

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Ester Augusta Lima Vinhas Marques

Aplicação de marcadores imunofenotípicos por citometria de fluxo na detecção de
doença residual mínima e determinação do prognóstico em crianças com Leucemia

Linfóide Aguda B

RECIFE
2017

Ester Augusta Lima Vinhas Marques

Aplicação de marcadores imunofenotípicos por citometria de fluxo na detecção de doença residual mínima e determinação do prognóstico em crianças com Leucemia Linfóide Aguda B

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

RECIFE

2017

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- M357a Marques, Ester Augusta Lima Vinhas.
Avaliação de marcadores imunofenotípicos por citometria de fluxo na detecção de doença residual mínima e determinação do prognóstico em crianças com Leucemia Linfóide Aguda / Ester Augusta Lima Vinhas Marques. - Recife: s.n, 2017.
107 p. : ilus., tab., graf.; 30 cm p.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2017.
Orientadora: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva.
1. Leucemia de Células B – diagnóstico. 2. Leucemia de Células B - imunologia. 3. Neoplasia Residual – diagnóstico. 4. Neoplasia Residual - imunologia. 5. Citometria de Fluxo. I. Silva, Norma Lucena Cavalcanti Licínio da. II. Título.

Ester Augusta Lima Vinhas Marques

Aplicação de marcadores imunofenotípicos por citometria de fluxo na detecção de doença residual mínima e determinação do prognóstico em crianças com Leucemia Linfóide Aguda B

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data de aprovação: 27 de Março de 2017

BANCA EXAMINADORA

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Haiana Charifker Schindler (Membro interno) Instituto Aggeu
Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro (Membro interno) Instituto Aggeu
Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Virginia Maria de Barros Lorena (Membro externo) Instituto Aggeu
Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Terezinha de Jesus Marques. Salles (Membro externo) Universidade de
Pernambuco

Dedicatória

(In Memoriam)

Dedico esse trabalho ao meu pai,
Walter Sebastião Vinhas, minha avó, Ester Pires Lima
e minha Sogra, Alba Marques Pimentel dos Santos.
Com certeza, onde estiverem, estarão felizes
com essa conquista que também é deles.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me permitido vivenciar esse momento;

À minha mãe, Maria José, a quem eu que admiro e que sempre me inspirou com sua força e meu irmão Mário Augusto, por terem sempre me incentivado, acreditado e confiado em mim;

Ao meu marido Guilherme Marques, pelo amor, amizade, incentivo e ajuda sempre que necessário e aos meus filhos queridos Rodrigo e Marina, que mesmo sem entenderem, vivenciaram minha ausência principalmente nos momentos finais dessa tese;

À Renata Nascimento Silva, minha irmã do coração, pelo carinho que sempre me demonstrou, Eduardo e Cadu.

Ao meu Sogro, José Carlos por ser um segundo pai para mim e sempre disponível para me ajudar nos dias de maior sufoco e aos meus cunhados Viviane, Germano e minha concunhada Carla pelos momentos de lazer, extremamente necessários para superar as pressões;

À Dra. Norma Lucena, minha orientadora e amiga, pela dedicação, conhecimentos passados e compreensão nos momentos mais difíceis vividos ao longo dessa trajetória;

Ao Dr. Dario Campana e Dra. Elaine Coustan-Smith do Departamento de Imunopatologia e Terapia Celular, Departamento de Pediatria, Universidade Nacional de Cingapura, pela atenção sempre que necessário e ensinamentos fundamentais para a realização desse projeto;

Ao Dr. Francisco Pedrosa, responsável médico pelo setor de oncologia pediátrica do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP, por permitir a realização desse trabalho;

Aos colegas da equipe do laboratório de imunogenética : André, Fernanda, Jair , Laís, Maíra, Sávio e Renan pela amizade e carinho;

Aos colegas da turma SHOW do Mestrado/Doutorado BBS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Com certeza as disciplinas foram mais “suaves” com o convívio de todos vocês;

Agradecimento especial às amigas Rossana Santos e Renata Almeida pelo grande apoio, principalmente nas disciplinas, quando eu estava mais sobrecarregada e por estarem sempre disponíveis para me ajudar com a parte burocrática e a Alessandra Ramos pela amizade, companheirismo e pela “cobertura” sempre que eu precisei me ausentar do trabalho para resolver alguma questão referente a esse trabalho;

Aos amigos de sempre e ex-Aggeu Albert Martins e Juliana Lyra pelas conversas, hoje em dia mais virtuais do que presenciais;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho..

“Talvez não tenha conseguido fazer o
melhor, mas lutei para que o melhor
fosse feito. Não sou o que deveria ser,
Mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

(Marthin Luther King)

MARQUES, Ester Augusta Lima Vinhas **Aplicação de marcadores imunofenotípicos por citometria de fluxo na detecção de doença residual mínima e determinação do prognóstico em crianças com Leucemia Linfóide Aguda B.** 2017. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife , 2017.

Resumo

A leucemia linfoblástica aguda B (LLA B) corresponde a cerca de 80% dos casos das leucemias linfóides. Atualmente, é descrito que a intensidade da quimioterapia deve ser proporcional ao risco de recaída, isto significa que pacientes com menos chances de recidiva recebam menos quimioterapia, assim como os com mais chance de recaída tenham seu tratamento intensificado. Desse modo, para a condução do tratamento os pacientes são classificados em grupos. A monitorização da doença residual mínima (DRM) na leucemia linfoblástica aguda por citometria de fluxo é um dos critérios utilizados para avaliar a resposta ao tratamento e de grande importância para a atribuição de risco, além disso, a presença ou ausência de determinados marcadores imunofenotípicos também podem ter influência na resposta ao tratamento. Foi avaliada a aplicação de marcadores imunofenotípicos na DRM e determinação do prognóstico em crianças com LLA B. Foram estudados 384 pacientes entre 0-18 anos, com LLA B, atendidos no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), utilizando a citometria de fluxo. Os casos de LLA B, apresentaram positividade para os marcadores de linhagem B como CD19, CD79a citoplasmático, CD22, para marcadores de imaturidade como CD34 e TdT na maioria dos casos e ainda 21% dos casos apresentaram marcadores de outras linhagens (aberrantes). A coexpressão dos marcadores 10/19/34 foi observada em 98,6% dos casos. A DRM foi possível ser realizada em 358 pacientes, onde 212 (59%) foram positivos e 146 (41%) negativos, sendo classificados em risco especial, intermediário ou alto risco de acordo com os valores encontrados. Marcadores como o CD13, CD34 e TdT e foram associados com risco de recaída ou óbito em determinados grupos de risco. Dessa forma, os marcadores imunofenotípicos podem ser utilizados para aplicação na DRM e determinação do prognóstico.

Palavras Chave: Leucemia de células B, Neoplasia Residual , Citometria de Fluxo

MARQUES, Ester Augusta Lima Vinhas **Application of immunophenotypic markers by flow cytometry in the detection of minimal residual disease and determination of prognosis in children with acute lymphoid leukemia B.** 2017. Thesis (Doctoral in Biosciences and Biotechnology for Health) - Aggeu Magalhães Research Center , Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2017.

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia B (B-ALL) corresponds to 80% of cases of lymphoid leukemia. Currently, it is described that the intensity of chemotherapy should be proportional to the risk of relapse, this means that patients with less chance of relapse receive less chemotherapy, as well as those with more chance of relapse have their treatment intensified. Thus, in order to conduct the treatment, patients are classified into groups. Minimal Residual Disease (MRD) monitoring in acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry is one of the criteria used to assess response to treatment and of great importance for the attribution of risk, in addition the presence or absence of certain immunophenotypic markers may also have an influence on the response to treatment. The application of immunophenotypic markers in DRM and determination of prognosis in children with ALL was evaluated. We studied 384 patients between 0-18 years old, with B-ALL, attended at the Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Using flow cytometry. The B-ALL cases showed positivity for B-line markers such as CD19, CD79a, cytoplasmic, CD22, for immature markers such as CD34 and TdT in most cases and 21% of the cases had markers of other (aberrant) strains. The coexpression of markers 10/19/34 was observed in 98.6% of the cases. The MRD was possible to be performed in 358 patients, where 212 (59%) were positive and 146 (41%) negative, being classified as special risk, intermediate or high risk according to the values found. Markers such as CD13, CD34 and TdT were associated with risk of relapse or death in certain risk groups. Thus, immunophenotypic markers can be used for DRM application and prognostic determination.

Key words: Acute Lymphoblastic Leukemia, Minimal Residual Disease, Flow Cytometry

Lista de Ilustrações

Figura 1	Distribuição dos tipos de câncer mais comuns em crianças com idade até 15 anos	19
Figura 2	Esquema mostrando a origem das leucemias	20
Figura 3	Achados encontrados no Mielograma	31
Figura 4	Esquema de funcionamento do citômetro de fluxo	34
Figura 5	Marcadores imunofenotípicos normal da célula B em diferentes estágios de maturação	36
Figura 6	Representação da identificação da DRM pela análise da coexpressão CD19 x CD10	47

Lista de Quadros

Quadro 1	Classificação Franco-Americana-Britânica de leucemia linfoblástica aguda e suas características.	22
Quadro 2	Classificação de Leucemias linfoblástica de acordo com a Organização Mundial de Saúde 2008	23
Quadro 3	Classificação da WHO 2016 para leucemias agudas	24
Quadro 4	Relação entre tipo morfológico (FAB) e coloração citoquímica	32
Quadro 5	Principais Marcadores celulares encontrados nas Leucemias Linfóide de células B.	37
Quadro 6	Marcadores celulares das leucemias linfóides de células T	38
Quadro 7	Critérios para definir a ploidia de DNA de acordo com os valores encontrados na citometria de fluxo	39
Quadro 8	Principais translocações nas leucemias linfoblásticas agudas de células B	40
Quadro 9	Características dos principais métodos utilizados na detecção da doença residual mínima.	44
Quadro 10	Características dos principais métodos utilizados na detecção da doença residual mínima.	51
Quadro 11	Esquema terapêutico do protocolo RE-LLA para os diferentes grupos de risco.	52
Quadro 12	Painel de anticorpos utilizados no diagnóstico da leucemia linfóide B utilizando citômetro Facs Calibur de um laser (Período de 2005-2012)	54
Quadro 13	Painel de anticorpos utilizados no diagnóstico da Leucemia Linfóide B utilizando o citômetro Accuri C6 com dois lasers.(Período de 2012-2015)	55
Quadro 14	Painel de anticorpos utilizados para detecção da Doença Residual mínima	56
Quadro 15	Iniciadores usados para a detecção das translocações pesquisadas	58
Quadro 16	Classificação definitiva das crianças com leucemia de células B conforme a presença de doença residual mínima	67

Lista de Tabelas

Tabela 1	Distribuição da taxa anual de incidência das leucemias linfoides agudas da infância até 14 anos em diferentes áreas geográficas	26
Tabela 2	Incidência da leucemia linfóide aguda por região geográfica no Brasil por milhão de habitantes	27
Tabela 3	Características demográficas e laboratoriais das crianças atendidas com leucemia linfóide B atendidas no Instituto de Medicina Integral professor Fernando Figueira (IMIP)	61
Tabela 4	Marcadores de superfície e intracelular expressos em diferentes subtipo de LLA B .	63
Tabela 5	da ploidia com o imunofenótipo e aberrações cromossômicas	65
Tabela 6	Distribuição dos casos de leucemia linfóide classificadas ao diagnóstico como de alto risco de acordo com os critérios clínicos e laboratoriais definidos pelo Nacional Cancer Institute of United States of American	66
Tabela 7	Marcadores Imunofenotípicos encontrados nos diferentes grupos de risco	69
Tabela 8	Significância dos diferentes marcadores analisados no grupo baixo risco	69
Tabela 9	Significância dos diferentes marcadores analisados no grupo de risco	71
Tabela 10	Significância dos diferentes marcadores analisados grupo de alto risco	73

Lista de abreviaturas e siglas

ABL	Proto-oncogene, não receptor de tirosina quinase
ANAE	Alfa-naftil acetato estearase
APC	Aloficocianina
CAE	Cloroacetato estearase
CD	Cluster of differentiation (Grupo de diferenciação)
CALLA	Common acute lymphoblastic leukemia-antigen (Antígeno comum da leucemia linfóide aguda)
DEPC	Diethyl pirocarbonato
DHL	Desidrogenase Láctea
DRM	Doença Residual Mínima
EBV	Vírus Eppestein-Baar
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (
EGIL	European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (Grupo Europeu para Classificação Imunológica de Leucemias)
ETPs	Early T precursors (Percursor inicial de células T)
FAB	Franco – Americano- Britânico
FITC	Isotiocianato de Fluorosceína
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization (Hibridização fluorescente <i>in situ</i>)
FLT3	Tirosino-quinase 3 Fms-relacionado
FSC	Forward scatter (Dispersão frontal)
HeNe	Hélio-Neônio
HLA	Human leukocyte antigen (Antígeno Leucocitário Himano)
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano
GAPDH	Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase
IgM	Imunoglobulina M

IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ID	Índice de DNA
LAIP	Leukemia-Associated Immunophenotype (Imunofenótipo Associado a Leucemia)
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo Maior de Histocompatibilidade)
MPO	Mieloperoxidase
NCI	National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer)
NOS	Not otherwise specified (Não especificado)
NPM1	Nucleofosfamina 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Ácido para-aminossalicílico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PercP	Peridilclorofina-proteína
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RT-PCR	Transcriptase reversa- Reação em cadeia da polimerase
SBB	Sudan Black B
SSC	Side Scatter (Dispersão Lateral)
SNC	Sistema Nervoso Central
TdT	Deoxinucleotidil transferase terminal

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Câncer Pediátrico	18
2.2 Leucemias	19
2.3 Leucemias Linfóides	20
2.4 Epidemiologia	24
2.5 Etiologia	25
2.5.1 Fatores Genéticos	27
2.5.2 Fatores ambientais	28
2.5.3 Infecções Virais	28
2.5.4 Fatores Imunológicos	29
2.6 Diagnóstico	29
2.6.1 Diagnóstico Clínico.....	30
2.6.2 Mielograma.....	31
2.6.3 Classificação das Leucemias Linfóides.....	31
2.6.3.1 <i>Citoquímica</i>	32
2.6.3.2 <i>Citometria de fluxo</i>	32
2.6.3.3 <i>Imunofenotipagem</i>	34
2.6.3.4 <i>Leucemia Linfoide Aguda subtipo B</i>	35
2.6.3.5 <i>Leucemia Linfoide Aguda subtipo T</i>	38
2.6.4 Determinação do índice de DNA	39
2.6.5. Caracterização Genética	40
2.7 Leucemia linfoide aguda de células B	41
2.7.1 Fatores prognósticos e classificação de risco na leucemia linfoide aguda B ...	41
2.7.2 Tratamento baseado na Classificação de Risco.....	42
2.8 Avaliação de Doença Residual Mínima	43
2.8.2 Doença residual mínima em leucemia de células B por citometria de fluxo	45
3 JUSTIFICATIVA	48
4 OBJETIVOS	49
4.1 Geral	49
4.2 Específicos	49
5 METODOLOGIA	50

5.1 Desenho de Estudo	50
5.2 Pacientes, local de estudo e período de coleta e considerações éticas	50
5.3 Critérios de inclusão e exclusão e classificação de risco	50
5.4 Variáveis de estudo e coleta de dados	50
5.6 Amostras de pacientes	53
5.7 Separação de células	53
5.8 Citometria de fluxo	53
5.8.1 Diagnóstico das leucemias	53
5.8.2 Avaliação da Doença Residual mínima (DRM)	55
5.9 Determinação do Índice de DNA	57
5.11 Análise dos dados	58
6 RESULTADOS	59
6.1 Perfil demográfico e laboratorial dos pacientes	59
6.2 Frequência de marcadores imunofenotípicos em leucemia de células B... ..	60
6.3 Frequência de translocações cromossômicas em leucemia de células B... ..	62
6.4 Determinação do índice de DNA e associação com imunofenotipagem e biologia molecular.....	64
6.5 Impacto da avaliação de doença residual mínima na classificação de risco das crianças com leucemia de células B	65
6.6 Frequência dos marcadores imunofenotípicos nos grupos de risco e prognóstico.....	67
7 DISCUSSÃO	75
8. CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	102
APÊNDICE B - CLASSIFICAÇÃO DE RISCO, APÓS A REALIZAÇÃO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA.....	104
APÊNDICE C - LISTA DOS CLONES DE ANTICORPOS UTILIZADOS NO ESTUDO	105
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	106
ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CYTOMETRY: PART B.....	107

1 INTRODUÇÃO

A leucemia aguda pode ser definida como uma proliferação clonal maligna de células precursoras na medula óssea de etiologia desconhecida, que leva à substituição da hematopoiese normal de células imaturas (ONCIU et al., 2009, WOO; ALBERTI; TIRADO, 2014). Na infância, a leucemia linfoblástica aguda da linhagem B (B-ALL) representa 80% dos casos (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015).

Fatores biológicos e fatores clínicos têm sido correlacionados como fatores prognóstico da doença, buscando o desenho de novos protocolos de tratamento de acordo com o risco de recidiva. Para o sucesso do tratamento, a intensidade da quimioterapia deve ser proporcional ao risco, impedindo que os pacientes com menos chances de recidiva recebam quantidades excessivas de quimioterapia e intensificando a quimioterapia para pacientes com risco elevado de recaída (CAMPANA; PUI, 2017; CAZE et al., 2010, PUI et al., 2011). Entre os fatores considerados para a recaída de risco de acordo com os critérios do National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos, LLA e em crianças são baseados na idade, número de leucócitos no diagnóstico, ploidia, presença de rearranjos genéticos e avaliação de Doença Residual Mínima (DRM). De acordo com esses parâmetros, os pacientes são divididos em baixo, intermediário e alto risco, e têm diferentes tratamentos para cada categoria (CAMPANA et al., 2010, PUI et al., 2015).

A determinação da doença residual mínima na leucemia LLA é de grande importância na avaliação da resposta ao tratamento e tornou-se essencial para a atribuição de risco nos protocolos de tratamento contemporâneos. Vários métodos têm sido propostos para a identificação de DRM, incluindo RT-PCR, Q-PCR e citometria de fluxo (COUSTAN-SMITH et al., 2009; HEALTH QUALITY ONTARIO, 2016; SZCZEPANSK et al., 2007). A citometria de fluxo é considerada o método bastante eficaz para o diagnóstico, caracterização e monitoramento via determinação da doença residual mínima da leucemia aguda, devido à sua velocidade e sensibilidade e a combinação de características morfológicas (tamanho e complexidade interna) e o painel de anticorpos que permite a definição da linhagem e do estágio de maturação celular (CAMPANA et al., 2002; ROCHA et al., 2000).

Diversos marcadores foram identificados como candidatos a detecção da doença residual mínima dentre eles a coexpressão entre CD10/CD19 e ou CD34 ,

presente em mais de 90% dos casos, sendo uma metodologia capaz de avaliar a DRM e assim poder classificar os pacientes em grupos terapêuticos distintos para uma melhor condução do tratamento (COUSTAN-SMITH et al., 2006).

Nos últimos anos, marcadores imunológicos também começaram a ser utilizados para avaliar a resposta ao tratamento, uma vez que alguns estudos têm vindo relacionar a presença ou ausência de determinados marcadores e prognóstico, sendo importante avaliar o comportamento dos marcadores imunofenotípicos nos diferentes grupos terapêuticos formados a partir da classificação de risco pela DRM (BOROWITZ et al., 2015; JIANG et al., 2010; KIM et al., 2015; NAKAMURA et al., 2001).

Dessa forma, o estudo desses marcadores e suas aplicações na determinação do prognóstico , juntamente com a determinação da doença residual mínima, é de grande importância para uma melhor classificação de risco do paciente e conseqüentemente um tratamento com chances mais elevadas de sucesso.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer Pediátrico

O câncer pediátrico é uma patologia que atinge a faixa etária entre 0-18 anos de idade e é considerado raro quando comparado com os tumores no adulto sendo responsável por cerca de 1 a 3% dos casos de câncer na população mundial. No Brasil, o câncer pediátrico já representa 8% do total de mortes na faixa pediátrica, sendo assim considerada a primeira causa de morte por doença entre crianças a partir dos 5 anos de idade da mesma forma que ocorre nos países desenvolvidos (MURPHY et al., 2013). Segundo Murphy (2013) a incidência de malignidades pediátricas pode variar entre 70 a 140 de ocorrências por milhão no mundo sendo que no Brasil foram estimados cerca de 12.600 novos casos de câncer pediátrico por ano no período de 2016 e 2017 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016). Dentre as Regiões estimadas com maior número de casos, destacam-se a região Sudeste com 6.050 casos novos e Nordeste com 2.750 casos novos, sendo 400 novos casos estimados para o Estado de Pernambuco (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER 2016; RIBEIRO et al., 2016). Para as regiões Sul, Centro-Oeste e Norte são estimados cerca de 1.320, 1.270 e 1.210 novos casos respectivamente (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

Dentre os tipos de câncer que mais acometem a faixa etária infantil, as leucemias e os linfomas foram descritos como os mais frequentes no Brasil (SILVA ; MATTOS; TEIXEIRA, 2013) e no mundo (PIZZO; POPLACK, 2011), seguidos pelos tumores de sistema nervoso central. Entretanto, recentemente, conforme demonstrou um estudo realizado com pacientes de diferentes regiões, os tumores do sistema nervoso central passaram a ser o segundo tipo de câncer mais diagnosticado em diversas regiões, exceto na África onde os linfomas aparecem em primeiro lugar em número de casos (figura 1) (RIBEIRO et al., 2016). Muitos desses tipos de câncer são de difícil diagnóstico devido a sua característica indiferenciada, porém, a cada dia, a classificação dos tumores pediátricos ganha mais detalhamento, devido aos avanços nas técnicas laboratoriais baseadas na biologia molecular, imunologia e genética celular (REIS et al., 2011).

Em Recife, dados do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

(IMIP) de 1994 até 2011 mostraram uma maior predominância das Leucemia, seguida pelos linfomas e tumores de sistema nervoso central e uma incidência de 41 por milhão (PEDROSA ; LINS, 2002; LINS et al., 2016).

Figura 1. Distribuição dos tipos de câncer mais comuns em crianças com idade até 15 anos.



Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2016, tradução a autora)

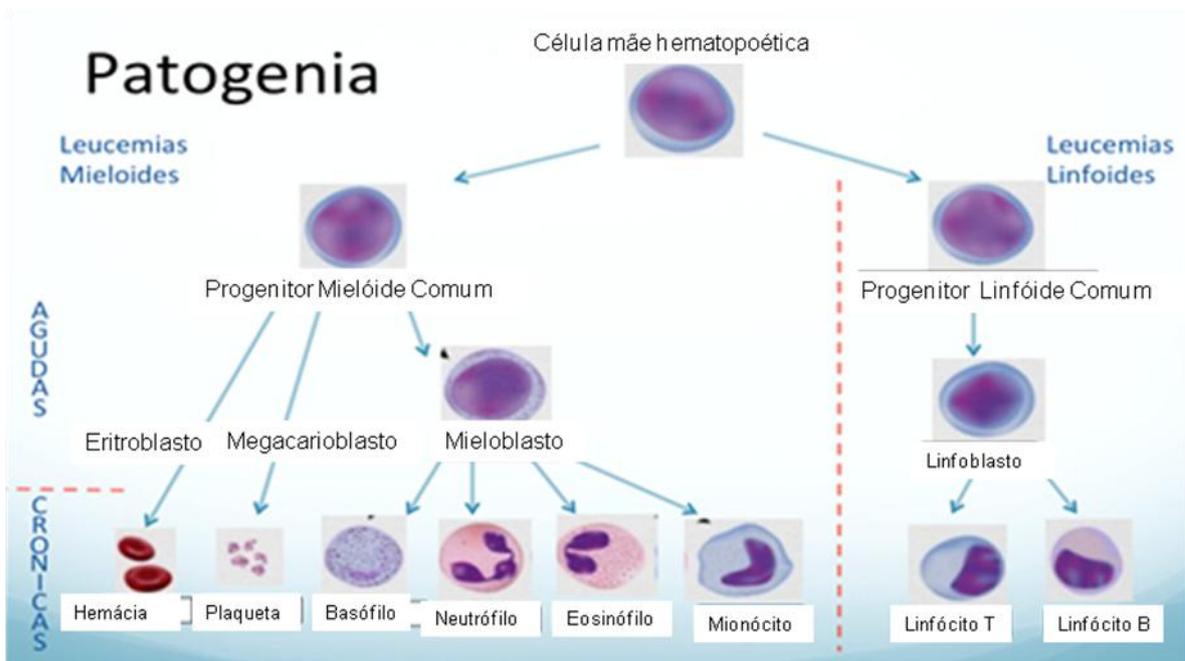
Nota: valores em percentual

2.2 Leucemias

As leucemias são neoplasias do sistema hematopoiético, compreendidas por um grupo heterogêneo de doenças que afetam a produção dos glóbulos brancos (leucócitos) sendo esses substituídos por leucócitos neoplásicos com função anormal e cuja proliferação desordenada suprime a proliferação normal das demais linhagens hematológicas (LANE, GILLIAND, 2010; PARK et al., 2012). Dependendo da forma de evolução da doença podem ser classificadas em agudas (evolução rápida) ou crônicas (evolução lenta) (HAMERSCHLAK et al., 2008; HOFFBRAND; MOSS, 2012; LAMEGO et al., 2010). A leucemia aguda pode ser definida como uma proliferação clonal maligna de células precursoras na medula óssea de etiologia desconhecida, que leva à substituição da hematopoese normal por células imaturas (blastos) com perda da sua função normal (MARTINS; FALCÃO, 2000; PELLOSO et al., 2003), enquanto nas leucemias crônicas ocorre a hiperplasia de elementos maduros com desvio escalonado de maturação dos leucócitos, podendo estes

manter algumas de suas funções (BAIN, 2003; QUIXABEIRA; SADDI, 2008). Em relação ao tipo celular envolvido, podemos classificar as leucemias em Linfóide, Mielóide ou Bifenotípica quando as duas linhagens celulares estão envolvidas. Em pediatria, a leucemia linfoblástica aguda (LLA), corresponde de 75% a 80% das leucemias, a leucemia mielóide aguda (LMA), representa 20% a 25% dos casos e a leucemia mielóide crônica (LMC), presente em até 5% dos casos registrados. A leucemia linfóide crônica é raramente descrita em crianças, e a bifenotípica ocorre em menos de 1% (COLBY-GRAHAM; CHORDAS, 2003). A figura 2 apresenta como são formadas as leucemias agudas/ crônicas e linfóide/mielóide.

