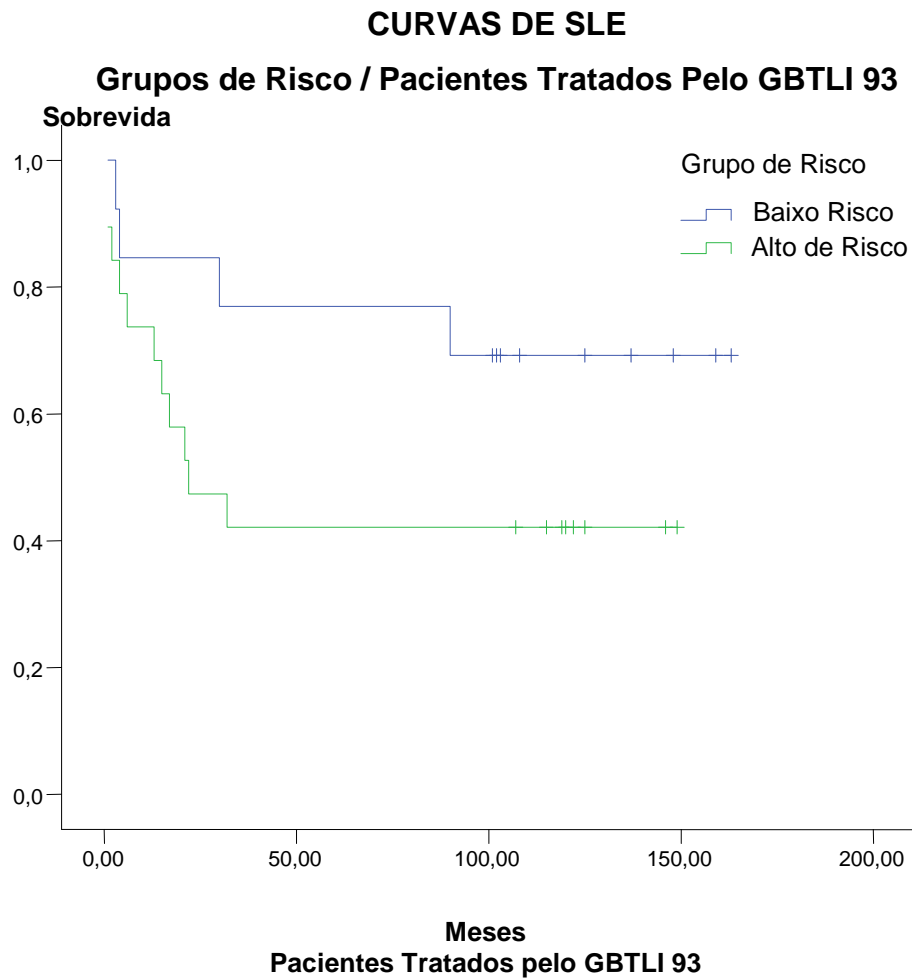
Quando analisamos separadamente os pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 93, encontramos uma SLE de 53,1% (figura 9). Nesse grupo, os pacientes de baixo risco (incluindo risco básico verdadeiro e risco básico) tiveram SLE de 69,2% enquanto os pacientes de alto risco tiveram uma taxa de SLE de 49,1%. (figura 10). As taxas de SLE apresentadas pelo grupo total de pacientes tratados no HCRP segundo o protocolo GBTLI 93 foram superiores às encontradas no presente estudo (SLE = 64% para todos os pacientes, sendo 78,9% para pacientes de baixo risco e 55,2% para pacientes de alto risco). Essa diferença nas taxas de SLE pode ser atribuída a um viés de seleção, visto que, no grupo tratado pelo GBTLI 93 foram excluídos todos os pacientes nos quais houve acidente de punção.

Nos pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 99 (SLE=76,2%) a SLE foi superior àquela encontrada entre os pacientes tratados pelo GBTLI 93 e a taxas de SLE dos pacientes com baixo risco e alto risco foram iguais a 83,3% e 70,8%, respectivamente.(Figuras 11 e 12).

Tais taxas foram semelhantes às apresentadas pela amostra total de pacientes tratados pelo GBTLI 99 no HCRP.

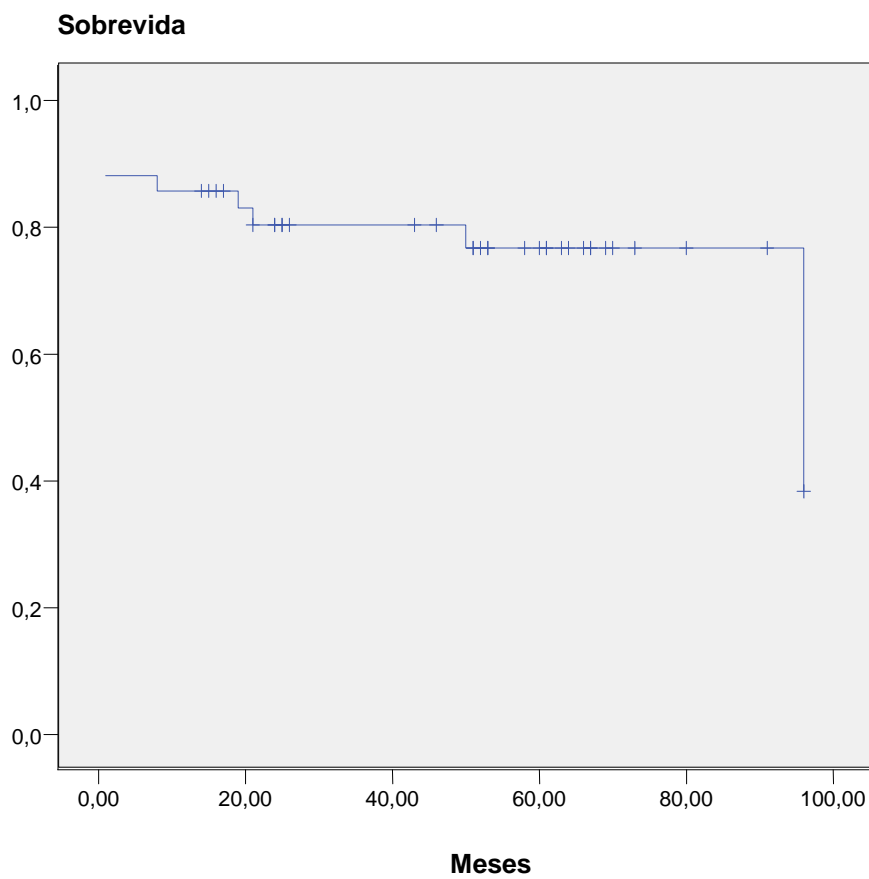


**Figura 9.** SLE: pacientes tratados com o GBTLI 93 (n=32)



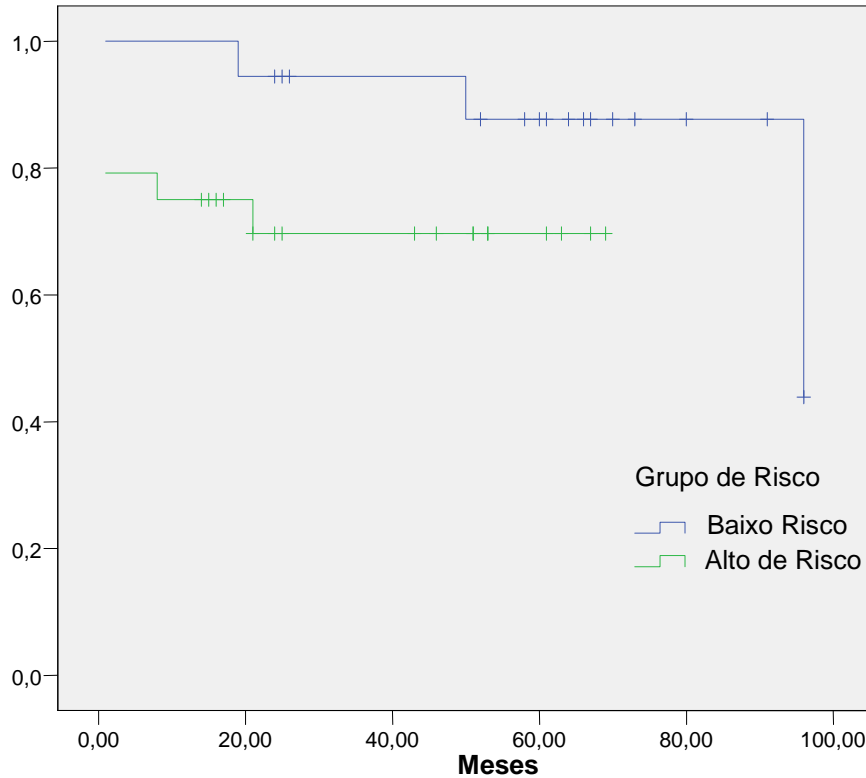
**Figura 10.** SLE: Pacientes tratados pelo GBTLI 93. Alto Risco X Baixo Risco ( $p=0,116$ )

**CURVA DE SLE**  
**Pacientes Tratados Pelo GBTLI 99**



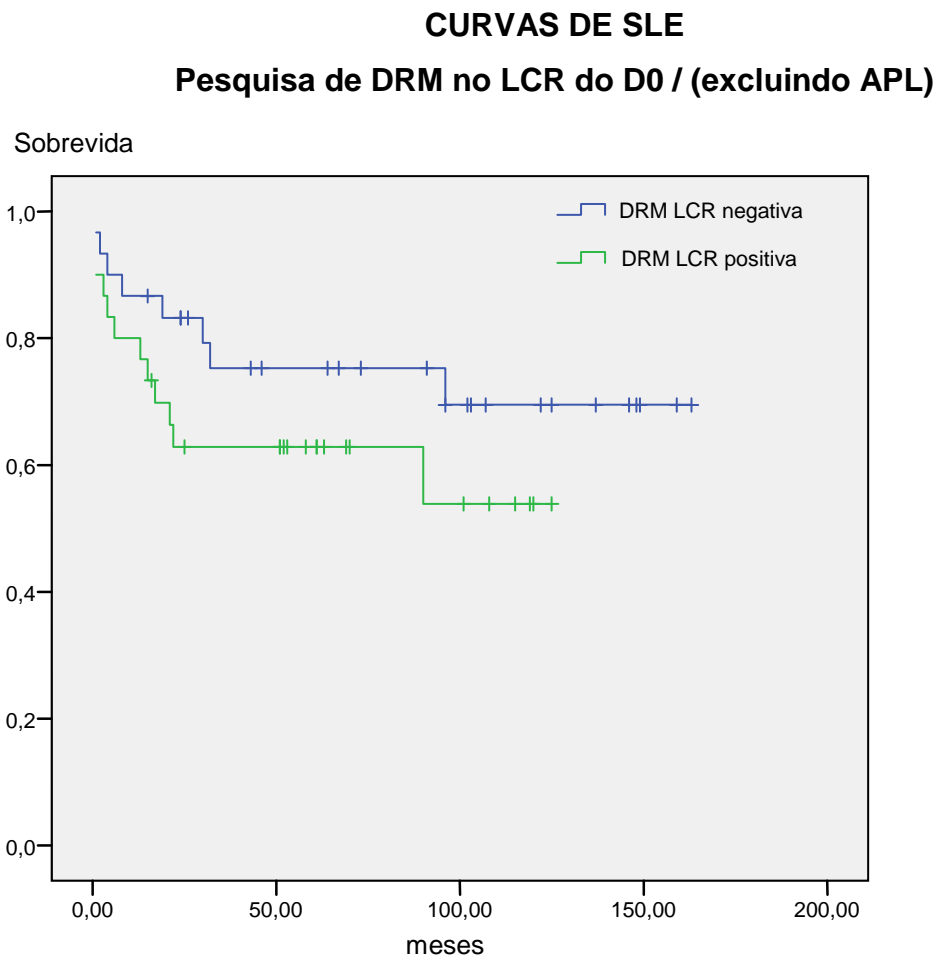
**Figura 11.** SLE: GBTLI 99 (n=45)

