

Camila Silva Peres Cancela

Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano pelas técnicas de imunofenotipagem e reação em cadeia da polimerase em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof^a. Benigna Maria de Oliveira
Co-orientadora: Dra. Juliana Godoy Assumpção

Belo Horizonte

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**Reitor:** Prof. Jaime Arturo Ramírez**Vice-Reitora:** Prof^a Sandra Regina Goulart Almeida**Pró-Reitor de Pós-Graduação:** Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte**Pró-Reitor de Pesquisa:** Prof^a Adelina Martha dos Reis**FACULDADE DE MEDICINA****Diretor:** Prof. Tarcizo Afonso Nunes.**Vice-Diretor:** Prof. Humberto José Alves**Coordenadora do Centro de Pós-Graduação:**Prof^a. Sandhi Maria Barreto**Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação:**Prof^a Ana Cristina Côrtes Gama**Chefe do Departamento de Pediatria:**Prof^a Claudia Regina Lindgren Alves**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE****Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente****Coordenador:** Prof. Eduardo Araújo Oliveira**Subcoordenador:** Prof. Jorge Andrade Pinto

À chacun son Everest!

Christine Janin

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Benigna, agradeço muito o convívio e o aprendizado durante todos esses anos. Agradeço a orientação, a dedicação, a paciência e o apoio neste trabalho, com todos seus altos e baixos. Agradeço, também, todo o incentivo para minha decisão de seguir a carreira acadêmica e ser professora no mesmo departamento do qual faz parte. Espero que nosso convívio na hematologia e na pediatria continue sempre harmonioso e que nossa parceria prossiga em projetos futuros. Ainda tenho muito a aprender com você.

À minha co-orientadora, Dra. Juliana, pelos ensinamentos e disponibilidade, especialmente na realização da PCR, minha maior dificuldade neste trabalho.

À Dra. Mitiko, por toda ajuda e dedicação na realização da imunofenotipagem. Agradeço, também, pelo convívio na hematologia e todo aprendizado dos últimos anos. Estendo meus agradecimentos ao Dr. Marcelo e a toda equipe do laboratório de Imunofenotipagem do Serviço de Hematologia do HC/UFMG.

À equipe do laboratório de Hematologia Molecular, em especial ao Dr. Francisco Danilo, por toda ajuda e aprendizado na realização da PCR.

Aos colegas da Hematologia Pediátrica, meus amigos, agradeço muito o apoio com as coberturas das minhas atividades no Serviço e pela grande ajuda na coleta e inclusão dos pacientes.

À minha mãe, meu porto seguro, por estar sempre presente, confiante e disposta a ajudar. Ao meu pai, que, mesmo caladinho, sempre me acolhe e cuida de mim. À minha vó Clara, mulher forte e animada, por ser nossa companheira de aventuras. Ao meu irmão, Ricardo, pelo companheirismo, sempre.

Ao Antonio, por apoiar e respeitar minhas decisões profissionais. Por ser, às vezes, tão racional e rigoroso e me colocar “na linha” e, ao mesmo tempo, tão malquinho e divertido e me permitir escapar um pouquinho do mundo real...

À minha Ana, que mesmo tão pequenininha, parece entender minhas ausências e meu cansaço e colore sempre o meu dia com seus gracejos e sorriso de dentinhos separados.

A toda minha família e amigos, agradeço muito pela presença e compreensão neste momento de concentração para conclusão deste meu trabalho.

Aos professores eméritos, Francisco Penna e Marcos Borato Viana, eternos mestres, pelo exemplo.

Aos alunos de iniciação científica que participaram do trabalho, José Márcio, Virgínia, Bruna e Douglas, agradeço a ajuda e parceria.

E agradeço, é claro, aos pacientes do Serviço de Hematologia, que são sempre a principal razão do nosso trabalho.

NOTA EXPLICATIVA

A presente tese segue as recomendações da resolução 03/2010 sobre o formato de teses e dissertações do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente. De acordo com tal resolução o formato de artigo é considerado preferencial pelo colegiado.

Logo, a tese obedece ao roteiro demonstrado abaixo:

1. Introdução;
2. Revisão da literatura;
3. Objetivos;
4. Pacientes e Métodos;
5. Resultados e discussão: sob o formato de três artigos originais;
6. Conclusões;
7. Considerações finais;
8. Anexos/Apêndices.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto contou com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), através do Edital Universal 2009.

Os estudantes de graduação, que participaram do projeto, receberam bolsa de iniciação científica, financiada pela FAPEMIG e pela Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPQ/UFMG).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------|---|
| Ac | Anticorpo |
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| CF | Citometria de fluxo |
| CT | Citologia |
| DRM | Doença residual mínima |
| GBTLI LLA | Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemias na Infância |
| HC-UFMG | Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais |
| Ig | Imunoglobulina |
| IMF | Imunofenotipagem |
| IT | Intratecal |
| LCR | Líquido cefalorraquidiano |
| LLA | Leucemia linfóide aguda |
| LMA | Leucemia mieloide aguda |
| MADIT | Quimioterapia tripla intratecal |
| MO | Medula óssea |
| MoAb | Anticorpo monoclonal |
| NCCN | <i>National Comprehensive Cancer Network</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| QT | Quimioterapia |
| rpm | Rotações por minuto |
| RQ-PCR | Reação em cadeia da polimerase em tempo real |
| RT | Radioterapia |
| SGLO | Sobrevida global |
| SLE | Sobrevida livre de eventos |
| SNC | Sistema nervoso central |
| VPN | Valor preditivo negativo |
| VPP | Valor preditivo positivo |
| TCR | Receptor de células T |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: Processo de formação dos rearranjos gênicos nas regiões variáveis que contêm os sítios de reconhecimento antigênico de uma imunoglobulina..... 28

PACIENTES E MÉTODOS

Figura 1: Células leucêmicas em LCR de paciente com LLA..... 41

Quadro1:Combinações de *primers* utilizadas para a triagem inicial nas LLAs-B e T..... 44

Figura 2: Diagrama esquemático da técnica de análise de homo/heteroduplex de rearranjos dos genes Ig e TCR..... 45

Figura 3: Estratégia de amplificação da região clonal..... 46

ARTIGO 1

Figure – Dot-plot of the selected events according to FSC, SSC and CD45 expression consistent with blast sites, with CD19 and CD5 (aberrant) immunostaining similar to diagnosis. CSF, sample 2, patient with B-ALL..... 53

ARTIGO 2

Figura 1: Fluxograma da inclusão dos 67 pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA)..... 63

Figura 2: Probabilidade de sobrevida livre de eventos (SLE) para 49 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com o resultado da imunofenotipagem do líquido cefalorraquidiano ($p < 0,0001$)..... 69

ARTIGO 3

Figura 1: Fluxograma dos pacientes e amostras de LCR incluídos para a PCR..... 87

Figura 2: Resultados da PCR de três pacientes com LLA: amostras de medula óssea e líquido cefalorraquidiano..... 88

Figura 3: Probabilidade de sobrevida livre de eventos (SLE) para 29 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com o resultado da PCR do líquido cefalorraquidiano ($p = 0,048$)..... 91

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Comparação entre resultados de estudos de imunofenotipagem do líquido cefalorraquidiano..... | 25 |
| Tabela 2: Principais indicações da biologia molecular na investigação das neoplasias hematológicas..... | 26 |
| Tabela 3: Vantagens e desvantagens dos métodos de avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano | 30 |
| Artigo 1 | |
| Table – Characteristics of 23 samples of CSF from children with acute lymphoblastic leukemia..... | 55 |
| Artigo 2 | |
| Tabela 1: Características clínicas dos 67 pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda..... | 64 |
| Tabela 2: Características dos 15 pacientes incluídos à recidiva de leucemia linfóide aguda..... | 65 |
| Tabela 3: Resultados da avaliação citológica e por imunofenotipagem de 72 amostras de líquido cefalorraquidiano de 67 pacientes diagnosticados com leucemia linfóide aguda..... | 66 |
| Tabela 4: Análise de concordância entre os métodos de imunofenotipagem e citologia para avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano..... | 67 |
| Tabela 5: Associação entre positividade do líquido cefalorraquidiano ao diagnóstico pelo método de imunofenotipagem e fatores de risco para recidiva de leucemia linfóide aguda em 49 pacientes..... | 68 |
| Tabela 6: Comparação entre resultados de estudos de imunofenotipagem do líquido cefalorraquidiano em crianças e adolescentes com diagnóstico de LLA..... | 71 |
| ARTIGO 3 | |
| Tabela 1: Características clínicas dos 55 pacientes incluídos ao diagnóstico inicial de leucemia linfóide aguda..... | 86 |
| Tabela 2: Amostras de líquido cefalorraquidiano positivas para a presença de blastos em pelo menos um dos quatro métodos testados em 44 pacientes com leucemia linfóide aguda..... | 89 |
| Tabela 3: Análise da concordância entre os métodos de avaliação do líquido cefalorraquidiano ao diagnóstico de leucemia linfóide aguda | 90 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 15 |
| 2.1. LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)..... | 15 |
| 2.2. DIAGNÓSTICO DA LLA NO SNC..... | 16 |
| 2.2.1. CITOLOGIA..... | 16 |
| 2.2.2. IMUNOFENOTIPAGEM..... | 20 |
| 2.2.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE..... | 26 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 31 |
| 3. OBJETIVOS..... | 37 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL..... | 37 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 37 |
| 4. PACIENTES E MÉTODOS..... | 38 |
| 4.1. PACIENTES..... | 38 |
| 4.2. DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS..... | 38 |
| 4.2.1. PROTOCOLO DE TRATAMENTO..... | 38 |
| 4.2.2. COLETA DOS DADOS CLÍNICOS..... | 39 |
| 4.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS..... | 40 |
| 4.3.1. COLETA E ARMAZENAMENTO DO LCR..... | 40 |
| 4.3.2. CITOLOGIA DO LCR..... | 40 |
| 4.3.3. IMUNOFENOTIPAGEM DO LCR..... | 42 |
| 4.3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE..... | 43 |
| 4.3.4.1. Extração de DNA das células do LCR..... | 43 |
| 4.3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR convencional)..... | 43 |
| 4.3.4.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RQ-PCR)..... | 46 |
| REFERÊNCIAS..... | 47 |
| 4.4. ASPECTOS ÉTICOS..... | 48 |
| 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 48 |
| 5. RESULTADOS..... | 49 |
| 5.1. ARTIGO ORIGINAL..... | 49 |
| Resumo..... | 50 |
| Abstract..... | 51 |

| | |
|---------------------------------|-----|
| 5.1.1. INTRODUCTION..... | 52 |
| 5.1.2. RETROSPECTIVE STUDY..... | 52 |
| REFERENCES..... | 56 |
| 5.2. ARTIGO ORIGINAL..... | 57 |
| Resumo..... | 58 |
| Abstract..... | 59 |
| 5.2.1. INTRODUÇÃO..... | 60 |
| 5.2.2 PACIENTES E MÉTODOS..... | 61 |
| 5.2.3. RESULTADOS..... | 63 |
| 5.2.4. DISCUSSÃO..... | 70 |
| REFERÊNCIAS..... | 75 |
| 5.3. ARTIGO ORIGINAL..... | 78 |
| Resumo..... | 79 |
| Abstract..... | 80 |
| 5.3.1. INTRODUÇÃO..... | 81 |
| 5.3.2. METODOLOGIA..... | 82 |
| 5.3.3. RESULTADOS..... | 85 |
| 5.3.4. DISCUSSÃO..... | 91 |
| REFERÊNCIAS..... | 95 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 99 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 100 |
| APÊNDICES..... | 101 |
| Apêndice A..... | 101 |
| ANEXOS..... | 107 |
| Anexo 1..... | 107 |
| Anexo 2..... | 117 |
| Anexo 3..... | 120 |
| Anexo 4..... | 121 |

1. INTRODUÇÃO

As leucemias agudas correspondem à maioria das neoplasias na infância, sendo responsáveis por cerca de um terço das doenças malignas nesta faixa etária. A leucemia linfóide aguda (LLA) é diagnosticada em 75% dos casos (INABA *et al*, 2013). Até 1950 o diagnóstico de leucemia aguda era fatal, com sobrevida em torno de três meses. Na década de 1950, surgiram os primeiros relatos do uso de quimioterapia (QT) no tratamento de leucemias (SIMONE, 2006). Tal fato transformou radicalmente a evolução da doença. Atualmente, nos serviços de referência para tratamento de LLA na infância, as taxas de cura aproximam-se dos 90% (LANINGHAM *et al*, 2007; INABA *et al*, 2013; PUI *et al*, 2012).