Figura 2 - Esquema mostrando a origem das leucemias



Fonte: Martins (2016)

Nota: Célula tronco Hematopoética originando as linhagens Mielóides e Linfóides com suas respectivas diferenciações

2.3 Leucemias Linfóides

As leucemias agudas correspondem a cerca de um terço dos casos de câncer pediátrico e são classificadas em linfóide ou mielóide dependendo da linhagem celular que a originou, sendo a LLA a que mais acomete a faixa etária pediátrica (ANNESLEY; BROWN, 2015; PUI, et al., 2011). A leucemia linfóide aguda é o resultado de uma proliferação clonal maligna de células progenitoras linfóides (WOO ;ALBERTI; TIRADO, 2014), que por motivos ainda desconhecidos sofre alteração no

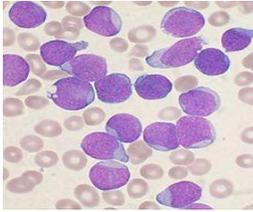
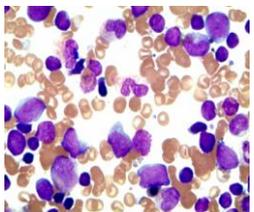
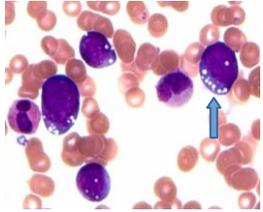
seu processo de reprodução e crescimento, levando ao acúmulo de um clone neoplásico (linfoblastos) na medula óssea, esse clone leucêmico pode ainda sair da medula óssea e infiltrar diversos órgãos, como fígado, baço, linfonodos, rins e cérebro, causando um mal funcionamento do organismo (MEENAGHAN; DOWLING; KELLY, 2012; ONCIU, 2009; PUI; RELING; DOWNING, 2004).

Em 1976, as leucemias agudas foram separadas em subtipos por um grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos (classificação FAB) tomando por base critérios morfológicos e citoquímicos, definindo como leucemia aguda quando apresentavam mais de 30% de blastos na medula óssea (FARIAS; CASTRO, 2004). A leucemia linfóide aguda foi classificada em três subtipos designados L1, L2 e L3, de acordo com critérios morfológicos que leva em conta características celulares como a relação do tamanho núcleo/citoplasma, presença de nucléolos, regularidade da membrana nuclear, tamanho da célula, basofilia e presença de vacúolos para distinguir entre os tipos celulares (VARDIMAN et al., 2009; WANDT et al., 2010).

Os Blastos tipo L1 são pequenos com alta relação do núcleo/citoplasma (que é escasso), são células com nucléolo indistinto e núcleo regular. Os blastos tipo L2 são maiores, possuem população heterogênea, com baixa relação núcleo/citoplasma; nucléolos proeminentes com padrão de condensação da cromatina variável e forma nuclear irregular já os Blastos tipo L3 são caracterizados por citoplasma profundamente basófilo e proeminente, além de uma vacuolização citoplasmática. As características desses subtipos celulares estão apresentados no Quadro 1. Aproximadamente 85% de crianças com LLA têm morfologia do tipo L1, 14% são L2 e 1% para L3, enquanto que o subtipo L2 é mais comum em adultos (CONTER et al., 2004; WANDT et al., 2010).

Com o surgimento de novas técnicas de diagnóstico, principalmente a imunofenotipagem, essa classificação foi revista em 2001 e 2008 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que propôs uma nova classificação baseada não só na morfologia, mas também incluindo informações sobre citoquímica, imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular, que pudessem auxiliar na condução terapêutica (JAFFE et al., 2001; VARDIMAN et al., 2009), além disso passou a considerar a presença de pelos menos 20% de linfoblastos na Medula Óssea, suficiente para o diagnóstico da doença (ONCIU et al., 2009; WANDT et al., 2010).

Quadro 1 - Classificação Franco-Americana-Britânica de leucemia linfoblástica aguda e suas características.

Características celulares	L1	L2	L3
Morfologia			
Diâmetro celular	Predominância de células pequenas e homogêneas	Grandes e heterogêneas	Grandes e homogêneas
Cromatina nuclear	Fina ou aglomerada	Fina	Fina
Forma do núcleo	Regular podendo apresentar fenda ou endentação	Irregular podendo apresentar fenda ou endentação	Regular, redondo ou oval
Nucléolos	Indistintos ou não visíveis	1 ou mais por célula, grandes e proeminentes	1 ou mais por célula, grandes e proeminentes
Quantidade de citoplasma	Escassa	Moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Ligeira	Ligeira	Intensa
Vacúolos Citoplasmáticos	Ausentes	Ausentes	Presentes

Fonte: Adaptado de Alves et al.(2012)

Nota: fotos cedidas por Dra. Tereza Fonseca (IMIP)

A nova classificação, mostrada no Quadro 2, permitiu a elaboração de protocolos de tratamento diferenciado de acordo com as alterações genéticas encontradas e o risco de recaída.

Quadro 2 - Classificação de Leucemias linfoblástica de acordo com a Organização Mundial de Saúde 2008.

<p>Leucemia\ Linfoma Linfoblástica B com anormalidades genéticas recorrentes:</p> <p>Leucemia\ Linfoma Linfoblástica B com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL</p> <p>Leucemia\ Linfoma Linfoblástica B com t(v;11q23);MLL</p> <p>Leucemia\ Linfoma Linfoblástica B com t(12;21)(p13;q22), TEL-AML1 (ETV6Runx1)</p> <p>Leucemia\ Linfoma Linfoblástica B com hiperdiploidia</p> <p>Leucemia\ Linfoma Linfoblástica B com hipodiploidia</p> <p>Leucemia\ Linfoma Linfoblástica B com t(5;14)(q31;q32) IL3-CMI</p> <p>Leucemia\ Linfoma Linfoblástica B com t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1</p> <p>Leucemia\ Linfoma linfoblástica B, não categorizada nos itens anteriores.</p> <p>Leucemia\ Linfoma Linfoblástica T</p>

Fonte: VARDIMAN et al (2009)

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, tais como a análise de expressão de genes e sequenciamento de nova geração novos biomarcadores foram identificados e associados com leucemias, melhorando assim tanto os critérios de diagnóstico como a avaliação do prognóstico da doença (ARBER et al., 2016). Por esse motivo, em 2016, a OMS juntamente com a Sociedade de Hematopatologia e Associação Européia de Hematopatologia publicaram uma nova classificação para as leucemias incorporando dados clínicos, prognósticos, morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares que surgiram desde a última edição após estudos clínicos e científicos (ARBER et al., 2016; BENNETT et al., 2016). A nova classificação da OMS para as leucemias agudas está mostrada no quadro 3.

Dessa forma, as LLA puderam ser diferenciadas principalmente em LLA de células B, LLA de células T e Ambíguas além disso, recentes pesquisas levaram a descoberta de numerosas alterações genéticas, incluindo mutações em genes responsáveis por vias de sinalização celular, supressão tumoral e regulação do ciclo celular. O entendimento e identificação dessas alterações é de grande importância para a estratificação de risco do paciente e uma maior chance de sucesso no tratamento (WOO et al., 2014).

Quadro 3 - Classificação da WHO 2016 para leucemias agudas

<p>Neoplasia de células plasmocitóides dendríticas blásticas</p> <p>Leucemia aguda de linhagem ambígua</p> <p>Leucemia aguda indiferenciada</p> <p>Leucemia aguda de fenótipo misto (MPAL) com t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></p> <p>Leucemia aguda de fenótipo misto com t(v;11q23.3); rearranjo <i>KMT2A</i></p> <p>Leucemia aguda de fenótipo misto , B/mieloide, NOS</p> <p>Leucemia aguda de fenótipo misto, T/mielóide , NOS</p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B</p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B, NOS</p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes</p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(v;11q23.3); rearranjo <i>KMT2A</i></p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i></p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B com hiperploídia</p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B com hipoploídia</p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31.1;q32.3) <i>IL3-IGH</i></p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;13.3); <i>TCF3-PBX1</i></p> <p><i>Classe provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico B , BCR-ABL1-like</i></p> <p><i>Classe provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico B , com iAMP21</i></p> <p>Leucemia/Linfoma linfoblástico T</p> <p><i>Classe provisória: leucemia linfoblástica precursora Early T-cell</i></p> <p><i>Classe provisória: Leucemia/Linfoma linfoblástico células Natural Killer (NK)</i></p>
--

Fonte: ARBER et al.(2016).

Nota: LMA: Leucemia mieloide aguda; NOS.: Not otherwise specified (Não especificado)

2.4 Epidemiologia

As leucemias linfoides são as mais comuns na infância com cerca de 75.000 casos novos já diagnosticados no mundo, com uma taxa de incidência de aproximadamente 48 casos por milhão e um pico de incidência em torno dos 3- 4 anos de idade (LINS et al., 2012; REIS et al., 2011). Há uma tendência de que os países mais industrializados, com população com mais recursos financeiros, apresentem taxas mais altas de LLA. Variações intermediárias são encontradas em alguns países do leste da Europa e baixa incidência ocorre em Israel, China e Índia (Tabela 1) (PARKIN; MUIR, 1992; REIS et al., 2011). Nos Estados Unidos são diagnosticadas com leucemia linfóide aguda em torno de 3.800 crianças por ano

com epidemiologia semelhante no Brasil (ESPARZA; SAKAMOTO, 2005; WHITEHEAD et al., 2016). No Brasil, Reis et al. (2011) avaliaram a incidência de leucemia nas diferentes regiões e observou uma grande variação de acordo com a área geográfica (Tabela 2). Estudos realizados no Nordeste Brasileiro diagnosticaram 156 casos de leucemia linfóide no Ceará (entre 2003-2006), 270 casos na Bahia (entre 2000-2004) e 123 casos na cidade do Recife, Pernambuco (entre 1998-2007) (LINS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2008; SANTANA et al., 2006). Em relação ao gênero, diversos estudos demonstram uma maior incidência no sexo masculino (LINET et al., 2016; SANTANA et al., 2006;). Parkin et al. (1993) mostraram a incidência por gênero em diversas regiões mundiais e os dados estão demonstrados no quadro 4. Em relação a raça, foi demonstrado que na população Americana existe uma maior incidência nos brancos e hispânicos em relação aos negros, porém na população brasileira há uma grande miscigenação de raças apresentando características genéticas distintas das populações brancas e negras dificultando a comparação entre essas duas populações. Talvez por esse mesmo motivo há no Brasil uma maior incidência de casos na raça parda (PIMENTA et al., 2006; REIS et al., 2011, SANTANA et al., 2006;).

2.5 Etiologia

A etiologia das leucemias ainda não está elucidada, principalmente pelo fato de que na infância não há uma grande exposição a fatores externos como acontece nas leucemias de adultos, porém existem alguns estudos que relacionam fatores genéticos, imunológicos ambientais, e exposição materna na gravidez a determinados reagentes químicos como possíveis causadores das leucemias (INFANTE-RIVARD, 2008; MILNE et al., 2012; PUI et al., 2011).

Tabela 1 - Distribuição da taxa anual de incidência das leucemias linfoides agudas da infância até 14 anos em diferentes áreas geográficas.

País	Ambos os sexos	Masculino	Feminino
Costa Rica	46,3	51,7	40,7
Finlândia	41,9	41,8	42,0
Canadá	41,0	44,8	36,9
Hong-Kong	40,6	50,6	29,9
Suécia	40,1	40,9	39,3
Austrália (Nova Gales do Sul)	39,9	56,2	43,2
Alemanha	39,0	43,6	34,1
Noruega	38,3	39,3	37,3
USA (SEER) em brancos	38,0	41,3	34,5
Itália	37,9	38,9	36,8
Hungria	33,5	37,0	29,9
Reino Unido (Inglaterra e País de Gales)	32,8	35,7	29,7
República Tcheca e Eslováquia	28,4	31,8	24,8
Cuba	25,4	27,6	23,1
Kwait	24,3	27,1	21,4
Japão	22,6	25,6	19,5
Brasil (Goiânia)	21,9	21,8	22,1
Nova Zelândia	21,9	30,3	13,1
Estados Unidos (SEER) em Negros	20,8	22,0	19,6
Brasil (Belém)	18,8	20,5	17,4
Israel (Judeus)	18,6	18,7	18,4
China	17,4	19,0	15,7
Índia	16,0	19,8	12,0

Fonte: Parkin(2010)

Nota: Taxas de LA por 100.000 habitantes em ordem decrescente de magnitude, ajustadas por Idade (0-14 anos).

Tabela 2 - Incidência da leucemia linfóide aguda por região geográfica no Brasil por milhão de habitantes

Região	Local (Período)	Taxa de Incidência
Norte	Belém (1997-2001)	22,4
	Manaus (1999 – 2002)	56,6
Nordeste	Aracajú (1998 – 2002)	22,0
	Fortaleza (1998 – 2002)	27,0
	Recife (1997 – 2001)	46,0
	João Pessoa (2000 – 2004)	22,0
	Natal (1998 – 2001)	36,0
Centro Oeste	Salvador (1998 – 2002)	17,8
	Cuiabá (2000 – 2004)	50
	Brasília (1999 – 2002)	30,5
Sudeste	Goiânia(1999 – 2003)	53,1
	Belo Horizonte (2000 – 2003)	34,0
	São Paulo (1998 – 2002)	34,6
Sul	Jaú (2000 – 2004)	51,9
	Curitiba (1999 – 2003)	50,7
	Porto Alegre (1999 – 2003)	42,4

Fonte :adaptado de Reis et al.(2011).

Nota: Taxa por 100.000 habitantes

2.5.1 Fatores Genéticos

Diversas alterações genéticas estão associadas com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento das leucemias. Uma delas é a síndrome de Down, foi demonstrado por alguns autores que pacientes com a trissomia do cromossomo 21 tem de 10 a 20 vezes mais chances de desenvolver uma leucemia do que pacientes sem essa alteração (ZWAAN et al., 2008). Outras doenças genéticas como síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, neurofibromatose tipo I, síndrome de Schwachman, síndrome de ataxia-telangiectasia e Síndrome de Beckwith-Wiedemann também já foram descritas como possíveis causadoras das leucemias porém correspondem a apenas 5% dos casos (SEIF, 2011) Além das doenças genéticas somáticas, determinados polimorfismos genéticos em genes responsáveis pelo reparo do DNA e resposta imune, pode aumentar o risco de desenvolver leucemia, por isso o polimorfismo genético pode ser um fator de risco

tão importante quanto os fatores ambientais (HAN et al., 2010, REIS et al., 2016).

2.5.2 Fatores ambientais

Os fatores ambientais têm sido amplamente estudados como possíveis fatores de risco para as leucemias. A exposição a determinados agentes químicos, tanto de crianças, mulheres grávidas e mulheres num período pré concepção, poderia ser uma das causas do surgimento da leucemia (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007; EVANS et al., 2014; POMBO-DE-OLIVEIRA, 2006). Evidências sugerem que seriam necessários vários eventos para o desenvolvimento da doença, sendo uma susceptibilidade genética o primeiro, seguida por um outro evento que seria a exposição a um determinado fator ambiental (BELSON et al., 2007; TIMMS et al., 2016). Diversos agentes já foram estudados como possíveis agentes que aumentam a predisposição ao desenvolvimento de leucemias, entre eles o consumo de fumo, álcool, dieta e uso de antibiótico e analgésicos pela mulher grávida; a exposição a poluição, pesticidas domésticos, radiação ionizante e tintas domésticas tanto por grávidas como crianças, porém essa relação pode variar de estudo para estudo não se tendo até o momento uma definição do real risco desses agentes (KAATSCH; SCHEIDEMANN-WESP; SCHUZ, 2010; KWAN et al., 2009; MILNE et al., 2012; TURNER; WIGLE; KREWSKI 2010; ZANROSSO et al., 2010;). Recentemente Haergreave et al. (2015) também identificou uma maior predisposição a desenvolver leucemias em crianças nascidas por métodos de reprodução assistida, porém um outro estudo não observou esse aumento de incidência nas leucemias, mas em câncer do sistema nervoso central e em neoplasias epiteliais malignas (SUNDH et al., 2014). Por outro lado, estudos demonstraram que o aleitamento materno pode ser um fator protetivo para o desenvolvimento da doença (INFANTE-RIVARD; FORTIER; OLSON, 2000).

2.5.3 Infecções Virais

As infecções virais são comuns na primeira infância e estudos epidemiológicos sugerem o aumento do risco de desenvolver leucemias devido a

uma falha na resposta imune durante essas infecções (GREAVES et al., 1993; MCNELLY; EDEN, 2004). Em um recente estudo, Bartenhagen et al. (2017) identificou Anelovírus, Herpes Vírus e Parvovírus em 11 amostras de 14 pacientes com leucemia linfoblástica aguda através da identificação do DNA viral por sequenciamento, sugerindo que esses vírus infectaram as crianças que devido a uma imunodeficiência ou predisposição genética, desenvolveram a leucemia após a infecção. A infecção por vírus como vírus T-linfotrópico humano (HTLV) e Epstein-Barr (EBV), também já foi descrita como possível causadora de leucemia linfóide (GUAN et al., 2017; WATANABE, 2017). Por outro lado, o retardo no contato com vírus durante o primeiro ano de vida foi sugestivo de aumentar o risco de desenvolvimento de leucemias, dessa forma ainda não se tem um consenso em relação ao contato com vírus e leucemia na infância (MCNALLY; EDEN 2004, RUDANT et al., 2010).

2.5.4 Fatores Imunológicos

Nos últimos anos, vem surgindo diversos estudos relacionados com a resposta imune dos indivíduos, com ênfase principalmente no papel do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), no desenvolvimento das leucemias (HAN et al., 2010; HOSKING et al., 2011; TAYLOR et al., 2009). O complexo maior de Histocompatibilidade é uma região rica em genes, sendo grande parte destes envolvidos na resposta imune. Dentre essas regiões, podemos encontrar o antígeno leucocitário humano (HLA) que é dividido em duas classes I e II. Essa região codifica genes altamente polimórficos como HLA-A, B, C (classe I) e HLA-DR, DQ e DP (classe II) (TAYLOR et al., 2009). Os estudos realizados indicam que polimorfismos nesses genes podem estar relacionados a um maior risco de desenvolver leucemia, porém até o momento não se chegou a um consenso sobre o real papel do HLA no desenvolvimento da leucemia (HAN et al., 2010; HOSKING et al., 2011).

2.6 Diagnóstico

A partir da história clínica sugestiva associada ao exame físico do paciente é

iniciada uma investigação mais detalhada para identificação da leucemia. Exames laboratoriais também são empregados, onde se observa um alto índice de alterações. Em 80% dos pacientes é possível encontrar anemia normocítica e normocrômica, com valores diminuídos de reticulócitos. A maioria dos pacientes apresentam leucometria elevada e contagem de plaquetas inferior a $100.000/\text{mm}^3$. Em cerca de 5% dos casos a contagem de leucócitos pode ser menor que $2.000/\text{mm}^3$, sem linfoblastos detectáveis no sangue periférico. Exames bioquímicos também podem estar elevados, principalmente ácido úrico e a Desidrogenas láctea (DHL) (SMITH et al., 2006).

2.6.1 Diagnóstico Clínico

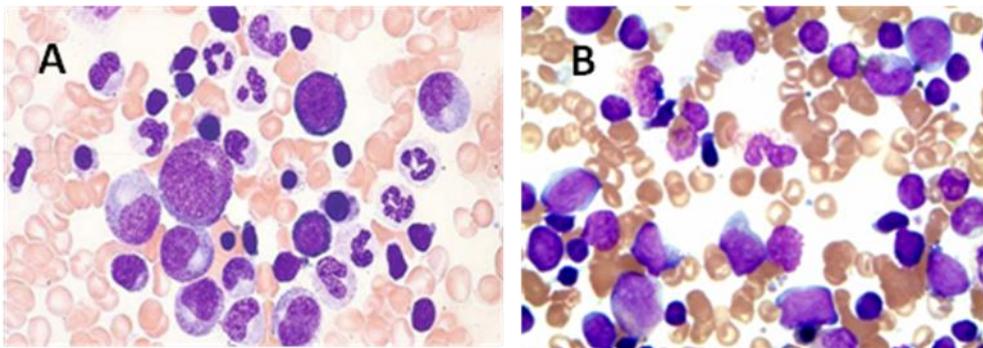
Os sinais e sintomas das leucemias agudas surgem em decorrência da falência da medula óssea, uma vez que as células hematopoéticas normais vão sendo substituídas por células neoplásicas. Essa substituição acarreta supressão na hematopoiese com conseqüente diminuição da circulação das células normais na corrente sanguínea (BACHER et al., 2012; PUI; ROBISON; LOOK, 2008). Desse modo, a diminuição das células vermelhas pode provocar anemia que leva a palidez, fraqueza e cansaço; a neutropenia pode levar a um quadro de febre inespecífica e infecções, já a diminuição do número de plaquetas provoca sangramento originando equimoses (BAIN, 2003; BASSAN et al., 2004). Além das alterações hematológicas, o paciente pode apresentar dores ósseas, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, e a presença de massas sólidas de células leucêmicas localizadas fora da medula óssea como cloroma ou sarcoma granulocítico, esses últimos mais comumente encontrados na LMA (ESPARZA, SAKAMOTO, 2005).

O diagnóstico das leucemias pode ser dificultado devido os sintomas serem inespecíficos, necessitando o diagnóstico diferencial com diversas patologias como: infecção virais (mononucleose e citomegalovirose), leishmaniose, púrpura trombocitopênica idiopática, aplasia de medula óssea, infecção por citomegalovírus, mononucleose, coqueluche, anemia falciforme, artrite reumatóide juvenil, aplasia de medula óssea ou infiltração medular por tumores sólidos como meduloblastoma, retinoblastoma e rabdomiossarcoma (SOUZA, 2009).

2.6.2 Mielograma

O mielograma é o primeiro exame a ser realizado e consiste na análise de precursores hematológicos da medula óssea aspirada de ossos como esterno, tíbia ou crista ilíaca. O diagnóstico das leucemias se dá quando a medula encontra-se infiltrada por mais de 30% de blastos, no entanto, estudos recentes sugerem que esse percentual diminua para 20% nos casos das leucemias com alterações citogenéticas e moleculares sabidamente relacionadas com as leucemias (SWERDLOW et al., 2008; VARDIMAN et al., 2009). A figura 3 mostra achados normais da medula óssea com a maturação preservada e achados compatível com leucemia com o acúmulo de células blásticas.

Figura 3 – Achados encontrados no Mielograma.



Fonte: Ribas (2016)

Nota: A. Medula óssea normal mostrando a presença de células em diferentes estágios de maturação. B. Medula óssea mostrando parada na maturação e acúmulo de células blásticas características da leucemia, foto cedida por Dra. Tereza Fonseca , Hematologista da Oncologia Pediátrica IMIP.

2.6.3 Classificação das Leucemias Linfóides

A leucemia sendo constatada pelo mielograma, são realizados exames complementares de citoquímica, Imunofenotipagem e Biologia molecular para uma melhor classificação da leucemia visando o tratamento adequado.

2.6.3.1 Citoquímica

A citoquímica permite a localização e identificação de substâncias intracelulares, e foi durante muito tempo um dos métodos mais utilizados para diferenciar as LLAs das LMAs nos casos onde a morfologia não podia distinguir entre os dois tipos celulares, e dentre as LMAs, as células de origem mieloide ou monocíticas (; CREUTIZIG et al., 2012; FARIAS; CASTRO, 2004).

As principais colorações utilizadas no diagnóstico das leucemias são: mieloperoxidase (MPO), *Sudan Black B* (SBB), naftol AS-D; esterases inespecíficas, como cloroacetato esterase (CAE); alfa-naftil acetato esterase (ANAE) e reação do ácido para-aminossalicílico (ácido periódico de Schiff, PAS)(SILVA et al., 2006; BUGA; GLÜCK; ARION, 2014). Com exceção do PAS as leucemias linfoides são negativas para os testes citoquímicos utilizados, dessa forma é possível identifica-las e diferencia-las das leucemias mieloides. A relação entre a positividade para cada coloração e o tipo de Leucemia aguda está discriminada no Quadro 4.

Quadro 4 - Relação entre tipo morfológico (FAB) e coloração citoquímica.