**CURVAS DE SLE**  
**Grupos de Risco / Pacientes Tratados Pelo GBTLI 99**  
**Sobrevida**



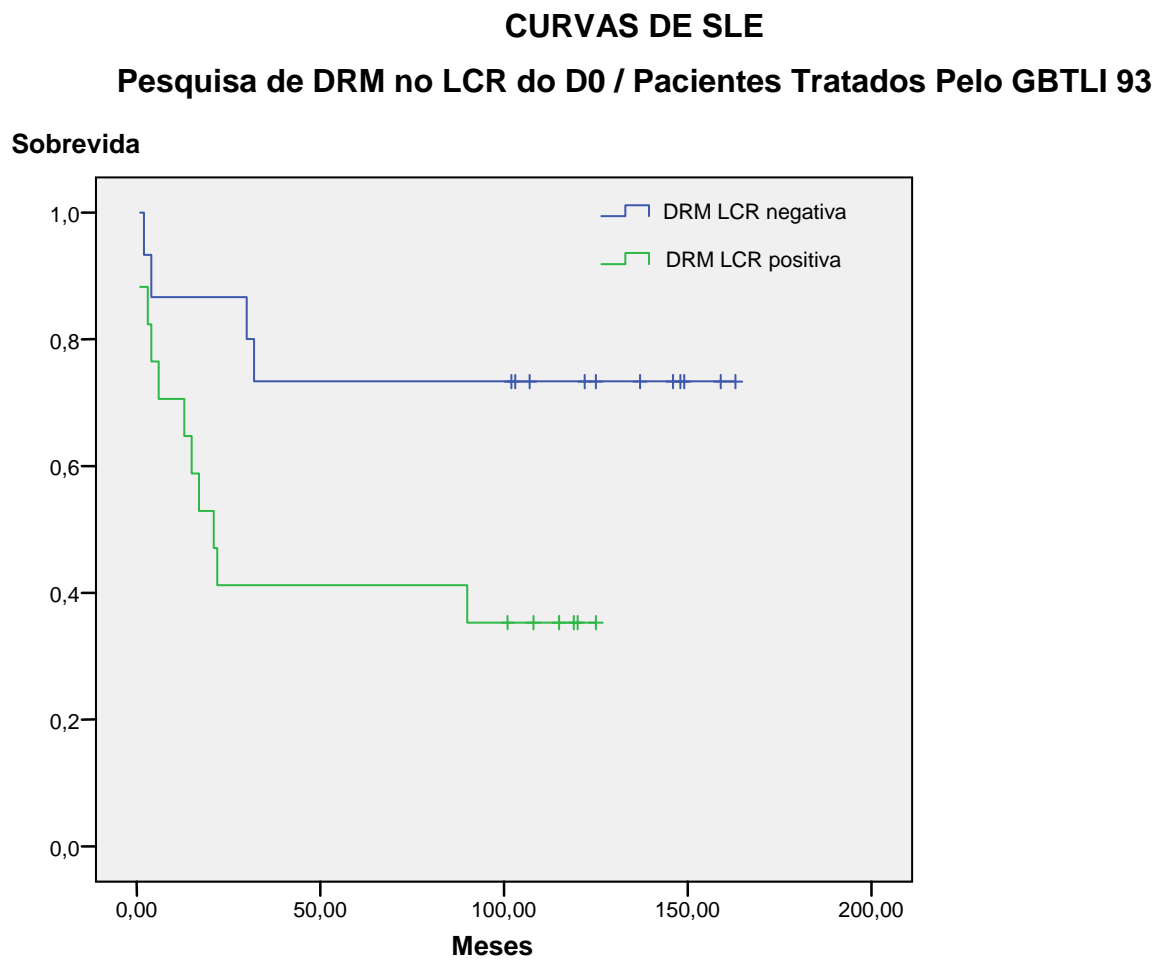
**Figura 12.** SLE GBTLI 99, Alto Risco X Baixo Risco (p=0,099)

Apesar de termos encontrado SLE inferior no grupo de pacientes com DRM no LCR do D0 positiva (SLE 60%); quando comparados aos pacientes com DRM no LCR negativa (SLE=73,3%), não houve diferença estatisticamente significativa (p=0,2). Entretanto, quando analisamos em separado os pacientes tratados pelo GBTLI 93, o grupo com DRM positiva no LCR do diagnóstico apresentou SLE inferior (SLE=35,3%) à SLE dos pacientes com DRM negativa (SLE=73,3%) (p=0,029). Quando os pacientes foram tratados pelo GBTLI 99, a presença de DRM no LCR do diagnóstico não determinou mudança estatisticamente significativa de SLE (92,3% X 73,3%; p=0,38). (Figuras 13, 14 e 15).



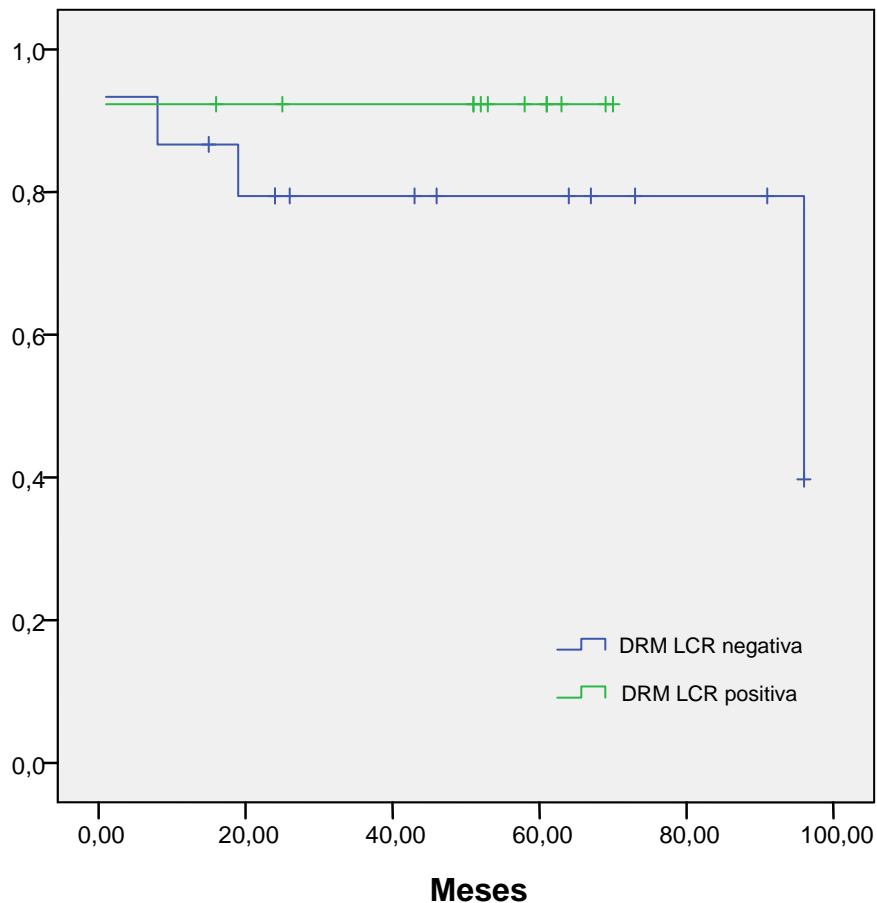
**Figura 13.** SLE: Pacientes com DRM LCR D0 + X Pacientes com DRM LCR D0 -.  
Todos os pacientes (excluídos pacientes com APL) (n=65) (p=0,18)





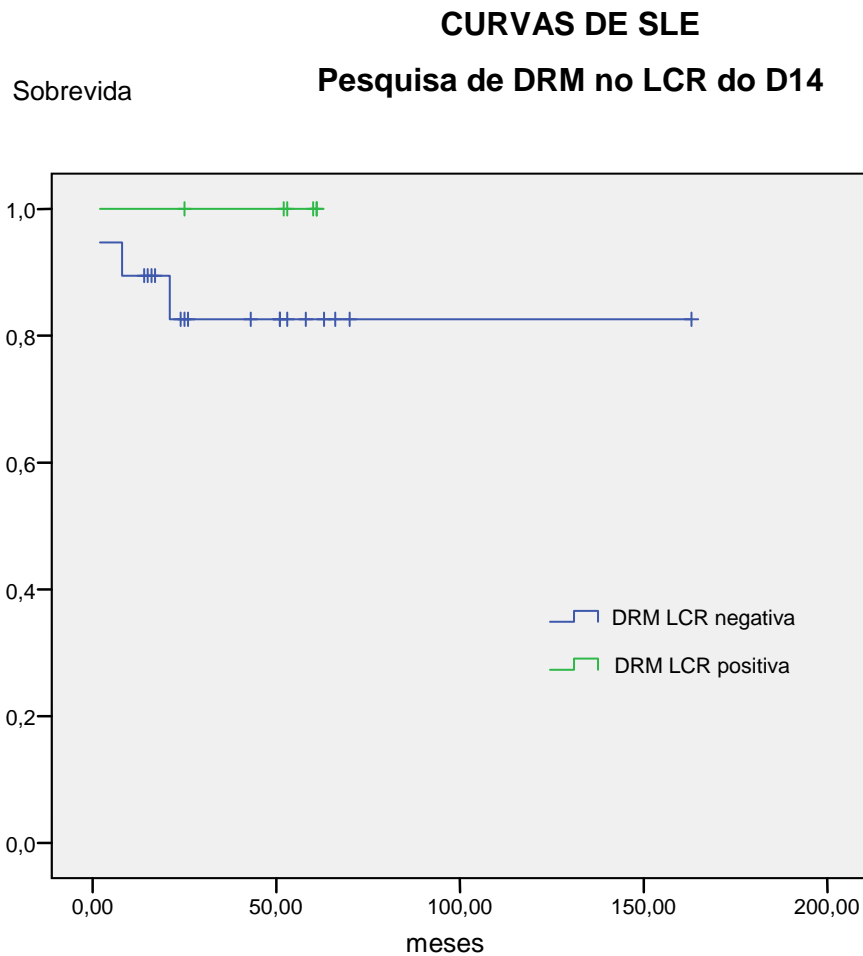
**Figura 14.** SLE: DRM LCR D0 + X DRM LCR D0 –  
Pacientes tratados pelo GBTLI 93 (p=0,029)

**CURVAS DE SLE**  
**Pesquisa de DRM no LCR do D0 / Pacientes Tratados Pelo GBTLI 99**  
**Sobrevida**



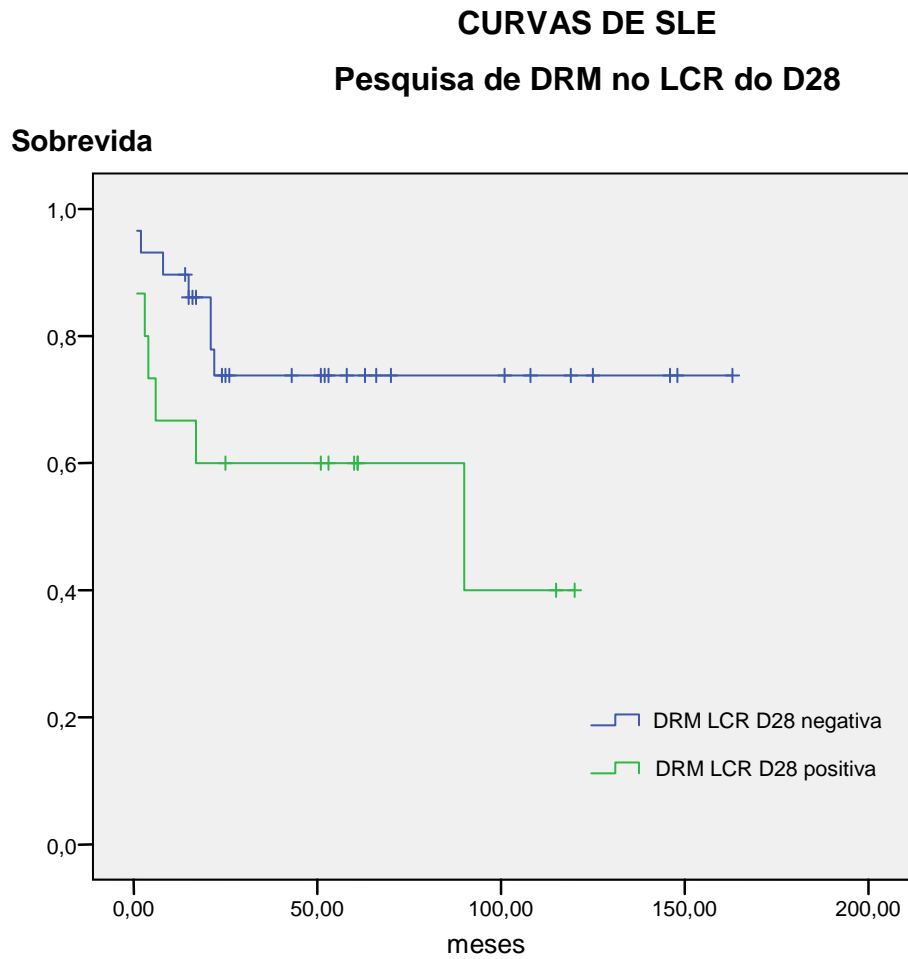
**Figura 15.** SLE: DRM LCR D0 + X DRM LCR D0-  
 Pacientes tratados pelo GBTLI 99 (p=0,38)

A análise de SLE dos pacientes que apresentaram DRM positiva no LCR do D14 (100%) foi superior à SLE dos pacientes cujo resultado da pesquisa de DRM no D14 foi negativa (84%), entretanto, a diferença não mostrou significância estatística (p=0,29) (figura 16). Devido a número restrito de pacientes, não foi realizada a análise de SLE dos pacientes com DRM LCR D14 considerando os diferentes protocolos de tratamento.