Por ser uma doença sistêmica, a LLA comumente apresenta sinais de acometimento extramedular. O sistema nervoso central (SNC) é o sítio extramedular mais acometido ao diagnóstico (< 5% dos pacientes) e às recidivas (entre 5 a 10% dos pacientes) (GASSAS *et al*, 2014; PUI *et al*, 2009). Alguns fatores de risco observados ao diagnóstico de LLA foram associados a um maior risco de recidiva da doença. Em relação às recidivas no SNC, os fatores de risco identificados foram: imunofenótipo T dos blastos leucêmicos, presença de alterações citogenéticas – t(9;22) e t(4;11), hiperleucocitose e presença de infiltração em SNC ao diagnóstico (PUI *et al*, 2004).

Após a introdução da QT sistêmica para tratamento da LLA, observou-se um aumento do número de recidivas em SNC (EVANS *et al*, 1970; SIMONE, 2006). Essa observação justifica-se pela melhora da sobrevida dos pacientes e dificuldade dos agentes quimioterápicos atingirem o SNC devido à barreira hematoencefálica (BHE) (HUTCHISON *et al*, 1973; SIMONE, 2006). Na tentativa de diminuir as recidivas em SNC, terapias direcionadas a esse sistema foram introduzidas, para tratamento e profilaxia (HUTCHISON *et al*, 1973; PUI *et al*, 2009; SIMONE, 2006). As estratégias utilizadas foram: radioterapia (RT) cranioespinhal, QT intratecal (IT) e QT sistêmica em altas doses (PIETERS *et al*, 2008; PUI *et al*, 2009; RICHARDS *et al*, 2013; SIMONE, 2006). Essa abordagem apresentou bons resultados (AUR *et al*, 1971; CHESSELLS, 1994; HUSTU *et al*, 1973; RICHARDS *et al*, 2013). Após seguimento dos pacientes submetidos a RT, observaram-se os efeitos colaterais da irradiação: neoplasias secundárias em SNC, anormalidades neurocognitivas e de crescimento, distúrbios endócrinos e efeitos neurotóxicos (OCHS *et al*, 1994; PUI *et al*, 2008; RIMM *et al*,

1987). A partir desta observação, vários estudos avaliaram protocolos de tratamento que preconizavam doses reduzidas de irradiação ou, até mesmo, suspensão do seu uso (CHESSELLS, 1994; MANERA *et al*, 2000; NESBIT *et al*, 1981; PUI *et al*, 2008; PUI *et al*, 2009; SCHRAPPE *et al*, 2000; VEERMAN *et al*, 2009; VILMER *et al*, 2000). Atualmente, sugere-se que a RT profilática pode ser eliminada do tratamento da LLA (PUI *et al*, 2009; RICHARDS *et al*, 2013; SIRVENT *et al*, 2011).

Para seleção de pacientes de maior risco para recidiva no SNC, que se beneficiariam de tratamento mais intensivo, é fundamental o diagnóstico correto da infiltração neste sistema. Uma das formas usadas para realização deste diagnóstico é a análise do líquido cefalorraquidiano (LCR). Não existe um padrão-ouro estabelecido para avaliação do LCR (SAYED *et al*, 2009). O exame realizado na maioria dos Serviço de tratamento de leucemia é a citologia (CT) do LCR, para identificação de células leucêmicas (CHAMBERLAIN *et al*, 2005). Entretanto, a escassez de células neste líquido corporal e a presença de linfócitos atípicos com morfologia semelhante à das células leucêmicas podem interferir nos resultados, conforme observado na literatura (BOROWITZ *et al*, 1981; GLANTZ *et al*, 1997; GLASS *et al*, 1979; PERSKE *et al*, 2010). Outros métodos para avaliação do LCR nas neoplasias hematológicas, como imunofenotipagem (IMF) e biologia molecular, têm sido estudados, com bons resultados (AHLUWALIA *et al*, 2011; CRESPO-SOLIS *et al*, 2013; GALATI *et al*, 2013; GOMES, 2013). No entanto, ainda não está bem definido na literatura qual seria a aplicação destes métodos (IMF e biologia molecular) na estratificação de risco de recidiva dos pacientes com LLA.

O Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) é referência para tratamento de neoplasias na infância. Anualmente são admitidos cerca de 20 casos novos de LLA no Serviço de Hematologia Pediátrica. Os pacientes são tratados pelos protocolos do Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemias na Infância (GBTLI LLA), grupo do qual o HC-UFMG é colaborador. Apesar de todo avanço no tratamento da LLA, os últimos resultados observados no HC-UFMG, pelo protocolo GBTLI LLA 99, estão aquém do relatado na literatura (probabilidade estimada de sobrevida global -SGLO- aos 5 anos de 69,5% \pm 3,6% e sobrevida livre de eventos - SLE- aos 5 anos de 58,8% \pm 4,0%). Um dos fatores associados a esse pior resultado foi a alta incidência acumulada de recidiva em SNC observada (10,9% em 8 anos) (CANCELA *et al*, 2012).

O presente estudo dá continuidade à linha de pesquisa do Grupo de Hematologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG dedicada ao estudo dos fatores prognósticos nas leucemias infantis. O objetivo foi avaliar novos métodos (IMF e reação em cadeia da polimerase – PCR) para a identificação de células leucêmicas no LCR dos pacientes diagnosticados com LLA e tratados pelos protocolos do GBTLI LLA no serviço de Hematologia do HC-UFMG.

Diante do exposto, a relevância do estudo apresentado é que ele poderá contribuir para fundamentar uma melhor abordagem diagnóstica e terapêutica, com repercussões na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes com LLA.

Propõe-se que, com a conclusão desse projeto, a IMF e a PCR, como métodos complementares de avaliação do LCR, sejam incorporadas à rotina de diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com LLA, tratados no Serviço de Hematologia do HC-UFMG.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

O LCR tem funções de amortecimento e lubrificação do SNC, além de depuração de resíduos e circulação de nutrientes. Sua produção é derivada de ultrafiltração e secreção dos plexos coróides numa taxa de 500 ml/dia. A reabsorção é realizada nos vilos aracnóides. O volume de LCR varia entre 80 ml e 150 ml, no adulto, e entre 10 ml e 60 ml, no recém-nascido. A regulação do seu conteúdo é realizada por sistemas de transporte específico (H^+ , K^+ , Ca^{2+} , bicarbonato, etc.) e por difusão passiva (proteínas). Algumas substâncias circulam livremente, como a glicose, até ocorrer equilíbrio. Esse controle rigoroso é denominado barreira hematoencefálica (BHE).

A celularidade do LCR normal é pequena, variando de 0 a 5 células/ μ L. Os tipos celulares geralmente encontrados são linfócitos e monócitos numa proporção de 70:30 em adultos. Nas crianças mais novas, a proporção de monócitos pode ser maior (até 80%). Outros tipos celulares (polimorfonucleares, células escamosas, células endimais, histiócitos, etc.) podem ser encontrados, em pequeno número, em consequência de punção traumática e de métodos laboratoriais que melhoram a concentração celular da amostra.

A avaliação laboratorial do LCR é indicada na suspeita de infecção do SNC, hemorragia subaracnoidea, doenças malignas com acometimento do SNC e doenças desmielinizantes. (KNIGHT *et al*, 2007).

A LLA é uma das principais neoplasias que podem acometer o SNC e levar a potenciais alterações no LCR. As células leucêmicas podem infiltrar o SNC por meio de vários mecanismos, inclusive de forma iatrogênica secundária a punção traumática. As principais vias de introdução dessas células no SNC seriam: por extensão da medula óssea (MO) do crânio ao espaço subaracnoideo pelas veias comunicantes; entrada no LCR pelo plexo coroide; invasão do parênquima cerebral via capilares cerebrais; ou infiltração direta das leptomeninges via lesões ósseas do crânio. Os blastos ainda podem invadir as raízes nervosas e chegar ao espaço subaracnoideo através do forame neural, e os cloromas podem se estender pelo forame intervertebral e entrar no espaço extradural (PINKEL *et al*, 1994; PRICE *et al*, 1973; PUI *et al*, 2008; ÜNAL *et al*, 2008).

A coleta do LCR para análise pode ser realizada por meio de punção lombar, cisternal, cervical lateral ou de cânulas e derivações ventriculares e reservatórios (de Ommaya) instalados cirurgicamente. Até 20 ml de LCR podem ser coletados, conforme a necessidade de cada exame solicitado. A coleta deve ser realizada em tubo estéril, preferencialmente um que não seja de vidro, pois as células podem ficar aderidas ao recipiente. As amostras devem ser processadas imediatamente para se evitar degradação celular e alteração dos resultados. O LCR pode ser conservado sob refrigeração, exceto para as amostras destinadas à cultura.

Várias análises podem ser realizadas no LCR coletado: contagem celular total e diferencial, CT, bioquímica (glico- e proteinorraquia), culturas, pesquisa de antígenos fúngicos e bacterianos, PCR, dentre outros (KNIGHT *et al*, 2007).

Na LLA, preconiza-se a coleta de LCR ao diagnóstico e durante todo o tratamento, para contagem celular e pesquisa de blastos através da análise citológica. A coleta geralmente é realizada por punção lombar.

2.2. DIAGNÓSTICO DA LLA NO SNC

2.2.1. CITOLOGIA

Desde os primeiros relatos de acometimento do SNC pela LLA, nas décadas de 1950 e 1960, o diagnóstico era confirmado pela análise citológica do LCR. Na ocasião, a maioria dos pacientes nos quais o LCR era coletado apresentava sinais e sintomas neurológicos. Os protocolos de tratamento, geralmente, não preconizavam a avaliação rotineira do LCR para pesquisa de células leucêmicas nos pacientes assintomáticos (EVANS *et al*, 1970; HARDISTY *et al*, 1967). Coincidentemente com um aumento na sobrevida dos pacientes com leucemia, observou-se um aumento na incidência de acometimento do SNC, que ocorria em cerca de 50% dos pacientes, em estudos dos anos 1960-70 (EVANS *et al*, 1970).