	LMA M0	LMA M1,M2,M3	LMA M4	LMA M5	LMA M6	LMA M7	LLA
Mieloperoxidase	-	+	+	-	-	-	-
Estearase Inespecífica							
Cloroacetato	-	+	+	+/-	-	-	-
Alfa-Naftil acetato	-	-	+	+	-	+/-	-
Sudan Black	-	+	+	-	-	-	-
PAS	-	-	+/-	+/-	+	-	+

Fonte: Adaptado de Buga et al.(2014)

Nota: LMA – Leucemia Mielóide Aguda, PAS - ácido para-aminossalicílico

2.6.3.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método imunológico que, através da análise simultânea de vários parâmetros celulares, como viabilidade, tamanho,

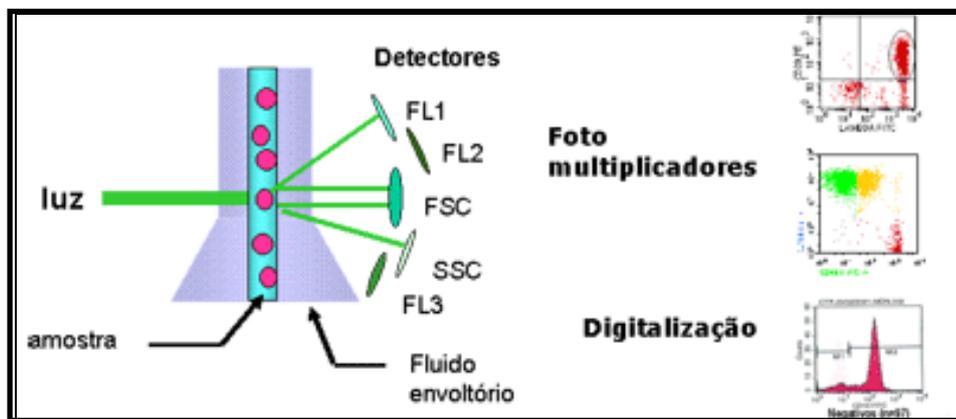
granulosidade e, principalmente, a partir da utilização de anticorpos monoclonais, permite avaliar a expressão de antígenos na superfície, no citoplasma ou no núcleo das células (CAMPANA, 2002). A associação de diferentes fluorocromos com anticorpos monoclonais permite identificar antígenos co-expressos em uma mesma célula e, conseqüentemente, determinar o tipo e estágio de maturação de células hematológicas, assim como a detecção de antígenos e expressões aberrantes presentes em células leucêmicas (DEL VECCHIO, 2004; SILVEIRA; ARRAES, 2008).

A técnica da citometria de fluxo é composta de três etapas: a aquisição da amostra realizada pelo sistema Fluido do equipamento, a leitura dos parâmetros celulares pelo sistema Ótico, e processamento de dados pelo sistema Eletrônico. O sistema fluido consiste no fluxo de um tampão (sheath) lateral ao fluxo da amostra, que é aspirada por uma agulha com ou sem vácuo, desta forma as células em suspensão são conduzidas enfileiradas no centro do tampão em fluxo contínuo, sendo interceptadas por um laser antes de atingirem o reservatório de descarte. O sistema Ótico é composto pelo laser, prisma, espelhos, lentes, filtros e detectores. A passagem da célula através do feixe do laser gera informações relativas ao tamanho celular, que é proporcional a dispersão frontal (Forward Scatter); informações relativas à granulosidade ou complexidade interna, de acordo com a dispersão lateral da luz (Side Scatter). Essas informações sobre tamanho e granulosidade celular permitem identificar os diferentes tipos celulares hematológicos. Identificações de subpopulações celulares são possíveis com a utilização de anticorpos específicos marcados com os fluorocromos. A exposição dessas moléculas marcadas ao laser, gera uma fluorescência em um comprimento de onda maior do que o da excitação, e essa fluorescência pode ser captada pelo sistema Ótico (BERTHO, 2004; MARTINS;FALCÃO, 2000; OLIVEIRA et al., 2004).

A luz dispersada ou fluorescente é captada e enviada através de lentes, espelhos dicróicos e filtros para os detectores (sistema ótico), convertendo o sinal luminoso em pulsos elétricos proporcionais à quantidade presente na amostra (BERTHO, 2004; MARTINS;FALCÃO, 2000). Os sinais elétricos são amplificados e convertidos em sinais digitais enviados a um computador, onde através de softwares específicos é realizada a análise e integração dos parâmetros tamanho, complexidade e fluorescências (Sinal eletrônico) (BERTHO, 2004). A figura 4 mostra o funcionamento do citômetro de fluxo

Existem diversos fluorocromos disponíveis para a aplicação na citometria de fluxo, dentre os fluorocromos mais utilizados e seus respectivos comprimentos de onda temos: Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, 495nm), Ficoeritrina (PE, 480), complexo peridinaclorofil-proteína (PercP, 490nm), que são excitados por um laser de íon de argônio (laser azul) e a alofocianina (APC, 650nm) excitada por um laser Helio-Neônio (HeNe) – (laser vermelho) (WOOD et al., 2007). A utilização de diferentes fluorocromos com diferentes espectro de emissão permite a detecção simultânea de diferentes antígenos presentes em uma mesma célula facilitando a sua identificação (CAMPANA; COUSTAN-SMITH, 2002).

Figura 4 - Esquema de funcionamento do citômetro de fluxo



Fonte: Laboratório Fleury (2002)

Nota: A célula atravessa perpendicularmente o feixe de laser, gerando 1) bloqueio no feixe de luz permitindo estimar o tamanho da célula, 2) dispersão lateral do feixe de luz proporcional a granulosidade interna e 3) a detecção das fluorescências geradas pela excitação de fluorocromos conjugados a anticorpos. Para maiores detalhes, consultar texto.

O diagnóstico de leucemia pode ser realizado com apenas dois fluorocromos por reação, contudo, para a identificação da DRM é preciso pelo menos 3 fluorocromos ligados aos anticorpos monoclonais (COUSTAN-SMITH, 1998; SAWADA, 2009).

2.6.3.3 Imunofenotipagem

As leucemias linfoides agudas, são originárias dos linfócitos T (LLA-T) ou B (LLA-B) e se desenvolvem a partir de linfócitos primitivos que estão em vários estágios de desenvolvimento, sendo os principais subtipos descobertos por exames

realizados através da imunofenotipagem pela citometria de fluxo. A imunofenotipagem é considerada o método preferencial para a caracterização de leucemias agudas, devido a sua rapidez e sensibilidade (LUCIO, et al., 2001; PUI; EVANS, 1998;). Por essa metodologia, antígenos de superfície, intracitoplasmáticos e intranucleares, os chamados *cluster of differentiation* (CD) que estão presentes nas células hematopoiéticas podem ser detectados através da utilização de anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos (ROCHA et al., 2000). Alguns desses antígenos estão associados a uma linhagem celular enquanto outros indicam os diferentes estágios de maturação da célula. De forma que, alterações no número de células precursoras hematopoiéticas e a expressão dos antígenos encontrados permitem a classificação em leucemia linfóide B, leucemia linfóide T ou leucemia mieloide (BAHIA et al., 2001; ROCHA, 2000;).

Apesar de determinados marcadores estarem associados à linhagem e maturação, a identificação individual de um antígeno não é capaz de definir por si só tipo de leucemia, sendo a combinação entre características morfológicas e um painel de anticorpos (marcadores de prematuridade, de linhagem e estágio de maturação celular) necessários para o diagnóstico acurado (MCGREGOR; MCNEER; GURBUXANI, 2012). Por exemplo, a mieloperoxidase é específico para LMA, mas 50% dos pacientes com LMA-M5 cursam com mieloperoxidase negativa, isto é, valores de detecção abaixo de 25%. Dessa forma essas leucemias poderiam ser erroneamente classificadas como sendo linfóide, por isso o diagnóstico é confirmado após a análise de vários anticorpos que podem classificar as leucemias linfóides em B ou T. Além disso, os marcadores imunológicos também podem ser utilizados para avaliação da resposta ao tratamento e determinação do prognóstico do paciente (BELURKAR et al., 2014). De acordo com o Grupo Europeu para Caracterização Imunológica das Leucemias (EGIL) a imunofenotipagem classifica as leucemias linfóides nos seus tipos B ou T e subtipos.

2.6.3.4 Leucemia Linfóide Aguda subtipo B

Durante os estágios normais de maturação dos linfócitos B, diferentes antígenos surgem ou deixam de ser expressos na superfície, citoplasma e ou núcleo das células (figura 5) e esses marcadores são pesquisados para identificar a qual

subtipo da leucemia B está sendo acometido.

A leucemia de células B (LLA B) apresenta na maioria dos casos positividade para os marcadores de maturidade Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT) nuclear, CD34 e CD10; e os marcadores de linhagem CD79a citoplasmático, CD19, CD22, CD20, IgM intracelular ou de superfície, e cadeia leve kappa ou lambda. A positividade e a intensidade de expressão dos marcadores de linhagem variam de acordo com o grau de maturação dos blastos, podendo ser subclassificados em Pro B (*early B*), B Comum, Pré B, Pré B-Transicional e B madura conforme apresentados no Quadro 5 (CAMPANA ; BEHM, 2000; PUI et al., 2002)

Figura 5 -- Marcadores imunofenotípicos normal da célula B em diferentes estágios de maturação

MEDULA ÓSSEA				PERIFERIA	
					
Pró B	B Comum	Pré B	Pre B Transicional	Célula B madura	Plasmócito
CD34 TdT	CD34 TdT CD10 ^h Forte CD19	CD34 (TdT) CD10 CD19 CD20 CD22 CD45 Cylgμ	CD10 CD19 CD20 CD22 CD45 Cylgμ SmIgM	CD19 CD20 CD22 ⁱ CD45 ⁱ SmIgM	CD19 CD20 CD45 Cylg CD38 CD13 ^B CD56 Forte

Adaptado de: Catelan (2009).

Nota: Ontogenia das células B apresentado as diferenças nos marcadores expressos em cada estágio de maturação.

A LLA do tipo Pro-B representa 5% dos casos pediátricos (FARIAS, CASTRO, 2004) e frequentemente está relacionada com o surgimento em crianças menores de 2 anos de idade, apresentando também leucometria elevada ao diagnóstico e prognóstico reservado. Além disso, uma das características imunofenotípicas desse subtipo é ausência do antígeno comum LLA (CALLA ou CD10) que é uma glicoproteína encontrada também ocasionalmente nos linfócitos precursores normais e em outros tecidos não hematopoiéticos (GLEISSNER et al., 2005).

Quadro - 5. Principais Marcadores celulares encontrados nas Leucemias Linfóide de células B.

Marcador	Pró B	B Comum	Pré B	B transicional	B Madura
CD19	+	+	+	+	+
CD22	-/+	+	+	+	+
CD20	-	-/+	+	+	+
CD10	-	+	+	+	-/+
TdT	+	+	+	+	+/-
HLADR	+	+	+	+	+
Imunoglobulina citoplasmática	-	-	+	+	-
Imunoglobulina de Superfície	-	-	-	+	+
Cadeia Kappa e/ou Lambda	-	-	-	-	+

Fonte: Adaptado de Farias (2004)

A LLA do tipo comum, também conhecida pela positividade ao CD10 apresenta-se em aproximadamente 75% dos casos pediátricos, sendo considerada uma leucemia com bom prognóstico. Além do CD 10 esse subtipo também apresenta positividade para CD19 e CD34, mas ausência da expressão da cadeia μ citoplasmática (KUBIAC-WLEKLY; NIEMIR, 2009; MAURGER-SATTA; BESANÇON; BACHELARD-CASCALES, 2011; PUI et al., 2006).

A leucemia Pré B é caracterizada pela expressão da cadeia μ citoplasmática em adição a outros marcadores específicos, ocorrendo em 15% das crianças com LLA (GAJJAR et al., 2000; HIGA et al., 2009).

A leucemia de células Pré B transicional é caracterizada pela expressão de imunoglobulina de superfície e intracitoplasmática, porém com ausência das cadeias leves Kappa e Lambda. Tem sua incidência variando entre 3% e 9% além de apresentar morfologia L3 e comprometimento do gene C-Myc (CRAIG; FOON, 2008; HIGA et al., 2009)

Por último, a LLA B madura observada em torno de 5% dos pacientes tem como principal característica a presença da expressão de cadeias leve (Kappa e/ou Lambda) na superfície da membrana celular. Nesse subtipo de leucemia, os blastos leucêmicos assemelham-se morfológicamente as células do linfoma de Burkitt (FARIAS; CASTRO, 2004).

2.6.3.5 Leucemia Linfóide Aguda subtipo T

A Leucemia Linfóide de linhagem T (LLA T) também pode ser subdividida em categorias de acordo com os diferentes estágios de maturação tímica dos linfócitos T. Essas categorias são: LLA pré-T, intermediário e maduro. Os marcadores usados na identificação da linhagem T são CD3 citoplasmático e de superfície, CD7, CD2, CD5, CD8 e CD4 (MATUTES et al., 2007; VAN DONGEN et al., 2003). Recentemente, Coustan-Smith et al. (2009) observaram um grupo de pacientes, cujos blastos apresentavam características de células T precursoras denominadas por “early T cells” (ETPs), que não respondiam bem ao tratamento convencional (COUSTAN-SMITH et al., 2009). Essas células são timócitos jovens provenientes da medula óssea, com potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, sugerindo origem direta nas células hematopoéticas tronco precursoras (ROTHENBERG; MOORE; YUI, 2008; BELL et al., 2008). Elas são identificadas pela presença dos marcadores de linhagem T CD2, CD7 e CD3 citoplasmático, a presença de CD5 em menos de 75% dos blastos, e ausência de CD8 e CD1a, associado a positividade para um ou mais antígenos da linhagem mielóide (CD33, CD13, CD15) e/ou de imaturidade (CD34, CD10, TdT) (COUSTAN-SMITH et al., 2009). Os marcadores mais encontrados nas LLAs T estão descritos no Quadro 6.

Quadro 6 - Marcadores celulares das leucemias linfóides de células T

Marcador	Precursoras T (early T)	Pré T	T intermediário	T madura
CD7	+	+	+	+
CD2	-	-	+	+
CD3 superfície	-	-	-	+
CD3 citoplasmático	+/-	+/-	+	+
CD 1 ^a	-	-	+/-	-
CD4/CD8	-	-	+/-	+
CD5	+ em menos de 75% dos Blastos	+	+	+
Marcadores Mielóides ou de imaturidade	+	-	-	-

Fonte: Adaptado de Farias;Castro (2004) e Coustan-Smith et al. (2009)

2.6.4 Determinação do índice de DNA

O índice de DNA é a razão entre o conteúdo de DNA de células leucêmicas em G0/G1 versus o conteúdo de DNA de células normais em G0/G1 (FRIEDMANN et al., 2000). A citometria de fluxo tem sido uma ferramenta bastante utilizada para a determinação do índice de DNA e sua importância se deve ao fato de que através da análise do ciclo celular é possível obter informações fundamentais a respeito da proliferação das células (FARIAS; CASTRO, 2004; KRUEGER; WILSON, 2011).

A determinação do índice de DNA por citometria de fluxo é realizada utilizando compostos fluorescentes específicos, como o iodeto de propídeo, que se intercala à estrutura helicoidal do DNA, sendo a intensidade da fluorescência resultante da ligação do fluorocromo ao DNA diretamente proporcional à quantidade de material genético presente no núcleo celular (BROWN; WITTEWER, 2000; ROSS et al., 2003; SWERTS et al., 2007)

Dessa forma, é possível determinar a ploidia celular e classificar as células leucêmicas como diploides, com conteúdo normal de DNA (46 cromossomos), hiperdiploides, com conteúdo aumentado de DNA (≥ 50 cromossomos) ou hipodiploides, com conteúdo diminuído de DNA (< 45 cromossomos) (FARIAS; CASTRO, 2004).

Entre 14-27% dos casos de LLA são hiperdiploides e essa característica confere um bom prognóstico, uma vez que as células leucêmicas dos pacientes com essa alteração possuem uma maior sensibilidade aos quimioterápicos normalmente utilizados no tratamento da leucemia (FADERL, 1998; KASPERS et al., 1995; RACHIERU-SOURISSEAU et al., 2010). Os casos de hipodiploidia são mais raros e conferem um pior prognóstico (HARRISON et al., 2011). A correlação entre os valores encontrados pela citometria e a classificação do índice de DNA estão descritos no quadro 7.

Quadro 7 – Critérios para definir a ploidia de DNA de acordo com os valores encontrados na citometria de fluxo

Índice de DNA do pico G0/ G1	Definição da ploidia de DNA
ID = 1,00 ($\pm 0,15$)	Diploide
ID $< 0,85$	Hipodiploide
ID $\geq 1,16$	Hiperdiploide

Fonte: adaptado de Ross et al. (2003).

2.6.5 Caracterização Genética

A identificação de alterações genéticas nas leucemias é de grande importância não só para o diagnóstico, mas principalmente para definição do prognóstico e conduta terapêutica, por isso é alvo de diversos estudos (MILTEMAN, MERTENS; JOHANSSON, 2005; PUI; EVANS., 2006). As alterações cromossômicas mais comumente encontradas nos blastos leucêmicos são o ganho ou perda de cromossomos e translocações cromossômicas (NIGRO et al., 2013).

As translocações cromossômicas envolvem a formação de genes quiméricos, que levam a desregulação da hematopoese levando ao surgimento da leucemia. Tais translocações podem ser detectadas pela citogenética (bandeamento G ou Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), PCR convencional ou PCR em tempo real, com exceção da t(12;21) que não pode ser identificada pela citogenética. Entre as principais alterações genéticas encontradas nas leucemias linfoblásticas de células B podemos destacar a t(12;21), t(1;19), t(9;22); rearranjos envolvendo o cromossomo 11 (região 11q23) e t(8;14), sendo essa última encontrada na LLA B Madura. Essas alterações genéticas definem o prognóstico da doença e estão descritas no Quadro 8) (SOUZA 2009, NIGRO et al., 2013).

Quadro 8: Principais translocações nas leucemias linfoblásticas agudas de células B.

Translocação	Genes envolvidos	Frequência	Prognóstico
t(12;21)	<i>TEL-AML1</i> (ou <i>ETV6-RUNX1</i>)	25%	Bom
t(1;19)	<i>E2A-PBX1</i> (ou <i>TCF3-PBX1</i>)	5%	Intermediário*
t(9;22)	<i>BCR-ABL1</i> (p190)	3%	Mau
11q23	<i>MLL</i>	60% (<2 anos)	Mau
t(8;14)	C-MYC-IgH	2%	Indeterminado

Fonte: Adaptado de Nigro (2014).

Nota:* Considerada como mau prognóstico e após o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento passou a ser considerada de prognóstico intermediário.

As leucemias de células T não estão bem caracterizadas quanto a identificação de translocações ou outras alterações genéticas (VAN VLIERBERGHE et al., 2008). Mesmo assim algumas translocações já foram identificadas, porém em pequeno número de pacientes, como por exemplo, a t(10;11) *CALM-AF10* que está relacionada com mau prognóstico; a t(1;14) *SIL-TAL*, em 4% dos pacientes, tem bom prognóstico; e a t(11;19) *MLL-ENL*, em 2-5% dos casos, tem valor prognóstico ainda indeterminado (MEIJERINK; DEN BOER; PIETERS, 2009; MEIJERINK et al., 2010).

A expressão do TLX1 (HOX11) está associada com prognóstico favorável e a expressão de TAL1, LYL1 ou TLX3 (HOX11L2) está associada a uma pior resposta à terapia. Um pequeno subconjunto de LLA-T (5% -6%) apresenta a amplificação do gene ABL1 (MAUVIEUX et al., 2002).

Além das translocações descritas, diversos estudos identificaram mutações em genes essenciais para hematopoiese normal como *NPM1* (HOLLINK et al., 2009), *FLT3* (MESHINCH et al., 2006), *WT1* (BALGOBIND et al., 2010), *CEPBA* (HO et al., 2009), *Jak2* (WALDMANN, 2017) que são clinicamente relevantes e deveriam ser incluídos na rotina diagnóstica. Com o avanço da tecnologia as leucemias passaram a ser melhores classificadas do ponto de vista genético e imunofenotípico e baseado nesses achados diversos protocolos de tratamento foram propostos visando um tratamento mais direcionado e de acordo com o prognóstico e risco de recaída do paciente (CAMPANA, 2009). Nesses protocolos, a determinação da DRM é de grande importância para a conduta terapêutica.

2.7 Leucemia linfoide aguda de células B

A leucemia Linfoide B corresponde a mais de 80% dos casos de leucemia da infância (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015). A LLA B é uma patologia que se origina a partir de precursores linfóides de origem B na Medula Óssea que perdem seu poder de diferenciação e se acumulam em determinados estágios de maturação (SEDEK et al., 2014). Os sintomas e sinais clínicos da Leucemia Linfoide Aguda são inespecíficos e semelhantes aos das demais leucemias, como anemia, palidez, febre, astenia, entre outros, porém em relação à LLA T possuem uma leucometria mais baixa e ausência de massa de mediastino na maioria dos casos (SMITH et al., 2006; STEINHERZ, 1998).

2.7.1 Fatores prognósticos e classificação de risco na leucemia linfoide aguda B

A característica fundamental para a condução do tratamento de pacientes com LLA B com mais chances de sucesso é que a intensidade do tratamento deva ser proporcional ao risco de recaída (PUI, 2001). Nesse sentido, diversos estudos

vêm sendo realizados na tentativa de correlacionar fatores biológico e clínicos com o desfecho da doença, buscando assim novos protocolos de tratamentos e evitando que alguns pacientes façam uso de quantidade excessiva de quimioterapia sem necessidade, e da mesma forma pacientes com alta chance de recaída devem ter seu tratamento intensificado (CAMPANA, 2009; CAZÉ; BUENO; SANTOS 2010; PUI et al., 2017).

Dentre os fatores considerados para a classificação de risco segundo os critérios do Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos e o estudo Grupo Brasileiro de Tratamento da leucemia infantil (GBTLI), os fatores de bom prognóstico da LLA B nas crianças são baseados em critérios como:

- a) Idade – Pacientes com idade entre 1 e menor que 10 anos apresentam uma melhor resposta terapêutica.
- b) Contagem dos leucócitos ao diagnóstico – A presença de uma contagem global de leucócito menor do que 50.000.
- c) Ploidia – Pacientes hiperdiploides (índice de DNA maior ou igual 1,16).
- d) Presença de rearranjos genéticos – Pacientes com translocação t(12;21)

As Crianças que apresentarem as características acima, associadas a ausência de SNC3, infiltração testicular ou outra alteração genética são consideradas de baixo risco enquanto as demais de alto risco e possuem tratamentos diferenciados para cada categoria (SMITH et al., 1996; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA, 2009).

Nos últimos anos, a avaliação da DRM principalmente nas etapas iniciais do tratamento, vem sendo utilizada para uma nova classificação desses pacientes, aumentando as chances de cura (CAMPANA;PUI,2017; HEALTH QUALITY ONTARIO, 2016; PUI, 2015,).

2.7.2 Tratamento baseado na Classificação de Risco

Antigamente os protocolos de tratamento utilizados para a leucemia linfóide B submetiam todos os pacientes ao mesmo tipo de terapia que envolvia desde o uso de quimioterápicos até radioterapia, porém esse tipo de tratamento expunha muitos pacientes a exposições desnecessária a quimioterápicos e radiação (PUI et al., 2009). Os protocolos atuais preconizam a classificação dos pacientes em grupos de

risco e o tratamento voltado de acordo com o risco estimado de falha terapêutica. Desta forma, pacientes considerados de alto risco são submetidos a tratamento mais agressivo devido a possibilidade mais alta de recaídas e menor chance de cura. Enquanto isso, os pacientes classificados como baixo risco recebem uma quimioterapia mais branda, ou seja, é o princípio da dose-risco dependente (, CAMPANA;PUI, 2017; PAOLUCCI et al., 2001; PUI et al., 2017).

O tratamento da leucemia linfóide B consiste em um tratamento complexo com a combinação de diferentes drogas quimioterápicas (SOUZA, 2009). A duração e as fases do tratamento da LLA B podem variar de acordo com o protocolo utilizado e grupo de risco mas consistem basicamente nas principais fases: indução da remissão, tratamento consolidação, intensificação tardia (às vezes dividido em fases de reindução e consolidação) e manutenção da terapia (PIZZO, POPLACK, 2011) .

As drogas mais utilizadas são Metotrexato, Citarabina, Ciclofosfamida, dexametasona, prednisona, vincristina e L-asparaginase, variando de dosagem dependendo da fase do tratamento e do grupo de risco. (ONCIU et al., 2009; PUI et al., 2009).

Os protocolos de tratamento atuais incluem a realização da pesquisa de DRM no período de indução (no dia 8 ou dia 15) e no final da indução (dia 29-35). Para definir o melhor tratamento visando aumentar a chance de sucesso (CAMPANA, 2010; PUI et al., 2015).

2.8 Avaliação de Doença Residual Mínima

Doença residual mínima (DRM) é definida como células leucêmicas detectadas após a quimioterapia abaixo da sensibilidade de detecção pela morfologia de rotina que corresponde a identificação de 5% de blastos na medula óssea (TERWIJN et al., 2013). A identificação da presença da DRM foi alvo de diversas pesquisas, porém só passou a ter grande importância no final da década de noventa quando três estudos independentes demonstraram que ela é um forte indicador de prognóstico nas leucemias da infância (CAVE et al.,1998; COUSTAN-SMITH et al., 1998, VAN DOGEN et al.,1998). Esses Estudos estimularam o desenvolvimento de protocolos de tratamento onde a classificação do risco final está altamente relacionada com a detecção da doença residual mínima (CAMPANA,

2009). Desde então, o monitoramento da resposta ao tratamento pelo exame periódico da medula óssea faz parte da condução clínica dos pacientes (CAMPANA; PUI, 2017; PUI et al., 2015,).

Diversos métodos para detecção da DRM foram descritos, porém os mais aplicados incluem a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de transcritos de gene quiméricos detectados ao diagnóstico, como os produtos das t(12;21), t(1;19), t(8;21) dentre outros, PCR em tempo real (qPCR) dos receptores de antígenos, citometria de fluxo e, mais recentemente, em nível de pesquisa tem sido testados arranjos de cDNA para definição de padrão genético específico (COUSTAN-SMITH et al., 2009; HEALTH QUALITY ONTARIO 2016; SZCZEPANSK et al., 2001). As características dos principais métodos utilizados estão descritas no Quadro 9.

Quadro 9. Características dos principais métodos utilizados na detecção da doença residual mínima.

Método	Aplicabilidade	Sensibilidade	Vantagens	Desvantagens
qPCR	90-95%	$10^{-4} - 10^{-5}$	Sensível	Trabalhoso e demorado no diagnóstico
RT-PCR	40-50%	$10^{-5} - 10^{-6}$	Alta sensibilidade Método consenso Leucemia-específico	Utilizado em parte dos pacientes
Citometria de fluxo (≥ 3 cores)	90-95%	$10^{-3} - 10^{-4}$	Rápido	Análises complexas Baixa sensibilidade comparado a outras técnicas.