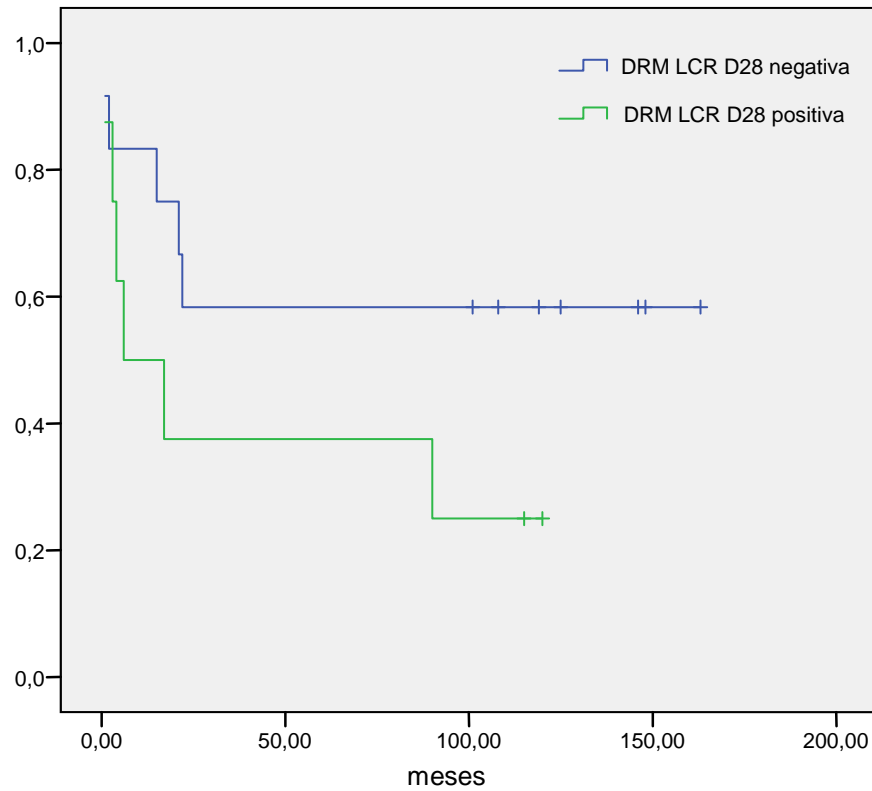
**Figura 16.** SLE: DRM LCR D14 + X DRM LCR D14-. (p=0,29)

Entre os pacientes com DRM no LCR positiva no D28 foi encontrada uma taxa de SLE de 53,3%, inferior à observada entre os pacientes com DRM LCR D28 negativa (SLE=75,9%), mas novamente a diferença não mostrou significado estatístico (p=0,12). Quando analisados em separado os pacientes tratados pelos diferentes protocolos (GBTLI 93 e GBTLI 99), a presença de DRM no D28 não mostrou impacto na SLE, embora se observe, no grupo tratado pelo GBTLI 93, uma tendência de SLE inferior entre os pacientes com DRM LCR D28 positiva (SLE DRM D28 + = 25% X SLE DRM D28 - = 58,3%) (p=0,14). Entre os pacientes tratados pelo GBTLI 99, foi observada uma SLE de 85,7% no grupo com DRM LCR D28 positiva contra 88,2% no grupo com DRM LCR D28 negativa (p=0,88). (figuras 17, 18 e 19)

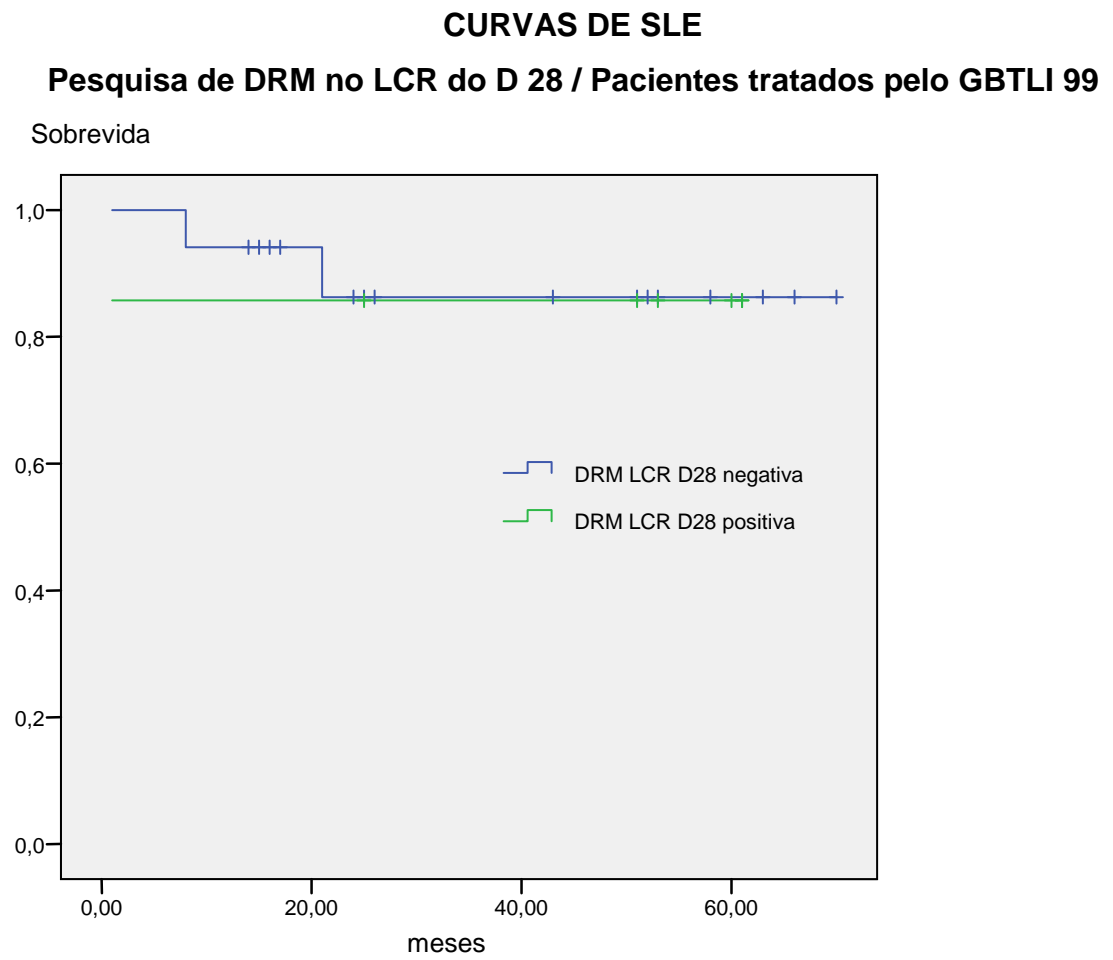


**Figura 17.** SLE: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28 -. ( $p=0,12$ )

**CURVAS DE SLE**  
**Pesquisa de DRM no LCR do D 28 / Pacientes tratados pelo GBTLI 93**



**Figura 18.** GBTLI 93. SLE: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28 -. (p=0,14)



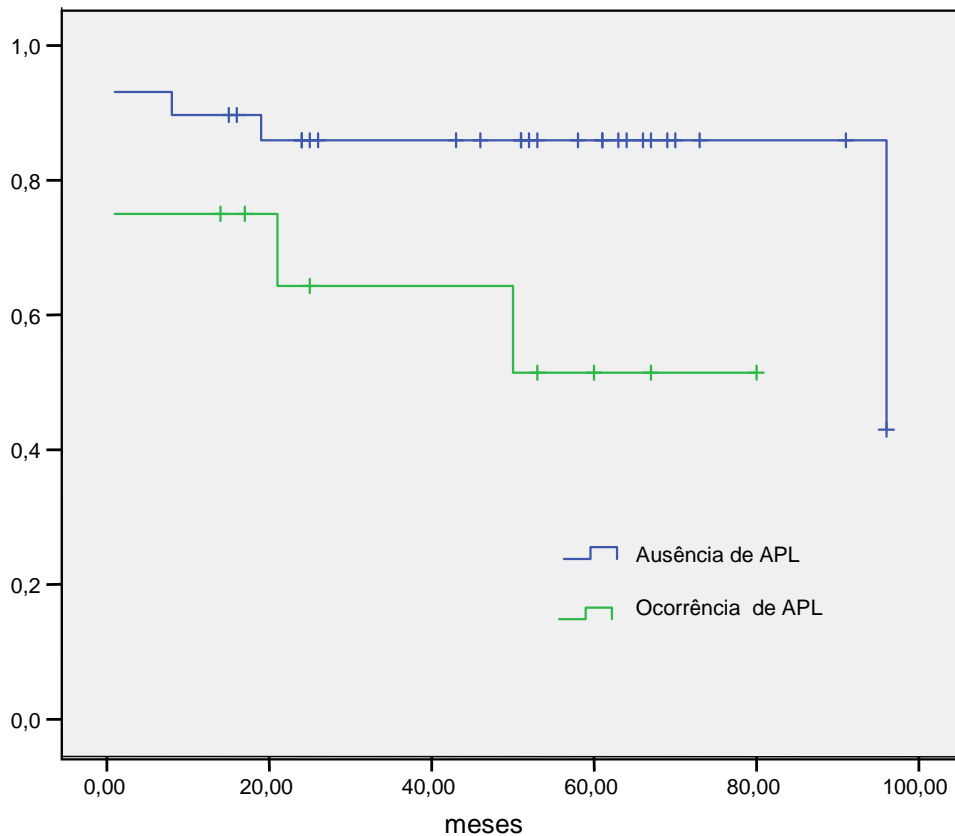
**Figura 19.** GBTLI 99. SLE: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28-. (p=0,88)

A ocorrência de acidente de punção lombar foi estudada apenas entre os pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 99 (n=45). A sobrevida livre de evento dos pacientes que sofreram acidente de punção lombar (n=12; SLE=58,3%) foi inferior à SLE dos pacientes nos quais não houve acidente de punção (n=29; SLE=82,8%) (p=0,04). (figura 20)

### CURVAS DE SLE

#### Presença de Acidente de Punção Lombar / Pacientes tratados pelo GBTLI 99

Sobrevida



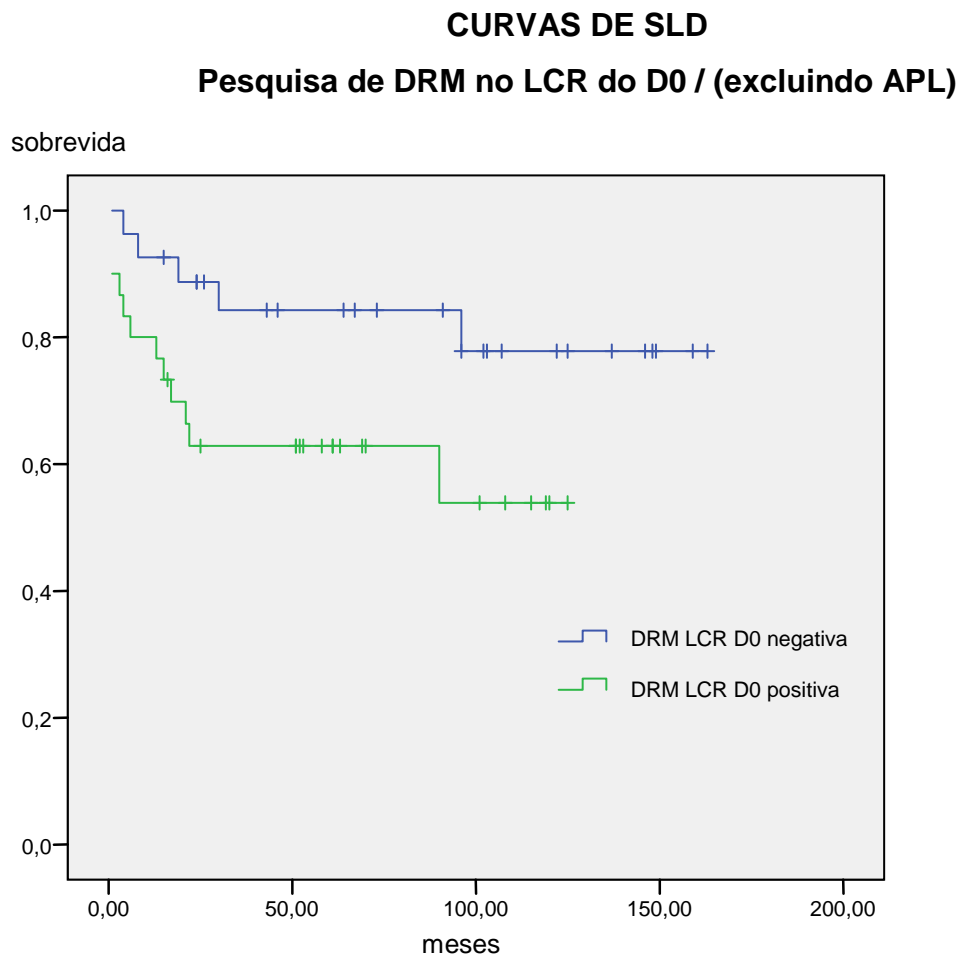
**Figura 20.** SLE: APL - X APL +  
Pacientes tratados pelo GBTLI 99 (p=0,04)