As alterações descritas no LCR eram aumento da celularidade e presença de células leucêmicas à microscopia óptica (HARDISTY *et al*, 1967; ODOM *et al*, 1990). Já se observava associação entre o número de leucócitos em sangue periférico ao diagnóstico com pior sobrevida e maior número de células no LCR nas recidivas em SNC. Também foi observado que a contagem de células acima de 1000/ μ L no LCR era associada com maior taxa de recidiva precoce no SNC (HARDISTY *et al*, 1967).

As dificuldades no diagnóstico citológico da infiltração leucêmica no SNC são observadas desde os primórdios de sua realização até a atualidade (BOROWITZ *et al*, 1981; CRESPO-SOLIS *et al*, 2012; GALATI *et al*, 2013; GLANTZ *et al*, 1997; GLASS *et al*, 1979; GOMES, 2013). Glass e colaboradores (1979) observaram cerca de 40% de resultados falso-negativos da CT do LCR, após confirmação da infiltração leucêmica no SNC por meio de autópsias. Wu e colaboradores observaram, pela revisão da CT do LCR de 16 pacientes com quadro benigno e 16 com diagnóstico de neoplasias hematológicas (nenhuma LLA), sensibilidade de 73%, especificidade de 55%, valor preditivo positivo (VPP) de 60% e valor preditivo negativo (VPN) de 66% (WU *et al*, 2009).

Vários fatores podem interferir na avaliação citológica do LCR (CRESPO-SOLIS *et al*, 2012; GLANTZ *et al*, 1997; RHODES *et al*, 1995):

- Presença de células inflamatórias (geralmente linfócitos T) decorrentes de infecções no SNC ou de processo inflamatório desencadeado pela quimioterapia;
- Liberação de citocinas pró-inflamatórias que interferem na integridade da BHE;
- Possível morfologia atípica de linfócitos ativados;
- Pequeno volume de LCR coletado;
- Freqüente hipocelularidade de amostras;
- Intervalo considerável entre coleta e processamento;
- Local da coleta do exame (região lombar, cisternal ou cervical lateral);
- Punção traumática.

Glantz e colaboradores (1997) avaliaram fatores que poderiam interferir na sensibilidade da avaliação citológica do LCR de pacientes com envolvimento neoplásico do SNC. Para minimizar os resultados falso-negativos, os autores sugerem, entre outras observações: coletar volume $\geq 10,5$ ml de LCR e processar a amostra imediatamente após a coleta. Em relação ao intervalo entre a coleta e o processamento da amostra, há descrição na literatura de que o mesmo possa interferir na viabilidade celular, com 50% de células viáveis após 30 minutos da coleta e apenas 10%, após 90 minutos (GOMES, 2013). Além dos fatores acima, Huppmann e colaboradores (2012) relataram um aumento em 5 a 9 vezes no número de células recuperadas nas amostras de LCR, após troca da citocentrífuga, o que sugere que a detecção de blastos pode ser instrumento-dependente.

O fato de os linfócitos serem parte da constituição habitual do LCR e as similaridades morfológicas entre linfócitos inflamatórios e blastos leucêmicos no LCR são um dos principais fatores que dificultam o diagnóstico da LLA. De forma geral, as características morfológicas observadas nos blastos são: células maiores, maior razão núcleo/citoplasma, citoplasma basofílico, irregularidade de citoplasma e núcleo, presença de nucléolo e figuras de mitose. Na tentativa de se avaliar quais critérios morfológicos pudessem distinguir células neoplásicas hematológicas de células inflamatórias no LCR, Perske e colaboradores (2010) avaliaram, retrospectivamente, lâminas de LCR de 42 pacientes com diagnóstico de neoplasias hematológicas no SNC e 26 com doenças infecciosas ou inflamatórias. Nenhum critério avaliado permitiu uma clara distinção entre o diagnóstico de neoplasias e de doenças infecciosas ou inflamatórias. Entretanto, observou-se, nas células neoplásicas, maior tamanho (2,5 x o diâmetro do linfócito normal), formato irregular do citoplasma e cromatina enovelada nos núcleos.

Além das dificuldades na avaliação citológica do LCR descritas acima, ainda existe controvérsia acerca de qual seria a melhor definição dos parâmetros citológicos para diagnóstico de infiltração no SNC e sua implicação no prognóstico destes pacientes. Sabe-se que a presença de 1 célula leucêmica/ μL de LCR corresponde a, aproximadamente, 10^5 células em todo o compartimento líquórico (GAJJAR *et al*, 2000; GILCHRIST *et al*, 1994). No início dos anos 1980, a definição de infiltração do SNC era realizada pela presença de mais de 10 células/ μL de LCR e pela presença de blastos em amostra citocentrifugada (ODOM *et al*, 1990). Posteriormente, em *workshop* realizado entre especialistas em Roma, a infiltração leucêmica no LCR foi redefinida pela presença de mais de 5 leucócitos/ μL e pela observação inequívoca de linfoblastos na amostra após citocentrifugação (MASTRANGELO *et al*, 1986). Estudos da década de 1990 iniciaram um questionamento sobre esta definição, a partir da observação de pior prognóstico da LLA em pacientes com pesquisa de blastos positiva em LCR com contagem de células abaixo de 5/ μL e pacientes com inoculação de blastos no LCR por punção traumática (BÜRGER *et al*, 2003; GAJJAR *et al*, 2000; JASTANIAH *et al*, 2015; MAHMOUD *et al*, 1993; SHAIKH *et al*, 2014). A partir dessas observações, elaborou-se nova classificação do LCR para diagnóstico de infiltração do SNC na LLA (GAJJAR *et al*, 2000; MAHMOUD *et al*, 1993), a saber:

- SNC 1 – punção lombar não-traumática (<10 hemácias/ μL) e ausência de blastos;

- SNC 2 – punção lombar não-traumática (<10 hemácias/ μL), contagem de leucócitos inferior a $5/\mu\text{L}$ e presença de blastos;
- SNC 3 – punção lombar não-traumática (<10 hemácias/ μL), contagem de leucócitos superior ou igual a $5/\mu\text{L}$ e presença de blastos;
- PLT *negativa* – punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μL) e ausência de blastos;
- PLT *positiva* – punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μL) e presença de blastos.

A definição de infiltração no SNC na maioria dos protocolos é realizada pelo achado de LCR classificado como SNC 3. As demais classificações geralmente não são consideradas como infiltração no SNC. Alguns protocolos preconizam intensificação na QT IT para os pacientes caracterizados como SNC 2 e PLT *positiva* (JASTANIAH *et al*, 2015; RICHARDS *et al*, 2013; SIRVENT *et al*, 2011). Destaca-se, também, que a definição de punção traumática pode ser diferente nos diversos centros de tratamento, como observa-se nos protocolos da *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC), que utilizam como critério um número ≥ 100 hemácias/ μL de LCR (SIRVENT *et al*, 2011).

A recidiva no SNC é definida pelo achado de LCR classificado como SNC3, em qualquer momento do tratamento, após a remissão. Alguns trabalhos sugerem que aqueles pacientes classificados como SNC2 em mais de uma punção, com intervalo de quatro semanas, também deveriam ser considerados como recidiva no SNC (ODOM *et al*, 1990; HUPPMANN *et al*, 2012).

O uso da CT do LCR para vigilância dos pacientes durante o tratamento de LLA, ainda hoje recomendado na maioria dos protocolos de tratamento, foi questionado por Jorgensen e colaboradores (2012), após a observação de baixa taxa de detecção de recidivas assintomáticas no SNC (0,09%) por esta medida. No entanto, a análise deste estudo excluiu o grupo de pacientes de alto risco para recidiva em SNC (JORGENSEN *et al*, 2012). Observou-se em outro estudo, em contrapartida, uma maior taxa de detecção de recidivas assintomáticas no SNC, a partir da vigilância de rotina do LCR, especialmente nos pacientes com recidiva isolada neste local (GASSAS *et al*, 2014).

Alguns questionamentos sobre a infiltração da LLA no SNC merecem destaque. A presença de células leucêmicas no SNC ao diagnóstico, como fator prognóstico na LLA, poderia ser decorrente de um clone neoplásico mais resistente ou apenas consequência

da presença de blastos em um compartimento no qual a QT sistêmica teria maior dificuldade de acesso. O diagnóstico de infiltração no SNC, nos protocolos mais antigos, participava dos critérios de estratificação de risco. Atualmente, a partir da observação de que a maioria dos pacientes classificados como SNC 3 apresentam outros marcadores de mau prognóstico, o papel da infiltração do SNC ao diagnóstico da LLA ficou mais restrito, mas ainda é fundamental para escolha dos pacientes que podem se beneficiar de tratamento mais intensivo para este sistema, como a QT IT e a RT (LEVINSEN *et al*, 2014; RICHARDS *et al*, 2013; SIRVENT *et al*, 2011).

2.2.2. IMUNOFENOTIPAGEM

A citometria de fluxo (CF) caracteriza-se pelo fluxo contínuo de partículas ou células em suspensão, que serão contadas, e seus aspectos físicos e químicos, mensurados (BACAL *et al*, 2003; WOOD *et al*, 2007). O funcionamento do citômetro de fluxo é baseado no emprego de radiação *laser*, fluxo hidrodinâmico, óptica, substâncias fluorescentes (fluorocromos) e recursos de informática (SILVA *et al*, Boletins de Biotecnologia).

Para que seja possível a análise pelo citômetro de fluxo, é necessário que o material esteja em suspensão. Medula óssea, sangue periférico, LCR e outros líquidos corporais são suspensões celulares por natureza. Outros materiais, como tecidos sólidos de biópsias, também podem ser preparados para CF, desde que sejam colocados nessa condição (BACAL *et al*, 2003).

A IMF por CF é a análise das células marcadas com anticorpos (Ac) monoclonais, associados a um fluorocromo, onde a passagem destas através do citômetro possibilita a medida do número de células positivas para os Ac marcados (BACAL *et al*, 2003).

A IMF permite, também, avaliar as várias etapas de maturação celular, ao identificar os padrões de diferenciação das diversas linhagens (DEL VECCHIO *et al*, 2004). A seleção dos Ac que serão utilizados em cada análise (painel de Ac) dependerá das características da população que se pretende avaliar.