Adaptado de Szczepansk et al.(2007)

Enquanto estudos de DRM por métodos moleculares como PCR estão extremamente limitados a subtipos específicos de leucemia, os estudos utilizando a citometria de fluxo tem um potencial de aplicação mais abrangente. Isso devido ao fato que as células leucêmicas expressam padrões anormais de marcadores celulares que podem ser identificados pela citometria de fluxo (SAN MIGUEL et al., 2001).

Outra vantagem dos estudos com citometria de fluxo para DRM é que eles podem quantificar com acurácia células leucêmicas residuais e também podem distinguir células viáveis de apoptóticas (CAMPANA, 2010). É sabido que algumas mudanças nos marcadores imunofenotípicos podem ocorrer ao longo do tratamento quimioterápico podendo ser uma das causas dos resultados falsos negativos, porém em geral a maioria ou todas as anormalidades fenotípicas encontradas ao diagnóstico também reaparecem no momento da recaída (BAER et al., 2001; KERN et al., 2008). Desse modo é de grande importância a identificação nos diferentes tipos de leucemia para condução terapêutica.

2.8.2 Doença residual mínima em leucemia de células B por citometria de fluxo

A citometria de fluxo possui a sensibilidade de distinguir 1 célula leucêmica em 10.000 células hematológicas normais (CAMPANA;COUSTAN-SMITH, 2002). Essa distinção é possível devido a algumas características que os blastos leucêmicos possuem de apresentarem a expressão de marcadores aberrante conhecidos como fenótipos associados a leucemia (LAIPs) (CAMPANA;COUSTAN-SMITH,1999; CAMPANA;COUSTAN-SMITH, 2002). Esses antígenos não estão presentes ou são muito raros nas células hematopoiéticas normais e podem se apresentar das seguintes formas: (1) Assincronismo de expressão de antígenos - Quando marcadores de diferentes estágios de maturação são expressos na mesma célula, por exemplo, coexpressão de CD34 com CD20; (2) Infidelidade de linhagem - Marcadores de outras linhagens que não são expressos nos progenitores B normais, como a expressão de CD13 ou CD33; e (3) Expressão alterada de antígenos - A expressão de alguns antígenos pode estar aumentada ou diminuída, por exemplo, CD10 aumentado nos estágios iniciais.

Como estratégia para monitorar a DRM, essas alterações presentes nas células leucêmicas ao diagnóstico são utilizadas como marcadores para acompanhamento durante o tratamento (CAMPANA;COUSTAN 1999).

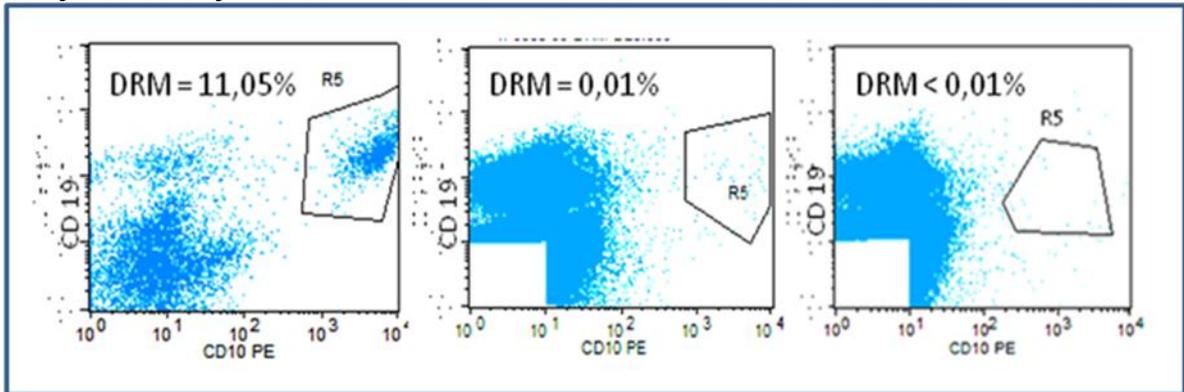
Para ter influência no prognóstico é recomendado que o exame de DRM na LLA B seja realizado nos estágios iniciais do tratamento que é dividido em Indução-Consolidação- Manutenção. Diversos estudos realizados concluíram que a melhor data para se realizar a análise da DRM é no meio da indução, em torno do dia 15 de

tratamento, pois nesse período é esperado que aproximadamente 50% dos pacientes não apresentem células leucêmicas na medula (DRM menor que 0,01%), e nesse período os pacientes que tiverem uma resposta insuficiente (DRM maior ou igual a 1%) tem o risco de recaída aumentado em 8,5 vezes (BASSO et al., 2009; XU et al., 2012). A detecção da DRM em outros tempos do tratamento, como no final da manutenção e consolidação, tem sido avaliada em relação ao risco de recaída, mas não apresentam resultados tão relevantes quanto a detecção no meio da indução (FOSSAT, 2015; PUI, 2010; SAWADA et al., 2009). A análise de DRM após o tratamento quimioterápico pode ser dificultada pela presença de células hematopoiéticas jovens na regeneração da medula, hematogônias, cuja morfologia e imunofenótipo podem se assemelhar as células de LLA (MCKENNA, 2001; VAN WERING, 2000;). Por isso, é preciso escolher os marcadores corretos que possam realmente distinguir essas células dos blastos leucêmicos para evitar a ocorrência de falsos positivos (CAMPANA; COUSTAN-SMITH, 2012).

Coustan-Smith et al. (2006) desenvolveu uma metodologia capaz de diferenciar essas células (hematogonias ou blastos) baseado na coexpressão de CD 19 x CD10 com CD 34 positivo ou negativo ilustrada na figura 6.

As hematogônias também podem apresentar positividade para CD19, CD10 e CD34, porém essas células são sensíveis ao pulso de corticosteroides que são utilizados no início do tratamento (COUSTAN-SMITH et al., 2006), desse modo esse estudo identificou que células positivas para os referidos marcadores encontradas na medula no período da indução, seriam leucêmicas. A metodologia descrita também é de fácil aplicação e baixo custo podendo ser realizada em diversos centros com menos recursos mais limitados. Porém em alguns casos onde o tratamento inicial não utiliza corticoides ou quando ao diagnóstico as células não apresentarem positividade para pelo menos dois desses marcadores, essa metodologia não pode ser aplicada para DRM (COUSTAN-SMITH et al., 2006).

Figura 6 - Representação gráfica da coexpressão dos marcadores CD19/CD10 utilizados na detecção da doença residual mínima



Fonte: Elaborado pela autora

Nota: Diferentes níveis de expressão de células leucêmicas residuais. À esquerda DRM altamente positiva, ao centro DRM fracamente positiva e à direita amostra negativa para DRM.

Outra abordagem para a detecção da DRM nas LLA B é baseada na identificação de marcadores cuja expressão difere quantitativa ou qualitativamente entre as células normais e leucêmicas como, CD38, CD45, CD66c, CD58 entre outros. Apesar de poder ser aplicado em cerca de 90% dos casos de LLA é uma metodologia que requer a utilização de citometro de fluxo com capacidade de detecção de pelo menos 4 fluorocromos, é cara e exige muita experiência do analisador (CAMPANA; COUSTAN-SMITH 2002).

Diante do exposto o presente trabalho visa a utilização de marcadores imunofenotípicos na detecção da DRM e na avaliação do prognóstico nas leucemias linfoblásticas agudas de células B no protocolo RE-LLA utilizado nos pacientes atendidos na Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), no período de 10 anos (2005-2015).

3 JUSTIFICATIVA

O Instituto de medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) é um Centro de referência em tratamento Materno- Infantil, atendendo aproximadamente 150 novos casos de câncer pediátrico por ano, sendo que em torno de 80% deles são de leucemia. O presente trabalho irá beneficiar os pacientes portadores de leucemia linfóide aguda B, no sentido de avaliar a aplicação da doença residual mínima no serviço para que o paciente possa ser melhor classificado e receba doses de quimioterapia compatíveis com o seu risco, além disso a determinação da doença residual mínima também é de grande importância para o acompanhamento da resposta ao tratamento.

Os laboratórios de diagnóstico do serviço de oncologia pediátrica do IMIP realizam de rotina a detecção das translocações comumente envolvidas nas leucemias e a análise imunofenotípica que são importantes na caracterização e identificação da doença residual mínima no câncer infantil. É de interesse do serviço investir em desenvolvimento e tecnológico que traga um benefício ao atendimento da criança com câncer e esse projeto permitirá a ampliação de suas linhas de pesquisa.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a frequência de marcadores imunofenotípicos e o seu papel na detecção de doença residual mínima e determinação do prognóstico em crianças com leucemia linfóide aguda de células B.

4.2 Específicos

- a) Caracterizar os casos de leucemia linfoblástica aguda de células B em crianças do ponto de vista demográfico e laboratorial;
- b) Determinar a frequência de marcadores imunofenotípicos e correlacionar com o desfecho da leucemia linfoblástica de células B;
- c) Determinar a presença de doença residual mínima nos portadores de leucemia linfoblástica de células B, e avaliar sua aplicabilidade na rotina clínica;
- d) Avaliar as translocações cromossômicas encontradas e correlacionar com imunofenótipos;
- e) Determinar o índice de DNA nos pacientes estudados e correlacionar com imunofenótipos.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho de Estudo

Esse é um estudo de coorte de crianças com diagnóstico de leucemia linfoblástica de linhagem B iniciado em agosto de 2005, visando à avaliação do protocolo de detecção da doença residual mínima pelo método proposto por Coustan-Smith.

5.2 Pacientes, local de estudo e período de coleta e considerações éticas

Foram estudadas todos os pacientes de zero a 18 anos diagnosticados com leucemia linfoblástica de linhagem B, no Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), no período de Agosto 2005 até julho de 2015, que preencheram os critérios de inclusão.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CPqAM e do IMIP (CAAE:13296913.3.0000.5190) (ANEXO A). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado pelos responsáveis legais dos menores. (APÊNDICE A)

5.3 Critérios de inclusão e exclusão e classificação de risco

Foram estudadas exclusivamente pacientes de zero a 18 anos diagnosticados e tratados no Serviço de Oncologia Pediátrica do IMIP, e que os representantes legais concordaram em participar do estudo assinando o termo de consentimento informado. Foram excluídas as crianças que não foram classificadas com outros tipos de leucemia não B. Os pacientes de LLA B foram divididos em grupos de risco de acordo com características clínicas e biológicas conforme quadro 10.

5.4 Variáveis de estudo e coleta de dados

Os dados demográficos (idade ao diagnóstico e sexo), clínicos (sintomas e

sinais), e dados laboratoriais do hemograma, desidrogenase láctea (DHL), mielograma, assim como as variáveis de desfecho (remissão completa, recaída, segunda neoplasia, óbito e cura) foram retirados do prontuário eletrônico do paciente e submetidos a teste de qualidade, subtraindo as duplicações e incongruências, por exemplo: a presença de cura na ausência de remissão completa.

Quadro 10. Critérios para classificação de risco utilizadas no estudo de acordo com NCI

Risco provisório ao Diagnóstico		
Baixo Risco	Alto Risco	
Idade > 1 < 10	Todos os pacientes que não satisfaçam os critérios de Baixo Risco	
Leucócitos < 50.000/mm ³		
Índice de DNA ≥ 1.16 (hiperdiploide);		
Apresentar t(12;21)		
E não apresentar nenhum dos seguintes achados:		
SNC 3 (≥ 5 leucócitos/mm ³ no LCR com blastos ou paralisia de nervos cranianos)		
Infiltração testicular (evidenciada por ultrasonografia);		
Achados genéticos adversos (t(9;22), t(1;19) ou rearranjo <i>MLL</i> ; Hipoploidia (< 45 cromossomos)		
Risco Definitivo definido pelo resultado da DRM do dia 19		
Especial	Intermediário	Alto
Todos os pacientes classificados provisoriamente como de baixo risco e com DRM negativa (<0.01%)	Todos os pacientes classificados provisoriamente como de baixo risco e com DRM positiva entre 0.01%-4,99%.	Todos os pacientes classificados provisoriamente como de baixo risco e com DRM positiva igual ou maior que 5%

Fonte: Elaborado pela autora

5.5 Protocolo de Tratamento

Os pacientes receberam o tratamento de acordo com o grupo de risco definido pelo protocolo RE-LLA (ainda não publicado). O esquema terapêutico do protocolo está descrito resumidamente no Quadro 11.

Quadro 11: Esquema terapêutico do protocolo RE-LLA para os diferentes grupos de risco.

Tratamento	Risco		
	Especial (116 semanas)	Intermediário (120 semanas)	Alto (120 semanas)
Indução	4 semanas (prednisona, vincristina, daunorubicina , L-asparaginase)	4 semanas (prednisona, vincristina, daunorubicina , L-asparaginase) + 3 semanas (ciclofosfamida, 6-mercaptopurina e citarabina)	4 semanas (prednisona, vincristina, daunorubicina , L-asparaginase) + 3 semanas (ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, citarabina e L-asparaginase)
Consolidação	8 semanas (metotrexato em altas doses(2,5g/m ²), 6-mercaptopurina)	8 semanas (metotrexato em altas doses(2,5g/m ²), 6-mercaptopurina)	8 semanas (metotrexato em altas doses(5,0g/m ²), 6-mercaptopurina)
Manutenção Primária	6 semanas (6-mercaptopurina , metotrexato , dexametasona e vincristina)	6 semanas (6-mercaptopurina , metotrexato , dexametasona e vincristina)	6 semanas (6-mercaptopurina , metotrexato , dexametasona e vincristina)
Re-indução I	6 semanas (dexametasona , vincristina, L-asparaginase , 6-mercaptopurina, metotrexato)	6 semanas (dexametasona , vincristina, L-asparaginase , 6-mercaptopurina, metotrexato)	6 semanas (dexametasona , vincristina, L-asparaginase , 6-mercaptopurina, metotrexato, daunorubicina)
Manutenção A	40 semanas (dexametasona , vincristina , 6-mercaptopurina, metotrexato)	40 semanas (dexametasona , vincristina , 6-mercaptopurina, metotrexato)	12 semanas (dexametasona , vincristina, L-asparaginase , 6-mercaptopurina, metotrexato)
Re-indução II	Não Realizado	Não Realizado	4 semanas (dexametasona , vincristine, L-asparaginase , 6-mercaptopurina, metotrexato)
Manutenção	Não Realizado	Não Realizado	24 semanas (6-mercaptopurina , metotrexato , dexametasone ,vincristina)
Manutenção B	52 semanas (6-mercaptopurina , metotrexato)	52 semanas (dexametasona, vincristina, 6-mercaptopurina, metotrexato)	52 semanas (dexametasona, vincristina, 6-mercaptopurina, metotrexato)

Fonte: elaborado pelaElaborado pela autora

5.6 Amostras de pacientes

Amostra de aspirado de medula óssea coletada da crista ilíaca ou sangue periférico em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de pacientes ao diagnóstico (aproximadamente 8ml). Após a confirmação de uma leucemia aguda dada pela análise da morfologia das células no aspirado associado aos exames citoquímicos, uma alíquota da amostra foi encaminhada para o laboratório de imunofenotipagem. A amostra da medula também foi coletada no meio da indução (Dia 19) e no final da indução (D26) do tratamento para acompanhamento da doença residual mínima.

5.7 Separação de células

As células brancas foram separadas dos demais componentes da medula óssea/sangue periférico utilizando o gradiente Ficoll®-Hystopaque (GE Health Care Bio-ciências, Uppsala, Suécia). A amostra foi diluída em tampão PBS 1X, colocada em um tubo cônico de 15ml contendo 3ml do reagente Ficoll e submetida a centrifugação por 30 minutos a 2000 g. O anel de células foi removido para um tubo limpo para sucessivas lavagens com tampão PBSA (PBS + 5% de azida sódica). Ao final o precipitado de células foi suspenso em PBSA e a contagem das células feita utilizando câmara de Neubauer.

5.8 Citometria de fluxo

5.8.1 Diagnóstico das leucemias

Ao diagnóstico 1×10^6 células de medula óssea (em 50 μ L de PBSA) foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com um dos fluoróforos Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE), Complexo Peridinaclorofil-proteína (PercP), e a Alofococianina (APC) e específicos para identificação de antígenos de superfície CD3, CD7, CD10, CD13, CD34, CD45, Kappa e Lambda e antígenos intracitoplasmáticos cyCD3, mieloperoxidase (MPO), desoxinucleotidil

transferase (TdT), CD79a e IgM, conforme apresentados nos Quadros 12 e 13. Os anticorpos utilizados neste estudo foram da BD (Becton Dickinson, San Jose, EUA), exceto TdT e CD79a (DAKO TM, Carpinteria, CA, EUA) e o volume utilizado foi de 10 µL para cada anticorpo com exceção do TdT e CD79a que foram utilizados 5 µL. A lista dos clones utilizados está demonstrada no Apêndice C.

Para a marcação, as células foram incubadas com os anticorpos durante 10 minutos no escuro, seguidas de 2 lavagens com 1 mL de PBSA seguidas por centrifugação 2 min a 10.000 x g, e depois as células precipitadas foram fixadas em paraformaldeído a 0,5%. Para a coloração intracelular, as células foram primeiro permeabilizadas com tampão 8E (gentilmente cedido pela Dra. Coustan-Smith, National University Cancer Institute, Singapore (NCIS) por 40 minutos no escuro, antes da incubação com anticorpos que ocorreu da mesma forma que os anticorpos de superfície. Aquisição foi feita no citômetro FACsCalibur (Becton Dickson) de 2005 a 2012, e no citômetro de fluxo Acurri C6 (Becton Dickson) de 2013-2015. Os dados de aquisição foram analisados utilizando os softwares Cellquest (aquisição FACS) ou Cflow-plus (aquisição Accuri). Foram adquiridos 10.000 eventos por tubo e os resultados foram impressos em valor percentual da população de células positivas ($\geq 25\%$) ou negativas ($< 25\%$) para determinado anticorpo.

Quadro 12 - Painel de anticorpos utilizados no diagnóstico da leucemia linfóide B utilizando citômetro Facs Calibur de um laser (Período de 2005-2012) (continua)

Tubo	FITC	PE	PercP
1	U/A*		
2	IgG	IgG	IgG
3	CD3	CD19	CD45
4	CD7	CD13	-
5	-	CD33	-
6	CD10	CD34	-
7	-	CD22	-
8	Kappa	Lambda	
9**	IgG	IgG	IgG

Quadro 12 - Painel de anticorpos utilizados no diagnóstico da leucemia linfoide B utilizando citômetro Facs Calibur de um laser (Período de 2005-2012) (Conclusão)

Tubo	FITC	PE	PercP
10**	MPO	CitCD79a	CitCD3
11**	TdT	IgM	CitCD3
12***	CD34	CD10	CD19 (Percp Cy5.5)

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: * U/A – Unstained/Autofluorescence (Tubo com células não marcadas para controle de auto fluorescência); ** Marcadores intracitoplasmáticos; *** Tubo residual D01.

Após a aquisição do citômetro AccuriC6 passou a ser utilizado o painel de 4 cores conforme demonstrado no Quadro 13.

Quadro 13 - Painel de anticorpos utilizados no diagnóstico da Leucemia Linfoide B utilizando o citômetro Accuri C6 com dois lasers.(Período de 2012-2015)

Tubos	FITC	PE	PercP	APC
1	U/A*			
2	IgG1	IgG1	45	IgG1
3	34	13	45	19
4	7	117	45	33
5**	Kappa	10	34	19
6	Lambda	22	45	-
7***	MPO	79a	45	3
8***	TdT	IgM	45	HLA-DR

Fonte : Elaborado pela autora

Nota : * U/A – Unstained/Autofluorescence (Tubo com células não marcadas para controle de auto fluorescência); ** Tubo residual D01; *** Marcadores intracitoplasmáticos, necessita marcação prévia do CD45 de superfície.

Os Anticorpos CD117 e HLADR foram excluídos das análises por terem sido utilizados apenas nas amostras entre 2013-2015 e foram usados apenas para aplicação no diagnóstico.

5.8.2 Avaliação da Doença Residual mínima (DRM)

A DRM foi avaliada de acordo com a expressão dos marcadores

CD10/CD34/CD19 proposta por Coustan -Smith et al. (Coustan-Smith 2006). Em cada tubo, foram colocadas 10^6 células, 5ul de soro fetal de coelho (Invitrogen São Paulo, Brazil), para bloqueio de sítios inespecíficos, e o anticorpo específico conforme listado no Quadro 14. Foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, foram feitas 2 lavagens com PBSA seguidas por centrifugação 2 min a $10.000 \times g$ e por fim o precipitado de células foi suspenso em paraformaldeído 0,5% para fixação da reação, com exceção só tubo contendo o reagente Syto que foi ressuspenso em tampão PBSA 1X.

As células marcadas foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACScalibur de um laser entre 2005-2012 e analisadas com o programa Cell Quest (Becton & Dickinson). A partir de 2013 as células foram adquiridas utilizando o citômetro Accuri de dois lasers e os dados analisados no programa Cflow plus analyzer (Becton & Dickinson). Foram adquiridos no mínimo 100.000 eventos por tubo e no máximo 1.000.000. A doença residual mínima foi considerada positiva quando igual ou maior que 0,01%.

Quadro 14 - Painel de anticorpos utilizados para detecção da Doença Residual mínima

Protocolo	Tubo	FITC	PE	PercP	APC
2005-2012	1	Syto 13* (0.5 ul)	--	CD19 (PercP cy5.5) (5ul)	--
	2	CD34 (20ul)	CD10 (15ul)	CD19 (PercP cy5.5) (5ul)	--
	2	CD34 (20ul)	IgG (10ul)	CD19 (PercP cy5.5) (5ul)	--
	2	Kappa e Lambda (10 ul cada)	CD10 (15ul)	CD19 (PercP cy5.5) (5ul)	--
2013 -2015	1	Syto 13* (0.5 ul)	CD10 (15ul)	CD34 (10ul)	CD19 (5ul)
	2	Kappa e Lambda (10 ul cada)	CD10 (15ul)	CD34 (10ul)	CD19 (5ul)
	3	Kappa e Lambda (10 ul cada)	IgG (10ul)	CD34 (10ul)	CD19 (5ul)

Fonte; Elaborado pela autora

Nota: * Corante utilizado para identificar células nucleadas e detectado pelo canal FITC.

5.9 Determinação do Índice de DNA

Para determinar o índice de DNA (ploidia), foi incubado 150 µl de medula óssea ou sangue periférico com 2 ml de solução BD FACS-Lysing (Becton Dickinson, San Jose, EUA) à temperatura ambiente durante 10 minutos no escuro. Em paralelo, foi processado 150µl de sangue periférico saudável como células diplóides de referência. Após centrifugação a 2000g durante 2 minutos, o sedimento celular foi ressuspenso com 2 mL de FACSflow (Becton Dickinson, San Jose, EUA) para lavagem e centrifugação como anteriormente. O precipitado foi suspenso em 500 µl de iodeto de propídio (Sigma Aldrich,) na presença de 10 µl de RNase (2 mg / mL) (Invitrogen São Paulo, Brasil) e deixado a 4°C durante 10 minutos antes da aquisição de 20.000 eventos por tubo utilizando o FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, EUA). A análise foi realizada pelo software MODIFIT (Becton Dickinson, San Jose, EUA) e considerada hipodiploide, valores com índice de DNA menor do que 1, diploide com o valor do índice de DNA entre 1 e 1.15 e hiperdiploide valores ≥ 1.16 .

5.10 Detecção de translocações cromossômicas por Biologia Molecular

O RNA foi extraído de 5×10^6 células usando o reagente Trizol® (Invitrogen São Paulo, Brazil) e em seguida submetido a síntese de cDNA utilizando primers randômicos e superscript RT II (Invitrogen São Paulo, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi utilizado para amplificar os transcritos quiméricos mais comuns e o gene constitutivo *GAPDH*, utilizado como controle da qualidade do material genético. Para a reação da polimerase em Cadeia (PCR), foram utilizados os iniciadores listados no Quadro 15.

A reação de PCR consistiu em Tampão de PCR 1X, 0,1mM de dNTP's , 0,7 mM de $MgCl_2$, 1U de *Taq* DNA polimerase, 25 pmoles de cada iniciadores, 1ul de cDNA e Água Diethylpyrocarbonate (DEPC) para um volume final de 25ul . As condições de PCR para *GAPDH*, t(12;21), t(4;11) e t(9;22)-1 (para detecção da quebra p210) foram: 30 cycles de 94°C-3 minutos, 94°C -1 minuto, 60°C -1 minuto; 72°C -1 minuto e 72°C - 7 minutos . Para a detecção da t(1;19) e t(9,22)-2 (para detecção da quebra p190)foi alterada apenas a temperatura de anelamento que foi 65°C. O produto de PCR foi visualizado sob luz UV em gel de Agarose a 2%, corado

com brometo de etídio (10mg/ml)

Quadro 15: Iniciadores usados para a detecção das translocações pesquisadas.

Translocação alvo	Sequencia
t(12;21)	5' CGTGGATTTCAAACAGTCCA 5' CGCCTCGCTCATCTTGCCTG
t(1;19)	5' CACAGCCGGCGACATGCACAC 5'TGAACCTGCCCCCTCCAGAAGC
t(4;11)	5' GGCTCAGCTGTACTAGGCGTATGTA 5' CCTCCACGAAAGCCCGTCGAGGAAAA
t(9;22)	5' ATCTCCACTGGCCACAAAATCATACA (ABL) 5' TGGAGCTGCAGATGCTGACCAACTCG (BCR 1) 5'AGATCTGGCCCAACGATGGCGAGGGC (BCR 2)
t(9;11)	5' TATGCCTTGTCACATTCACC 5' CGCCTCAGCCACCTACTACA
t(11;19)	5' CCCAAAGAAAAGCAGTAGTGA 5' CGTACCCCGACTCCTCTACT
<i>GAPDH</i>	5' AGAAGGCTGGGGCTCATTG 5'GTGGTCATGAGTCCTTCCAC

Fonte: Elaborado pela autora

5.11 Análise dos dados

Foi realizada uma análise descritiva e a comparação das variáveis qualitativas foi através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher, quando necessário. Para as curvas de sobrevida foi aplicado o método de Kaplan-Meier e o teste Log-Rank para as comparações das curvas de sobrevida. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no SPSS v 8.0.