#### 4.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

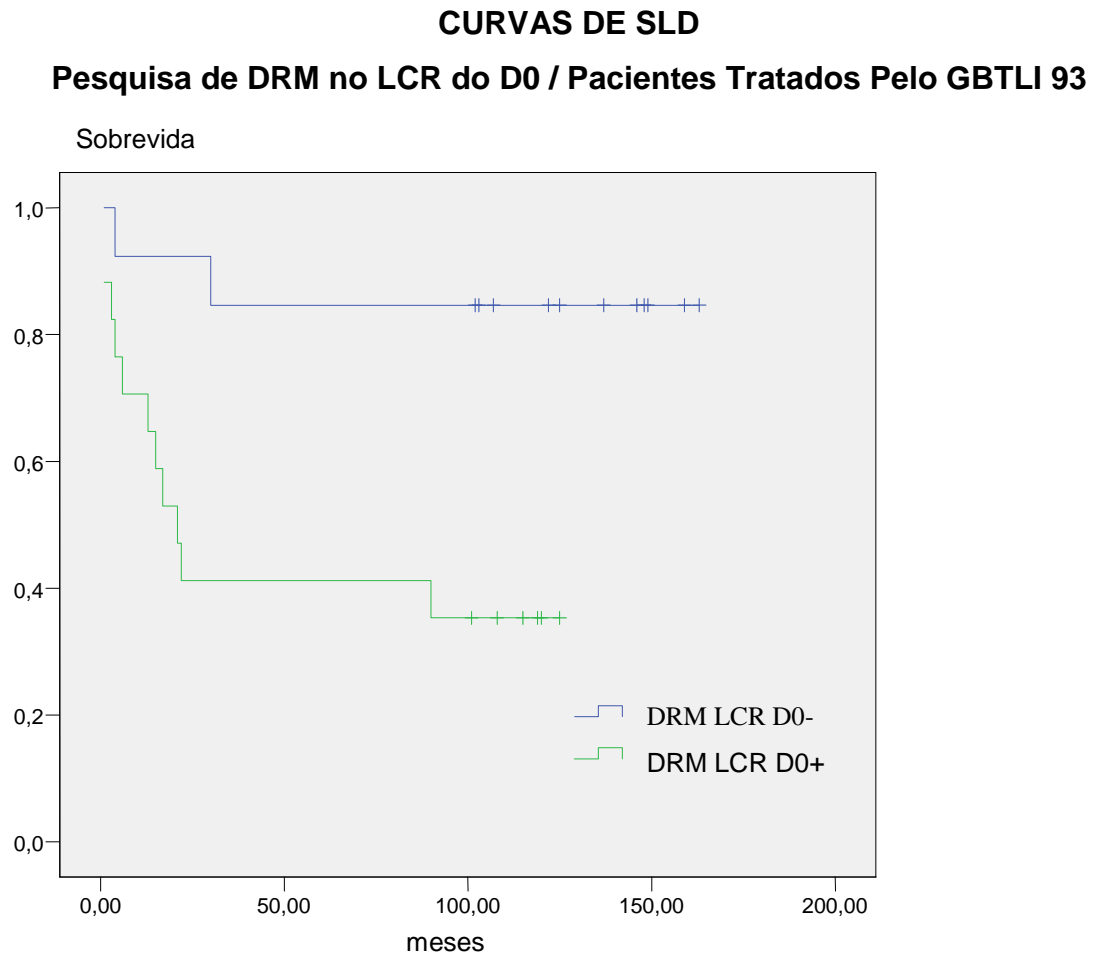
Em análise complementar, foram comparadas a taxas de sobrevida livre de doença (SLD). Para tal avaliação, foram excluídos os pacientes que foram a óbito na indução e os pacientes cujo óbito ocorreu durante remissão clínica.

Os pacientes com DRM LCR negativa apresentaram taxas de SLD superiores às taxas de SLD apresentadas pelos pacientes com DRM LCR positiva (81,5% e 60,0%, respectivamente;  $p=0,04$ ). Quando analisamos separadamente os pacientes tratados pelo GBTLI 93, os pacientes com DRM LCR - continuaram apresentando taxas de SLD superiores (SLD=84,6%) às taxas de SLD observadas entre os pacientes com DRM LCR + (SLD=35,5%) ( $p=0,007$ ). Já no grupo de pacientes tratados pelo GBTLI 99, a ocorrência de doença residual mínima no LCR do diagnóstico não determinou mudança estatisticamente significativa na SLD (80% para DRM - e 92% para DRM +,  $p=0,67$ ) (Figuras 21, 22 e 23).





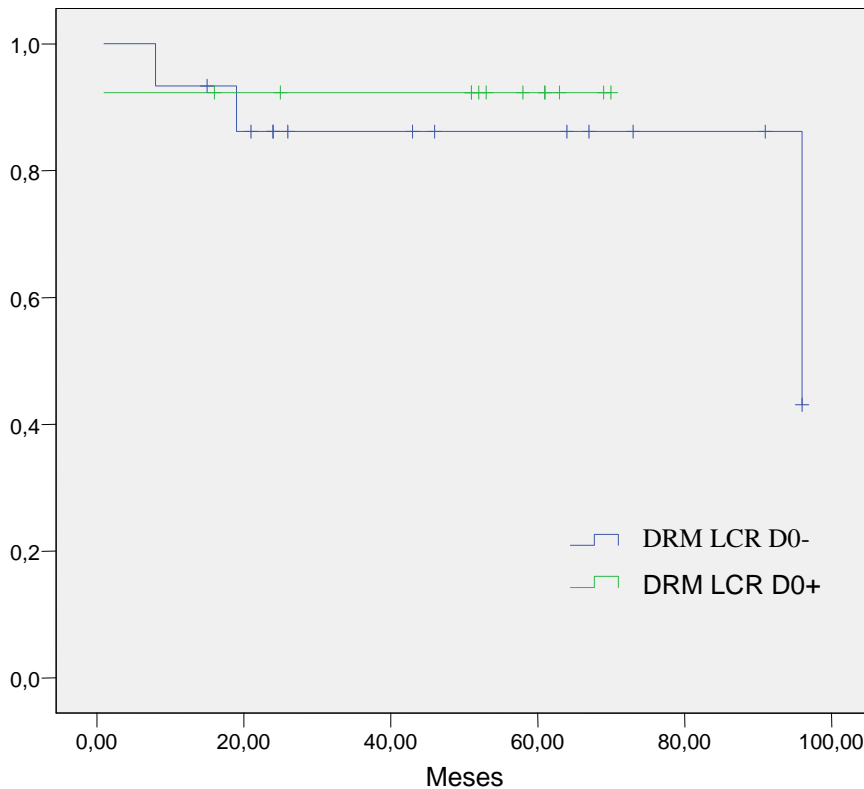
**Figura 21.** SLD: DRM LCR D0 + X DRM LCR D0 –  
Pacientes tratados pelo GBTLI 93 e GBTLI 99, exceto óbito em indução e óbito em remissão.  
(p=0,04)



**Figura 22.** SLD: DRM LCR D0 + X DRM LCR –  
Pacientes tratados pelo GBTLI 93, exceto óbito em indução e óbito em remissão. (p=0,007)

**CURVAS DE SLD**  
**Pesquisa de DRM no LCR do D0 / Pacientes Tratados Pelo GBTLI 99**

Sobrevida



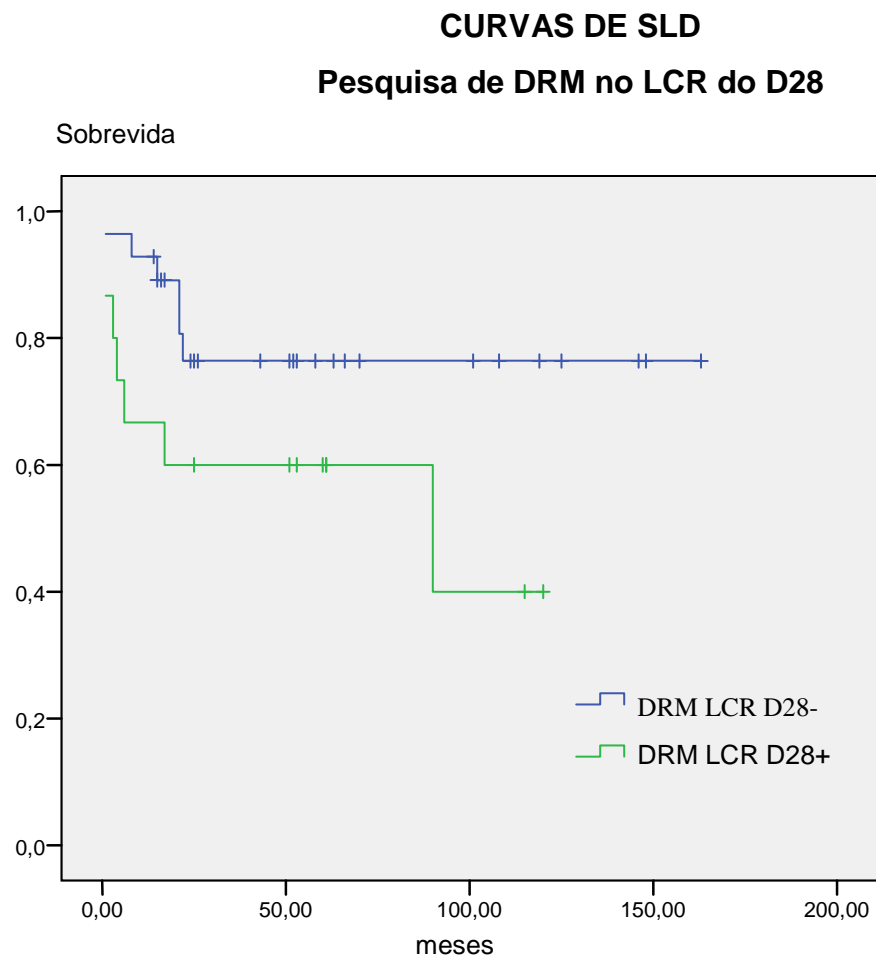
**Figura 23.** SLD: DRM LCR D0 + X DRM LCR D0 –  
 Pacientes tratados pelo GBTLI 99, exceto óbito em indução e óbito em remissão. (p=0,67)

A análise das taxas de SLD apresentadas pelos pacientes com DRM LCR D14 positiva e negativa foi prejudicada pelo pequeno tamanho da amostra.

Os pacientes com DRM LCR D28 positiva apresentaram SLD igual a 53,3% e os pacientes com DRM LCR D28 negativa, SLD igual a 78,6% (p=0,07). O nível de significância de 7% mostra uma tendência de diferença estatística, sendo necessário uma análise de maior número de casos para melhor definição dos achados. Entre ps pacientes

tratados pelo GBTLI 93 encontramos taxas de SLD iguais a 25% e 63,3% para os grupos com DRM LCR D28 + e DRM LCR D28 – respectivamente ( $p=0,07$ ). Novamente, há uma tendência de diferença estatisticamente significativa, a qual poderia ser melhor avaliada com análise de uma amostra maior.

No grupo tratado pelo GBTLI 99 foram encontradas taxas de SLD de 85,7% e 88,2% para os pacientes com DRM LCR 28 + e DRM LCR D28 – respectivamente ( $p=0,8$ ). (figuras 24, 25 e 26).

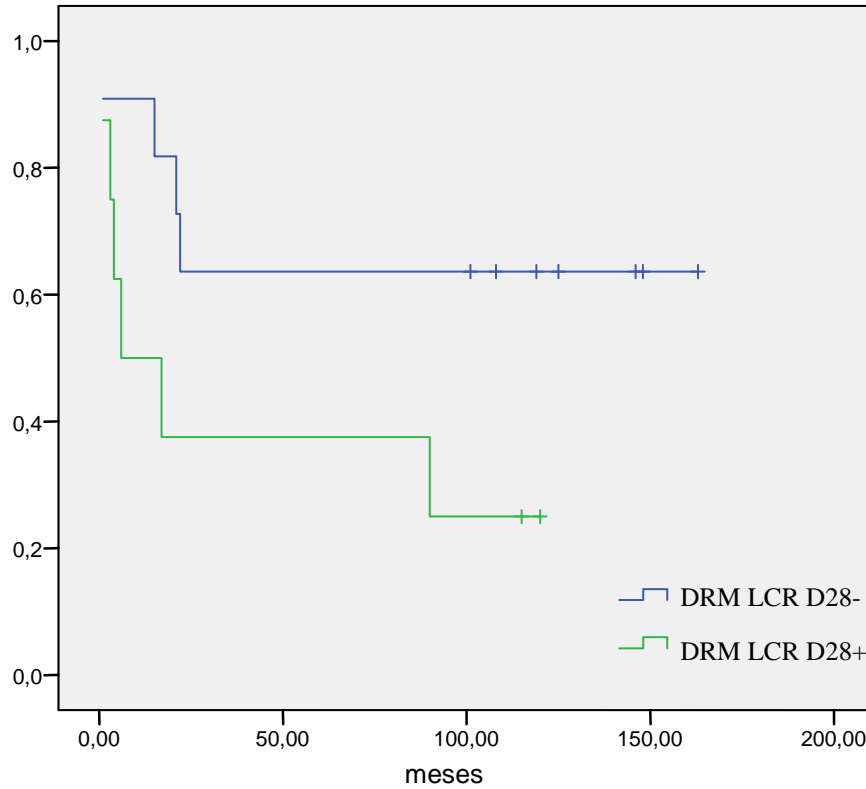


**Figura 24.** SLD: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28 –  
Todos os pacientes, exceto óbito em indução e óbito em remissão. ( $p=0,07$ )

### CURVAS DE SLD

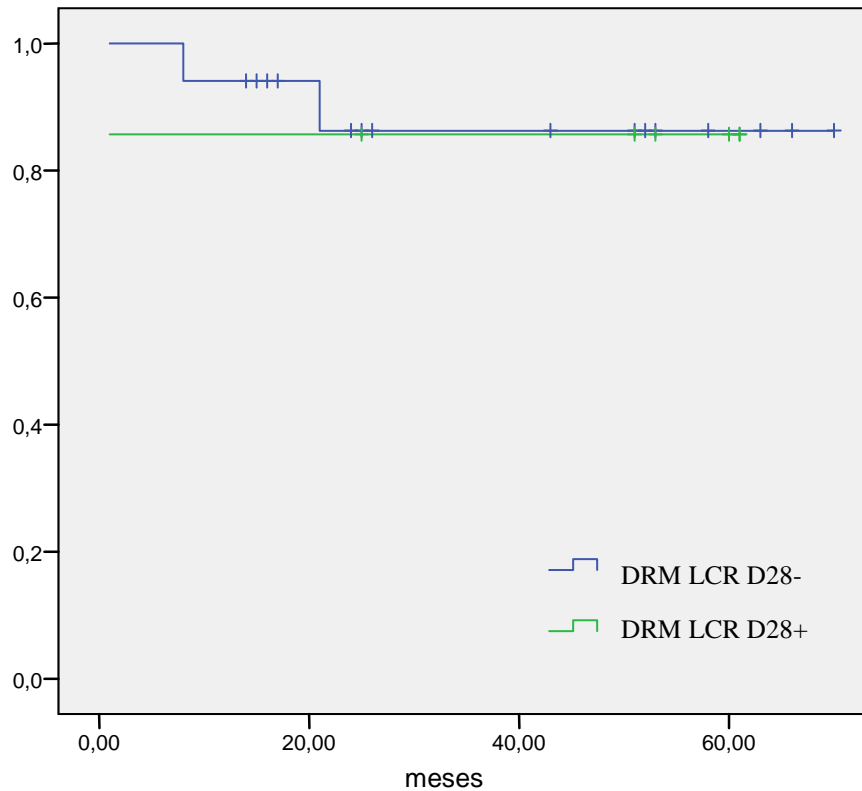
#### Pesquisa de DRM no LCR do D28 / Pacientes Tratados Pelo GBTLI 93