A análise morfológica e citoquímica da MO era o único método utilizado para o diagnóstico das leucemias e seus subtipos até há pouco mais de duas décadas. No entanto, algumas linhagens celulares podem apresentar características morfológicas semelhantes, como é o caso da LLA e das leucemias mieloides agudas (LMA) de subtipo M0 ou M7 (VARMA *et al*, 2011). Como o tratamento e o prognóstico dos

pacientes está relacionado com o subtipo celular da leucemia, sua correta identificação é indispensável. Há mais de 25 anos, a IMF tem complementado o diagnóstico morfológico das leucemias agudas e permitido uma melhor distinção entre as linhagens celulares (BOOMER *et al*, 2011). Sua eficácia é baseada na observação de que as células leucêmicas apresentam moléculas (antígenos) de superfície e intracitoplasmáticas, frequentemente com fenótipos aberrantes quando comparadas com as células hematológicas normais. As aplicações atuais da IMF no diagnóstico das neoplasias hematológicas compreendem (VARMA *et al*, 2011):

- Distinção das leucemias minimamente diferenciadas e com mieloperoxidase negativa entre LMA-M0, LMA-M7 ou LLA;
- Diagnóstico das leucemias de linhagem ambígua;
- Subcaracterização das leucemias e linfomas em origem de células B ou T;
- Monitorização da doença residual mínima (DRM);
- Identificação de alvos potenciais para terapia.

Mais recentemente, a IMF tem sido utilizada com sucesso na identificação de células neoplásicas no LCR, complementando a CT no diagnóstico da infiltração do SNC (ALVAREZ *et al*, 2012; BROOMBERG *et al*, 2007; CRAIG *et al*, 2011; Di NOTO *et al*, 2008; FINN *et al*, 1998; FRENCH *et al*, 2000; HEGDE *et al*, 2005; LIANG *et al*, 2013; MARTINEZ-LAPERCHE *et al*, 2013; NÜCKEL *et al*, 2006; QUIJANO *et al*, 2009; RANTA *et al*, 2015; ROMA *et al*, 2002; SCHINSTINE *et al*, 2006).

Os primeiros relatos do uso da IMF para identificação de neoplasias hematológicas no LCR surgiram na década de 1990. Moriarty e colaboradores (1993) avaliaram 31 LCR, no período entre 1988 e 1991, pelo uso da IMF. Foram encontradas cinco amostras com proliferação monoclonal. No entanto, a IMF não permitiu a identificação do diagnóstico em 11 casos, e 15 amostras foram inadequadas para avaliação. Os autores concluíram, na ocasião, que a IMF era de uso limitado no LCR devido à sua hipocelularidade. Com o desenvolvimento de citômetros de fluxo mais modernos e o aperfeiçoamento da técnica, a CF no LCR começou a apresentar melhores resultados. As principais neoplasias estudadas foram os linfomas não Hodgkin de alto risco para acometimento do SNC e as leucemias agudas. Os principais resultados destes

estudos estão resumidos na Tabela 1. A maioria dos estudos identificou uma melhora significativa na sensibilidade para identificação de células neoplásicas no LCR. A concordância entre CT e CF nos diversos estudos variou entre 37,5% e 94,0% (CRESPO-SOLIS *et al*, 2012). Os painéis de Ac utilizados, de forma geral, eram baseados no imunofenótipo das células neoplásicas encontradas ao diagnóstico da doença de base. Outra preocupação na seleção do painel de Ac foi a de identificar populações de linfócitos T normais, habitualmente presentes no LCR.

O processamento do LCR era realizado o mais rápido possível para permitir maior viabilidade das células, de preferência nas três primeiras horas após a coleta. Alguns trabalhos relataram uso de conservante para processamento posterior da amostra (BROMBERG *et al*, 2007; QUIJANO *et al*, 2009).

O volume de LCR utilizado variou consideravelmente (0,1 ml a 10 ml) (CRAIG *et al*, 2011). A capacidade de detecção de clones neoplásicos atingiu níveis tão baixos quanto 0,2% das células (HEDGE *et al*, 2005). Alguns estudos excluíram amostras contaminadas com hemácias por acidente de punção (SUBIRÁ *et al*, 2001), outros as incluíram; nestes casos, as amostras eram processadas com solução de lise (FINN *et al*, 1998; HEDGE *et al*, 2005; SCHISTINE *et al*, 2006).

Observou-se associação entre o número de células presentes no LCR e a positividade dos exames de CT e IMF, sendo que, nos casos em que ambas foram positivas, foi constatado maior número de células. Outra observação realizada foi a respeito da sintomatologia: nos casos em que a CT e a IMF foram positivas, houve maior número de pacientes sintomáticos, quando comparados com os pacientes que só apresentaram a IMF positiva (QUIJANO *et al*, 2009).

Algumas recomendações foram formuladas para o sucesso da IMF do LCR (CRESPO-SOLIS *et al*, 2012):

- Amostras não-traumáticas, com volume acima de 2 ml;
- Aquisição dentro de três horas após a coleta;
- Uso de, no mínimo, três cores;
- Uso de painel de Ac capazes de identificar linfócitos T normais do LCR;
- Confecção de painel de Ac baseado na IMF da MO ao diagnóstico;
- Ajuste e calibração adequada do citômetro.

Craig e colaboradores (2011) avaliaram 230 LCR de pacientes com suspeita de neoplasia no SNC. Dentre os casos avaliados, 74 apresentaram confirmação do diagnóstico de neoplasia, sendo 28 casos de LLA. Foram observadas 197 amostras negativas pela IMF, 11 positivas e 19, indeterminadas. Duas amostras foram inadequadas para análise. Os autores apontaram algumas causas para as amostras inadequadas e indeterminadas: poucos eventos adquiridos, presença de artefatos (por exemplo: contaminação por ar), marcação inadequada e fluorescência inespecífica (CRAIG *et al*, 2011).

Outra utilidade da IMF no LCR seria a de auxiliar no diagnóstico diferencial dos casos inconclusivos pela CT. Estudo realizado por Schistine e colaboradores (2006), em 32 pacientes com leucemia e linfoma que apresentaram LCR atípico ou suspeito pela CT, mostrou maior número de casos positivos para presença de blastos no LCR pela IMF (em seguimento de um ano: 19 pacientes apresentaram IMF positiva; nove tiveram CT positiva, e dois apresentaram os dois exames positivos).

Apesar de haver consenso entre os estudos sobre a melhora significativa na sensibilidade da identificação de células neoplásicas no LCR pela técnica de IMF, ainda restam dúvidas sobre o impacto deste diagnóstico no prognóstico dos pacientes. Hedge e colaboradores (2005) observaram nove recidivas em 51 pacientes com diagnóstico de linfoma com alto risco para envolvimento do SNC. Na avaliação do LCR ao diagnóstico inicial, dentre os pacientes recidivados, quatro apresentaram IMF positiva, e apenas um apresentou CT positiva.

Outro estudo, realizado por Alvarez e colaboradores (2012), não observou diferença na SLE e SGLO nos pacientes com IMF positiva no LCR. Os pacientes avaliados apresentavam diagnóstico de linfoma. O tempo de seguimento foi de 14 meses, e foram apenas quatro recidivas dentre os 101 pacientes avaliados.

A maioria dos estudos descritos incluiu pacientes adultos e com outros diagnósticos além da LLA (linfoma, na sua maioria). Apenas três estudos foram identificados com abordagem específica da LLA, em população pediátrica. Liang e colaboradores (2013) avaliaram 313 crianças com diagnóstico de LLA. Foi realizada avaliação citológica e IMF do LCR ao diagnóstico, no dia 33 de tratamento e, posteriormente, de oito em oito semanas. Apresentaram CT e IMF positivas, simultaneamente, 43 pacientes; 79 apresentaram apenas a IMF positiva. O grupo de pacientes com apenas a IMF positiva foi subdividido, e 34 receberam doses habituais de quimioterapia intratecal (MADIT), enquanto os 45 restantes receberam doses

adicionais. Nenhum paciente foi submetido a RT. Observou-se melhor SGLO e menor risco de recidiva em SNC no grupo de pacientes que recebeu doses extras de MADIT.

No período entre 2007 e 2009, 136 pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA foram avaliados por Martinez-Laperche e colaboradores (2013) pela IMF do LCR em diversos momentos do tratamento. Foram avaliadas 990 amostras de LCR, correspondentes a 108 pacientes. Ao diagnóstico foram observados 30 LCR com IMF positiva e apenas três, com CT positiva. Durante o tratamento nenhum paciente apresentou LCR com CT positiva, e 63 apresentaram IMF positiva. A IMF positiva foi associada à presença de outros fatores de risco, como imunofenótipo T. Dentre os pacientes com IMF positiva no LCR ao diagnóstico, não foi observado maior risco de recidiva ou óbito. Já os pacientes que apresentaram IMF positiva durante o tratamento, especialmente na fase de manutenção, apresentaram pior SLE e tendência a pior SGLO (MARTINEZ-LAPERCHE *et al*, 2013).

Outro estudo avaliou o LCR de 214 pacientes, com idade inferior a 18 anos, ao diagnóstico inicial de LLA. Observou-se 17,3% de amostras positivas para a presença de blastos pela IMF (9,8% foram positivas pela CT). Para o grupo de pacientes com contagem de leucócitos no LCR inferior a $5/\mu\text{L}$ e presença de blastos identificados pela CT e/ou IMF foi observada pior SLE e tendência a pior SGLO. Os autores relataram, também, maior incidência acumulada de recidiva nos pacientes que apresentaram apenas a IMF positiva do LCR ao diagnóstico (RANTA *et al*, 2015).

Os bons resultados observados nos estudos sobre IMF no LCR permitiram a elaboração de recomendação pelo NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) do uso rotineiro desse exame no diagnóstico do acometimento do SNC nos linfomas (BREM *et al*, 2008). Quanto ao uso da IMF no LCR nas leucemias agudas, persistem questionamentos sobre seu real significado, e não existem indicações precisas para sua realização e acerca da interpretação de seus resultados.