6 RESULTADOS

Do período de agosto de 2005 até julho de 2015, 384 pacientes foram diagnosticados no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) com leucemia linfóide B e atenderam os requisitos para serem incluídos no estudo. O diagnóstico foi baseado em critérios clínicos e laboratoriais, como mielograma e imunofenotipagem.

6.1 Perfil demográfico e laboratorial dos pacientes

Dentre os pacientes analisados a maioria estava na faixa etária de 1-5 anos de idade (50,3%), sendo seguida pelo grupo de 5-10 anos (30%), maiores de 10 anos (17,8%) e menores de 1 ano de idade (1,8%). Em relação ao gênero, o sexo masculino apresentou uma incidência um pouco maior (porém não significativa) em relação ao feminino, foram 211 casos em meninos (55,1%) contra 173 casos em meninas (44,9%). Em relação a ancestralidade, considerando a característica fenotípica da cor da pele, as crianças pardas foram a maioria com 245 casos (63,7%), as crianças brancas representaram 132 casos (34,5%), e com uma menor incidência, as crianças negras foram apenas 7 casos (1,8%).

Quanto aos achados laboratoriais hematológicos foi identificado que em relação a contagem de hemácias, houve uma predominância no grupo que tinha entre 1–4 milhões de hemácias por mm^3 (92,7%), enquanto pacientes com quantidades inferior a 1 milhão por mm^3 e maiores que 4 milhões de hemácias por mm^3 foram mais raros com 4(1,1%) e 22(6,1%) casos respectivamente. Ainda em relação a série vermelha foram observados valores abaixo do normal (de referência para idade) para hemoglobina e hematócrito em 96,7% e 98,8% dos pacientes respectivamente.

Apesar do fato da leucemia provocar contagens elevadas de leucócitos na maioria das vezes, nós identificamos que nos casos estudados esse parâmetro encontrava-se com valores normais (<10.000 leucócitos por μL) em 54,1% dos casos, já valores entre $10.000 - 50.000$ por μL foi encontrado em 28% dos casos e valores acima de 50.000 em apenas 17,9%.

Dos 359 pacientes com contagem de plaquetas realizada ao diagnóstico

apenas 18(5%) apresentaram valores acima de 300.000/ μ L. Valores entre 100.000-300.000/ μ L plaquetas foram encontrados em 67(18.4%) dos pacientes e a grande maioria, 274 pacientes (76.5%) apresentaram valores baixos de plaquetas (<100.000 por μ L).

Dentre as dosagens bioquímicas realizadas ao diagnóstico das leucemias, o aumento do ácido úrico e da desidrogenase láctea estão diretamente relacionados com lise tumoral. Nos casos analisados foi possível fazer a dosagem desses metabólitos em 383 pacientes e apenas 24.9% dos pacientes apresentaram valores aumentados de ácido úrico, enquanto que para o HDL houve uma discreta predominância dos casos com esse valor acima do valor de referência (55.5%).

A infiltração do Sistema Nervoso Central (SNC) é um importante fator prognóstico a ser analisado, e nesse estudo foram identificados 340 pacientes (84.4%) com SNC1 (ausência de blastos no líquido céfalo raquidiano (LCR)), 2 pacientes (0.5%) com SNC 2 (menos 5 blastos mm^3 no LCR), 15 pacientes (4%) com SNC3 (mais de 5 blastos mm^3 no LCR) e ainda 7 pacientes (1.8%) apresentaram punção traumática com blastos podendo ser contaminação com amostra do sangue periférico.

Todas as informações referentes aos dados demográficos e laboratoriais dos pacientes estão discriminadas na Tabela 3.

6.2 Frequência de marcadores imunofenotípicos em leucemia de células B.

A imunofenotipagem foi realizada nos 384 pacientes para o diagnóstico de leucemia linfóide aguda e de acordo com os marcadores imunofenotípicos encontrados nos casos analisados foi possível separar as leucemias linfóides agudas B em 4 subtipos: Pró B 17 casos (4,4%), B comum 284 casos (74,2%), Pré B 74 casos (19,3) e B madura 9 casos (2,3). A frequência dos marcadores imunofenotípicos presentes em cada subtipo da LLA B está apresentado na Tabela 4.

As amostras classificadas como LLA Pró B tinham como característica principal a ausência do antígeno CD10 (CALLA), sendo 17 amostras, que correspondeu a 4,4% do total dos casos analisados.

Tabela 3 - Características demográficas e laboratoriais das crianças atendidas com leucemia linfóide B atendidas no Instituto de Medicina Integral professor Fernando Figueira (IMIP).

Características Demográficas e laboratoriais	N	Frequencia (%)
Idade (anos)		
<1	7	1,8
1-5	193	50,3
5-10	116	30,0
≥10	68	17,8
Total	384	100
Sexo		
Masculino	211	55,1
Feminino	173	44,9
Total	384	100
Raça		
Branços	132	34,5
Morena (Parda)	245	63,7
Negros	7	1,8
Total	384	100
Hemácias milhões/mL		
< 1.000.000	4	1,1
1.000.000- 4.000.000	333	92,7
> 4.000.000	22	6,1
Total	359	100
Leucócitos por mm ³		
>10.000	206	54,1
10.000- 50.000	106	28,0
> 50.000	68	17,9
Total	380	100
Plaquetas por µL		
<100.000	274	76,5
100.000 – 300.000	67	18,4
>300.00	18	5,0
Total	359	100
Ácido Úrico mg/dL		
< 6	288	75,1
> 6	95	24,9
Total	383	100
DHL* U/L		
<480	171	44,5
>480	212	55,5
Total	383	100
SNC**		
SNC 1	340	84,4
SNC 2	2	0,5
SNC 3	15	4,0
Punção traumática com blastos	7	1,8
Total	380	100

Fonte: Elaborado pela autora

*DHL – Desidrogenase Láctea ; ** Sistema Nervoso Central

O grupo da LLA B comum foi o mais numeroso correspondendo a 74,2% do total dos casos e tinha como principais características imunofenótípicas a presença dos antígenos CD10, CD19, CDcit79a, CD22 e ausência da cadeia leve de imunoglobulina (IgM) tanto no citoplasma como na superfície e ausência de marcadores de cadeia pesada Kappa e/ou Lambda de superfície.

O segundo grupo mais frequente foi o da LLA Pré B com 74 casos (19,3%). Esse imunofenótipo apresentou em todos os casos a presença de cadeia leve de imunoglobulina (IgM) no citoplasma e demais marcadores de linhagem linfóide.

O subtipo LLA B madura foi o mais raro com apenas 9 pacientes (2,3%), caracterizado pela presença de marcadores de imunoglobulina de cadeia pesada Kappa e/ou Lambda na superfície das células além dos marcadores característicos da linhagem B.

Dentro dos grupos analisados também foi identificado um percentual de 20% de marcadores aberrantes, isto é a presença de marcadores de linhagem linfóide T ou mielóide nas leucemias linfóides B. O marcador aberrante mais encontrado foi o marcador de linhagem mielóide CD13 que foi identificado em 12,5% dos casos de LLA Pró B, 16% dos casos de LLA B comum e 3,8% dos casos de LLA Pré B. Outro marcador de linhagem mielóide também identificado foi o CD33, observado em 11,8% dos casos de LLA pró B, 6,4% dos casos de LLA B comum e em 3,8% dos pacientes com LLA Pré B. O marcador de linhagem T, CD7 foi visto em dois pacientes (0,7%) do total de pacientes com LLA B comum. O subtipo LLA B madura não apresentou positividade para nenhum marcador aberrante.

A presença de coexpressão de CD19 X CD10 com ou sem a expressão de CD34, em 98,9% dos casos considerando todos os subtipos, foi de grande importância para a aplicação da DRM D19 pelo método proposto por Coustan-Smith et al.. Nos casos de CD10 negativo (4,4%), a coexpressão de CD19 x CD34 permitiu a detecção pelo método simplificado de DRM.

6.3 Frequência de translocações cromossômicas em leucemia de células B

A pesquisa de translocações cromossômicas pela técnica de PCR foi realizada em 371 amostras de pacientes com LLA B. Dentre as translocações.

Tabela 4 - Marcadores de superfície e intracelular expressos em diferentes subtipo de LLA B .

Marcadores	Pro B (+/n)	B comum (+/n)	Pre B (+/n)	B maduro (+/n)
Imunofenotípicos				
Marcadores inespecíficos				
CD10	0/17	284/284	72/74	9/9
CD45	12/16	197/280	61/74	9/9
Marcadores B				
CD 19	17/17	281/284	74/74	9/9
CD 22	14/17	263/281	69/74	7/9
CitCD79a	17/17	280/284	73/74	9/9
Cyt IgM	0/17	0/283	74/74	0/9
Kappa	0/17	0/269	0/74	3/9
Lambda	0/17	0/269	0/74	6/9
Marcadores de imaturidade				
CD34	15/17	244/284	37/74	0/9
TdT	16/17	267/281	66/74	1/9
Marcadores aberrantes				
CD7	0/16	2/280	0/74	0/9
CD13	2/16	49/281	5/74	0/9
CD33	2/17	19/280	3/74	0/9
MPO	0/17	0/282	0/74	0/9
Coexpressão				
CD10+/CD19+ / CD34±	0/17	284/284	72/74	7/9
CD19+/CD34+ /CD10neg	16/17	0/284	1/74	0/9

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: + corresponde ao número de casos positivos (>25%), n corresponde ao número de casos testados para cada marcador.

avaliadas a mais comum foi a t(12;21) encontrada em 56 casos (15,1%), seguida pela t(1;19) detectada em 27 casos (7,3%), t (9;22) em 10 (2,7%) casos, t(4;11) em 4 casos (1,1%), t(9;11) e t(11;19) com 1 caso cada (0,3%). Os 272 pacientes negativos para as translocações testadas por PCR, não foram avaliados por técnica de

citogenética. Dentro dos subtipos testados os casos de LLA B comum foi o que apresentou o maior número de translocações com 47 casos de t(12;21), 8 casos de t(1;19), 7 casos de t(9;22) e 1 caso de t(9;11). A LLA Pré B apresentou na sua grande maioria a t(1;19) com 19 casos, t(12;21) com 9 casos e 3 casos com t(9;22). A LLA pró B apresentou apenas 4 pacientes positivos e todos com rearranjo no gene *MLL* presente no cromossomo 11 região q23, sendo 3 com t(4;11) e 1 com t(11;19). Nenhuma alteração cromossômica dentre as estudadas foi encontrada na LLA B madura.

6.4 Determinação do índice de DNA e associação com imunofenotipagem e biologia molecular.

O índice de DNA (IDNA) foi avaliado em 373 pacientes, e destes foi detectado hiperploídia (IDNA $\geq 1,16$) em 82 casos (22%), enquanto 291 pacientes apresentaram diploídia (IDNA $< 1,16$). A frequência das características imunofenotípicas e das alterações genéticas das células leucêmicas nos blastos diploides e hiperploides estão descritas na Tabela 5.

Em relação aos subtipos de LLA B, a proporção de casos diploides X hiperploides na LLA B comum (209 X 67), LLA Pre B (59 X 14) e LLA B madura (6 X 1) foi similar ($P=0.833$). Nenhum dos 17 casos de LLA pró B apresentou hiperploídia e a hipoploídia não foi observada em nenhum dos 373 casos analisados.

Além disso, os casos de hiperploídia estiveram associados com a positividade ao marcador de imaturidade CD34 ($P=0,002$; OR=2,58; IC95%=1,41-4,75), sendo em 96% dos casos associados a positividade ao marcador de prematuridade TdT. Contudo, o marcador TdT por si não esteve associado a hiperploídia ($P=0,316$; OR=2,02; IC95%=0,58-6,93).

Dos 247 pacientes diploides avaliados quanto a biologia molecular, 83 (33,6%) apresentaram alterações cromossômicas, sendo 48 (57,8%) positivo para t(12;21), 22 (26,5%) para t(1;19), 9 (10,8%) para t(9;22), 3 (3,6%) positiva para t(4;11), e 1 (1,2%) para t(11;19). Dentre os 78 hiperploides testados para biologia molecular apenas 7 casos (9,0%) apresentaram rearranjo cromossômico; 4 foram positivos para t(12;21), enquanto 3 para t(1;19).

Tabela 5 - Relação da ploidia com o imunofenótipo e aberrações cromossômicas.

Característica	Diploide		Hiperdiploide		p
	N	%	N	%	
Imunofenótipo (n= 373)					
Pró B	17	5,8	0	0	0,833
B comum	209	71,8	67	81,7	
Pré B	59	20,3	14	17,1	
B madura	6	2,1	1	1,2	
Total	291	100	82	100	
Marcadores Imaturos (n= 373)					
CD34+ / TdT +	177	60,6	64	79	0,012
CD34+ / TdT-	7	2,4	2	2,5	
CD34- / TdT+	94	32,2	14	17,3	
CD34 - / TdT-	14	4,8	1	1,2	
Total	292	100	81	100	
Translocação cromossômica (n=325)					
t(12;21)	48	19,4	4	5,1	<0,01
t(1;19)	22	8,9	3	3,9	
t(9;22)	9	3,6	0	0	
t(4;11)	3	1,2	0	0	
t(11;19)	1	0,4	0	0	
Negativo	164	66,4	71	91,0	
Total	247	100	78	100	

Fonte: |Elaborado pela autora

6.5 Impacto da avaliação de doença residual mínima na classificação de risco das crianças com leucemia de células B

Ao diagnóstico, 132 (34,4%) das 384 crianças estudadas foram classificadas de alto risco pelos critérios da NCI (Tabela 6).

A classificação definitiva do risco do paciente considera o resultado da doença residual mínima no dia 19 do tratamento, que corresponde ao estágio de indução. Adicionalmente, a presença de doença residual mínima foi avaliada no dia 26 de tratamento para confirmação da classificação.

Tabela 6 - Distribuição dos casos de leucemia linfóide classificadas ao diagnóstico como de alto risco de acordo com os critérios clínicos e laboratoriais definidos pelo Nacional Cancer Institute of United States of American.

Critérios	Número de pacientes
Idade < 1 ano e ≥ 10 anos	48
Leucócitos ≥ 50.000 mm ³ /μL	26
SNC 3	3
Biologia Molecular desfavorável	12
Mais de um critério	43

Fonte:Elaborado pela autora.

Nota: Critérios de alto risco são Idade < 1 ano e ≥ 10 anos; Leucócitos ≥ 50.000 mm³/μL; infiltração no sistema nervoso central (SNC3); e alteração genética envolvendo rearranjo MLL e t(9;22).

A doença residual mínima foi determinada pela presença da coexpressão CD10 X CD19 com ou sem expressão de CD34, e pode ser realizada em 358 dos 384 pacientes. A acurácia do método simplificado para detecção da doença residual mínima foi testada inicialmente, e os resultados estão apresentados no artigo intitulado “*Implementation of a simplified flow cytometric assays for minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia*”, publicado na revista “*Cytometry Part B Clinical Cytometry*”. (Anexo B).

Dos 26 pacientes que não tiveram a DRM determinada, 3 foram devido a óbito precoce antes do dia 19 e os demais não tiveram condições clínicas de coleta ou o número de células obtidas foi insuficiente para atingir a sensibilidade do teste. O resumo da reclassificação dos casos está apresentado no Quadro 16.

Dos 132 pacientes alto risco ao diagnóstico, 76 foram positivos e 42 foram negativos para a presença de DRM no dia 19, mesmo assim permaneceram como sendo de alto risco de acordo com os critérios do NCI, e 14 não foram avaliados quanto a DRM.

Dos 252 pacientes de baixo risco ao diagnóstico, 17 foram reclassificados de alto risco devido a presença de DRM superior a 4,99%, 119 tornaram-se de risco intermediário devido a positividade a DRM entre 0,01% e 4,99% e 104 pacientes apresentaram DRM negativa (<0,01%) considerados com risco baixo de recaída, sendo denominado de risco especial. Entretanto, 7 pacientes dos 104 com DRM negativa apresentaram valores acima de 0,01% na análise confirmatória da DRM no dia 26 de tratamento e foram reclassificados com risco intermediário. Apenas 12

pacientes não foram avaliados quanto a presença de DRM, sendo reclassificados como risco intermediário. O fluxograma resumido da classificação após a determinação da DRM está descrita no Apêndice B.

Quadro 16. Classificação definitiva das crianças com leucemia de células B conforme a presença de doença residual mínima

Risco Provisório	N	Risco Definitivo	N	Sem DRM
Alto	132	Alto	118*	14
Baixo	252	Especial	97**	
		Intermediário	126**	12
		Alto	17	

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: (*) 42 pacientes apresentaram DRM no dia 19 negativo; (**) 7 pacientes com DRM negativa no dia 19 apresentaram DRM positiva no dia 26, e foram reclassificados como risco intermediário.

Em relação ao resultado da DRM do dia 19, foram identificados 212 casos positivos (59%), com presença de pelo menos 0,01% de células leucêmicas detectáveis, sendo que setenta e cinco desses casos já tinham sido classificados como de alto risco ao diagnóstico. Dentre os 240 casos sem critérios clínicos e laboratoriais para gravidade ao diagnóstico, 143 (59,6%) se beneficiaram com a avaliação quanto a presença de DRM no dia 19, passando a ser elegível a intensificação do esquema terapêutico. Por outro lado, pode-se ressaltar que 40% das crianças submetidas a avaliação de DRM foram beneficiadas com esquema quimioterápico menos intenso, sujeitas a menos efeito adverso dos quimioterápicos, que influem segunda neoplasia e toxicidade. Além disso, 7 pacientes que apresentaram resultado negativo no dia 19 foram positivos para DRM no dia 26 e foram reclassificados como risco intermediário. Dentre os 97 pacientes classificados como risco especial baseado na avaliação de DRM, e que receberam menos quimioterapia apenas 2 recaíram (2,1%), enquanto a taxa de recaída foi mais alta entre os pacientes de risco intermediário (13%) e alto (17%).

6.6 Frequência dos marcadores imunofenotípicos nos grupos de risco e prognóstico

A importância prognóstica dos marcadores imunofenotípicos foi avaliada considerando os grupos de risco definidos pelo protocolo RE-LLA, desta forma evita-

se que os resultados sejam influenciados pelo tipo de tratamento realizado. A tabela 7 mostra os marcadores imunofenotípicos testados nos diferentes grupos de risco, i.e., 97 pacientes no grupo especial, 138 no grupo intermediário e 149 no de alto risco.

O marcador pan leucocitário CD45 apresentou menos casos positivos no grupo especial (60%) em relação ao grupo intermediário que apresentou 72% e ao grupo de alto risco (83%) (qui-quadrado=15,75; $P<0,000$). Enquanto que em relação ao marcador CD10, a frequência de resultados positivos foi mais alta no grupo especial (99% dos casos), já no grupo intermediário e alto risco esse percentual foi de 96% e 91% respectivamente (qui-quadrado=9,33; $P=0,009$). A presença do marcador de imaturidade CD34 foi similar entre os grupos especial e intermediário (71% e 79% respectivamente), porém maior do que no grupo de alto risco onde foi encontrado apenas 54% de positividade para esses marcadores (qui-quadrado=21,71; $P<0,000$).

Dentre os marcadores aberrantes mielóide, o CD13 apresentou frequência semelhante nos três grupos, sendo 12% no risco especial, 17% no risco intermediário e 15% no alto risco ($P=0,540$), enquanto o CD33 estava presente apenas no grupo intermediário (9,6%) e no alto (8,1%) ($P=0,677$).

Tabela 7- Marcadores Imunofenotípicos encontrados nos diferentes grupos de risco (continua)

Marcadores Imunofenotípicos	Risco	Risco	Risco
	Especial(+/n)	Intermediário(+/n)	Alto (+/n)
CD10	96/97	134/138	136/149
CD45	57/95	100/137	122/147
Marcadores B			
CD 19	97/97	139/138	147/149
CD 22	88/95	130/138	137/148
CitCD79a	97/97	139/138	146/149

Tabela 7- Marcadores Imunofenotípicos encontrados nos diferentes grupos de risco (conclusão)

Marcadores Imunofenotípicos	Risco Especial(+/n)		Risco Intermediário(+/n)		Risco Alto (+/n)	
	N	%	N	%	N	%
Cit IgM	22	22.7	25	18.9	39	26.1
Kappa	0	0.0	0	0.0	5	3.3
Lambda	0	0.0	0	0.0	7	4.6
Marcadores Imaturos						
CD34	69	71.1	109	80.5	80	53.7
TdT	96	98.9	131	97.9	141	94.6
Marcadores aberrantes						
CD7	0	0.0	1	0.7	1	0.6
CD13	11	11.3	23	17.1	22	14.7
CD33	0	0.0	13	9.7	12	7.9

Fonte: Elaborado pela autora

Nota . Nota: + corresponde ao número de casos positivos (>25%), n corresponde ao número de casos testados para cada marcador.

A presença do marcador aberrante mielóide CD13 nas células dos pacientes do grupo de risco especial ($P = 0,012$, Tabela 6) e a ausência de expressão do TdT nas células dos pacientes do grupo de alto risco ($P = 0,050$, Tabela 8) e, possivelmente, do risco intermediário ($P = 0,081$, Tabela 8) foram associados com a recaída.

Nenhum marcador imunofenotípico foi associado com risco aumentado de óbito nos pacientes de risco especial (Tabela 8).

Tabela 8 - Significância dos diferentes marcadores analisados no grupo baixo risco. (Continua)

	Óbito					Recaída				
	Sim		Não		P-valor	Sim		Não		P-valor
	N	%	N	%		N	%	N	%	
CitCD3										
≥ 25%	0	0.0	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0	-
< 25%	1	1.1	94	98.9	-	1	1.1	94	98.9	-
CitCD79a										
≥ 25%	0	0.0	0	0.0	-	0	0.0	0	0.0	-
< 25%	1	1.1	94	98.9	-	1	1.1	94	98.9	-

Tabela 8 - Significância dos diferentes marcadores analisados no grupo baixo risco. (Continua)

	Óbito					Recaída					P-valor
	Sim		Não		P-valor	Sim		Não			
	N	%	N	%		N	%	N	%		
≥ 25%	1	1.0	95	99.0		≥ 25%	2	2.1	94	97.9	
< 25%	0	0.0	1	100.0	1.000	< 25%	0	0.0	1	100.0	1.000
CitlgM						CitlgM					
≥ 25%	0	0.0	23	100.0		≥ 25%	0	0.0	23	100.0	
< 25%	1	1.4	73	98.6	1.000	< 25%	2	2.7	72	97.3	1.000
MPO						MPO					
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0	
< 25%	1	1.0	96	99.0	-	< 25%	2	2.1	95	97.5	-
TdT						TdT					
≥ 25%	1	1.1	94	98.9		≥ 25%	2	2.1	93	97.9	
< 25%	0	0.0	0	0.0	-	< 25%	0	0.0	0	0.0	-
CD10						CD10					
≥ 25%	1	1.0	95	99.0		≥ 25%	2	2.1	94	97.9	
< 25%	0	0.0	1	100.0	1.000	< 25%	0	0.0	1	100.0	1.000
CD13						CD13					
≥ 25%	0	0.0	11	100.0		≥ 25%	2	18.2	9	81.8	
< 25%	1	1.2	84	98.8	1.000	< 25%	0	0.0	85	100.0	0.012
CD19						CD19					
≥ 25%	1	1.0	96	98.0		≥ 25%	2	2.1	95	97.9	
< 25%	0	0.0	0	0.0	-	< 25%	0	0.0	0	0.0	-
CD22						CD22					
≥ 25%	1	1.1	86	98.9		≥ 25%	2	2.3	85	97.7	
< 25%	0	0.0	8	100.0	1.000	< 25%	0	0.0	8	100.0	1.000
CD3						CD3					
≥ 25%	0	0.0	1	100.0		≥ 25%	0	0.0	1	100.0	
< 25%	1	1.3	79	98.8	1.000	< 25%	1	1.3	79	98.8	1.000
CD33						CD33					
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0	
< 25%	1	1.0	96	99.0	-	< 25%	2	2.1	95	97.9	-

Tabela 8 - Significância dos diferentes marcadores analisados no grupo baixo risco. (Conclusão)

	Óbito					P-valor	Recaída					P-valor
	Sim		Não		Sim		Não					
	N	%	N	%	N		%	N	%			
CD34												
≥ 25%	0	0.0	69	100.0		≥ 25%	2	2.9	67	97.1		
< 25%	1	3.6	27	96.4	0.289	< 25%	0	0.0	28	100.0	1.000	
CD45												
≥ 25%	1	1.8	56	98.2		≥ 25%	1	1.8	56	98.2		
< 25%	0	0.0	38	100.0	1.000	< 25%	0	0.0	38	100.0	1.000	
CD7												
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0		
< 25%	1	1.0	96	99.0	-	< 25%	2	2.1	95	97.9	-	
Kappa												
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0		
< 25%	1	1.0	96	99.0	-	< 25%	2	2.1	95	97.9	-	
Lambda												
≥ 25%	0	0.0	1	100.0		≥ 25%	0	0.0	1	100.0		
< 25%	1	1.1	94	98.9	1.000	< 25%	2	2.1	93	97.9	1.000	

Fonte: Elaborado pela autora

As crianças do grupo de risco intermediário apresentaram maior mortalidade quando as células leucêmicas eram negativas para os marcadores de imaturidade TdT ($P = 0,025$) ou CD34 ($P = 0,003$). A ausência do marcador de superfície da linhagem B, CD22 ($p = 0,037$), também foi associada com risco de óbito nas crianças com leucemia do grupo intermediário (Tabela 9).