Sobrevida



**Figura 25.** SLD: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28 -  
Pacientes tratados pelo GBTLI 93, exceto óbito em indução e óbito em remissão. (p=0,07)

**CURVAS DE SLD**  
**Pesquisa de DRM no LCR do D28 / Pacientes Tratados Pelo GBTLI 99**  
 Sobrevida

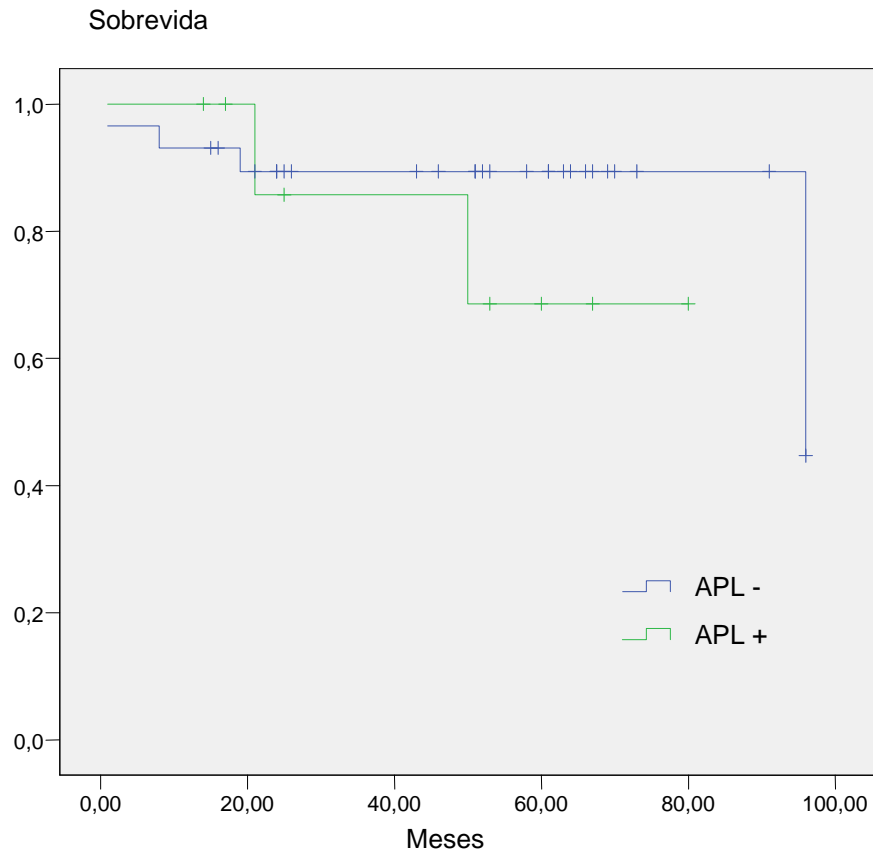


**Figura 26.** SLD: DRM LCR D28 + X DRM LCR D28 –  
 Pacientes tratados pelo GBTLI 99, exceto óbito em indução e óbito em remissão. ( $p=0,88$ )

Quando excluimos os pacientes que foram a óbito em indução ou durante remissão clínica, a ocorrência de acidente de punção lombar não determinou mudanças estatisticamente significativas nas taxas de SLD. (Figura 27)

## CURVAS DE SLD

### Presença de Acidente de Punção Lombar / Pacientes tratados pelo GBTLI 99



**Figura 27.** SLD: APL + X APL -

Pacientes tratados pelo GBTLI 99, exceto óbito em indução e óbito em remissão. (p=0,36)

## 5. DISCUSSÃO

A Leucemia Linfóide Aguda, é um modelo de sucesso no tratamento oncológico e um exemplo de como o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e a compreensão do comportamento biológico da doença podem refletir diretamente nas taxas de cura e na qualidade de vida dos pacientes.

Com as excelentes taxas de sobrevida obtidas atualmente (de 75-80%) as pesquisas estão direcionadas para a otimização e adaptação do tratamento aos grupos com probabilidades diferentes de recidiva. (VILMER *et al*, 2000; PUI *et al* 2001, PUI *et al* 2004, PUI *et al*, 2007)

### 5.1 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

Em relação às características epidemiológicas, a população incluída no estudo apresentou semelhanças com os dados encontrados na literatura nacional e internacional referentes a crianças com LLA.

A idade é considerada como fator prognóstico independente em crianças com LLA, sendo consideradas como preditoras de má evolução, idades inferiores a 1 ano e superiores a 9 anos. No presente estudo, 7 pacientes tinham idade inferior a 12 meses (9,2%), 52 entre 1 e 9 anos (68,4%) e 17 com idade superior a 9 anos (22,3%). No estudo GBTLI 93, no qual foram analisados 853 pacientes de diferentes centros de tratamento do Brasil, foi encontrada a seguinte distribuição quanto à idade: 2% menores de um ano, 75% entre um e 10 anos e 23% entre 10 e 18 anos. Observamos uma frequência mais elevada de crianças com idade inferior a



1 ano no nosso estudo. Não se pode afirmar que este dado reflete uma característica da população de crianças com LLA da região de Ribeirão Preto, uma vez que o Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto é um centro de referência inserido numa região em que há instituições de menor porte e menor complexidade que realizam tratamento de doenças onco-hematológicas na infância. Por ser um fator reconhecido de mau prognóstico, uma maior proporção de lactentes na população do nosso estudo pode refletir um viés de seleção relacionado ao serviço, para o qual pacientes de maior gravidade são referenciados. (PUI *et al*, 2001; PUI *et al*, 2004; SOBOPE, 2000)

As características biológicas e genéticas apresentados por pacientes com diagnóstico de qualquer neoplasia, incluindo LLA, podem refletir uma peculiaridade da composição étnica de tal população. Caracterizado por ser um país colonizado por diversas culturas, e intensa miscigenação, a população brasileira apresenta características genéticas próprias, o que não nos permite extrapolar dados de pesquisas genéticas realizados em outras regiões do mundo para a realidade do Brasil. (POMBO-DE-OLIVEIRA *et al*, 2005; SILVA *et al*, 2002)

Nos últimos anos, uma série de estudos nacionais descreve as características biológicas e imunológicas de crianças com LLA. (REGO *et al*, 1996; DE SOUZA *et al*, 1998; (SILVA *et al*, 2002)

Entre os 76 pacientes analisados observamos uma frequência 73,6% de LLA B calla +, 17,1% de LLA T e 9,2% de LLA pró B. Essa distribuição foi semelhante à encontrada em um estudo prévio realizado entre os anos de 1985 e 1994 no nosso centro de tratamento: 6,5% de pró-B; 72,6% de B calla positivo e 16,4% de T. Um estudo que analisou 808 pacientes com diagnóstico de LLA tratados em diferentes estados do Brasil (Rio de Janeiro, Distrito Federal, Bahia, entre outros); foi observada uma distribuição de 55,4% de leucemias de células B, 15,1% de LLA T e 1,6% de LLA B madura. No estudo GBTLI 93, entre 586 pacientes com LLA nos quais foi realizada imunofenotipagem, 87% (513) eram LLA pré B e 13% (74) de

LLA T. Outros estudos realizados no Brasil e no mundo descrevem uma frequência de LLA T que oscila entre 7,4% a 19%. (REGO *et al*, 1996; DE SOUZA *et al*, 1998; SOBOPE, 2000; BARRETO, 2001; PAOLUCCI *et al*, 2001; SILVERMAN *et al*, 2001; SILVA *et al*, 2002; POMBO-DE-OLIVEIRA *et al*, 2005).

A incidência de LLA é discretamente maior entre crianças do sexo masculino quando comparada ao sexo feminino e essa diferença é maior na adolescência. (PAOLUCCI *et al*, 2001; SILVERMAN *et al*, 2001; LICR *et al*, 2006; FRAUMENI *et al*, 1974).

Na população de pacientes com diagnóstico com LLA admitidos no HCRP entre 1995 e 2007, o predomínio do sexo masculino foi confirmado (relação homem/mulher igual a 1,28), mas na população incluída no estudo (n=76), houve igual distribuição entre os dois sexos (38 vs 38). Estudos realizados no Brasil descrevem relações entre os sexos masculino e feminino de 1,04 (estudo GBTLI 93, com 867 pacientes), 1,28 (estudo multicêntrico com 1029 pacientes do Rio de Janeiro, Bahia, Distrito Federal, entre outros), 1,4 (na Bahia), 1,7 (no Recife). (SOBOPE, 2000; POMBO-DE-OLIVEIRA *et al*, 2005; BARRETO, 2001; LEITE *et al*, 2007).

Em relação à distribuição quanto ao grupo de risco, observamos um predomínio de pacientes de alto risco (56,5%). Nos resultados apresentados pelo estudo GBTLI 93, 48% dos pacientes foram classificados com de alto risco. Em estudo realizado na Bahia, 57,5% foram considerados AR e 42,5% RB, sendo que este grupo (assim como no nosso estudo) incluiu também os pacientes classificados com RBV pelo GBTLI-93 (BARRETO, 2001). Em estudo retrospectivo com 108 pacientes menores de 18 anos de idade, admitidos para tratamento de LLA na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), de janeiro de 1993 a dezembro de 2001, 67% dos pacientes foram considerados de alto risco, 21% RB e 12% RBV segundo os critérios do GBTLI 93. (LEITE *et al*, 2007). Pesquisa realizada na mesma cidade, mas em outro centro de tratamento (Instituto Materno Infantil de Pernambuco)

e que utilizou diferentes critérios para a classificação de risco, avaliou as características de pacientes com diagnóstico LLA tratados em diferentes períodos e encontrou proporções de pacientes de alto risco iguais a 59% (de 1994 a 1997) e 55% (de 1997 a 2002). (HOWARD *et al*, 2004).

Os dados encontrados no HCRP, na Bahia, no HEMOPE e no Instituto Materno Infantil de Pernambuco revelam um maior número de pacientes de alto risco quando comparados com os resultados do estudo nacional GBTLI-93. Assim como observado em relação à distribuição quanto à faixa etária, a explicação para estes achados pode estar no fato de que os estudos foram realizados em centros de referência para tratamento de doenças oncológicas na infância inseridos em regiões nas quais há outras instituições de menor complexidade que realizam tratamento de crianças com leucemias agudas. (BARRETO *et al*, 2001; HOWARD *et al*, 2004; LEITE *et al*, 2007)

## **5.2 MORFOLOGIA DO LCR E ACIDENTE DE PUNÇÃO LOMBAR**

A incidência de infiltração leucêmica no SNC foi de 5,2 %, um pouco maior do que é descrito na literatura (Vide tabela 13).

**Tabela 13.** Taxas de incidência de pacientes com infiltração do SNC ao diagnóstico

<b>Estudo</b>	<b>Ano</b>	<b>No pacientes</b>	<b>Envolvimento no SNC (%)</b>
AIEOP-91	1991-1995	1194	2.6
BFM-95	1995-1999	2021	2.9
CCG-1800	1989-1995	5121	3.3
COALL-92	1992-1997	538	3.1
DCLSG-ALL-8	1991-1996	467	3.0
DFCI-95	1996-2000	491	2.4
EORTC-CLG 5881	1989-1998	2065	2.6
NOPHO ALL 92	1992-1998	1143	2.8
SJCRH 138	1994-1998	247	2.8
UKALL	1997-2002	1935	3
GBTLI 93	1993-1999	853	1.7

AIEOP=Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica. BFM=Berlin-Frankfurt-Munster. CCG=Children's Cancer Group. COALL=Cooperative ALL Study Group. DCLSG=Dutch Childhood Leukemia Study Group. DFCI=Dana-Farber Cancer Institute consortium. EORTC-CLCG=European Organization for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukaemia Cooperative Study Group. NOPHO=Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology. SJCRH=St Jude Children's Research Hospital. UKALL=United Kingdom Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. GBTLI= Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemias na Infância (PUI, 2006)

Essas discrepâncias entre as taxas de infiltração leucêmica do SNC apresentadas pelos diferentes estudos podem ser secundárias à dificuldade no diagnóstico de infiltração leucêmica no SNC, o que reforça a necessidade de adoção de técnicas mais precisas e objetivas para análise dos casos de difícil definição. Um aspecto importante a ser considerado, e que já foi citado anteriormente, é a possibilidade de que tenha havido um viés de seleção da população relacionado à complexidade dos casos encaminhados para o HCFMRP, justificando a alta incidência de pacientes com SNC3.

Quando analisamos as características clínicas e laboratoriais apresentados no momento do diagnóstico, é interessante observar que, na nossa amostra, todos os pacientes com SNC 3

(n=4) apresentaram pelo menos um fator de risco descrito na literatura para infiltração do SNC (imunofenótipo T, leucometria elevada ou idade). (tabela 9) (MATLOUB *et al*, 2006; PUI *et al*, 2003). Além disso, reafirmando observações pregressas que associam a presença de infiltração leucêmica do SNC com evolução desfavorável, no presente estudo, três entre os quatro pacientes com SNC 3 foram a óbito. (SCHRAPPE *et al*, 2000; SILVERMAN *et al*, 2000; PUI *et al*, 2000).