Tabela 1: Comparação entre resultados de estudos de imunofenotipagem do líquido cefalorraquidiano

| Estudo | Período | Doenças avaliadas | Número de pacientes/amostras | Amostras inadequadas | Idade (anos) | Amostras positivas | CT+/CF- | CT-/CF+ | CT+/CF+ |
|---------------------------------------|------------|---|------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|---------|---------|
| FINN <i>et al</i> , 1998 | 1994-97 | Linfoma (confirmado ou suspeita) | 31/36 | 9 (para CF) | NI | 10 | 1 | 3 | 6 |
| FRENCH <i>et al</i> , 2000 | 1999 | Neoplasias no SNC (confirmado ou suspeita) | 32/35 | 10 (para CF) 5 (para CT) | NI | 9 | 2 | 3 | 4 |
| SUBIRÁ <i>et al</i> , 2001 | NI | Leucemias agudas | 31/168 | 0 | Crianças e adultos | 11 | 3 | 6 | 2 |
| ROMA <i>et al</i> , 2002 | NI | Neoplasias hematológicas (confirmado ou suspeita) | 43/53 | 2 (para CF) | 6 a 76 | 21 | 0 | 9 | 12 |
| HEDGE <i>et al</i> , 2005 | 1999-2004 | Linfomas | 60/60 | 0 | 9 a 81 | 14 | 0 | 12 | 2 |
| NÜCKEL <i>et al</i> , 2006 | 2000-2004 | Neoplasias hematológicas (confirmado ou suspeita) | 50/45 | 5 | NI | 18 | 3 | 3 | 12 |
| Di NOTO <i>et al</i> , 2008 | 2000-2007 | Linfomas | 42/42 | 0 | NI | 11 | 0 | 7 | 4 |
| QUILJANO <i>et al</i> , 2009 | Desde 2006 | Linfomas | 123/123 | 0 | 13 a 92 | 28 | 1 | 21 | 6 |
| CRAIG <i>et al</i> , 2011 | 2008 | Neoplasias no SNC (confirmado ou suspeita) | 145/230 | 2 (para CF) | | 12 | 1 (neoplasia não hematológica) | 9 | 2 |
| ALVAREZ <i>et al</i> , 2012 | 2005-2009 | Linfomas | 111/114 | 0 | 18 a 84 | 14 | 0 | 13 | 1 |
| LIANG <i>et al</i> , 2013 | 2001-2007 | LLA | 313/NI | NI | 2 a 14 | 122 | NI | 79 | 43 |
| MARTINEZ-LAPERCHE <i>et al</i> , 2013 | 2007-2009 | LLA | 108/990 | NI | 0 a 15 | 93 | 0 | 90 | 3 |
| RANTA <i>et al</i> , 2015 | 2000-2012 | LLA | 214/214 | NI | < 18 | 38 | 1 | 17 | 20 |

NI: não informado; CF: citometria de fluxo; CT: citologia

2.2.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A citogenética e a biologia molecular nas neoplasias hematológicas, especialmente na LLA, são essenciais, ao diagnóstico da doença (Tabela 2). A evolução destas técnicas tem permitido um melhor conhecimento das bases genéticas da LLA na infância (HARRISON *et al*, 2008; INABA *et al*, 2013; PUI *et al*, 2012). Parte dos pacientes apresenta alterações cromossômicas nas células leucêmicas, que serão importantes na patogênese e manejo clínico da doença. As principais alterações observadas são hiperdiploidia com ganho não aleatório de pelo menos 5 cromossomos (incluindo X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 e 21), hipodiploidia (< 44 cromossomos) e translocações cromossômicas, tais como a t(12;21) presente em 20 a 25% dos casos, a t(1;19) em 3 a 6% dos casos e outras menos frequentes como a t(9;22) e rearranjos MLL envolvendo 11q23 e outros genes (HARRISON *et al*, 2008; INABA *et al*, 2013; PUI *et al*, 2012). No protocolo brasileiro em vigência, as translocações t(9;22) ou fusão BCR/ABL e t(4;11) ou fusão MLL/AF4 fazem parte da estratificação de grupos de risco para escolha de tratamento mais intensivo (GBTLI LLA 2009).

Tabela 2: Principais indicações da biologia molecular na investigação das neoplasias hematológicas

| | |
|------------------|--|
| Diagnóstico | Complementar a análise das células neoplásicas, aumentando a sensibilidade do diagnóstico, especialmente em casos inconclusivos. |
| Subclassificação | Participar da classificação de algumas neoplasias, conforme definições da Organização Mundial de Saúde (OMS). |
| Prognóstico | Identificar fatores de risco associados a resultados favoráveis ou não. Monitorar e quantificar a doença residual mínima (DRM). |

Adaptado de VISWANATHA *et al*, 2007

Uma das técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico da LLA e monitorização da DRM durante o tratamento é a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é um método rápido e sensível para amplificação de fragmentos de DNA que podem ser marcadores das leucemias (KNOERS, 2006).

Com o estudo e aprimoramento da técnica, novas formas de realização da PCR foram surgindo. A PCR *nested*, por exemplo, emprega dois pares de *primers*, para

umentar a sensibilidade e especificidade do teste. A principal desvantagem desta metodologia é o risco de contaminação na fase de transferência das amostras entre as duas rodadas da PCR (NOLTE *et al*, 2007). Nas duas últimas décadas, tem sido empregada com frequência a PCR quantitativa em tempo real (RQ-PCR), que permite resultado mais acurado e quantitativo, a partir da utilização de sondas fluorescentes. A intensidade da fluorescência será proporcional à quantidade de produto da PCR que foi formado (KNOERS, 2006; NOLTE *et al*, 2007).

Na LLA, a PCR pode ser usada para detectar os genes de fusão gerados pelas translocações cromossômicas tanto ao diagnóstico como no monitoramento da DRM. Essa aplicação, contudo, está restrita aos pacientes portadores destas alterações, que na LLA pediátrica correspondem a aproximadamente 30% dos casos (para os genes de fusão mais frequentemente encontrados) (INABA *et al*, 2013; PUI *et al*, 2012). A PCR, contudo, pode ser utilizada para detectar marcadores leucêmicos presentes em mais de 95% dos casos. Esta aplicação baseia-se na presença de rearranjos clonais específicos das células leucêmicas.

No processo de maturação dos linfócitos B e T ocorrem rearranjos nos genes de imunoglobulina (Ig) e de receptores de células T (TCR), que são exclusivos para cada célula. Os rearranjos são formados pela junção de segmentos V (variável), D (diversidade) e J (junção), a partir de inserções e deleções randômicas de nucleotídeos (Figura 1) (GALOIN *et al*, 1997; RHODES *et al*, 1996; STORCH-HAGENLOCHER *et al*, 2000). Como em grande parte as células leucêmicas derivam de uma transformação oncogênica de um único precursor linfóide, elas possuem os mesmos rearranjos de genes Ig e TCR (rearranjos clonais). Os rearranjos clonais da Ig ocorrem em quase 100% das LLA B e, do TCR, ocorrem em mais de 90% das LLA T e em 50 a 80% das LLA B (SZCZEPAŃSKI *et al*, 1999; SZCZEPAŃSKI *et al*, 2000). Estes rearranjos são os segmentos alvos de DNA para a realização da PCR e, conseqüentemente, identificação de clones neoplásicos ao diagnóstico e para pesquisa de DRM na MO.

A identificação dos rearranjos presentes na MO, pela PCR, é realizada por meio de oligonucleotídeos (*primers*) consenso previamente descritos para os segmentos V, D e J dos genes Ig e TCR. A avaliação da clonalidade para distinção entre as células normais e as células neoplásicas é realizada pela análise de homo/heterodúplex (LANGERAK *et al*., 1997; VAN DER VELDEN *et al*., 2007). As amostras de PCR com resultado clonal podem ser sequenciadas para confecção de *primers* específicos de cada paciente, complementares à região de junção VDJ. Estes *primers* específicos

podem então ser utilizados para a reação de RQ-PCR (VAN DER VELDEN *et al.*, 2007).

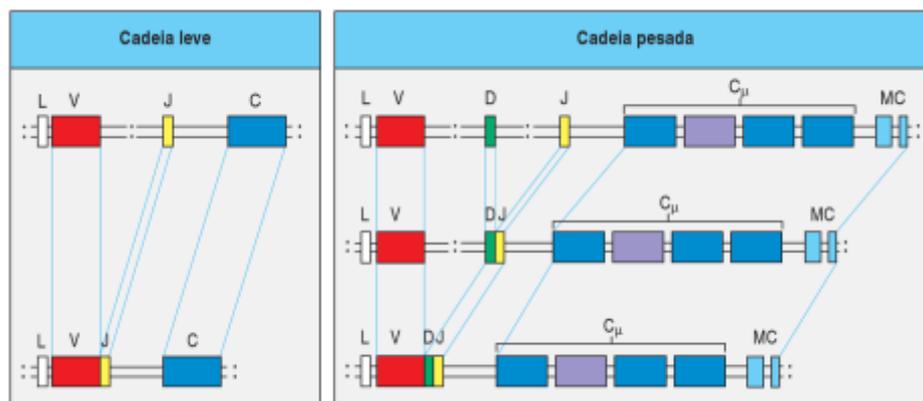


Figura 1: Processo de formação dos rearranjos gênicos nas regiões variáveis que contêm os sítios de reconhecimento antigênico de uma imunoglobulina.

Os genes das regiões variáveis da cadeia leve são formados pela junção e recombinação dos segmentos gênicos V e J, e da cadeia pesada dos segmentos gênicos V, D e J.

L - Peptídeo líder; C - Domínio constante; C_L - Domínio constante da cadeia leve; C_H - Domínio constante da cadeia pesada.

Retirado de Janeway *et al.*, 2007.

A avaliação do LCR em neoplasias hematológicas pelas técnicas de PCR não é preconizada de rotina, mas já foi estudada por alguns autores (BIOJONE *et al.*, 2012; GALOIN *et al.*, 1997; HAAS *et al.*, 2002; PINE *et al.*, 2005; RHODES *et al.*, 1996; SAYED *et al.*, 2009; SCRIDELI *et al.*, 2003; STORCH-HAGENLOCHER *et al.*, 2000). Entretanto, a metodologia e o tipo de neoplasia avaliados foram diversificados. As primeiras neoplasias estudadas foram os linfomas não Hodgkin de células B, nos quais foram pesquisados os rearranjos nos genes da Ig (GALOIN *et al.*, 1997; RHODES *et al.*, 1996; STORCH-HAGENLOCHER *et al.*, 2000). Observou-se maior sensibilidade na detecção de células neoplásicas no LCR com a PCR *semi-nested* e sequenciamento (GALOIN *et al.*, 1997) e, com a PCR convencional (RHODES *et al.*, 1996), para pacientes com neoplasias hematológicas de células B quando comparados a detecção por CT, especialmente nos casos em que a análise citológica do LCR foi inconclusiva.

Em pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA, a infiltração do LCR foi avaliada tanto por PCR convencional (*nested* ou não), quanto por RQ-PCR (BIOJONE *et al.*, 2012; HAAS *et al.*, 2002; PINE *et al.*, 2005; SAYED *et al.*, 2009; SCRIDELI *et al.*, 2003). A PCR *nested* para rearranjos dos genes de Ig e TCR foi utilizada por Haas e

colaboradores (2002), para avaliar o LCR de crianças com LLA em diversos momentos (recidiva em SNC, recidiva em outros locais e remissão). Observaram-se amostras positivas pela PCR apenas no grupo de pacientes com recidiva em SNC. Nestes pacientes, a positividade do LCR pela PCR precedeu a recidiva em SNC (constatada pela CT) em 5 de 6 casos. Utilizando técnica semelhante, Scrideli e colaboradores (2003) avaliaram 11 pacientes com LLA e suspeita de acometimento do SNC (4 ao diagnóstico inicial e 7 com suspeita de recidiva), por meio de exame citológico e PCR do LCR. Os autores encontraram 5 amostras positivas pela CT e 6 pela PCR, uma das amostras positivas pela CT foi negativa pela PCR.

Scrideli e colaboradores realizaram ainda outro estudo, no qual avaliaram 65 pacientes com LLA. As amostras de LCR foram analisadas ao diagnóstico e no 28º dia de tratamento, utilizando-se a CT e a PCR convencional. Observou-se um aumento na detecção de células leucêmicas no LCR pela PCR quando comparada com a CT tanto ao diagnóstico (32/65 positivas pela PCR *versus* 3/65 pela CT) quanto no 28º dia de tratamento (14/40 positivas pela PCR *versus* 0/65 pela CT). Outro dado relevante observado foi um pior prognóstico dos pacientes com PCR do LCR positiva ao diagnóstico, no protocolo GBTLI LLA 93, fato este, não observado nos pacientes que foram tratados por um protocolo mais intensivo (GBTLI LLA 99) (BIOJONE *et al*, 2012).