Tabela 9- Significância dos diferentes marcadores analisados no grupo de risco intermediário (continua)

	Óbito				P-valor	Recaída				P-valor	
	Sim		Não			Sim		Não			
	N	%	N	%		N	%	N	%		
CitCD3											
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0	
< 25%	19	13.8	119	86.2	-	< 25%	18	13.0	120	87.0	-

Tabela 9- Significância dos diferentes marcadores analisados no grupo de risco intermediário (continua)

	Óbito					P-valor	Recáida					P-valor
	Sim		Não		N		Sim		Não		N	
	N	%	N	%			N	%	N	%		
CitCD79a						CitCD79a						
≥ 25%	20	14.4	119	85.6		≥ 25%	18	12.9	121	87.1		
< 25%	0	0.0	1	100.0	1.000	< 25%	0	0.0	1	100.0	1.000	
CitIlgM						CitIlgM						
≥ 25%	4	16.0	21	84.0		≥ 25%	5	20.0	20	80.0		
< 25%	15	13.2	99	86.8	0.749	< 25%	12	10.5	102	89.5	0.191	
MPO						MPO						
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0		
< 25%	19	13.7	120	86.3	-	< 25%	18	12.9	121	87.1	-	
TdT						TdT						
≥ 25%	16	12.3	114	87.7		≥ 25%	14	10.8	116	89.2		
< 25%	4	44.4	5	55.6	0.025	< 25%	3	33.3	6	66.7	0.081	
CD10						CD10						
≥ 25%	18	13.5	115	86.5		≥ 25%	17	12.8	116	87.2		
< 25%	2	28.6	5	71.4	0.262	< 25%	1	14.3	6	85.7	1.000	
CD13						CD13						
≥ 25%	5	21.7	18	78.3		≥ 25%	5	21.7	18	78.3		
< 25%	15	12.9	101	87.1	0.327	< 25%	13	11.2	103	88.8	0.180	
CD19						CD19						
≥ 25%	19	13.7	120	86.3		≥ 25%	17	12.2	122	87.8		
< 25%	1	100.0	0	0.0	0.143	< 25%	1	100.0	0	0.0	0.129	
CD22						CD22						
≥ 25%	16	12.3	114	87.7		≥ 25%	16	12.3	114	87.7		
< 25%	4	40.0	6	60.0	0.037	< 25%	2	20.0	8	80.0	0.617	
CD3						CD3						
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0		
< 25%	19	15.3	105	84.7	-	< 25%	17	13.7	107	86.3	-	
CD33						CD33						
≥ 25%	0	0.0	13	100.0		≥ 25%	1	7.7	12	92.3		
< 25%	20	16.3	103	83.7	0.215	< 25%	16	13.0	107	87.0	1.000	
CD34						CD34						
≥ 25%	10	9.2	99	90.8		≥ 25%	13	11.9	96	88.1		
< 25%	10	32.3	21	67.7	0.003	< 25%	5	16.1	26	83.9	0.549	
CD45						CD45						
≥ 25%	17	16.8	84	83.2		≥ 25%	15	14.9	86	85.1		
< 25%	3	7.9	35	92.1	0.278	< 25%	3	7.9	35	92.1	0.398	
CD7						CD7						
≥ 25%	0	0.0	1	100.0		≥ 25%	0	0.0	1	100.0		
< 25%	20	14.7	116	85.3	1.000	< 25%	18	13.2	118	86.8	1.000	

Tabela 9- Significância dos diferentes marcadores analisados no grupo de risco intermediário (conclusão)

	Óbito					P-valor	Recaída					P-valor
	Sim		Não		N		Sim		Não		N	
	N	%	N	%			N	%	N	%		
Kappa												
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0		
< 25%	19	14.3	114	85.7	-	< 25%	17	12.8	116	87.2	-	
Lambda												
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0		
< 25%	19	14.3	114	85.7	-	< 25%	17	12.8	116	87.2	-	

Fonte: Elaborado pela autora

As taxas de sobrevida mostraram associação entre a positividade para o marcador aberrante mioelide CD33 nos blastos de linhagem B e o óbito das crianças do grupo de alto risco ($P = 0,003$)(Tabela 10).

Tabela 10- Significância dos diferentes marcadores analisados grupo de alto risco. (Continua)

	Óbito					P-valor	Recaída					P-valor
	Sim		Não		N		Sim		Não		N	
	N	%	N	%			N	%	N	%		
CitCD3												
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0		
< 25%	32	24.1	101	75.9	-	< 25%	21	15.8	112	84.2	-	
CitCD79a												
≥ 25%	31	23.5	101	76.5		≥ 25%	20	15.2	112	84.8		
< 25%	1	50.0	1	50.0	0.422	< 25%	1	50.0	1	50.0	0.290	
CitIgM												
≥ 25%	9	32.1	19	67.9		≥ 25%	7	25.0	21	75.0		
< 25%	23	21.7	83	78.3	0.318	< 25%	14	13.2	92	86.8	0.147	
MPO												
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0		
< 25%	32	24.1	101	75.9	-	< 25%	21	15.8	112	84.2	-	
TdT												
≥ 25%	28	22.6	96	77.4		≥ 25%	17	13.7	107	86.3		
< 25%	4	40.0	6	60.0	0.250	< 25%	4	40.0	6	60.0	0.050	
CD10												
≥ 25%	30	24.0	95	76.0		≥ 25%	20	16.0	105	84.0		
< 25%	2	22.2	7	77.8	1.000	< 25%	1	11.1	8	88.9	1.000	
CD13												
≥ 25%	6	28.6	15	71.4		≥ 25%	2	9.5	19	90.5		
< 25%	26	23.2	86	76.8	0.587	< 25%	19	17.0	93	83.0	0.526	

Tabela 10- Significância dos diferentes marcadores analisados grupo de alto risco. (Conclusão)

	Óbito					Recidência					
	Sim		Não		P-valor	Sim		Não		P-valor	
	N	%	N	%		N	%	N	%		
CD19						CD19					
≥ 25%	32	24.2	100	75.8		≥ 25%	21	15.9	111	84.1	
< 25%	0	0.0	2	100.0	1.000	< 25%	0	0.0	2	100.0	1.000
CD22						CD22					
≥ 25%	29	23.0	97	77.0		≥ 25%	21	16.7	105	83.3	
< 25%	3	42.9	4	57.1	0.358	< 25%	0	0.0	7	100.0	0.596
CD3						CD3					
≥ 25%	1	100.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	1	100.0	
< 25%	31	26.1	88	73.9	0.267	< 25%	20	16.8	99	83.2	1.000
CD33						CD33					
≥ 25%	8	61.5	5	38.5		≥ 25%	4	30.8	9	69.2	
< 25%	24	20.0	96	80.0	0.003	< 25%	17	14.2	103	85.8	0.126
CD34						CD34					
≥ 25%	20	25.6	58	74.4		≥ 25%	10	12.8	68	87.2	
< 25%	12	21.4	44	78.6	0.682	< 25%	11	19.6	45	80.4	0.338
CD45						CD45					
≥ 25%	29	27.1	78	72.9		≥ 25%	17	15.9	90	84.1	
< 25%	3	12.0	22	88.0	0.129	< 25%	4	16.0	21	84.0	1.000
CD7						CD7					
≥ 25%	0	0.0	0	0.0		≥ 25%	0	0.0	0	0.0	
< 25%	32	24.2	100	75.8	-	< 25%	20	15.2	112	84.8	-
Kappa						Kappa					
≥ 25%	2	66.7	1	33.3		≥ 25%	2	66.7	1	33.3	
< 25%	27	22.1	95	77.9	0.134	< 25%	18	14.8	104	85.2	0.066
Lambda						Lambda					
≥ 25%	1	25.0	3	75.0		≥ 25%	0	0.0	4	100.0	
< 25%	28	23.1	93	76.9	1.000	< 25%	20	16.5	101	83.5	1.000

Fonte: Elaborado pela autora

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com 384 pacientes pediátricos diagnosticados e tratados no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). Dentre os pacientes envolvidos no estudo houve maior número de casos na faixa etária entre 1-5 anos e menor número em crianças com idade inferior a 1 ano de idade, compatível com diversos estudos que também demonstraram que essa faixa etária é a mais acometida, e que a doença é considerada rara em menores de 1 ano de idade (PIZZO; POPLACK, 2011; POMBO-DE-OLIVEIRA, 2009; SIEGEL; NAISHSDHAM; JEMAL, 2013;). Rudant et al. (2010) sugere que a maior incidência nessa faixa etária pode ser devido a imaturidade do sistema imune que está em formação e em constante contato com diversas viroses que poderiam ser uma das causas da leucemia.

Em relação a incidência de acordo com o sexo, foi observada uma discreta predominância no sexo masculino o que foi compatível com diversos estudos (PUI, 2010; SALINA et al., 2016) Em Pernambuco, também foram realizados estudos que apresentaram essa maior frequência nos meninos em relação às meninas (PEDROSA et al., 2002; POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2009).

Os casos em pacientes considerados pardos/mulatos foi maioria quando comparado com os brancos e negros, fato que pode estar relacionado a maior predominância dessa etnia na região de estudo, mas também há referência da maior incidência de leucemia ser em crianças da raça parda e hispânica seguida pela branca, enquanto que a raça negra é raramente acometida (ALDRICH et al., 2006; GIDDINGS et al., 2016).

Ao diagnóstico, a maioria dos pacientes apresentava anemia e quantidades reduzidas de plaquetas, achados frequentes na leucemia em diversos estudos (BARBOSA et al., 2002; KUMAR et al., 2015; MARGOLIN, 2011; NAEEM; BUKHARI, 2015), mas, apesar da quantidade de leucócitos na leucemia poder variar desde leucopenia até contagens acima de $400.000/\text{mm}^3$, a maioria dos casos estudados (54%) apresentou valores normais (até $10.000/\text{mm}^3$) de leucócitos ao diagnóstico, contrastando com a maior percentagem (60 a 80% dos casos) dos casos de crianças com contagens acima de $25.000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico reportada em vários estudos (KUMAR et al., 2015; SOUZA et al., 2015).

Dosagens bioquímicas como ácido úrico e DHL quando elevadas ao diagnóstico, podem estar associadas a um risco aumentado de desenvolver

síndrome de lise tumoral, podendo levar a falência renal e morte (HOWARD; JONES; PUI, 2011; MONTESINOS et al., 2008). Truang et al. (2007) identificou uma frequência de 23% de síndrome de lise tumoral em pacientes com leucemia linfoblástica aguda. As crianças estudadas apresentaram valores séricos aumentados para ácido úrico em 25% e para DHL em 55% dos casos. Nos pacientes estudados apenas 14(3,7%) desenvolveram falência renal ao longo do tratamento, desses 14, o DHL estava aumentado em 10 pacientes e o ácido úrico em 6, por outro lado não foi possível determinar se a falência renal foi em decorrência de lise tumoral ou outro fator.

Encontramos, na maioria dos casos, pacientes com ausência de blastos no SNC (SNC1), assim como Bowman et al. (1996) que identificou 76,5% de pacientes com essa característica. Além disso, a maioria dos pacientes foram diagnosticados com o do tipo L1 e L2, enquanto um outro estudo indicou que os subtipos L3 são os que possuem maior o risco de acometimento do sistema nervoso central (HIGA et al., 2009).

De acordo com a presença de marcadores imunofenotípicos na superfície e citoplasma dos blastos foi possível classificar as leucemias nos subtipos LLA Pró B, B comum, Pré B e B madura de acordo com o estágio de maturação do clone leucêmico. No presente estudo, a leucemia do subtipo B comum foi a mais frequente (74% dos casos), assim como demonstrado em outros estudos de grupos americanos e brasileiros (ALVES et al., 2009; CAMPANA, 2010,). Em um estudo realizado no México esse subtipo chegou a ter uma frequência de 85.3% (QUEROHERNANDÉZ et al., 2012).

A presença de marcadores aberrantes mielóides CD13 e CD33 não é um fato incomum em LLA B. A ocorrência desses marcadores mielóides pode variar entre 4% e 86% (BASTURK et al., 2015; KALEEM et al., 2003; SEEGMILLER et al., 2009; SHARMA et al., 2016). No nosso estudo, o marcador CD13 foi encontrado em 13,5% dos casos, e o CD33 em 8,1% dos casos. Apesar da maioria dos estudos apresentarem frequências mais altas dos marcadores mielóides, nosso achado foi semelhante ao encontrado por Basturk et al. (2015) que encontrou 14,6% de positividade para o CD13 nos pacientes com leucemia linfóide B em pacientes da Turquia. Por outro lado, o estudo do México mostrou frequência mais baixa, de 6%, de expressão de marcadores mielóides, sendo o CD33 prevalente (QUEROHERNANDEZ). Os valores mais baixos na frequência de marcadores aberrantes

mielóides no nosso estudo pode ser devido ao fato de considerarmos positivo a expressão de um marcador quando ele está presente em pelo menos 25% das células analisadas, enquanto que nos demais estudos esse percentual foi de 20%. Além disso, Garcia Vela et al. (2000) acredita que variações nos valores de marcadores aberrantes podem ser devido à utilização de diferentes fluorocromos.

A presença do marcador de linhagem T CD7 é raramente descrito na literatura nos casos de LLA B, especialmente na faixa etária pediátrica. Quinjano et al. (2013) identificou a presença desse marcador em um percentual de 28% dos casos de LLA B, enquanto que a maioria dos estudos que verificaram a presença desse marcador nas leucemias B observaram uma frequência entre 0,7 – 3,2%, assim como ocorreu no nosso estudo que encontrou a expressão desse antígenos em 0,7% dos casos (BACHIR et al., 2009; QUINJANO et al., 2013; SEEGMILLER et al., 2009).

A presença de linfoblastos coexpressando CD19/CD10 com ou sem o CD34 é um achado comum nas leucemias de células B. Coustan-Smith et al. encontrou apenas 6 (1,6%) pacientes de 386 analisados que não apresentaram expressão de CD10 com CD19, sendo possível a realização da DRM simplificada pela detecção da expressão simultânea desses antígenos em pacientes com leucemia, submetidos a inibição da hematopoese com corticosteroides, em 94,5% dos pacientes, que foi semelhante aos 98,9% dos pacientes que apresentaram a coexpressão CD10/CD19 no nosso estudo (COUSTAN-SMITH et al., 2006). Outro estudo realizado por Koh et al. (2010) também encontrou alta frequência (94,6%) da coexpressão CD10/CD19 nas células leucêmicas dos pacientes.

Alterações genéticas podem ser encontradas na maioria das leucemias linfóide B, considerado a análise citogenética e molecular estima-se que apenas 30-40 dos casos possuem cariótipo normal e dentre as alterações mais comumente detectadas nas leucemias pediátricas estão a t(12;21), t(1;19), t(9;22) e rearranjos envolvendo o gene *MLL* (MROZÉK et al., 2009; PUI et al., 2015). A frequência que esses rearranjos aparecem na população pode variar de acordo com o grupo étnico, por esse motivo diferentes estudos podem mostrar valores de frequência diferentes dependendo da região onde foi realizada o estudo (ALDRICH et al., 2006)

A translocação presente no maior número de casos é a t(12;21), sendo a sua frequência em torno de 25% dos casos (NIGRO et al., 2013). No nosso estudo encontramos uma positividade para t(12;21) em 15,1%, considerada baixa em relação a maioria dos casos da literatura, porém diversos estudos também

apresentaram valores distintos para a frequência dessa translocação na LLA B. Os valores da frequência da $t(12;21)$ variou desde 0% a 7% na população Indiana (HILL et al., 2005; SAZAWAL et al., 2004;), passando por 3% na população espanhola (GARCIA-SANZ et al., 1999), 13% na população britânica (SPATHAS et al., 1999), 18% em chineses (TSANG et al., 2001) e a maior frequência (26%) foi encontrada na população americana branca (RUBNITZ et al., 2008). No Brasil, a população do Distrito Federal com LLA B apresentou uma frequência de 20% dessa translocação (MAGALHAES et al., 2000; MESQUITA et al., 2009). Um estudo realizado por Aldrich et al. (2006) também identificou uma variação da presença dessa translocação entre pacientes Americanos brancos hispânicos (13%) e brancos não hispânicos (24%). Como a população brasileira é bastante miscigenada, a influência da origem genética pode estar influenciando nessa menor incidência em relação ao maior percentual encontrado como foi observado no estudo de Aldrich (2006).

A translocação $t(1;19)$ tem uma distribuição média em torno de 5% na LLA B (Nigro et al., 2013), sendo próximo a frequência encontrada nesse trabalho que foi de 7,3%, porém caso de frequência mais elevadas já foi descrito por Jiménez-Morales et al. (2008) que chegaram a detectar essa alteração em até 11,5% dos casos na população Mexicana. Apesar de ser uma alteração bem específica da leucemia linfóide Pré B, presente em 25% dos casos (WIEMELS et al., 2002), encontramos também casos em leucemias agudas do tipo B-comum (2,2%). Esse achado foi um pouco mais elevado do que o descrito na literatura que considera que 1% dos casos das LLA tipo B-comum podem apresentar essa translocação, podendo também ser uma característica da população de estudo (VAN DONGEN et al., 1998).

A translocação $t(9;22)$ é mais frequentemente encontrada em adultos com LLA, porém pode ser encontrada em torno de 3% nas leucemias da infância (DANTHALA et al., 2016; NIGRO et al., 2013). A frequência de $t(9;22)$ em 2,7% dos casos que avaliamos corrobora com os estudos citados.

Alterações envolvendo o gene *MLL* podem estar presente entre 50-80% dos casos das leucemias especialmente em crianças menores de 1 ano de idade e no subtipo Pro B; em crianças mais velhas esse percentual diminui para em torno de 3% (EMERENCIANO et al., 2006; FRIEDMANN et al., 2000; HILDEN et al., 2006).

No presente estudo, observamos apenas 6 casos (1,7%) de leucemia com alterações genéticas envolvendo o gene *MLL*, 1 tinha 6 meses de idade, 4 tinham 1 ano de idade e 1 com 2 anos completos. Apesar dessa translocação ter sido

encontrada em menores de 2 anos, ela correspondeu a apenas 14% de todos os menores de 1 ano estudados, estudos prévios já haviam identificado uma menor prevalência desta translocação na região avaliando casos de leucemia linfóide e mielóide em pacientes menores de 1 ano de idade(MARQUES et al., 2011).

O índice de DNA é um importante fator de prognóstico uma vez que hiperploídia está relacionada com o aumento da apoptose *in vitro* e sensibilidade a uma variedade de agentes quimioterápicos com bons resultados no tratamento dos pacientes com leucemia (CARROL et al., 2003; FARIAS;CASTRO, 2004; NYGAARD et al., 2006). O percentual de hiperploídia encontrado por nós foi de 21,8%, que foi semelhante aos 14-27% de crianças com LLA e hiperploídia reportado em diferentes estudos (FADERL et al., 1998; QUINJANO et al., 2013), embora haja estudo mostrando que a ocorrência de hiperploídia pode atingir 35% (KUMAR et al., 2015). No nosso estudo não foram identificados casos de hipodiploídia usando a citometria de fluxo. Contudo, de acordo com Pui et al. (2010) casos de hipoploídia são encontrados 1% das leucemias linfóides nas crianças, embora outros grupos tenham identificados a presença de hipoploídia entre 0,3 - 7,6% dos casos de leucemia linfóide (OLAH et al., 2011; WOO et al., 2014).

Os casos de hiperploídia apresentaram positividade para marcadores de imaturidade como TdT, CD34 e CD10 assim como aconteceu em um outro estudo diversos. Por outro lado, o CD45 que normalmente se apresenta negativo nos casos de hiperploídia, foi positivo em 70,3% dos pacientes analisados(QUINJANO et al., 2013).

Anormalidades genéticas associadas com translocações foram identificadas em sua maioria nos casos dos pacientes diploides (DNA index < 1.6). A presença de hiperdiploídia juntamente com essas translocações não é um achado comum, mas já descrito na literatura. A t(12;21) na presença de hiperploídia é um achado infrequente pois são dois marcadores de bom prognóstico mas a presença dessas duas anomalias juntas encontrada em nosso estudo, também foi evidenciada por Quinjano et al. em 17 % dos casos testados, e por Mesquita colaboradores em 10 % dos pacientes (ATTARBASCH et al.,1994; MESQUITA et al., 2009; QUINJANO, et al., 2013). Outro fato que chamou a atenção foi que em 3 pacientes com hiperploídia foi encontrada a translocação t(1;19), tal associação é bastante rara sendo descrita apenas por Pui et al. (1994) em pacientes com a forma derivativa da t(1;19), visualizada por citogenética e por Hunger et al. (2016) que observou essa

associação em um caso de leucemia em adulto. A presença de t(9;22) e hiperploídia não foi identificada em nosso estudo, mas um estudo mostrou 1 caso de associação entre hiperploídia e t(9;22) (QUINJANO et al., 2013).

Diversos estudos vêm demonstrado a importância da classificação de risco para o tratamento direcionado, obtendo assim um melhor índice de sucesso no tratamento (PUI et al., 2011; PUI et al., 2015; PUI et al., 2017; VORA et al., 2013).

Na maioria dos estudos, inicialmente, os pacientes são classificados de acordo com critérios do NCI; no presente estudo, os critérios do NCI permitiram identificar 34% dos pacientes como de alto risco, resultados semelhantes ao encontrado por Salina et al. (2016) onde 40% das crianças atendidas em um hospital referência em câncer pediátrico no Amazonas, foram inicialmente classificados como alto risco e Koh et al. (2010) que também classificou 37,2 % das crianças atendidas em um centro médico em Seul, Coreia do sul, como alto risco, sugerindo pouca ou nenhuma influência da etnia da população estudada na gravidade da doença ao diagnóstico.

A avaliação da DRM no período da indução tem papel importante como indicador de prognóstico da leucemia (BASSO et al., 2009; CAMPANA; PUI, 2017; Xu et al., 2012). Dessa forma, após a realização da doença residual mínima no dia 19 de tratamento, os pacientes foram reclassificados para definição da conduta terapêutica. A metodologia utilizada para a detecção da DRM foi proposta por Coustan-Smith et al. baseada na coexpressão de CD19/CD10 com ou sem expressão de CD34, sob a ação inibitória dos corticoides sob a hematogonias. Essa metodologia foi proposta no intuito de facilitar a detecção da célula leucêmica residual após a indução da quimioterapia, em laboratórios com menos recursos financeiros, por utilizar um painel simples de anticorpos, podendo ser realizado com citômetro de 3 cores, e sendo capaz de atingir uma sensibilidade de 0,01% (COUSTAN-SMITH et al., 2006). Por ser ainda uma metodologia pouco descrita na literatura foi preciso a transferência da metodologia para o laboratório de citometria do IMIP, e avaliação do índice Kappa de concordância dos resultados entre treinando e treinador. Valores mais baixos do coeficiente Kappa nos primeiros estágios do treinamento pode estar relacionado com a falta de experiência do treinando, que melhorou nas etapas seguintes do treinamento. O resultado desse estudo demonstrou que a detecção da doença residual mínima pode ser facilmente aplicada em países com recursos reduzidos.

No nosso estudo foram identificados 212 (de 358) pacientes com doença residual mínima positiva $\geq 0,01\%$ que corresponde a 59% dos casos. O resultado corroborou com os achados por Coustan-Smith (2006) que identificou 55,5% dos pacientes com DRM positiva em 380 analisados. Outros estudos realizados utilizando a metodologia do CD19/CD10/CD34 para detecção residual de células leucêmicas na indução apresentaram resultados positivos entre 66,6% - 88,6%, porém o número de pacientes analisados foi menor nesses estudos, variando entre 15 a 37 pacientes (CHATTERJE; SOMASUNDARAM, 2017; KOH et al., 2010; SALINA et al., 2016). Essa metodologia se mostrou eficiente na detecção da DRM e classificação de risco no âmbito do protocolo RE-LLA de tratamento, porém deve ser utilizada apenas na indução e não pode ser aplicada em outras fases do tratamento, pois em outros períodos células imaturas normais expressando CD19/CD10/CD34 começam a repovoar a medula não sendo possível distingui-las dos blastos leucêmicos, sendo isso um fator limitante da metodologia (BABUSIKOVA et al., 2008; COUSTAN-SMITH et al., 2006; STOW et al., 2010). Provavelmente por esse motivo, em 7 pacientes (1,8%) a DRM realizada no dia 26 de tratamento mostrou células CD19/CD10/CD34 positivas mesmo sendo negativas no dia 19, semelhante ao descrito por Coustan-Smith et al. (2006) que identificou em 1,1% dos casos, células normais da medula com esses marcadores, quando compararam essa metodologia com outras mais complexas para a determinação da DRM (COUSTAN.

Mesmo assim, essa metodologia pode auxiliar a identificar pacientes que poderão responder melhor a quimioterapia e os que tem alta chance de recaída. No nosso estudo 97 pacientes foram tratados com protocolo mais brando por apresentar menor risco de recaída, enquanto 138 tiveram tratamento intermediário e 149 receberam tratamento mais agressivo. Os pacientes que receberam tratamento menos agressivo tiveram baixos índices de recaída indicando que mesmo com baixa quimioterapia foi possível ter sucesso no tratamento, evitando futuros danos ao paciente inerentes a doses desnecessárias de quimioterápicos. Resultados semelhantes foram encontrados por Koh (2010), que observou que taxas mais altas de recaída foram observadas nos pacientes de risco alto e intermediário.

Estudos sugerem que a presença ou ausência de determinados marcadores imunofenotípicos, podem estar relacionados com prognóstico desfavorável podendo variar de acordo com o protocolo de tratamento utilizado (BOROWITZ et al., 2015; JIANG et al., 2010; KIM et al., 2015; NAKAMURA et al., 2001). Para excluir possíveis

variáveis em relação ao tipo de tratamento realizado, avaliamos a presença de marcadores em cada grupo de risco definido pela DRM do dia 19 e sua aplicação para definição de prognóstico no protocolo RE-LLA.

Nakamura et al. (2001) analisou a expressão do CD45 em dois grupos de pacientes: não alto risco (baixo e intermediário) e alto risco utilizando o protocolo ALL-941 e observou que no grupo de alto risco os pacientes que apresentaram valores baixos de CD45 tinham melhor sobrevida, mas sem impacto no grupo de pacientes classificados como não alto risco, enquanto que no nosso estudo não houve impacto no prognóstico em nenhum dos grupos estudados. Outro estudo indicou prognóstico desfavorável com valores altos de CD45 (maior do que 90%) independente do grupo de risco (CARIO et al., 2014), da mesma forma também encontramos alto índice de risco de recaída com os valores de CD45 acima de 90% dentre todos os casos de leucemias ($p=0,041$), porém quando estratificadas de acordo com o risco essa diferença não foi significativa.