Apesar de tradicionalmente, a infiltração leucêmica do SNC no momento do diagnóstico ter sido considerada como um fator de maior risco de recidiva, recentemente, a intensificação dos regimes quimioterápicos tem feito com que o status SNC 3 perca seu significado prognóstico (PUI *et al*, 2008). Em vários esquemas de tratamento adotados atualmente (incluindo GBTLI 99 e BFM 2002), o status do SNC no momento do diagnóstico não é mais considerado para estratificação de risco. (SOBOPE, 2000; PUI *et al*, 2008; FRONKOVA *et al*, 2008). Leva-se em consideração, a resposta à terapia de indução tanto na MO como no SNC. Interessante ressaltar que assim como já bem estabelecido em relação à infiltração medular, os critérios morfológicos utilizados para diagnóstico de infiltração do SNC são pouco sensíveis e subjetivos. Atualmente, a presença de DRM na MO é considerada fundamental na avaliação da resposta ao tratamento e no planejamento terapêutico de crianças com LLA. Da mesma maneira, a adoção de técnicas de detecção de DRM no LCR pode ser uma ferramenta útil e complementar no seguimento desses pacientes.

A ocorrência de APL foi estudada apenas no grupo tratado pelo GBTLI 99 (n=44). Em 27% dos pacientes houve APL. Essas taxas são muito elevadas quando comparadas às descritas na literatura e, como há indícios de que a ocorrência de APL possa estar relacionada a um comprometimento da evolução dos pacientes, esse é um fato alarmante. As explicações para alta frequência de APL podem estar no fato de que os pacientes são submetidos ao procedimento de punção lombar sem sedação, ao contrário do que ocorre nos

grandes centros de tratamento oncológico dos EUA, Europa e outros centros do Brasil. Além disso, o HCRP caracteriza-se por ser um Hospital Universitário, ou seja, um centro de treinamento de profissionais, no qual muitas vezes os procedimentos invasivos não são realizados pelos profissionais mais experientes. Com base nos achados, seria altamente recomendável que pelo menos a primeira punção lombar fosse realizada com paciente sedado e por profissional experiente.

### **5.3 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA NO LCR**

A leucemia é uma doença sistêmica que acomete de forma disseminada, em maior ou menor grau, todos os órgãos e sistemas do organismo. O critério atualmente utilizado para definição de infiltração leucêmica no SNC é presença de cinco ou mais células por mm<sup>3</sup> de LCR com presença de blastos. Entretanto, o SNC é considerado um santuário de células leucêmicas, ou seja, um local onde os linfoblastos indetectáveis ao diagnóstico sobrevivem protegidos pela barreira hemato-encefálica dos efeitos da quimioterapia. Em um momento subsequente essas células podem emergir favorecendo a ocorrência de recidiva medular ou no SNC.

Técnicas modernas de diagnóstico possibilitaram maior eficácia nos sistemas de classificação de risco, e maior acurácia nas estimativas de potencial de recidiva em crianças com LLA. Conseqüentemente, permitiram a otimização e o direcionamento da terapia, incluindo aquela voltada para o SNC. A pesquisa de DRM através de PCR ou citometria na MO após a indução de remissão é uma dessas técnicas, utilizada para estratificação de risco e adaptação do tratamento. (LANINGHAM *et al*, 2007).

Poucos estudos descrevem técnicas de detecção de DRM em amostras de LCR de pacientes com LLA ou outras neoplasias hematológicas.

Em 2005, Hegde e col publicaram um estudo que avaliou através de citometria de fluxo, 51 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico de linfoma de células B, dos quais um paciente com critério citológico de infiltração no SNC. Em 11 dos 51 pacientes (22%) foram detectadas, através de citometria de fluxo, populações anormais de células B, compatíveis com linfoma. No único paciente com critério morfológico de acometimento do SNC foi encontrada a maior concentração de células tumorais, que constituíam 99% das células. Entre os pacientes nos quais a citometria detectou células tumorais, a percentagem média dessas células na amostra concentrada de LCR foi de apenas 7% (variado de 0,2% a 99%). (HEGDE *et al*, 2005).

Não podemos fazer comparações entre os dados encontrados no estudo acima citado com os nossos resultados, visto que o primeiro analisou pacientes com diagnóstico de linfoma, uma doença com menor chance de infiltração de SNC quando comparado a LLA, e as técnicas de detecção de DRM utilizadas são distintas.

No nosso estudo, em 38 dos 76 pacientes analisados (50%), a pesquisa de DRM no LCR do diagnóstico através de PCR simplificado foi positiva. Este achado foi semelhante ao encontrado em estudo preliminar realizado no nosso laboratório que utilizou a mesma técnica e no qual a pesquisa de DRM em amostras de LCR do diagnóstico foi positiva em 45,9% dos pacientes (17/37).

O significado clínico da detecção de DRM na MO a níveis inferiores a  $10^{-4}$  é discutível. Protocolos que adotam pesquisa de DRM na MO no fim da indução para classificação de risco, utilizam como ponto de corte para determinação de mau prognóstico a detecção de células blásticas em concentrações maiores ou iguais a  $10^{-4}$ . (STANULLA *et al*, 2007)

A técnica de detecção de DRM utilizada no presente estudo tem uma sensibilidade de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ , intermediária entre as técnicas tradicionais de citomorfologia e as técnicas laboratoriais de alta sensibilidade (capazes de detectar uma célula em  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ ). É esperado que a presença de DRM detectada em nosso estudo tenha um maior significado prognóstico quando comparada com estudos que utilizem técnicas mais sensíveis.

Adicionalmente, a persistência de DRM no LCR durante a fase de indução (D14) e após o término dessa fase (D28), pode refletir (de uma forma mais precisa e mais sensível) uma má resposta ao tratamento quimioterápico. Um dos objetivos iniciais do nosso estudo era a avaliação da “velocidade de clareamento” do LCR (ou seja, de negatização da DRM) e a influência dessa velocidade sobre o prognóstico. Infelizmente, devido ao número restrito de pacientes estudados, não se pode extrapolar os resultados das análises realizadas com os pacientes com DRM positiva nas amostras de LCR dos D14 e D28. As curvas de sobrevida mostram uma tendência de diferença na evolução entre os pacientes com DRM no LCR do D28 + e DRM no LCR do D28-, entretanto, estudos complementares, com amostras maiores seriam necessários para confirmar tais achados.

Um ponto importante a ser considerado é o fato de que um dos critérios de exclusão de pacientes no nosso estudo foi a ausência de DNA extraído das amostras de LCR. Muito provavelmente, esses pacientes poderiam ter uma menor concentração de células no LCR. Nos pacientes com infiltração leucêmica do SNC espera-se uma maior concentração de linfócitos no LCR quando comparados aos pacientes em que não há acometimento do SNC. Ou seja, pode ser que o fato de não haver DNA extraído do LCR signifique ausência de linfoblastos no SNC, e a exclusão desses pacientes pode ter sido um viés do trabalho.



## 5.4 CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

Ao longo dos anos, foram descritas diversas características clínicas relacionadas a uma pior evolução dos pacientes com LLA. Entretanto, com a intensificação da quimioterapia e a melhoria das taxas de sobrevida, a maioria dessas características perdeu seu valor prognóstico. Atualmente, segundo os critérios adotados pelo GBTLI, os únicos fatores clínicos identificados no momento do diagnóstico que apresentam importância na determinação da evolução dos pacientes com LLA são a idade (os lactentes e maiores de 9 anos tem evolução desfavorável) e a leucometria do diagnóstico (maior que  $50.000/\text{mm}^3$ ), que é a manifestação mais fiel da extensão do clone leucêmico. É provável que essas características estejam diretamente relacionadas ou predisponham à ocorrência de outras características concomitantes que também possam influenciar a evolução dos pacientes.

Quando tentamos identificar características clínicas ou laboratoriais que pudessem estar associadas com um risco aumento de detecção de DRM no LCR, as únicas variáveis que mostraram uma correlação positiva foram a leucometria do diagnóstico e o grupo de risco dos pacientes. Considerando que a leucometria é a representação mais fidedigna da extensão do clone leucêmico, pode-se concluir que os pacientes com níveis elevados de GB ao diagnóstico têm maior probabilidade de apresentarem disseminação morfológica e/ou molecular não só no sistema nervoso central como em todo os órgãos e sistemas do organismo.

Nenhuma variável clínica ou laboratorial estudada apresentou correlação com a presença de DRM nas amostras de LCR do D14 e D28. Fato importante a ser considerado é o número limitado de pacientes que tiveram tais amostras estudadas (17 no D14 e 33 no D28), o que impossibilita uma análise com maior significado estatístico.

Também não foi identificado fator que possa estar associado à ocorrência de APL. Mais uma vez, o limitado número da amostra (n=11) pode ter comprometido os resultados.

## 5.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE EVENTO

A sobrevida livre de evento em 5 anos da amostra estudada foi de 66,2%. Quando analisados em separado os pacientes tratados por dois protocolos GBTLI 93 e GBTLI 99, observa-se uma melhora importante nas taxas de SLE. Certamente a intensificação do tratamento teve uma contribuição fundamental para a melhor evolução dos pacientes. Entretanto, outros fatores relacionados à melhor assistência aos pacientes podem ter contribuído para o incremento nas taxas de SLE: melhora no tratamento de suporte, diagnóstico mais precoce, etc.

Na comparação das taxas de SLE apresentadas pelos diferentes grupos de risco, observamos que a SLE dos pacientes de baixo risco foi superior à apresentada pelos de alto risco tanto no grupo tratado pelo GBTLI 93 quanto no grupo tratado pelo GBTLI 99. Estatisticamente essa diferença não teve significado; o que possivelmente pode ser atribuído ao tamanho reduzido das amostras (33 no GBTLI 93 e 44 no GBTLI99).

Quando comparamos as taxas de SLE dos pacientes cuja pesquisa de DRM no LCR do D0 foi positiva (excluídos pacientes nos quais houve APL) com a SLE dos pacientes com DRM no LCR do D0 negativa, o gráfico nos dá uma clara idéia de que há diferença nas taxas de SLE, o que não é confirmado pela análise estatística ( $p=0,18$ ). O mesmo ocorre quando analisamos o grupo de pacientes tratados pelo GBTLI 99. Já entre os pacientes tratados pelo GBTLI 93, a positividade de DRM no LCR do D0 teve impacto negativo na SLE com nível

de significância igual a 2,9%. A partir desses achados podemos chegar às seguintes observações:

1. A intensificação do tratamento quimioterápico no protocolo GBTLI 99 possibilitou uma melhora na evolução dos pacientes, e conseqüentemente fatores que poderiam ter influência negativa sobre o prognóstico perderam seu valor.
2. A amostra relativamente reduzida pode ter prejudicado a comprovação estatística da diferença nas taxas de SLE entre os grupos com DRM LCR D0 + e DRM LCR D0 – tratados pelo protocolo GBTLI 99;
3. Mesmo que com a ampliação da amostra conseguíssemos comprovar um impacto negativo da DRM no LCR do D0 entre os pacientes tratados pelo GBTLI 99, esse impacto seria bem menor do que aquele observado para os pacientes tratados pelo GBTLI 93. Nesse grupo, apesar da amostra pequena, houve diferença estatisticamente comprovada nas taxas de SLE dos pacientes com DRM no LCR do D0 positiva e negativa.

As análises das curvas de SLE dos grupos com DRM no LCR positiva nos D14 e D28 para comparação com as taxas de SLE dos pacientes com DRM no LCR negativas nesses mesmos períodos foram realizadas apenas para fins ilustrativos. Os tamanhos das amostras são extremamente reduzidos, o que impossibilita conclusões e observações consistentes.

No nosso estudo, a ocorrência de acidente de punção lombar provocou uma redução nas taxas de SLE dos pacientes ( $p=0.04$ ). Estes achados corroboram com a hipótese de que durante o APL há introdução de células leucêmicas provenientes dos capilares sanguíneos no LCR, contribuindo para uma evolução desfavorável. Os primeiros estudos que avaliaram a importância clínica da ocorrência de acidente de punção lombar foram publicados no fim da década de 90. Os achados iniciais demonstraram uma clara influência negativa da ocorrência

sobre a sobrevida dos pacientes. Entretanto, estudos mais recentes não confirmam esses dados e não acharam diferença nas taxas de sobrevida apresentadas por pacientes nos quais houve APL. Certamente essa discrepância entre os resultados deve-se às diferenças entre regimes de tratamento, e é provável que o risco aumentado de recidiva no SNC e de uma pior sobrevida livre de evento possa ser suplantado por uma terapia mais eficaz. (tabela 14) (GAJJAR *et al*, 2000; RECH *et al*, 2005; te Loo *et al*, 2006; PUI, 2006)

**Tabela 14.** SLE de pacientes com LLA no SNC e com APL

<b>Estudo (período)</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>SLE % (anos) Pacientes SNC 1</b>	<b>SLE % (anos) Pacientes com APL</b>	<b><i>p value</i></b>
BFM 95 (1995-1999)	1605	80 (5a)	73 (5a)	0.003
DCLSG ALL 7 & 8 (1988- 1997)	304	72.6 (10a)	58 (10a)	<0.01
SJCRH XI & XII (1984- 1991)	336	77 (5a)	60 (5a)	0.026
SJCRH XIII B (1994-1998)	145	80.6 (5a)	82.4 (5a)	0.67

Abreviaturas: BFM, Berlin-Frankfurt-Münster; DCLSG, Dutch Childhood Leukemia Study Group; ALL, acute lymphoblastic lymphoma; SJCRH, St. Jude Children's Research Hospital. (PUI 2006)

## 5.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

A detecção de DRM no LCR do D0 causou redução estatisticamente significativa nas taxas de SLD ( $p=0,04$ ). Essa diferença foi observada quando analisados separadamente os pacientes tratados pelo GBTLI 93. Entre o grupo tratado pelo GBTLI, não houve diferença nas taxas de SLD apresentadas pelos grupos com DRM no LCR do D0 positiva em relação aos pacientes com DRM no LCR do D0 negativa. Este achado consolida a observação de que, a intensificação do tratamento quimioterápico anulou o efeito negativo sobre o prognóstico da detecção DRM no LCR do D0.