A PCR-RQ foi avaliada no LCR, por meio de *primers* específicos para a região juncional dos rearranjos Ig e TCR em pacientes pediátricos com LLA por PINE *et al*, (2005). Os autores observaram, ao diagnóstico da LLA, seis amostras positivas pela PCR. Destas, pela CT: 3 foram classificadas com SNC1; 1 como SNC 2; 1 como SNC3 e 1 como PLT *negativa*. Ao final da indução (30º dia) todas as amostras foram consideradas negativas pela CT e pela PCR. Outro objetivo do estudo foi avaliar a melhor forma de conservação do LCR para análise pela PCR: a conservação em RPMI na concentração de 1:1 foi a melhor e, permitiu bons resultados até 7 dias após a coleta (PINE *et al*, 2005).

Os diferentes métodos de avaliação da presença de células leucêmicas no LCR (CT, IMF e PCR) apresentam vantagens e desvantagens (Tabela 3). A maioria dos estudos sugere que a PCR e a IMF sejam complementares à avaliação citológica do LCR, para definição da infiltração no SNC pela LLA, nos casos inconclusivos pela CT (CRESPO-SOLIS *et al*, 2012; GALATI *et al*, 2013; SAYED *et al*, 2009).

Tabela 3: Vantagens e desvantagens dos métodos de avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano

| Método | Vantagens | Desvantagens |
|--------------------------------------|---|--|
| Citologia (CT) | Fácil realização Baixo custo Resultado rápido | Baixa sensibilidade (50 a 73%) (CRESPO-SOLIS <i>et al</i> , 2012). Necessidade de células íntegras Depende de maior número de células na amostra |
| Imunofenotipagem (IMF) | Resultado rápido Boa sensibilidade analítica* (10^{-4}) | Custo elevado Necessidade de células íntegras Depende de maior número de células na amostra |
| Reação em cadeia da polimerase (PCR) | Boa sensibilidade analítica* (10^{-4} a 10^{-5}) Não necessita de células íntegras | Resultado mais demorado (quando comparada com a CT e a IMF) Custo elevado (PCR-RQ) Possibilidade de contaminação – falso positivo |

*sensibilidade analítica: definida como o número mínimo de células neoplásicas que podem ser identificadas, dentre as células normais, expresso em percentagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahluwalia MS, Wallace PK, Peereboom DM. Flow Cytometry as a Diagnostic Tool in Lymphomatous or Leukemic Meningitis. Ready for Prime Time? *Cancer*; DOI: 10.1002/cncr.26335

Alvarez R, Dupuis J, Plonquet A, Christov C, Copie-Bergman C, Hemery F, et al. Clinical relevance of flow cytometric immunophenotyping of the cerebrospinal fluid in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol* 2012;23(5):1274–9.

Aur RJA, Simone J, Hustu HO, Walters T, Borella L, Pratt C, et al. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. *Blood* 1971; 37(3): 272-281.

Bacal NS, Faulhaber MHW. Aplicação prática em citometria de fluxo. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2003.

Biojone E, Queiróz RP, Valera ET, Odashima NS, Takayanagui OM, Viana MB, et al. Minimal residual disease in cerebrospinal fluid at diagnosis: a more intensive treatment protocol was able to eliminate the adverse prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2012 Jan; 53(1):89-95

Borowitz M, Bigner SH, Johnston WW. Diagnostic problem in the cytologic evaluation of cerebrospinal fluid for lymphoma and leukemia. *Acta Cytol.* 1981;25: 665–74.

Brem SS, Black P, Brem H, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Central nervous system cancers. V.1.2008 ed: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/cns.pdf

Bromberg JEC, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der Holt B, Sillevius Smitt P, et al. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology* 2007; 68: 1674-1679.

Bürger B, Zimmermann M, Mann G, Kühl J, Löning L, Riehm H, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21:184-188.

Cancela CSP, Murao M, Souza MEL, Barcelos JM, Furtado VM, Silva ML, et al. Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia: diagnosis by immunophenotyping. *J Bras Patol Med Lab*, v.49, n.4, p.260-263, 2013.

Chamberlain MC, Glantz M, Groves MD, Wilson WH. Diagnostic tools for neoplastic meningitis: detecting disease, identifying patient risk, and determining benefit of treatment. *Sem Oncol* 2009;36(Suppl): S35-S45.

Chessells JM. Central nervous system directed therapy in acute lymphoblastic leukaemia. *Baillière's Clinical Haematology* 1994; 7(2): 349-363.

Craig FE, Ohori NP, Gorrill TS, Swerdlow SH. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Am J Clin Pathol* 2011;135(1):22–34.

Crespo-Solis E, López-Karpovitch X, Higuera J, Vega-Ramos B. Diagnosis of Acute Leukemia in Cerebrospinal Fluid (CSF-Acute Leukemia). *Curr Oncol Rep* (2012) 14:369–378.

Del Vecchio L, Brando B, Lanza F, Ortolani C, Pizzolo G, Semezato G et al. Recommended report format for flow cytometry diagnosis of acute leukemia. *Haematologica* 2004; 89: 594-98.

Di Noto R, Scalia G, Abate G, Gorrese M, Pascariello C, Raia M, et al. Critical role of multidimensional flow cytometry in detecting occult leptomeningeal disease in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas. *Leukemia Research* 32 (2008) 1196–1199.

Evans AE, Gilbert ES, Zandstra R. The increasing incidence of central nervous system leukemia in children (Children's Cancer Study Group A). *Cancer* 1970; 26(2): 404-409.

Finn WG, Peterson LC, James C, Goolsby CL. Enhanced detection of malignant lymphoma in cerebrospinal fluid by multiparameter flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology* 1998; 110: 341-346.

French CA, Dorfman DM, Shaheen G, Cibas ES. Diagnosing Lymphoproliferative Disorders Involving the Cerebrospinal Fluid: Increased Sensitivity Using Flow Cytometric Analysis. *Diagnostic Cytopathology* 2000; 23 (6): 369-374.

Gajjar A, Harrison PL, Sandlund JT, et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in 146 American Society of Hematology childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 3381-3384.

Galati D, Di Noto R, Del Vecchio L. Diagnostic strategies to investigate cerebrospinal fluid involvement in haematological malignancies. *Leuk Res* 2013;37:231-237.

Galoin S, Daste G, Apoil PA, Chollet F, Roda D, Blancher A, et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid of leptomeningeal involvement by B-cell lymphoma and leukaemia: a novel strategy and its implications. *British Journal of Haematology* 1997; 99: 122-130.

Gassas A, Krueger J, Alvi S, Sung L, Hitzler J, Lieberman L. Diagnosis of central nervous system relapse of pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of routine cytological CSF analysis at time of intrathecal chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61: 2215-2217

Gilchrist GS, Tubergen DG, Sather HN, Coccia PF, O'Brien RT, Waskerwitz MJ, et al. Low numbers of CSF blasts at diagnosis do not predict for the development of CNS leukemia in children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group report. *Journal of Clinical Oncology* 1994; 12: 2594-2600.

Glass JP, Melamed M, Chernik NL, Posner JB. Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. *Neurology* 1979;29:1369–75.

Glantz MJ, Cole BF, Glantz LK, Cobb J, Mills P, Lekos A, et al. Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer* 1998;82:733–9.

Gomes HR. Cerebrospinal fluid approach on neuro-oncology. Estudo do líquido cefalorraquiano em neuro-oncologia. *Arq Neuropsiquiatr* 2013;71(9-B):677-680.

Haas V, Vet RJWM., Verhagen OJHM, Kroes W, van den Berg H, van der Schoot VE. Early detection of central nervous system relapse by polymerase chain reaction in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 2002; 81:59–61.

Hardisty RM, Norman PM. Meningeal leukaemia. *Arch Dis Child* 1967; 42: 441-447.

Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2008; 144: 147–156.

Hegde U, Filie A, Little RF, Janik JE, Grant N, Steinberg SM, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood* 2005; 105(2): 496-502.

Huppmann AR, Rheingold SR, Bailey C, Helfrich M, Choi JK. Detection of Leukemic Lymphoblasts in CSF Is Instrument-Dependent. *Am J Clin Pathol* 2012;137:795-799.

Hustu HO, Aur RJA, Verzosa MS, Simone JV, Pinkel D. Prevention of central nervous system leukemia by irradiation. *Cancer* 1973; 32(3): 585-597.

Hutchison JH, Hardisty RM, Bagshawe KD, Bridges JM, Butler N, Deasy PF, et al. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukaemia: Effect of "Prophylactic" Therapy against Central Nervous System Leukaemia. *British Medical Journal*, 1973, 2, 381-384.

Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2013; 381(9881): 1943-55.

Jastaniah W, Elimam N, Abdalla K, Khattab TM, Felimban S, Abrar MB. Does the early intensification of intrathecal therapy improve outcomes in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients with CNS2/TLP+ status at diagnosis? *Hematology* 2015; DOI: <http://dx.doi.org/10.1179/1607845415Y.0000000020>.

Jorgensen M, Shankar A, Aabideen Z, Cheng D, Goulden N, Vora A, et al. The role of routine surveillance for silent central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2012, 159, 368–379.

Knight JA, Kjeldsberg CR. Cerebrospinal, synovial and serous body fluids. In: Mc Pherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 21a ed. EUA: Saunders-Elsevier; 2007. p 426-454.

Knoers NVAM, Monnens LAH. Teaching molecular genetics: chapter 1 - background principles and methods of molecular biology. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 169-176.

Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia*. 1997;11(12):2192-9.

Laningham FH, Kun LE, Reddick WE, Ogg RJ, Morris EB, Pui CH. Childhood central nervous system leukemia: historical perspectives, current therapy, and acute neurological sequelae. *Neuroradiology* 2007; 49(11): 873–888.

Levinsen M, Taskinen M, Abrahamsson J, Forestier E, Frandsen TL, Harila-Saari A, et al. Clinical features and early treatment response of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61: 1416-1421.

Liang Y, Ca Q, Zhai ZM, Wang NL. A Practical Strategy of Monitoring Minimal Residue Disease and Intervention for Central Nervous System Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Single Chinese Center's Experience. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35 (5):388-393.

Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML, Krance RA, Kun LE, Behm FG, et al. Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine* 1993; 329(5): 314-319.

Manera R, Ramirez I, Mullins J, Pinkel D. Pilot studies of species-specific chemotherapy of childhood acute lymphoblastic leukemia using genotype and immunophenotype. *Leukemia* 2000; 14: 1354–1361.

Martinez-Laperche C, Gomez-Garcia AM, Lassaletta A, Moscardo C, Vivanco JL, Molina J, et al. Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am. J. Hematol.* 88(5):359–364, 2013.

Mastrangelo R, Poplack D, Bleyer A, Riccadi R, Sather H, D'Angio G. Report and recommendations of the Rome workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in children: biologic basis for staging, stratification, and treatment. *Medical and Pediatric Oncology* 1986; 14: 191-194.