A relação dos marcadores de imaturidade CD 34 e TdT com o prognóstico da doença ainda é controversa, pois enquanto alguns estudos sugerem que valores positivos para CD34 confere bom prognóstico (KIM et al., 2015), outros afirmam que essa relação não é significativa (JIANG et al., 2010). Em relação ao CD34, nós identificamos associação entre valores negativos e o risco de óbito no grupo intermediário. Pacientes com valores negativos de TdT foram associados com risco de recaída e óbito no grupo alto risco, no grupo intermediário houve uma diferença mas não foi significativa em relação a recaída ($p=0,08$) mas significativa em relação ao óbito ($p=0,025$), enquanto que o grupo especial não apresentou nenhum caso com TdT negativo, não sendo possível realizar a análise estatística nesse grupo. Resultados semelhantes foram encontrados em pacientes adultos com LLA e positivos para o TdT que apresentavam melhor sobrevida livre de eventos e sobrevida global independentemente dos grupos de risco alto e baixo (KIM et al., 2015).

Marcadores de linhagem mieloide são relativamente comuns nas leucemias linfóide de linhagem B, mas também ainda não existe um consenso sobre sua relação com o prognóstico. Suggs et al. (2007) identificou que a presença de marcadores aberrantes mielóides estava significativamente associada com baixa sobrevida livre de doença, baixa duração da primeira remissão e altas taxas de recaída ainda durante o tratamento, por outro lado outros autores afirmam que esses

marcadores não influenciam no tratamento e prognóstico (NORONHA et al., 2011; PUI et al., 1998; SHARMA et al., 2016). De acordo com o protocolo de tratamento utilizado em nossos pacientes, observamos a relação entre a presença do marcador mieloide CD13 no grupo de risco especial com maior risco de recaída, enquanto que a presença de CD13 nos demais grupos não teve impacto nem na recaída, nem na mortalidade. O marcador CD33 não foi observado em nenhum paciente do grupo de risco especial, e foi relacionado apenas com risco de óbito no grupo de alto risco no protocolo de tratamento RE-LLA. Nesse aspecto, é plausível sugerir que a presença do marcador mieloide CD13 em pacientes do grupo de risco especial possa ser um critério de risco para reclassificação no grupo intermediário, recebendo uma quimioterapia com doses ajustadas para diminuir o risco da recaída.

Marcadores de linhagem T são mais raros em casos de LLA B em crianças, sendo mais comum a presença do CD5 em adultos que não foi avaliado no nosso estudo (SMEERLINGER et al., 2007). Outro marcador linfóide B que pode estar presente em LLA B é o CD7 que é indicativo de mau prognóstico, porém identificamos apenas 2 pacientes com a expressão desse marcador, onde 1 apresentou recaída após 2 anos fora de tratamento, e o segundo paciente positivo para esse marcador ainda se encontra em tratamento. A relação do prognóstico com esse marcador não foi significativa, possivelmente devido à quantidade pequena de pacientes com expressão aberrante desse marcador, ou por ele ser responsável por uma recaída tardia.(SMEERLINGER et al., 2007).

Na maioria dos casos o marcador CD10 está relacionado com bom prognóstico quando positivo nos pacientes, porém não observamos essa relação em nenhum dos grupos de risco desse estudo, o que foi semelhante ao encontrado por Consollini (1998), que concluiu que apesar do CD10 ter sido relacionado com características clínicas favoráveis não houve diferença significativa entre os grupos de baixo e alto risco, e que a sua relação com bom prognóstico pode ser quando esse marcador está associado a outros marcadores como o CD19 e CD34 (UCKUN, et al., 1997).

Diante do exposto, concluímos que a avaliação de marcadores imunofenotípicos contribui para melhorar a estratificação de risco dos pacientes nos diversos protocolos de tratamento, principalmente nas terapias risco-direcionadas, por tanto, deve ser uma atividade prioritária e constante.

8 CONCLUSÃO

- a) As características demográficas das crianças estudadas com leucemia de células B tratadas no Hospital IMIP foram semelhantes a relatada na literatura, sendo mais frequente em meninos, de 1 a 5 anos, mas diferiu na apresentação de menor leucometria ao diagnóstico;
- b) Dentre os marcadores aberrantes, o CD 13 foi o único envolvido com recaída no grupo de baixo risco, devendo ser avaliada a progressão para o risco intermediário dos pacientes positivos para esse marcador;
- c) Dentre os marcadores de imaturidade, o TdT negativo foi relacionado com risco de recaída no grupo de alto risco; e ambos TdT e CD34 negativos foram relacionados com risco de óbito no grupo intermediário, devendo ser avaliada alteração do protocolo de tratamento nesses casos;
- d) A avaliação de doença residual mínima simplificada na leucemia de células B baseada na expressão de CD10/CD19 e CD34 (+/-) é factível de ser realizada em laboratório de recursos limitados com boa acurácia.

REFERÊNCIAS

- ALDRICH, M.C. et al. Cytogenetics of Hispanic and White children with acute lymphoblastic leukemia in California. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v.15, n.3, p.578-581, 2006.
- ALVES, G.V. et al. Flow cytometry immunophenotyping evaluation in acute lymphoblastic leukemia: correlation to factors affecting clinic outcome. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.26, n.6, p. 431-440, 2012 .
- ANNESLEY, C.E.; BROWN, P. Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia, **Ther. Adv. Hematol.**, London, v.6, n.2, p.61–79, 2015.
- ARBER, D.A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood.**, New York, v.127, n.20, p. 2391-2405, 2016.
- ATTARBASCHI, A. et al. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. **Leukemia**, New Jersey, v.18, n.10, p.1611-1616, 2004.
- AZAD, F. et al. CD7 aberrant expression led to a lineage switch at relapsed childhood acute pre-B lymphoblastic leukemia. **Med. Mol. Morphol.**, Tokyo, v.49, n.1, p.53-56, 2016.
- BABUSIKOVA, O. et al. Hematogones in acute leukemia during and after therapy. **Leuk. Lymphoma**, Chur, v.49, p.1935-44, 2008.
- BACHER, U. et al. Diagnostics of acute leukemias: interaction of phenotypic and genetic methods. **Pathologe**, Berlin, v.33, n.6, p.528-538, 2012.
- BACHIR, F. et al., Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in moroccan children. **Int. J. Pediatr.**, New York, 2009. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2778177>>. Acesso em 15 Jan. 2017.
- BAER, M.R. et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). **Blood.**, New York, v. 97, n.11, p. 3574-3580, 2001.
- BAHIA, D.M.M. et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and clinical significance. **Haematologica.**, Pavia, v.86, n.8, p.801-806, 2001.
- BAIN, B.J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
- BALGOBIND, B.V. et al. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia. **Haematologica**, Pavia, v.96, n.10, p.1478-1487, 2011.

- BARBOSA, C.M.P.L. et al. Manifestações músculo-esqueléticas como apresentação inicial das leucemias agudas na infância. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 78, n.6, p.481-484, 2002.
- BARTENHAGEN, C. et al. Infection as a cause of childhood leukemia-virus detection employing whole genome sequencing. **Haematologica, Paiva**, v. 2, p.153-182, 2017.
- BASSAN, R. et al. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **Crit. Rev. Oncol.Hematol.**, Boca Raton, v.50, n.3, p.223-261, 2004.
- BASSO, G. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.27, p.5168–5174, 2009.
- BASTURK, A. et al. Prognostic significance of flow cytometry findings in Turkish adult acute leukemia patients. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, Roma, v.19, n.18, p.3360-3366, 2015.
- BELL, J.J.; BHANDoola, A. The earliest thymic progenitors for T cell possess myeloid lineage potential. **Nature**, London, v.452, p. 764–67, 2008.
- BELSON, M.; Kingsley, B.; Holmes, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ. Health. Perspect.**, Durham, v.115, n.1, p.138–145, 2007.
- BELURKAR, S. et al. Correlation of morphologic and cytochemical diagnosis with flow cytometric analysis in acute leukemia. **J. Cancer Res. Ther.**, Mumbai, v.9, n.1, p.71-79, 2013.
- BENNETT, J.M. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. **Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.**, New York, v.16, n.11, p.607-609, 2016.
- BERTHO, A. L. **História da Citometria de Fluxo**. Rio de Janeiro: Laboratório de imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, 2004.
- BHOJWANI, D. ; YANG, J.J.; PUI, C.H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v. 62, n.1, p.47-60, 2015.
- BOROWITZ, M.J. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. **Blood**, New York, v.126, n.8, p.964-971, 2015.
- BOWMAN, W.P. et al Improved survival for children with B-cell acute lymphoblastic leukemia and stage IV small noncleaved-cell lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.14, p.1252–1261, 1996.
- BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clin. Chem.**, Boston, v. 46, n. 8B, p. 1221–1229, 2000.

- BUGA C. V.; GLÚCK, A.; ARION, C. Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children. **J. Med. Life.**, Bucareste, v. 7, n.2, p.291-295,2014.
- CAMPANA, D.; COUSTAN-SMITH, E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. **Cytometry**, New York, v.38, n.4, p.139-52, 1999.
- CAMPANA, D.; BEHM, F.G. Immunophenotyping of leukemia. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.243, p. 59-75, 2000.
- CAMPANA, D.; COUSTAN-SMITH, E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Best. Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 15, n.1,p.1-19, 2002.
- CAMPANA, D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia.**Semin. Hematol.**, New York, v.46, p.100–106,2009.
- CAMPANA, D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. **Hematology**, Washington v. 2010, p.7-12, 2010
- CAMPANA, D.; COUSTAN-SMITH, E. Measurements of treatment response in childhood acute leukemia. **Korean J. Hematol.**, Seoul, v.47, n.4, p. 245-254, 2012.
- CAMPANA, D.; PUI, C.H. Minimal residual disease-guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, New York, v.29, n.14, p.1913-1918, 2017.
- CARIO, G. et al. High CD45 surface expression determines relapse risk in children with precursor B-cell and T- cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. **Haematologica**, Pavia, v. 99, n.1, p.103-110, 2014.
- CARROLL, W.L. et al. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology**, Washington, p. 102-131, 2003.
- CATELAN,T.T.T et al. Linfócitos B: da imunologia aos imunobiológicos. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v.8, p.35-57, 2010.
- CAVE, H. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.339, p.591-598,1998.
- CAZÉ, M.O; BUENO, D; SANTOS, M.E.F. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Rev. Hosp. Clin. Porto Alegre**, Porto Alegre, v.30, n.1,p. 5-12, 2010.
- CHATTERJEE, T.; SOMASUNDARAM, V. Flow cytometric detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia by using "MRDlite" panel. **Med. J. Armed Forces India**, Maharashtra , v. 73, n.1, p. 54-57,2017.
- COLBY-GRAHAM M.E.; CHORDAS . The childhood leukemias. **Journal of pediatric nursing**, Philadelphia, v.18, n.2, p.87-95, 2003.

CONSOLINI, R. et al. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. The Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP). **Haematologica**, Pavia, v.83, n.11, p. 967-973, 1998.

CONTER, V. et al. **Acute Lymphoblastic Leukemia**. [S.R.], 2004 . Disponível em: <<https://www.orpha.net/data/patho/Pro/en/AcuteLymphoblasticLeukemia-FRenPro3732.pdf>>. Acesso em: 10.01.2017.

COUSTAN-SMITH, E. et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, London, v.351, p.550-554, 1998.

COUSTAN-SMITH, E. et al. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. **Blood**, New York, v. 108, n.1, p. 97-102, 2006.

COUSTAN-SMITH, E. et al Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Oncol.**, London, v.10, n.2, p.147-156, 2009.

CRAIG, F.E.; FOON, K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, New York , v.111, p.3941-3967, 2008.

CREUTZIG, U. et al AML Committee of the International BFM Study Group. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. **Blood**, New York, v.120, n.16, p.3187-3205, 2012.

DANTHALA, M. et al. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: 8 years' experience from a tertiary care center in India. **South Asian J. Cancer.**, Nova Dheli, v.5, n.4, p. 176–178,2016.

DEL VECCHIO, L. et al. Recommended reporting format for flow cytometry diagnosis of acute leukemia. **Haematologica**, Pavia , v.89, n.5, p. 594-598, 2004.

EMERENCIANO, M. et al. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian Collaborative Study Group of Infant acute leukemia. **Pediatr. Blood Cancer**, Hoboken, v. 47, n.5, p.549-554, 2006.

ESPARZA, S.D.; SAKAMOTO, K.M. Topics in pediatric leukemia acute lymphoblastic leukemia. **Med. Gen. Med.**, New York, v.7, n.1, p.23-27, 2005.

EVANS, T.J. et al Confirmation of childhood acute lymphoblastic leukemia variants, ARID5B and IKZF1, and interaction with parental environmental exposures. **PLoS One**, San Francisco, v.13, n.9 2014. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4195717/>>. Acesso em: 19 Jan. 2017.

FADERL, S. et al. Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**. New York, v. 91, n. 11, p.3995-4019, 1998.

FARIAS, M.G.; CASTRO, S.M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfoides agudas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.40, n.2, p.91-98, 2004.

FOSSAT, C. et al. Methodological aspects of minimal residual disease assessment by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: A French multicenter study. **Cytometry B Clin. Cytom.**, Hoboken, v.88, n.1, p.21-29, 2015.

FRIEDMANN, A.; WEINSTEIN, H. J. The Role of Prognostic Features in the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **The Oncologist**, Dayton, v.5, p. 321-328, 2000.

GAJJAR, A. et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, New York, v 15, n.96(10), p.3381-3384, 2000.

GARCIA-SANZ, I. et al. Low frequency of the TEL/AML1 fusion gene in acute lymphoblastic leukaemia in Spain. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 107, n. 3, p. 667-669, 1999.

GARCIA VELA, J.A. et al. Aberrant immunophenotypes detected by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk. Lymphoma**, Chur, v. 36, p. 275-284, 2000.

GIDDINGS, B.M. et al. Childhood leukemia incidence in California: High and rising in the Hispanic population. **Cancer**, Philadelphia, v.122, n.18, p. 2867-2875, 2016.

GLEISSNER, B. et al. CD10- pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). **Blood**, New York, v.106, n.13, p.4054-4056, 2005.

GREAVES MF, ALEXANDER FE. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? **Leukemia**, New Jersey, v.7, n.3, p.349-360, 1993.

GUAN, H. J. Correlations between Epstein-Barr virus and acute leukemia. **J. Med Virol.**, New York, 2017. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.24797/abstract>>. Acesso em :03 Fev. 2017.

HAMERSCHLAK N. **Manual de Hematologia: Programa Integrado de Hematologia e Transplante de Medula Óssea**, Barueri – Manole, 2010.

HAN, S. et al. Polymorphisms in innate immunity genes and risk of childhood leukemia. **Hum. Immunol.**, New York, v.71, n.7, 727-30, 2010.

HARGREAVE, M. et al. Maternal use of fertility drugs and risk of cancer in children--a nationwide population-based cohort study in Denmark. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 136, n.8, p.931-939, 2015.

HARRISON, C.J. Acute lymphoblastic leukemia. **Clin. Lab. Med.**, Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 631-647, 2011.

HEALTH QUALITY ONTARIO. MINIMAL RESIDUAL DISEASE EVALUATION IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: A CLINICAL EVIDENCE REVIEW. **Ont Health Technol Assess Ser.**, Toronto, v.16, n.7, p.1-52, 2016.
Disponível em:

<<http://www.hqontario.ca/evidence/publications-and-ohtac-recommendations/ontario-healthtechnology-assessment-series/eba-mrd>>. Acesso em 10 Fev. 2017.

HIGA, B. et al. Precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia with FAB L3 (i.e., Burkitt's leukaemia/lymphoma) morphology and co-expression of monoclonal surface light chains and Tdt: report of a unique case and review of the literature. **Pathology**, Sidney, v. 41, n.5, p.495-498, 2009.

HILDEN, J.M., et al. Children's Oncology Group. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. **Blood**, New York, v. 108, p. 441-451, 2006.

HILL, A. et al. The t(12:21) is underrepresented in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Kerala, Southern India. **Haematologica**, Pavia, v. 90, n. 3, p. 414-416, 2005.

HO, P.A. et al. Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. **Blood**, New York, v.113, n.26, p.6558-6566, 2009.

HOFFRAND, A.V.; MOSS, P.A.H. **Fundamentos em Hematologia**. 6.ed.Porto Alegre: Artmed, 2012.

HOLLINK, I.H. et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. **Leukemia**, New Jersey, v.23,n.2, p.262-270, 2009.

HOSKING, F.J. et al. MHC variation and risk of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, New York, v.117, n.5, p.1633–1640, 2011.

HOWARD, S.C., JONES, D.P., PUI, C.H. The tumor lysis syndrome. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.364, n.19, p.1844-1854, 2011.

HUNGER, S.P. et al. Hyperdiploidy and E2A-PBX1 fusion in an adult with t(1;19)+ acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature. **J. Cancer Res. Ther.**, **Mumbai**, v. 12, n.2, p.620-626, 2016.

INFANTE-RIVARD, C.; FORTIER, I.; OLSON, E. Markers of infection, breast-feeding and childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br. J. Cancer**, London, v.83, n.11, p.1559–1564,2000.

INFANTE-RIVARD, C. Chemical risk factors and childhood leukaemia: a review of recent studies. **Radiat. Prot. Dosimet.**, v.132, n.2, p.220–227, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Tipos de Câncer**, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>>. Acesso em: 08 Jan. 2017.

JAFFE, E.S. et al. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**, Lyon, IARC Press, 2001.

JIANG, Z. et al. CD34 and CD38 are prognostic biomarkers for acute B lymphoblastic leukemia. **Biomark. Res.**, v.16, p.4-23, 2016.

JIMÉNEZ-MORALES, S. et al. BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. **Leuk. Res.**, Oxford, v.32, n.10, p. 1518-1522, 2008.

KAATSCH, P.; SCHEIDEMANN-WESP, U.; SCHUZ, J. Maternal use of antibiotics and cancer in the offspring: results of a case–control study in Germany. **Cancer Causes Control**, Oxford, v.21, n.8, p.1335–1345, 2010.

KALEEM, Z. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.127, n. 1, p. 42-48, 2003.

KASPERS, G.J. et al. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: Results of an in vitro study. **Blood**, New York, v.85, p.751-756, 1995.

KERN, W et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. **Cancer**, Hoboken, v.112, n.1, p. 4-16, 2008.

KIM, D.Y. et. al. Immunophenotypic markers in adult acute lymphoblastic leukemia: the prognostic significance of CD20 and TdT expression. **Blood Research.**, v.50, n. 4, p. 227-234, 2015.

KOH, et al. Prognostic significance of minimal residual disease detected by a simplified flow cytometric assay during remission induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Korean J. Pediatr.**, v.53, n.11, p. 957-964, 2010.

KRUEGER, S.A.; WILSON, G.D. Flow cytometric DNA analysis of human cancers and cell lines. **Methods. Mol. Biol.**, Totowa, v. 731, p. 359–70, 2011.

KUBIAK-WLEKŁY, A.; NIEMIR, Z.I. The relevance of neprilysin for systemic homeostasis and its involvement in the pathological processes. **Pol. Med.J.**, London, v. 27, n.157, p.51, 2009.

KUMAR, B.K. DNA Ploidy and S-phase Fraction Analysis in Paediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cases: a Tertiary Care Centre Experience. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, Bangkok, v. 16, n.17, p. 7917-7922, 2015.

KWAN, M.L. et al. Maternal diet and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Public. Health. Rep.**, Boston, v.124, n.4, p.503–142,2009.

LAMEGO, R.M. et al. Transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas em leucemias agudas: a experiência de dez anos do Hospital das Clínicas da UFMG. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v.32, n. 2, p.108-115, 2010.

LANE,S.W.; GILLILAND, D.G. Leukemia stem cells. **Semin. Cancer Biol.**, Philadelphia, v. 20, n.2, p. 71-76, 2010.

LINET, M.S. International long-term trends and recent patterns in the incidence of leukemias and lymphomas among children and adolescents ages 0-19 years. **Int. J. Cancer**, New York, v.138, n.8, p.1862-1874, 2016.

LINS, M.M. Incidence and survival of childhood leukemia in Recife, Brazil: A population-based analysis. **Pediatr. Blood Cancer, Hoboken**, 2016. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.26391/abstract>>. Acesso em 15 Fev. 2017.

LINS, M.M. Delayed diagnosis of leukemia and association with morbid-mortality in children in Pernambuco, Brazil. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, New York, v.34, n.7, p.271-276. 2012.

LUCIO, P. et al. BIOMED-I. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. **Leukemia**, New Jersey, v.15, n.8, p.1185-1192, 2001.

MAGALHÃES, I.Q. et al. TEL-AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. **Br .J. Haematol.**, Oxford, v.111, n.1, p.204-207, 2000.

MAGUER-SATTA,V.; BESANÇON, R.; BACHELARD-CASCALES, E. Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor is stem cells, physiological mechanisms and cancer. **Stem Cells**, Basiléia, v. 29, n.3, p. 389-396, 2011.

MARGOLIN, J.F. Molecular diagnosis and risk-adjusted therapy in pediatric hematologic malignancies: a primer for pediatricians. **Eur. J. Pediatr.**, Heidelberg, v.170, n.4, p.419-425, 2011.

MARQUES, E.A. et al. Molecular findings in childhood leukemia in Brazil: high frequency of MLL-ENL Fusion/t(11;19) in infant leukemia. **J. Pediatr. Hematol., Oncol.**, New York, v.33, n.6, p.470-474, 2011.

MARTINS, J.M. Aspectos clínicos da Leucemia, uma breve revisão bibliográfica. **Rev. Bras. Cancerol.** Rio de Janeiro, 2016 Disponível em <<http://www.crbiodigital.com.br/portal?txt=3877343639>>. Acesso em 10 Fev. 2017.

MARTINS, S.L.; FALCAO, R.P. Importance of immunophenotyping of leukemia myelocytic acute. **Rev. Associ. Med. Bras.**, São Paulo, v.46, p. 57-62, 2000.

MATUTES, E. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. **J. Clin. Pathol.**, London, v.12, p.1373-1377, 2007.

MAUVIEUX, L. et al. High incidence of HOX11L2 expression in children with T-ALL. **Leukemia**, New Jersey, v.16, n.12, p.2417-2422, 2002.

MCGREGOR, S.; MCNEER, J.; GURBUXANI, S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. **Semin. Diagn. Pathol.**, Philadelphia, v.29, n.1, p.2–11, 2012.

MCKENNA, R.W. et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color. Flow Cytometry. **Blood**, New York, v.98, p.2498-2507, 2001.

MCNALLY, R.J.; EDEN, T.O. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.127, n.3 , p.243–263,2004.

MEENAGHAN,T.; DOWLING, M.; KELLY, M. Acute leukemia: making sense of a complex blood cancer. **Br. J. Nurs.**, London, v.21, n.2, p.78-83, 2012.

MEIJERINK, J.P.; DEN BOER, M.L.; PIETERS, R. New genetic abnormalities and treatment response in acute lymphoblastic leukemia. **Semin. Hematol.**, New York, v.46, n.1, p. 16-23, 2009.

MEIJERINK, J.P. et al. Genetic rearrangements in relation to immunophenotype and outcome in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, Philadelphia, v.23, n.3, p.307-318, 2010.

MESQUITA, D.R. et al. Molecular and chromosomal mutations among children with B-lineage lymphoblastic leukemia in Brazil's Federal District. **Genet. Mol. Res.**, Ribeirão Preto, v.8, n.1, p.345-353, 2009.

MIESHINCHI, S. et al. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. **Blood**, New York, v.108, n.12, p.3654- 3661, 2006.

MILNE, E. et al. Parental prenatal smoking and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.175, n.1, p.43–53, 2012.

MITELMAN, F.; MERTENS, F.; JOHANSSON, B. Prevalence estimates of recurrent balanced cytogenetic aberrations and gene fusions in unselected patients with neoplastic disorders. **Genes Chromosomes and Cancer**, New York, v.43, n.4, p.350-366, 2005.

MONTESINOS, P. et al. Tumor lysis syndrome in patients with acute myeloid leukemia: identification of risk factors and development of a predictive model. **Haematologica**, Pavia, v.93, p.67–74, 2008.

MRÓZEK, K.; HARPER, D.P.; APLAN, P.D. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.23, n.5, p.991-1010,2009.

MURPHY, M.F. et al. Childhood and adult cancers: Contrasts and commonalities. **Maturitas**, Limerick, v. 76, p.95–98, 2013.

NAEEM, S.; BUKHARI, M.H. Antigen Expression on Blast Cells and Hematological Parameters at Presentation in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. **J. Coll. Physicians Surg. Pak.**, Carachi, v.25, n.6 , p.407-411, p. 2015.

NAKAMURA, A. et al. Prognostic impact of CD45 antigen expression in high-risk, childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Leuk. Lymphoma**, Chur, v. 42, n. 3, p. 393-398, 2001.

NIGRO, L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **J. Ped. Hematol. Oncol.**, Philadelphia, v.35, n.4, p.245-252, 2013.

NORONHA, E.P. et al. Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhão, northeastern Brazil. **Sao Paulo Med. J.**, São Paulo. v.129, n.6 ,2011.

NYGAARD, U. et al. Flow cytometric DNA index, Gband ,karyotyping, and comparative genomic hybridization in detection of high hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J. Pediatr. Oncol.**, New York, v. 28, n. 3, p.134-140, 2006.

OLAH, E. et al Ten-year experiences on initial genetic examination in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Hungary (1993–2002): Technical Approaches and Clinical Implementation. **Pathol. Oncol. Res.**, Budapeste, v.17, p. 81-90, 2011.