Ao contrário do que foi observado em relação às taxas de SLE, a ocorrência de APL não exerceu influência negativa sobre as taxas de SLD. Pode ser que a ocorrência de APL no

D0 esteja relacionada a outras variáveis não avaliadas em nosso estudo (como plaquetopenia severa, infecção etc) relacionadas a uma maior gravidade e má evolução dos pacientes durante a indução. Com a exclusão dos pacientes que evoluíram para óbito durante a indução (além daqueles que foram a óbito em remissão), esse possível viés foi excluído, e a presença de APL não mostrou valor prognóstico.

## 6. CONCLUSÃO

1. A presença de células leucêmicas pode ser estudada em amostras de LCR de pacientes com LLA através de técnicas de PCR com a utilização de *primers* de consenso para IgH e receptores  $\gamma$  de células T.
2. A detecção de DRM no SNC é evento frequente em crianças com LLA e sua presença no momento do diagnóstico apresentou impacto negativo na evolução dos pacientes tratados pelo protocolo GBTLI-93., mas não causou mudanças nas taxas de SLE e de SLD dos pacientes tratados pelo protocolo GBTLI-99
3. Não houve correlação entre as variáveis clínicas estudadas e presença de DRM em amostras do D14 e D28, entretanto estes dados devem ser vistos com cautela devido ao número pequeno de casos analisados.
4. Leucometria inicial elevada e classificação em grupo de alto risco apresentaram correlação positiva com a detecção de doença residual mínima no LCR.do diagnóstico .
5. A ocorrência de APL esteve associada a maior taxa de evento desfavorável em pacientes tratados pelo protocolo GBTLI-99, mas não interferiu nas taxas de SLD.
6. A intensificação do tratamento pelo protocolo GBTLI-99, proporcionou um aumento nas taxas de SLE de crianças com LLA e parece ter sido capaz de anular o efeito negativo da

detecção de DRM no SNC sobre prognóstico observado entre pacientes tratados pelo protocolo GBTLI 93.

**7.** Análise de um número maior de casos é necessária para a confirmação destes achados.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARICO M, CONTER V, VALSECCHI MG, *et al.* Treatment reduction in highly selected standard-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. The AIEOP ALL-9501 study. **Haematologica**. Vol 90, nº 9, pag 1186-1191. 2005.
2. BARRETO LHS. Estudo de sobrevida em crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda. [dissertação mestrado]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2001.
3. BLEYER WA. Central nervous system leukemia. **Pediatric Clinical of North America**; Vol 35, pag 789-814. 1988.
4. BOROWITZ MJ, PULLEN DJ, WINICK N, MARTIN PL, *et al.* Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for residual disease detection: a report from the children's oncology group. **Clinical Cytometry (B)**. Vol 68, nº 1, pag 18-24. 2005.
5. BOSTROM BC, SENSEL MR, SATHER HN, *et al.* Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Blood**, Vol 101, pag 3809–3817. 2003.
6. BRUMPT C, DELABESSE E, BELDJORD K, *et al.* The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. **Blood**. Vol 96, nº 6, pag 2254-2261. 2000.
7. BURGER B, ZIMMERMANN M, MANN G, KUHL, LO'NING L, RIEHM H, REITER A, SCHRAPPE M. Diagnostic Cerebrospinal Fluid Examination in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Significance of Low Leukocyte Counts With Blasts or Traumatic Lumbar Puncture. **Journal of Clinical Oncology**. Vol 21, pag 184-188, 2003.
8. CAMPANA D, COUSTAN-SMITH E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. **Cytometry**. Vol 34, no 4, pag 139-152. 1999.
9. CAMPANA D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. **British Journal of Haematology**. Vol 121, pag 823-838. 2003.
10. CAVE H, BOSCH JVDWT, SUCIU S, GUIDAL C, WATERKEYN C, OTTEN J, BAKKUS M, THIELEMANS K, GRANDCHAMP B, VILMER E. European Organization for Research and Treatment of Cancer—Childhood Leukemia Cooperative Group. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**. Vol 339, pag 591–598. 1998.
11. CAZZANIGA G, GAIPA G, ROSSI V, BIONDI A. Minimal residual disease as a surrogate marker for risk assignment to ALL patients. **Reviews in clinical and experimental hematology**. Vol 7, pag 292-323. 2003.

12. CAZZANIGA G, BIONDI A. Molecular monitoring of minimal residual disease. In: Pui CH, editor. **Treatment of acute leukemias: new directions for clinical research.** Totowa, N.J., Humana, 2003. pag. 537-547.
13. CAZZANIGA G, BIONDI A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. **Haematologica.** Vol 90, n° 3 pag 382-390. 2005.
14. CHESSELLS JM, BAILEY C, RICHARDS SM. Intensification of treatment and survival in all children with lymphoblastic leukaemia: results of UK Medical Research Council trial UKALL X. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. **Lancet.** Vol 345 pag 143-148. 1995
15. CHESSELLS JM. Pitfalls in the diagnosis of childhood leukaemia. **British Journal of Haematology;** 114, pag 506-511, 2001.
16. CIUDAD J, SAN MIGUEL JF, LOPEZ-BERGES MC, VIDRIALES B, VALVERDE B, OCQUETEAU M, MATEOS G, CABALLERO MD, HERNANDEZ J, MORO MJ, MATEOS MV, ORFAO A. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology.** Vol 16 pag 3774-3781. 1998.
17. COUSTAN-SMITH E, SANCHO J, HANCOCK ML, RAZZOUK BI, RIBEIRO RC, RIVERA GK, RUBNITZ JE, SANDLUND JT, PUI DH, CAMPANA D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood.** Vol 96, pag 2691-2696, 2000.
18. COUSTAN-SMITH E, RIBEIRO RC, STOW P, ZHOU Y, PUI CH, RIVERA GK, PEDROSA F, CAMPANA D. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. **Blood.** Vol 108, vol 1 pag 97-102. 2006
19. CRIST W, BOYETT J, PULLEN J, VAN EYS J, VIETTI T. Clinical and biological features predict poor prognosis in acute lymphoid leukemia in children and adolescents: a Pediatric Oncology Group Review. **Medical Pediatric Oncology.** Vol 14, pag 135-9. 1986
20. CRIST W, SHUSTER J, LOOK T, BOROWITZ M, BEHM F, BOWMAN P, FRANKEL L, PULLEN J, KRANCE R, STEUBER P. Current results of studies of immunophenotype. Age and leukocyte-based therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia.** Vol 6, pag 162-6. 1992
21. DE SOUZA MH, DIAMOND HR, SANTOS MP, *et al.* Immunophenotypic Study of Acute Lymphoblastic Leukemia (A Prospective Study in Brazilian Children). **Medical and Pediatric Oncology.** Vol 31, pag 185-188. 1998.

22. DYER MJ. T-cell receptor delta/alpha rearrangements in lymphoid neoplasms. **Blood**. Vol 74, pag 1073. 1989.
23. DWORZAK MN, FROSCHL G, PRINTZ D, MANN G, POTSCHGER U, MUHLEGGER N, FRITSCH G, GADNER H. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia, **Blood**. Vol 99 pag 1952–1958. 2002.
24. EVANS AE, GILBERT ES, ZANDSTRA R: The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. **Cancer**. Vol 26, pag 404-409. 1970
25. FELIX CA, POPLACK DG. Characterization of acute lymphoblastic leukemia of childhood by immunoglobulin and T-cell receptor gene patterns. **Leukemia**. Vol 5, pag 1015. 1991
26. FINN WG, PETERSON LC, JAMES C, et al. Enhanced detection of malignant lymphoma in cerebrospinal fluid by multiparameter flow cytometry. **American Journal of Clinical Pathology**. Vol 110, pag 341-346. 1998
27. FORONI L, HARRISON JC, A.V. HOFFBRAND, M.N. POTTER. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia by molecular analysis. **British Journal of Haematology**. Vol 105, pag 7–24. 1999.
28. FRAUMENI JF, WAGONER J. Changing sex differentials in leukemia. **Public Health Reports**. Vol 79, pag 1093. 1974.
29. FRENCH CA, DORFMAN DM, SHAHEEN G, et al. Diagnosing lymphoproliferative disorders involving the cerebrospinal fluid: increased sensitivity using flow cytometric analysis. **Diagnostic Cytopathology**. Vol 23, pag 369-374. 2000.
30. GAJJAR A, RIBEIRO R, HANCOCK ML, RIVERA GH, MAHMOUD H, SANDLUND JT, CRIST WM, PUI CH. Persistence of circulating blasts after 1 week of multiagent chemotherapy confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. Vol 86 pag 1292–1295. 1995
31. GAJJAR A, HARRISON PL, SANDLUND JT, *et al.* Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in 146 American Society of Hematology childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. Vol 96 pag 3381-3384. 2000.
32. GERMANO G, DEL GIUDICE L, PALATRON S, *et al.* Clonality profile in relapsed precursor-B-ALL children by GeneScan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease monitoring. **Leukemia**. Vol 17, pag 1573–1582. 2003
33. GILCHRIST GS, TUBERGEN DG, SATHER HN, COCCIA PF, O'BRIEN RT, WASKERWITZ MJ, *et al.* Low numbers of CSF blasts at diagnosis do not predict for the development of CNS leukemia in children with intermediate-risk acute lymphoblastic

- leukemia: a Children Cancer Group report. **Journal of Clinical Oncology**. Vol 12, pag 2594-2600. 1994.
34. HARA J, BENEDICT SH, CHAMPAGNE E, *et al.* T cell receptor delta gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Investigation**. Vol 82, pag 1974. 1988
  35. HOWARD SC, PEDROSA M, LINS M, *et al.* Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. **Journal of American Medical Association**. Vol 291(20), pag 2471-5. 2004.
  36. JÓLKOWSKA J, DERWICH K, DAWIDOWSKA M. Methods of minimal residual disease (MRD) detection in childhood haematological malignancies. **Journal of Applied Genetics** Vol 48(1), pag 77-83. 2007.
  37. KITCHINGMAN GR, ROVIGATTI U, MAUER AM, *et al.* Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in T cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood** Vol 65, pag 725-729. 1985
  38. 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**. Vol 11, n° 12, pag 2192-2199, 1997.
  39. LAUER S, SHUSTER J, KIRSCHNER P, *et al.* Prognostic significance of cerebrospinal fluid (CSF) lymphoblasts (LB) at diagnosis (dx) in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Proceedings of the American Society for Clinical Oncology**. Vol 3, pag 317. 1994. In: ASCO meeting, 1994.
  40. LEITE EP, MUNIZ MTC, AZEVEDO ACAC, *e col.* Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**. Vol 7 (4), pag 413-421. 2007
  41. LI CR, CHIK KW, HA SY, *et al.* Improved outcome of acute lymphoblastic leukaemia treated by delayed intensification in Hong Kong children: HKALL 97 study. **Hong Kong Medical Journal**. Vol 19, pag 33-9. 2006.
  42. MAHMOUD H, RIVERA G, HANCOCK M, *et al.* Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**. Vol 329, pag314-319. 1993
  43. MARGOLIN JF, STEUBER CP, POPLACK DG. Acute Lymphoblastic Leukemia. In PIZZO FA, POPLACK DG. **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. 4ª Edição. Philadelphia, PA: Lippincott-Williams & Wilkins, 2002. Cap 19 pag 489-544.
  44. MASTRANGELO R, POPLACK D, BLEYER A, RICCADI R, SATHER H, D'ANGIO G. Report and recommendations of the Rome workshop concerning poor-prognosis acute

- lymphoblastic leukaemia in children: biologic basis for staging, stratification, and treatment. **Medical and Pediatric Oncology**. Vol 14 pag 191-194. 1986.
45. MATLOUB Y, LINDEMULDER S, GAYNON PS, *et al.* Intrathecal triple therapy decreases central nervous system relapse but fails to improve event-free survival when compared to intrathecal methotrexate: results of the Children's Cancer Group (CCG) 1952 study for standard-risk acute lymphoblastic leukemia. A report from the Children's Oncology Group. **Blood**. Vol 108, pag 1165-1173. 2006.
  46. MELESHKO AN, LIPAY NV, STASEVICH IV, POTAPNEV MP. Rearrangements of IgH, TCRD and TCRG genes as clonality marker of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Experimental Oncology**. Vol 27, n° 4, pag 319-324. 2005.
  47. MELESHKO AN, BELEVTSSEV MV, SAVITSKAJA TV, POTAPNEV MP. The incidence of T-cell receptor gene rearrangements in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia is related to immunophenotype and fusion oncogene expression. **Leukemia Research**. Vol 30, n°, pag 795-800. 2006.
  48. MOREAU EJ, LANGERAK AW, VAN GASTEL-MOL EJ, *et al.* Easy detection of all T cell receptor gamma (*TCRG*) gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. **Leukemia**. Vol 13, pag 1620-1626. 1999.
  49. NACHMAN J, CHERLOW J, SATHER HN, *et al.* Effect of initial central nervous system (CNS) status on event-free survival (EFS) in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Medical and Pediatric Oncology**. Vol 39, pag 277. 2002.
  50. ODOM LF, WILSON H, CULLEN J, *et al.* Significance of blasts in low-cell-count cerebrospinal fluid specimens from children with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**. Vol 66, pag 1748-1754. 1990.
  51. PAOLUCCI G, VECCHI V, FAVRE C, *et al.* Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Long-term results of the AIEOP-ALL 87 study. **Haematology**. Vol 86, pag 478-84. 2001;
  52. PEHAM M, PANZER S, FASCHING K, *et al.* Low frequency of clonotype Ig and T-cell receptor gene rearrangements in t(4;11) infant acute lymphoblastic leukaemia and its implication for the detection of minimal residual disease. **British Journal of Haematology**. Vol 117, pag 315-321. 2002.
  53. POMBO-DE-OLIVEIRA MS, CORDOBA JC, ALENCAR DM *et al.* Biological diversity variations of pediatric acute leukemia in Brazil: contribution of immunophenotypic profiles to epidemiological studies. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**. Vol 27(1) pag 21-26. 2005
  54. PUI CH, CAMPANA D. New Definition of Remission In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Leukemia**. Vol 14. pag 783-785. 2000.