Moriarty AT, Wiersema L, Snyder W, Kotylo PK, McCloskey DW. Immunophenotyping of cytologic specimens by flow cytometry. *Diagn Cytopathol* 1993;9:252-8.

Nesbit Jr ME, Robison LL, Littman PS, Sather HN, Ortega J, D'Angio GJ, et al. Presymptomatic central nervous system therapy in previously untreated childhood acute lymphoblastic leukaemia: comparison of 1800 rad and 2400 rad. A report for Children's Cancer Study Group. *The Lancet* 1981; 28: 461-465.

Nolte FS, Hill CE. Polymerase chain reaction and other nucleic acid amplification technology. In: Mc Pherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 21a ed. EUA: Saunders-Elsevier; 2007. p 1239-1249.

Nüchel H, Novotny JR, Noppeney R, Savidou I, Dührsen U. Detection of malignant haematopoietic cells in the cerebrospinal fluid by conventional cytology and flow cytometry. *Clin Lab Haem* 2006; 28: 22-29.

Ochs J, Mulhern R. Long-term sequelae of therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Baillière's Clinical Haematology* 1994; 7(2): 365-376.

Odom LF, Wilson H, Cullen J, Bank J, Blake M, Jamieson B. Significance of Blasts in Low-Cell-Count Cerebrospinal Fluid Specimens From Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer* 66:1748-1754,1990.

Perske C, Nagel I, Nagel H, Strik H. CSF cytology—the ongoing dilemma to distinguish neoplastic and inflammatory lymphocytes. *Diagn Cytopathol* 2011;39:621-6.

Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin N Am* 2008; 55:1-20.

Pine SR, Yin C, Matloub YH, Sabaawy HE, Sandoval C, Levendoglu-Tugal O, et al. Detection of central nervous system leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Diagnostics* 2005; 7(1): 127-132.

Pinkel D, Woo S. Prevention and treatment of meningeal leukemia in children. *Blood* 1994; 84(2): 355-366.

Price R, Johnson WW. The central nervous system in childhood leukemia: I. The arachnoid. *Cancer* 1973; 31(3): 520-533.

Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIB at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* 2004; 104(9): 2690-2696.

Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol* 2008; 9: 257-68.

Pui CH, Thiel E. Central Nervous System Disease in Hematological Malignancies: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol* 2009; 36 (Suppl 2): S2-S16.

Pui, CH, Campana, D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Prophylactic Cranial Irradiation. *N Engl J Med*. 2009; 360(26): 2730-2741.

Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012; 120: 1165-1174.

Quijano S, Lopez A, Sancho JM, Panizo C, Deben G, Castilla C, et al. Identification of Leptomeningeal Disease in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Improved Sensitivity of Flow Cytometry. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27 (9): 1462-1469.

Ranta S, Nilsson F, Harila-Saari A, Saft L, Tani E, Söderhäll S, et al. Detection of Central Nervous System Involvement in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Cytomorphology and Flow Cytometry of the Cerebrospinal Fluid. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62:951–956.

Richards S, Pui CH, Gaynon P. Systematic Review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60: 185-195.

Rimm IJ, Li FC, Tarbell NJ, Winston KR, Sallan SE. Brain tumors after cranial irradiation for childhood acute lymphoblastic leukemia a 13-year experience from the Dana-Farber Cancer Institute and The Children's Hospital. *Cancer* 1987; 59:1506-1508.

Rhodes CH, Glantz MJ, Glantz L, Lekos A, Sorenson GD, Honsinger C, et al. A comparison of polymerase chain reaction examination of cerebrospinal fluid and conventional cytology in the diagnosis of lymphomatous meningitis. *Cancer* 1996; 77 (3): 543-548.

Roma AA, García A, Avagnina A, Rescia C, Elsner B. Lymphoid and myeloid neoplasms involving cerebrospinal fluid: comparison of morphologic examination and immunophenotyping by flow cytometry. *Diagn Cytopathol.* 2002;27:271–5.

Sayed D, Badrawy H, Ali AM, Shaker S. Immunophenotyping and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement analysis in cerebrospinal fluid of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* 2009; 33:655–661.

Shaikh F, Voicu L, Tole S, To T, Doria AS, Sung L, Alexander S. The risk of traumatic lumbar punctures in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2014; 50(8):1482-1489.

Schrappé M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. *Blood* 2000; 95(11): 3310-3322.

Schinstine M, Filie AC, Wilson W, Stetler-Stevenson M, Abati A. Detection of malignant hematopoietic cells in cerebral spinal fluid previously diagnosed as atypical or suspicious. *Cancer (Cancer Cytopathology)* 2006; 108(3): 157-162.

Scrideli CA, Queiroz RP, Takayanagui OM, Bernardes JE, Tone LG. Polymerase Chain Reaction on cerebrospinal fluid in suspected leptomeningeal involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison to cytomorphological analysis. *Diag Molec Pathol* 2003; 12(3): 124-127.

Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro R. Citometria de fluxo – funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Metódos em biotecnologia – Citometria de fluxo II. Boletim de biotecnologia:* 32-40.

Simone JV. History of the treatment of childhood ALL: A paradigm for cancer cure. *Best Practice & Research Clinical Haematology* Vol. 19, No. 2, pp. 353–359, 2006.

Sirvent N, Suciú S, Rialland X, Millot F, Benoit Y, Plantaz D, et al. Prognostic significance of the initial cerebro-spinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: results of European Organization for

Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children Leukemia Group study 58881. *European Journal of Cancer* 2011; 47: 239-247.

Storch-Hagenlocher B, Haas J, Vogt-Schaden ME, Bentz M, Hoffmann LA, Biessmann A, et al. Molecular analysis of the CDR3 encoding region of the immunoglobulin heavy chain locus in cerebrospinal fluid cells as a diagnostic tool in lymphomatous meningitis. *Ann Neurol* 2000; 47: 211-217.

Subirá D, Castañón S, Román A, Aceituno E, Jiménez-Garófano C, Jiménez A, et al. Flow cytometry and the study of central nervous disease in patients with acute leukemia. *British Journal of Haematology* 2001; 112: 381-384.

Szczepański T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hählen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ, Tibbe GJ, De Bruijn MA, Van Dongen JJ. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999;13(2):196-205.

Szczepański T, Langerak AW, Willemse MJ, Wolvers-Tettero IL, van Wering ER, van Dongen JJ. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2000;14(7):1208-14.

Ünal S, Tuncer AM, Çetin M, Yetgin S. The absence of peripheral blood blasts at diagnosis may predict CNS involvement or CNS relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2008; 50: 537-541.

Van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007; 21: 604-611.

Varma N, Naseem S. Application of Flow Cytometry in Pediatric Hematology-Oncology. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57: 18-29.

Veerman AJ, Kamps WA, van den Berg H, van den Berg E, Bökkerink JPM, Bruin MCA, et al. Dexamethasone-based therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the retrospective Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) protocol ALL-9 (1997-2004). *Lancet Oncol* 2009; 10: 957-66.

Vilmer E, Suciú S, Ferster A, Bertrand Y, Cavé H, Thyss A, et al. Long-term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia: a CLCG-EORTC report. *Leukemia* 2000; 14: 2257-2266.

Viswanatha DS, Larson RS. Molecular diagnosis of hematopoietic neoplasms. In: Mc Pherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 21a ed. EUA: Saunders-Elsevier; 2007. p 1296-1322.

Wood BL, Borowitz MJ. The flow cytometric evaluation of hematopoietic neoplasia. In: Mc Pherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 21a ed. EUA: Saunders-Elsevier; 2007. p 599-616.

Wu JM, Georgy MF, Burroughs FH, Weir EG, Rosenthal DL, Ali SZ. Lymphoma, leukemia, and pleocytosis in cerebrospinal fluid: is accurate cytopathologic diagnosis possible based on morphology alone? *Diagn Cytopathol*. 2009;37:820-4.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as técnicas de IMF por CF e de PCR para detecção de rearranjos clonais dos genes Ig e TCR como métodos complementares de avaliação do LCR ao diagnóstico inicial e da recidiva, para crianças e adolescentes com LLA.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de detecção de células leucêmicas no LCR pelos métodos: CT, IMF e PCR.
- Comparar os resultados da análise do LCR pelos três métodos: CT, IMF e PCR.
- Correlacionar os resultados obtidos na análise do LCR pelos métodos de IMF e PCR com os dados clínicos e laboratoriais utilizados para estratificação de risco de recidiva ao diagnóstico inicial da LLA.
- Avaliar o prognóstico dos pacientes de acordo com a classificação do LCR ao diagnóstico, pelos métodos de IMF e PCR.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. PACIENTES

A população estudada foi uma coorte prospectiva de pacientes com idade até 18 anos, com diagnóstico recente de leucemia linfocítica aguda (LLA), admitidas no HC-UFG, no período de novembro de 2011 a novembro de 2014, submetidas aos protocolos de tratamento do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Infantil – GBTLI LLA.

Também foram incluídos os pacientes, dentro da mesma faixa etária, tratados inicialmente com os referidos protocolos e que apresentaram recidiva da doença no período de 2011 a 2014.

Para a IMF do LCR, foi realizada também uma avaliação retrospectiva, no período de implantação da técnica pelo Serviço de Hematologia. Tal fato ocorreu entre 2008 e 2012 e, os pacientes incluídos apresentaram até 16 anos de idade, no momento do diagnóstico da LLA (resultados desta análise são apresentados no primeiro artigo da tese).

Os critérios de exclusão do estudo foram:

- Tratamento inicial de acordo com outros protocolos terapêuticos;
- Não concordância em participação no estudo (pelo paciente e/ou seus pais ou responsáveis);

4.2. DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

4.2.1. PROTOCOLO DE TRATAMENTO

O esquema quimioterápico utilizado no Serviço de Hematologia Pediátrica do HC-UFG é o protocolo do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Infantil – GBTLI LLA (Anexo 1). Não foram realizadas modificações no esquema terapêutico em função desta pesquisa.

É preconizado nos protocolos GBTLI LLA-99 e 2009 que a primeira punção lombar, com coleta de LCR para pesquisa de células neoplásicas e injeção IT de quimioterápico, seja feita no primeiro dia do tratamento. Tal procedimento é realizado rotineiramente no bloco cirúrgico do HC-UFG, com a criança sob sedação. Durante o procedimento ocorre a coleta de LCR para realização do exame citológico. Logo após a coleta do LCR, é realizada a QT IT.

Nos protocolos GBTLI LLA 99 e 2009, a infiltração do SNC é definida como “SNC-3 pela contagem ≥ 5 células/mm³ no líquor e identificação de linfoblastos *ou* por infiltrados intracerebrais detectados por técnica de imagem *ou* por acometimento de pares craneanos *ou* pela presença de massa dentro da medula espinhal, identificada por técnica de imagem. Se blastos forem identificados no líquido, em preparação com citospin, estando a contagem de células no líquido < 5 células/mm³, o estado líquórico será classificado como SNC-2. No caso de punção lombar traumática, com identificação de blastos, o estado do SNC será classificado PLT *positiva*. Nessa eventualidade, se os linfoblastos não forem identificados, o estado do SNC será classificado como PLT *negativa*. O critério de leucócitos ≥ 5 /mm³ é baseado na recomendação CTEP-NCI.”