OLIVEIRA, B.M.; DINIZ, M.S.; VIANA, M.B. Leucemias agudas na infância. **Rev. Med. Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 14(1),p. 33-39, 2004.

OLIVEIRA, S. U. **Perfil clínico-epidemiológico das crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda (Ila) em um hospital pediátrico de Fortaleza-CE.** 2008. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual do Ceará,Fortaleza, 2008.

ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v.23, n.4, p. 655-674, 2009.

PAOLUCCI G. et al.Treatment of childhood acute lymphoblastic leucemia Long-term results of the AIEOP-ALL 87 study. **Haematology**, Pavia, v.86, p. 478-484,2001.

PARK, B.G. et al. Clinical implications of non-A-type NPM1 and FLT3 mutations in patients with normal karyotype acute myeloid leukemia. **Acta. Haematol.**, Basiléia, v.127, n.2, p.63-71, 2012.

PARKIN, D.M., MUIR, C.S. Cancer Incidence in Five Continents, **Sci. Publ.**, Lyon, v.120, p.45-173, 1992.

PEDROSA, F.; LINS, M. M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, Recife, v.2 , n.1, p. 63-68, 2002 .

PELLOSO, L.A. et al. Karyotype in acute myeloid leukemia: importance and type of aberrations in 30 patients at diagnosis. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 49, p. 150-455, 2003.

PIMENTA, J.R. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. **Hum. Hered.**, Basileia, v.62, n.4, p.190-195, 2006.

PIZZO, P.A.; POPLACK, D.G. **Principles and practice of pediatric oncology**. 6th ed., Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2011.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S et al. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v.15, n.12, p.2336-4231, 2006.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. et al. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. **Blood Cells Mol. Dis.**, New York, v.42, n.2, p.121-125,2009.

PUI, C.H. et al. Immunologic, cytogenetic, and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1;19) (q23; p13) or its derivative. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.12, n.12, p.2601-2606, 1994.

PUI, C.; EVANS, W. Acute Lymphoblastic Leukemia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 339, n.9, p. 605-615, 1998.

Pui, C.H. et al. Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.6, p.3768-3773, 1998.

PUI, C.H.; Risk assessment in acute lymphoblastic leukemia: beyond leukemia cell characteristics. **J.Pediatr. Hematol. Oncol.**, New York, v.23, n.7, p.405-408, 2001.

PUI, C.H. et al. Outcome or treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. **The Lancet**, London, v.359, p.1909-1915, 2002.

PUI, C.H.; RELING, M.V.; DOWNING, J.R. Acute lymphoblastic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.350, p.1535–1548, 2004.

PUI, C.H. et al. Update on Pediatric ALL. **Clin. Adv. Hematol. Oncol.**, New York, v.4, n.12, p.884-886, 2006.

PUI, C.H.; Evans, W.E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.354, p.166-178, 2006.

PUI, C.H.; ROBISON, L.L.; LOOK, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, London, v.371, p.1030–1043, 2008.

PUI, C.H. et al Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.360, n.26, p.2730-41, 2009.

Pui, C.H. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J. Formos. Med. Assoc.**, Taipei, v.109, n.11, p.777-787, 2010.

PUI, C.H. et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.29, n.5, p.551-565, 2011.

PUI, C.H. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.33, n.27, p.2938-2948, 2015.

PUI , C.H. et al. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. **Leukemia**, New Jersey, v.31, n.2, p.333-339,2017.

QUERO-HERNÁNDEZ, A. et al., Características clínicas e imunofenotípicas en un grupo de niños con leucemia aguda linfoblástica. **Pediatr. Méx.**, Cidade do México, v. 14, n.4, p. 166 -171, 2012.

QUIJANO, S.M. et al. Correlation of the t(9;22), t(12;21), and DNA hyperdiploid content with immunophenotype and proliferative rate of leukemic B-cells of pediatric patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Biomedica**, Bogotá, v.33, n.3, p.468-486, 2013

QUIXABEIRA, V.B.L.; SADDI, V.A. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro, v.40, n.3, p.199-202, 2008.

RACHIERU-SOURISSEAU, P. et al. A. DNA Index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. **Int. J. Lab. Hem.**, Oxford, v. 32, p. 288–298, 2010.

REIS, R.S. et al .Childhood leucemia incidence in Brazil according to diferent geografic regions. **Pediatr. Blood Cancer**, Hoboken, v.56, p.58-64, 2011.

REIS, R.S. et al. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. **Pediatr. Hematol. Oncol.**, London, v.33, n.2, p.83-93, 2016.

RIBAS, M.M. Mielograma e Biópsia de Medula Óssea. Disponível em <<http://www.marleneribas.com.br/informações>>. Acesso em 20 Jan. 2017.

RIBEIRO, R.C et al. Global Pediatric Oncology: Lessons From Partnerships Between High-Income Countries and Low- to Mid-Income Countries. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.34, n.1, p. 53-61, 2016.

ROCHA, M.H. Leucemias. In: CARRAZZA FR, ANDRIOLLO A. **Diagnóstico Laboratorial em Pediatria**, São Paulo: Sarvier ,2000. v.4 , p. 46-51.

ROSS, J.S. et al. DNA ploidy and cell cycle analysis in breast cancer. **Am. J. Clin.**

Pathol., Baltimore, v.120, n.1, p.72–84, 2003.

ROTHENBERG, E.V.; MOORE, J.E.; YUI, M.A. Launching the T-cell-lineage developmental programme. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v.8, p.9–21, 2008.

RUBNITZ, J.E. et al. Prospective Analysis of *TEL* Gene Rearrangements in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group Study. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.26, n.13, p. 2186–2191, 2008.

RUDANT, J. et al. Childhood acute leukemia, early common infections, and allergy: the ESCALE Study. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.172, n.9, p.1015–1027, 2010.

SALINA, T. D. C. et al. Role of peripheral blood minimum residual disease at day 8 of induction therapy in high-risk pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. **Sci. Rep.**, London, 2016. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4985643/>>. Acesso em: 15 Fev. 2017.

SAN MIGUEL, J. et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. **Blood**, New York, v.98, p.1746-1751, 2001.

SANTANA, L.R. et al. Perfil Epidemiológico das Leucemias em Crianças e Adolescentes no Estado da Bahia. **Gaz. Med. Bahia**, Salvador, v.76, n.3, p.51-54, 2006.

SAWADA, S. et al. Significance of four MRD markers in MRD-based treatment strategy for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, Oxford, v.33, p.1710-1713, 2009.

SAZAWAL, S. et al. Paucity of TEL-AML 1 translocation, by multiplex RT-PCR, in B-lineage acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Indian patients. **Am. J. Hematol.**, New York, v.76, p.80-82, 2004.

SEDEK, L. et al. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts? **Cytometry B Clin. Cytom.**, Hoboken, v. 86, n.5, p.329-339, 2014.

SEEGMILLER, A.C. et al. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. **Am. J. Clin. Pathol.**, Baltimore, v.132, n.6, p.940-949, 2009.

SEIF, A.E. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding leukemogenesis. **Cancer Genet.**, New York, v. 204, n.5, p.227-244, 2011.

SHARMA, M.C. et al. Characterization of immunophenotypic aberrancies in adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: A study from Northern India. **J. Cancer Res. Ther.**, Mumbai, v.12, n.2, p. 620-626, 2016.

SIEGEL, R.M.P.H.; NAISHSDHAM, D.M.A; JEMAL, A.D.V.M. Cancer statistics. **CA: Cancer J. Clin.**, New York, v.63, n. 1, p.11-30, 2013.

SILVA, G.C. et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.42, n.2, p.77-84, 2006.

SILVA, D.S.; MATTOS, I.E.; TEIXEIRA, L.R. Tendência de Mortalidade por Leucemias e Linfomas em Menores de vinte anos, Brasil. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v.59, n.2, p.165-173, 2013.

SILVEIRA, N.A.; ARRAES, S.M.A.A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. **Arq Mudi.**, Maringá, v.12, n.1, p.5-14, 2008.

SMITH, M. et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.14,n.1, p.18-24, 1996.

SMITH, O.P. Clinical features and treatment of lymphoblastic leukemia. In: Arceci RJ HISO, editor. **Pediatric. Hematol.**, Massachusetts: Blackwell Publishing, p.450-481, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA. **Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoide Aguda na Infancia-GBTLI-LLA-2009**. Campinas, 2009.

SOUZA, S.S. **Estudo epidemiológico dos casos de leucemia linfoide aguda nas crianças e adolescentes tratados no centro de tratamento onco hematológico infantil –cetohi, do hospital regional de Mato Grosso do Sul**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

SOUZA, D.W.L. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v.37, n.4, 223–229, 2015.

SPATHAS, D.H. et al. Detection of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, New York, v.110, p.7–13,1999.

STEINHERZ, P.G. Treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia with bulky extramedullary disease and T-cell phenotype or other poor prognostic features: randomized controlled trial from the Children's Cancer Group. **Cancer**, Philadelphia, v.:82,n.3, p.600-612, 1998.

STOW, P. et al . Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, New York, v.115, n.23, p.4657-4663, 2010.

SUGGS, J.L. ;CRUSE, J.M.; LEWIS, R.E. Aberrant myeloid marker expression in precursor B-cell and T-cell leukemias. **Exp. Mol. Pathol.**, New York, v.83, n.3, p.471-43, 2007.

SUNDH, K.J. et al. Cancer in children and young adults born after assisted reproductive technology: a Nordic cohort study from the Committee of Nordic ART and Safety (CoNARTaS). **Hum. Reprod.**, Oxford, v.29, n.9, p.2050-2057, 2014.

SWERDLOW, S.H. et al. **WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues**,. Lyon: IARC press, 2008.

SWERTS, K. et al. Improved flow cytometric DNA content analysis and minimal residual disease detection in childhood malignancies. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 379, n. 1 – 2, p. 154–157, 2007.

SZCZEPANSKI, T. et al. Minimal residual disease in leukaemia patients. **Lancet Oncol.**, London, v.2, p.409–417, 2001.

TAYLOR, M. et al. The human major histocompatibility complex and childhood leukemia: an etiological hypothesis based on molecular mimicry. **Blood Cells. Mol. Dis.**, New York. v.42, n.2, p.129–35, 2009.

TERWIJN, M. et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. **J. Clin. Oncol.**, New York, v. 31, n.31, p.889-897, 2013.

TIMMS, J.A. et al. DNA methylation as a potential mediator of environmental risks in the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Epigenomics, London**, v.8, n.4, p.519-536, 2016.

TRUONG, T.H. et al. Features at presentation predict children with acute lymphoblastic leukemia at low risk for tumor lysis syndrome. **Cancer**, Philadelphia v.110, p.1832-1839, 2007.

TSANG, K.S. et al. TEL/AML1 rearrangement and the prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia in Hong Kong. **Am. J. Hematol.**, New York, v.68, p.91 –98, 2001.

TURNER, M.C.; WIGLE, D.T.; KREWSKI, D. Residential pesticides and childhood leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Environ. Health Perspect.**, Durham, v. 118, n. 1, p.33–41, 2010.

UCKUN, F.M. et al. Prognostic significance of the CD10+CD19+CD34+ B-progenitor immunophenotype in children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Leuk. Lymphoma**, Chur, v.27, n.5-6, p.445-457, 1997.

VAN DONGEN, J.J. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. **Lancet**, London, v. 352, n.9142, p.1731-1738, 1998.

VAN DONGEN, J.J. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. **Leukemia**, New Jersey, v.17, p.2257–2317, 2003.

VAN VLIERBERGHE, et al. Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.143, n.2, p.153-68, 2008.

VAN WERING, E.R. et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v.110, p.139-46, 2000.

VARDIMAN, J.W. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, New York, v.114, p.937–951, 2009.

VORA, A. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. **Lancet Oncol.**, London, v.14, n.3, p.199-209, 2013.

WALDMANN, T.A. JAK/STAT pathway directed therapy of T-cell leukemia/lymphoma: Inspired by functional and structural genomics. **Mol. Cell. Endocrinol.**, Limerick, 2017. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720717301065>>. Acesso em 28 Fev. 2017

WANDT, H. et al. WHO classification of myeloid neoplasms and leukemia. **Blood**, New York, v. 115, n. 3, p. 748-749, 2010.

WATANABE, T. Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells. **Blood**, New York, v.129, n.9, p.1071-1081, 2017.

WHITEHEAD, T.P. et al Childhood Leukemia and Primary Prevention. **Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care.**, Saint Louis, v.46,n.10, p.317-352, 2016.

WIEMELS J. L.; LEONARD, B. C.; WANG, Y. et al. Site-specific Translocation and Evidence of Postnatal Origin of the t(1;19) E2A-PBX1 Fusion in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 23, n.99, p. 15101–15106, 2002.

WOO, J.S.; ALBERTI, M.O., TIRADO, C.A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. **Exp. Hematol. Oncol.**, London, v.3, n.16, p. 1-14, 2014.

WOOD, B.L. et al. Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoidneoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. **Cytometry B Clin. Cytom.**, Hoboken, v.72, n.1, 14-22, 2007.

XU, X.J. et al. Day 22 of induction therapy is important for minimal residual disease assessment by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia, **Leukemia Research**, Oxford, v.36, p. 1022-1027, 2012.

ZANROSSO C.W. et al. N-acetyltransferase 2 polymorphisms and susceptibility to infant leukemia with maternal exposure to dipyrone during pregnancy. **Cancer**

Epidemiol. Biomark. Prevent., Philadelphia, v.19, n.12, p.3037–3043, 2010.

ZWAAN, M.C. et al. Acute leukemias in children with Down syndrome. **Pediatr. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v.55, p.53–70, 2008.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

 **Ministério da Saúde**
PROCEL
Prevenção Oncológica
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ / MINISTÉRIO DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1) **TÍTULO DA PESQUISA:** Cuidado do câncer infantil em Pernambuco: desenvolvendo ferramentas diagnósticas acessíveis à rede pública, de impacto no tratamento e prognóstico de crianças com câncer.

2) **PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Dra. Naura Lorenza Cavakani Lucino da Silva.

A leucemia é uma doença que ocorre nos células de defesa (glóbulos brancos) do sangue, sendo o câncer mais frequente em crianças. Essa doença pode acontecer de várias maneiras, atacando diferentes células do sangue: leucemia de células B (LLA-B), leucemia de células T (LLA-T) ou leucemia mieloide (LMA). Os motivos pelos quais as crianças desenvolvem a doença não são bem conhecidos. Nesta pesquisa, propomos estudar a leucemia, tendo como objetivo a identificação de fatores existentes na célula da criança que possam estar relacionados ao desenvolvimento do câncer, podendo contribuir para o desenvolvimento de testes para diagnóstico da doença e para caracterização de gravidade e resposta ao tratamento, e assim melhorar a forma de tratamento do câncer.

Pedimos ao Senhor (a) responsável legal pelo menor, a permissão para o uso das informações sobre a doença e condições de vida reunidas no prontuário médico e banco de dados do hospital, além do uso e armazenamento de de amostras de sangue da medula óssea para este estudo e outros projetos futuros, já coletadas nos exames de rotina do Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira.

O principal desconforto relatado ao estado é a picada da agulha durante a punção medular realizada para o diagnóstico e para avaliação de resposta ao tratamento nos visitas de acompanhamento. Entretanto, esse procedimento ocorre de rotina, independente do projeto, e sob anestesia. Informamos que para esse estudo não será necessário nenhuma outra coleta de sangue, só tratamos o acúmulo de amostra de sangue da medula óssea colhido no "dia do procedimento" em uma de suas visitas ao hospital. Esclarecemos que os resultados desse estudo serão repassados ao seu médico, mas poderão não beneficiar sua criança diretamente. Entretanto, o estudo poderá fazer contribuições para outros estudos que visem a prevenir a leucemia, pois ajuda a melhorar o tratamento terapêutico e a entender as causas da doença. Os resultados do estudo serão divulgados com a garantia de sigilo sobre a identidade dos participantes.

O Senhor (a) estará livre para suspender sua autorização de participação do menor no estudo a qualquer momento, sem que haja nenhuma consequência ou prejuízo no tratamento dele.

Dr. Professor Manoel Rego - R. Celso Carneiro - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 55.070-120
 Telefone: (51) 2101-2575/2101-2600 Fax: (51) 3403-1211
 www.upipe.ufpe.br

1



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz do Ministério da Saúde. Caso exista qualquer tipo de problema, dúvida, gerada ou questionamentos sobre o estudo, entrar em contato com a pesquisadora responsável, Dra. Norma Lucena Cavalcanti Lício da Silva, pelos telefones (81) 2101-2618 ou (81) 9962-3975 ou e-mail: norma.lucena@funmul.com

Sendo assim, eu, _____
 Registro Geral Nº _____, na condição de responsável pelo menor
 Registro Geral Nº _____, Nº CEMOPE _____,
 autorizo a participação do mesmo como voluntário não remunerado estando ciente dos riscos e benefícios contidos neste instrumento. Autorizo também a utilização dessas anotações
 () com a necessidade de um novo contrato e assinatura de um novo TCLE.
 () dispensa a necessidade de um novo contrato e assinatura de um novo TCLE.

Desta forma, ciente o presente termo em duas vias ficando uma sob o minha guarda e a outra com a pesquisadora responsável.

Recife, _____/_____/_____

 RESPONSÁVEL LEGAL DO MENOR

Endereço do participante e para contato e envio.	
Rua _____	No. _____
Bairro _____	Cidade _____
Telefone _____	

CRIANÇA

1.º TESTEMUNHA

Recife, _____/_____/_____

ASSINATURA

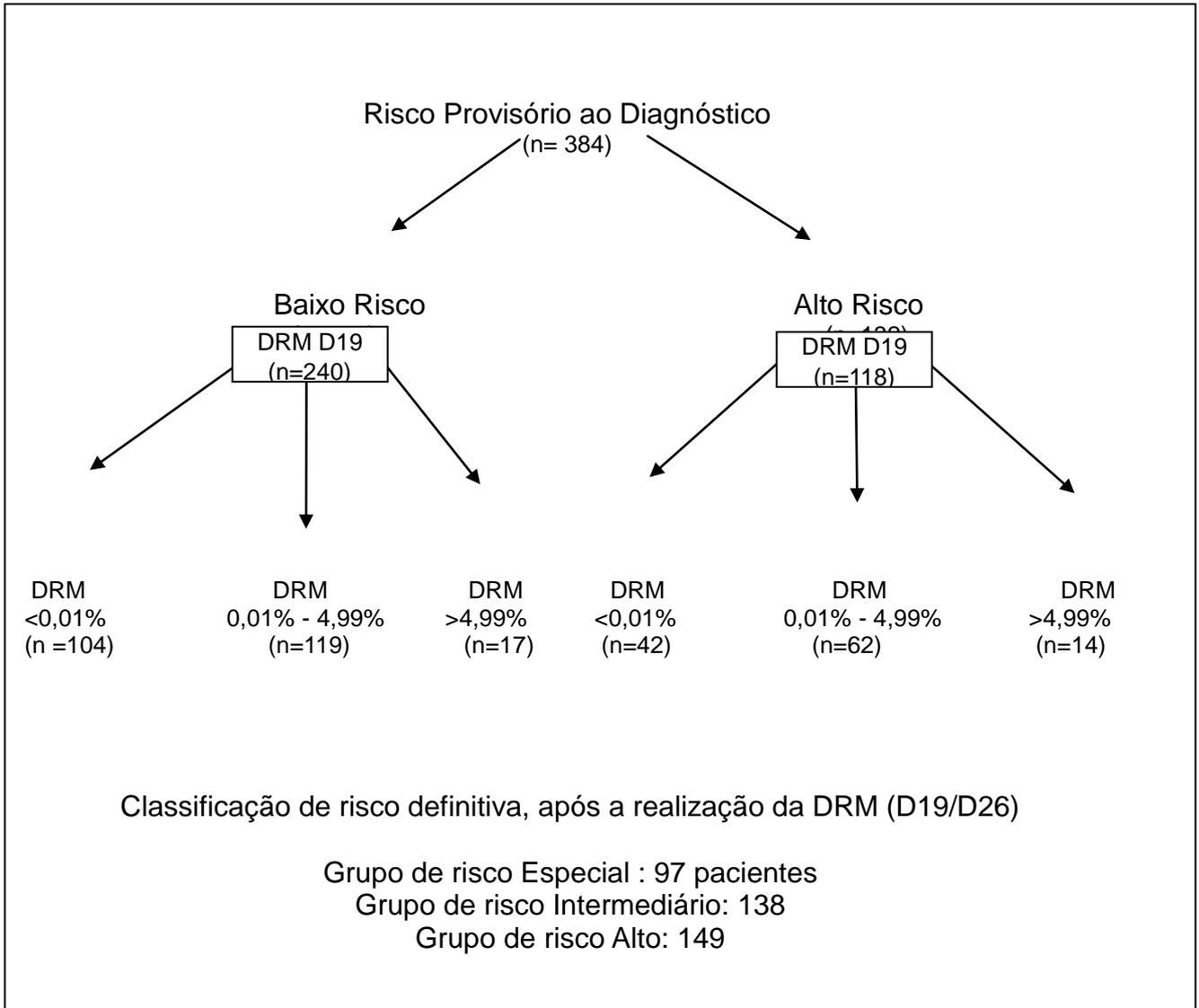
ASSINATURA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Av. Professor Moraes Rego, 101 - Cidade Universitária - Campus de UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.740-110
 Telefone: (81) 2101-2600/2101-2602 Fax: (81) 2423-1011
 www.funmul.com.br

APÊNDICE B -CLASSIFICAÇÃO DE RISCO, APÓS A REALIZAÇÃO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA.

Figura B1 - Esquema mostrando a classificação de risco , após a realização da Doença Residual Mínima



Fonte: Elaborado pela autora

APÊNDICE C -LISTA DOS CLONES DE ANTICORPOS UTILIZADOS NO ESTUDO

Anticorpo	Clone
CD3	SK7
CD7	4H9
CD10	W8E7
CD13	L138
CD19	SJ25C1/HIB19
CD22	S-HCL-1
CD33	P67-3
CD34	8G12
CD45	2DI
KAPPA	TB28-2
LAMBDA	JDC-12
TdT	HT-6
MPO	5B8
CD79a	HM47
IgG1	X40
IgM	Rabbit(FAB)2

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Título do Projeto: "Cenário do câncer infantil em Pernambuco: desenvolvendo ferramentas diagnósticas acessíveis à rede pública, de impacto no tratamento e prognóstico da criança com câncer".

Pesquisador responsável: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 07/03/2013

Registro no CAAE: 13296913.3.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 400.655

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 04 de setembro de 2016.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Rocife, 26 de fevereiro de 2015.

Vice-Coordenador do CEP/CPqAM

Paul Hindenburg Nobre de V. Sá
Análise de Qualidade em Saúde
Vice-Coordenador
Mat. SIAPE 195908
CEP/CPqAM/Fiocruz



Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2839
Rocife - PE - 51251
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br



ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CYTOMETRY: PART B

Disponível em

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21394/abstract;jsessionid=4209FA0BA8CE25DD95E3313F737A23DA.f04t04>>

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 008:00-00 (2016)

Brief Communication

Implementation of a Simplified Flow Cytometric Assays for Minimal Residual Disease Monitoring in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

Ester Vinhas,^{1,2} Norma Lucena-Silva,^{1,2*} and Francisco Pedrosa¹¹Pediatric Oncology, CEHOPE/Institute of Integral Medicine Professor Fernando Figueira, Recife, Brazil²Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil

Background: Monitoring minimal residual disease (MRD) in B-lineage acute lymphoblastic leukemia (ALL) to assess treatment response is crucial for risk assignment. Flow cytometry can be used to monitor MRD in ALL but the implementation of this approach requires extensive expertise. If resources are limited, the costs of full flow cytometric MRD testing might be prohibitive.

Objective: We evaluated the applicability of a previously reported simplified MRD assay, designed to distinguish leukemic from normal lymphoblastic during remission induction therapy.

Methods: Fifty-nine samples from children with ALL, enrolled in the RE-LLA study at a pediatric oncology center in Recife (Brazil), were evaluated for MRD on day 19 and on day 26 of remission induction therapy. We compared results obtained by a trainee in Recife and an expert.

Results: The method was implemented successfully and the concordance between results obtained by the trainee and the expert was practically absolute at the end of the study.

Conclusions: It is possible to implement reliable measurements of MRD during remission induction therapy in childhood ALL despite limited resources. The simplicity of the MRD method used in this study does not require extensive prior training in leukemia immunophenotyping. © 2016 International Clinical Cytometry Society

Key terms: acute lymphoblastic leukemia; minimal residual disease; flow cytometry

How to cite this article: Vinhas E, Lucena-Silva N and Pedrosa F Implementation of a Simplified Flow Cytometric Assays for Minimal Residual Disease Monitoring in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry Part B* 2016; 00B: 000-000.

INTRODUCTION

Minimal residual disease (MRD) determination in acute lymphoblastic leukemia (ALL) is of great importance in the assessment of treatment response, and it has become essential for risk assignment in contemporary treatment protocols (1–4). Several methods have been proposed for the identification of MRD, including RT-PCR, Q-PCR, and flow cytometry (5,6). The standard application of flow cytometry to evaluate MRD is based on identification of immunophenotypes expressed on leukemic cells but not on normal lymphoid progenitors. These studies, however, require considerable expertise and often have high costs due to the extensive panels of markers and sophisticated instruments required.

Because normal immature B cells, distinguished by the expression of CD19, with CD10 and/or CD34, are extremely sensitive to glucocorticoids and other

antileukemic drugs used during remission induction therapy for ALL, such cells are typically absent in the bone marrow of children with ALL approximately 2 weeks after initiation of treatment (7). Therefore, the presence of cells with such immunophenotype is indicative of residual leukemia. With this premise, an MRD assay using only 3–4 markers was developed to track early treatment response in ALL (7,8). Because of its simplicity, this assay should not only have lower costs than

*Correspondence to: Norma Lucena-Silva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, CEP: Pernambuco, Brazil. E-mail: norma.lucena@hotmail.com

Received 29 January 2016; Revised 8 June 2016; Accepted 23 June 2016

Published online 00 Month 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.21394