55. PUI CH, BOYETT JM, RIVERA GK, et al: Long-term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. **Leukemia** Vol 14, pag 2286-2294. 2000
56. PUI CH, BOYETT JM, RIVERA GK, *et al.* Long-term results of Total Therapy studies 11, 12 and 13A for childhood acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. **Leukemia**. Vol 14, pag 2286-2294. 2000
57. PUI CH, CAMPANA D, EVANS WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia: current status and future perspectives. **Lancet Oncology**. Vol 2, pag 597-607, 2001.
58. PUI CH. Toward optimal central nervous system-directed treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**. Vol 21, pag 179-181. 2003.
59. PUI CH, SANDLUND JT, PEI D, *et al.* Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St. Jude Children's Research Hospital. **Blood**. Vol 104, pag 2690-2696. 2004.
60. PUI CH, RELLING MV, DOWNING JR. Acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal Medicine**. Vol 350, pag 1535-1548. 2004.
61. PUI CH, PEI D, SANDLUND JT, CAMPANA D, RIBEIRO RC, RAZZOUK BI, RUBNITZ JE, HOWARD SC, HIJYA N, JEHA S, CHENG C, DOWNING JR, EVANS WE, RELLING MV, HUDSON M. Risk of Adverse Events After Completion of Therapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**; Vol 23, n° 31, pag 7936-7941. 2005.
62. PUI CH, EVANS WE. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England Journal of Medicine**. Vol 354, pag 166-178. 2006.
63. RECH A, DE CARVALHO GP, MENESES CF, HANKINS J, HOWARD S, BRUNETTO AL. The influence of traumatic lumbar puncture and timing of intrathecal therapy on outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Hematology Oncology**. Vol 22, n° 6, pag 483-488. 2005.
64. REGO EM, GARCIA AB, VIANA SR, FALCAO RP. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in Brazilian patients. **Leukemia Research**. Vol 20, pag 349-55. 1996.
65. REGO FN, PINHEIRO GS, METZE K, LORAND-METZE I. Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**. Vol 36, pag 331-337. 2003
66. REITER A, SCHRAPPE M, LUDWIG WD, *et al* Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. **Blood**. Vol 84, pag 3122-3133. 1994.

67. SATHER H. Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Medical Pediatric Oncology**. Vol 14, pág 166-72. 1986
68. SCRIDELI CA, KASHIMA S, CIPOLLOTI R, DEFAVERY R, BERNARDES JE, TONE LG. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: comparison of three detection methods by PCR. **Leukemia Research**. Vol 26, pag 431-438. 2002.
69. SCRIDELI CA, QUEIROZ RP, TAKAYANAGUI OM, BERNARDES JE, TONE LG. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid cells in suspected leptomeningeal involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison to cytomorphological analysis. **Diagnostic Molecular Pathology**. Vol 12, pag 124-127. 2003.
70. SCRIDELI CA, QUEIROZ RP, TAKAYANAGUI OM, BERNARDES JE, MELO EV, TONE LG. Molecular diagnosis of leukemic cerebrospinal fluid cells in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**. Vol 89, pag 1013-1015. 2004.
71. SCRIDELI CA, QUEIROZ RP, KASHIMA S, SANKARANKUTTY BO, TONE LG. T cell receptor  $\gamma$  rearrangements in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: a analysis and implications for the study of minimal residual disease. **Leukemia Research**. Vol 28 pag 267-273. 2004.
72. SCRIDELI CA, QUEIROZ 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**; Vol 30, n° 8, pag 1049-1052, 2006.
73. SCHRAPPE M, REITER A, ZIMMERMAN M, *et al*: Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by ALL-BFM study from 1981 to 1995. **Leukemia**. Vol 14, pag 2205-2222. 2000
74. SCHRAPPE M, REITER A, LUDWIG WD, *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**. Vol 95, pag 3310–3322. 2000.
75. SILVA MLM, ORNELAS DE SOUZA MH, RIBEIRO RC, *et al*. Cytogenetic analysis of 100 consecutive newly diagnosed cases of acute lymphoblastic leukemia in Rio de Janeiro. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. Vol 137, pag 85–90, 2002
76. SILVERMAN LB, DECLERCK L, GELBER RD, *et al*: Results of Dana-Farber Cancer Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). **Leukemia**. Vol 14, pag 2247-2256. 2000

77. SILVERMAN LB, GELBER RD, DALTON VK, *et al.* Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91- 01. **Blood**. Vol 97, pág 1211-8. 2001
78. SMITH M., ARTHUR D., CAMITTA B. *et al.* Uniform Approach to Risk Classification and Treatment Assignment for Children with Acute Lymphoblast Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**. Vol 14, n<sup>o</sup>1, pag :18-24. 1996.
79. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância- GBTLI-LLA-1999. Campinas; 2000.
80. STANULLA M, CARIO G, MEISSNER B,*et al.* Integrating molecular information into treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia—A perspective from the BFM Study Group. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. Vol 39, pag 160–163. 2007.
81. STEWARD CG, GOULDEN NJ, KATZ F, *et al.* A polymerase chain reaction study of he stability of Ig heavy-chain and T-cell receptor delta gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. Vol 83, pag 1355-1362. 1994.
82. STEINHERZ PG, GAYNON PS, BRENEMAN JC, *et al.* Cytoreduction and prognosis in acute lymphoblastic leukemia—the importance of early marrow response: report from the Children's Cancer Group. **Journal of Clinical Oncology**. Vol 14, pag 389–398. 1996.
83. SZCZEPANSKI T, LANGERAK AW, WOLVERS-TETTERO ILM, *et al.* Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemia are less mature in adults than in children: Implications for selection of PCR targets for detection of minimal residual disease. **Leukemia**. Vol 12, pag 1081. 1998
84. SZCZEPANSKI T, PONGERS-WILLEMSE MJ, LANGERAK A, *et al.* Ig Heavy Chain Gene Rearrangements in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Exhibit Predominant DH6-19 and DH7-27 Gene Usage, Can Result in Complete V-D-J Rearrangements, and Are Rare in T-Cell Receptor ab Lineage. **Blood**, Vol 93, no 12: pag 4079-4085. 1999
85. SZCZEPANSKI T, BEISHUIZEN A, PONGERS-WILLEMSE MJ, *et al.* 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**. Vol 13, pag 196-205. 1999.
86. SZCZEPAŃSKI T, LANGERAK AW, WILLEMSE MJ, *et al.* T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. **Leukemia**. Vol 14, n<sup>o</sup> 7, pag 1208-1214. 2000.
87. SZCZEPANSKI T, ORFAO A, VAN DER VELDEN VH, *et al.* Minimal residual disease in leukaemia patients. **Lancet Oncology**. Vol 2, pag 409-417. 2001.



88. SZCZEPANSKI T, WILLEMSE MJ, VAN WERINGER *et al.* Precursor-B-ALL with D(H)-J(H) gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. **Leukemia**. Vol 15 pag 1415-23. 2001.
89. SZCZEPAN SKI T, WILLEMSE MJ, BRINKHOF B, *et al.* Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. **Blood**.,Vol 99, n 7 pag 2315-2323. 2002
90. TE LOO DM, KAMPS WA, VAN DER DOES-VAN DEN BERG A, *et al.* Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: experience of the Dutch Childhood Oncology Group. **Journal Clinical Oncology**. Vol 24, n<sup>o</sup>15, pag 2332-2336. 2006.
91. TRAINOR KJ, BRISCO MJ, WAN JH, *et al.* Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. **Blood**. Vol 78, n<sup>o</sup> 1 pag 192-196. 1991.
92. TUBERGEN D, CULLEN J, BOYETT J, *et al.* Blasts in CSF with a normal cell count do not justify alteration of therapy for acute lymphoblastic leukemia in remission: A Children's Cancer Group study. **Journal of Clinical Oncology**. Vol 12, pag 273-278, 1994.
93. UCKUN FM, GAYNON PS, SENSEL MG, *et al.* Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T lineage leukemic blasts: A Children's Cancer Group study. **Journal of Clinical Oncology**. Vol 15, pag 2214-2221. 1997.
94. VAN DER VELDEN VHJ, SZCZEPANSKI T, JMWIJKHUIJS, *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**. Vol 17, pag 1834-1844. 2003
95. VILMER E, SUCIU S, FERSTER A, *et al.* Long-term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia: a CLCG-EORTC report. **Leukemia**. Vol 14, pag 2257-2266. 2000.
96. ZHOU J, GOLDWASSER MA, LI A, DAHLBERG SE, *et al.* Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCIALL Consortium Protocol 95-01. **Blood**. Vol 110, pag 1607-1611. 2007

## APÊNDICES

### APÊNDICE A: Ficha Cadastro/Pesquisa - LLA

Nome: \_\_\_\_\_  
 Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_      Data do diag: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Reg HC: \_\_\_\_\_      Reg lab: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_      Grupo de Risco: \_\_\_\_\_  
 Imunofenotipagem: \_\_\_\_\_

Tratamento: \_\_\_\_\_

DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Sangue Periférico		MO		LCR	
GB		Bl		Cels	
Hb				Hem	
Plaq		PCR		PCR	

D07: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Sangue Periférico	
GB	
Hb	
Plaq	

D14: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Sangue Periférico		MO		LCR	
GB		Bl		Cels	
Hb				Hem	
Plaq		PCR		PCR	

D28: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Sangue Periférico		MO		LCR	
GB		Bl		Cels	
Hb				Hem	
Plaq		PCR		PCR	

### EVOLUÇÃO

Término do tto: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Óbito: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Recaída: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
 Último retorno: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Causa: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As leucemias e linfomas são tipos de câncer muito comuns em crianças. Com o tratamento adequado, as taxas de cura dessas doenças são de 75 a 80% nos casos de leucemia e de 65 a 90% nos casos de linfoma. Sabe-se que há alguns fatores que aumentam os riscos dessas doenças e que tornam menores as chances de cura. Um dos fatores que pioram a evolução da doença é a presença de células tumorais no líquido cefalorraquidiano (LCR).

No decorrer do tratamento, as crianças são submetidas a várias punções lombares para a administração de quimioterapia. Durante esta punção é colhido um pouco de LCR (5ml). Uma pequena parte desse material é utilizada para pesquisar a presença de célula tumoral. Outra parte deveria ser desprezada. Este material que não seria utilizado, será congelado e guardado adequadamente no Banco de LCR do Laboratório de Pediatria.

Atualmente está sendo desenvolvido um projeto de pesquisa que tem a finalidade de utilizar uma técnica mais sensível (mais poderosa) para identificar a presença de células tumorais no LCR. Para isso, será utilizado o material (LCR) estocado durante as punções lombares.

O uso deste material não implicará riscos adicionais para seu filho(a), nem exigirá que se submeta a qualquer procedimento adicional. O projeto de pesquisa foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital. Serão fornecidos esclarecimentos e informações sobre a pesquisa caso houver interesse. Os resultados obtidos serão aplicados em seu filho(a) se houver indicação.

Todo o material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade 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, do modo descrito, é necessário esclarecer que você e os pesquisadores não terão benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em permitir a guarda e a utilização deste material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário. Solicitamos manter seu endereço atualizado, pois caso necessário será contactado posteriormente.

Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética em Pesquisa deste Hospital.

Eu, \_\_\_\_\_, responsável legal pelo menor \_\_\_\_\_, li as informações acima e concordo com a inclusão do paciente acima citado no estudo **“Detecção de Doença Residual**

**Mínima através de técnica de PCR em amostras de líquido cefalorraquidiano em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda”, desenvolvido pela Dra Estefânia Rodrigues Biojone sob orientação do Prof. Dr Carlos Alberto Scrideli.**

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

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

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

RG do Prontuário Médico: \_\_\_\_\_

Endereço:

Rua \_\_\_\_\_ n° \_\_\_\_\_

CEP \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

Telefone: DDD (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Celular: DDD (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Pesquisadores Responsáveis:

Dra Estefânia Rodrigues Biojone. Fone: 3602 2651

Dr Luiz Gonzaga Tone. Fone: 3602 2772

Dr Carlos Alberto Scrideli. Fone: 3602 2651

Dra Rosane de Paula Queiroz. Fone: 3602 2651

# 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](#)