Sobre o tratamento direcionado ao SNC, o protocolo GBTLI-LLA 99, preconizava a utilização de quimioterapia IT tripla (MADIT), com metotrexato, citarabina e dexametasona e, a RT, apenas para os pacientes com acometimento do SNC ao diagnóstico. Para o protocolo GBTLI LLA 2009, manteve-se o MADIT e ampliou-se a indicação da RT. Além dos pacientes com acometimento do SNC ao diagnóstico, a RT foi indicada para os pacientes com contagem de leucócitos ao diagnóstico ≥ 100.000 /mm³ e/ou classificados como respondedores lentos (≥ 1000 blastos/mm³ no sangue periférico no 8º dia de tratamento e/ou DRM positiva por IMF no 15º dia de tratamento e/ou DRM positiva por PCR no 35º dia de tratamento).

Nos protocolos GBTLI-LLA 99 e 2009, a recidiva em SNC é definida pelo aparecimento de linfoblastos em LCR, classificado como SNC 3, e/ou ocorrência de sintomas neurológicos provocados pela infiltração leucêmica após obtenção da remissão.

4.2.2. COLETA DOS DADOS CLÍNICOS

Foram coletados os seguintes dados, extraídos dos prontuários médicos e registros laboratoriais: idade ao diagnóstico, sexo, classificação inicial da doença: baixo risco (BR) ou alto risco (AR), imunofenótipo (B-derivada, T-derivada ou bifenotípica), alterações moleculares (fusões: BCR-ABL; E2A-PBX1; MLL-AF4; TEL-AML1), data e local da primeira recidiva (medular, extra-medular isolada ou combinada – MO e sítio extra-medular), data e local (enfermaria ou bloco cirúrgico) da primeira punção lombar, data e causa do óbito, situação da criança no momento da análise dos dados (vivo e em remissão, nova recaída ou óbito). Cada paciente recebeu um número de identificação no estudo.

O protocolo GBTLI LLA 2009 define como pacientes de AR aqueles que apresentarem qualquer uma das situações abaixo:

- Idade ao diagnóstico ≥ 9 anos (os pacientes com idade < 1 ano são tratados com protocolo específico para LLA do lactente);
- Contagem de leucócitos ao diagnóstico $\geq 50.000/\text{mm}^3$;
- ≥ 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico no 8º dia de tratamento;
- DRM na MO por IMF $\geq 10\%$ no 15º dia de tratamento;
- DRM na MO por PCR $\geq 10^{-3}$ no 35º dia de tratamento, para LLA B derivada e, $\geq 10^{-2}$, para LLA T derivada;
- Presença de alterações citogenéticas/moleculares de risco: hipodiploidia (< 46 cromossomos); os pacientes com $t(9;22)(q34;q11.2)/\text{BCR-ABL1}$ e $t(v;11q23)/$ rearranjo MLL são tratados com protocolo específico.

4.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

4.3.1. COLETA E ARMAZENAMENTO DO LCR

Na primeira punção lombar para o diagnóstico de infiltração leucêmica, foram coletados 5 ml de LCR, a partir do que 1 ml foi destinado para o exame citológico de rotina, 1 ml para PCR e o restante (3 ml), para a IMF. Todas as amostras destinadas à CT e IMF foram processadas e analisadas até 12 horas após a coleta, seguindo a rotina já estabelecida no serviço. A amostra destinada à PCR foi congelada a -80°C e posteriormente processada.

4.3.2. CITOLOGIA DO LCR

Conforme preconizado pelos protocolos GBTLI LLA 99 e 2009, para todos os pacientes ao diagnóstico de LLA foi realizado o exame citológico do LCR para pesquisa de blastos. Cerca de 1 ml de LCR foi destinado a essa análise. À admissão no laboratório, a primeira avaliação de cada amostra se referiu aos seus caracteres físicos (i.e., aspecto, cor).

Para realização da citometria, foi colocada pequena quantidade de LCR, homogeneizado suavemente por três a cinco minutos, em câmara de Neubauer. A contagem de hemácias e de células nucleadas foi realizada em microscópio óptico convencional, com aumento de 40x.

Para a CT, as amostras foram pipetadas (aproximadamente 100 μL /lâmina) no funil da citocentrífuga (Incibras, modelo Cito-spin) e colocadas para centrifugação a 2000

rotações por minuto (rpm), por cinco minutos. Para cada amostra foram realizadas duas lâminas. Após este período, as amostras foram retiradas do aparelho e colocadas para secar, ao ar livre. As lâminas secas foram, a seguir, coradas pelas colorações de May-Grunwald – Giemsa (três minutos imersas em May-Grunwald, dois minutos em água e 10 minutos em Giemsa). Após o término deste procedimento, as lâminas foram novamente colocadas para secar. A CT foi realizada em microscópio óptico convencional, em aumento de 100x, por médico patologista experiente.

A classificação utilizada do LCR, de acordo com a avaliação citológica, para diagnóstico de infiltração do SNC na LLA foi:

- SNC 1 – punção lombar não traumática, ausência de blastos;
- SNC 2 – punção lombar não traumática, contagem de leucócitos $< 5/\mu\text{L}$, presença de blastos;
- SNC 3 – punção lombar não traumática, contagem de leucócitos $\geq 5/\mu\text{L}$, presença de blastos (Figura 1);
- PLT *negativa* – punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μL), ausência de blastos;
- PLT *positiva* – punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μL), presença de blastos.

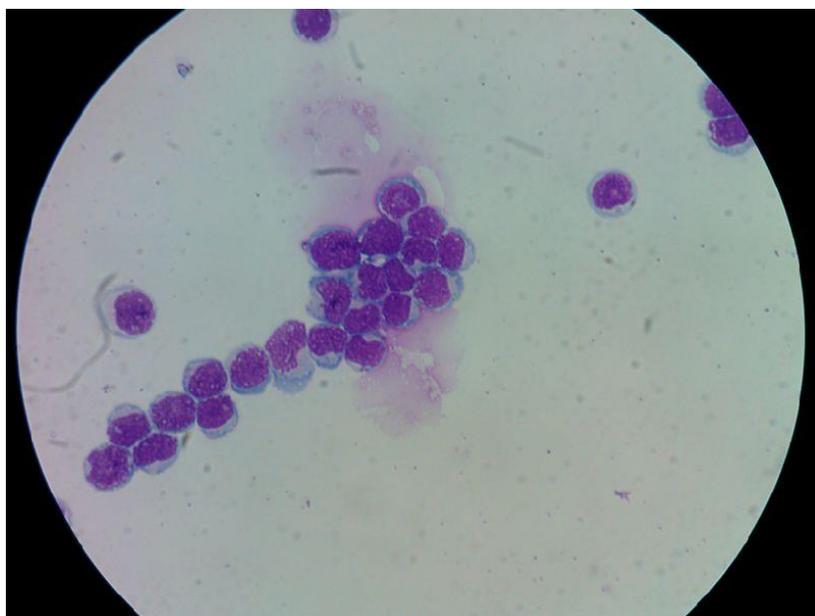


Figura 1: Células leucêmicas em LCR de paciente com LLA.

Foto cedida pela equipe de líquidos corporais do Laboratório Central do HC-UFGM.

4.3.3. IMUNOFENOTIPAGEM DO LCR

Dos 5 ml de LCR coletados de cada paciente, 3 ml foram utilizados para realização da IMF. O material foi processado e analisado no mesmo dia da coleta, no intervalo máximo de 12 horas após a mesma.

As amostras de LCR foram centrifugadas a 1700 rpm, por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado com a pipeta, até restarem 500 μ L. Este volume foi, a seguir, distribuído em três tubos, nos quais foram adicionados anticorpos monoclonais (MoAb) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou Cychrome (Cy), de acordo com a disposição abaixo:

- Tubo 1: controle, volume aproximado de 100 μ L a 150 μ L de LCR;
- Tubo 2: 150 μ L de LCR e MoAb para análise de linfócitos T maduros (anti-CD3, anti-CD8, anti-CD45, anti-CD4);
- Tubo 3: 200 μ L de LCR e painel de MoAb selecionado de acordo com o imunofenótipo dos blastos na MO ao diagnóstico (imunofenótipo B: anti-CD10, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD19/ imunofenótipo T: anti-CD1a ou anti-CD α b, anti-CD7, anti-CD45, anti-CD3).

Após a marcação com os MoAb, as amostras foram incubadas no escuro por 20 minutos, em temperatura ambiente. Realizada adição de 0,5 ml de solução de lise em cada tubo e, novamente, as amostras foram incubadas por mais 10 minutos no escuro. Adicionados 2,0 ml de PBS, nova centrifugação a 1700 rpm, por cinco minutos. Desprezado o sobrenadante de cada tubo. Cada amostra foi fixada com 200 μ L de PBS 1x para realização da aquisição, ou conservação em geladeira, para leitura posterior.

As amostras foram analisadas empregando-se o feixe *laser* de argônio de 488 nm, na potência de 15 mW. A aquisição foi realizada no equipamento FACSCalibur® e os dados analisados no microcomputador Macintosh MacPower 7600/132®, por meio do programa CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA).

Devido à pouca celularidade do LCR, todas as células de cada tubo foram adquiridas. A detecção de número ≥ 10 eventos, com o mesmo perfil imunofenotípico da MO, foi considerada como positiva para infiltração no SNC (QUIJANO *et al.*, 2009). As amostras foram classificadas, então, em positivas ou negativas.

A IMF do LCR foi realizada pela equipe de Citometria de Fluxo do Serviço de Hematologia do HC-UFMG, coordenada pela Dra. Mitiko Murao. A doutoranda participou do processo de padronização da IMF do LCR e, posteriormente, acompanhou a realização de alguns exames dos pacientes incluídos no estudo.

4.3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DO LCR

O volume de LCR destinado à PCR foi 1 ml. Após a coleta, as amostras foram congeladas a -80°C . Ao final do período de inclusão dos pacientes, ocorreu o processamento, conforme descrito a seguir.

4.3.4.1. Extração de DNA das células do LCR:

As amostras foram descongeladas a $4-8^{\circ}\text{C}$ por 40 minutos. Após descongelamento, foi realizada centrifugação a 13200 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, cuidadosamente, com pipeta. Adicionou-se ao tubo 25 μL de H_2O milli-Q. Foi realizado aquecimento da amostra em bloco térmico a 94°C por 10 minutos e, após este procedimento, as amostras foram colocadas em geladeira por 18 horas. O DNA obtido foi usado para pesquisa dos rearranjos clonais nos genes Ig e TCR previamente identificados na MO de cada paciente ao diagnóstico (PAULA, 2015).

4.3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR convencional)

A detecção de rearranjos clonais nos genes Ig e TCR na MO ao diagnóstico foi realizada por metodologia definida pelo grupo de Biologia Molecular do GBTLI, e padronizada pelo grupo do Dr. Andres Yunes (Centro Infantil Boldrini, Campinas/SP), tendo sido adaptada a partir da metodologia desenvolvida pelo grupo BIOMED (VAN DONGEN *et al.*, 2003; PONGERS-WILLEMSE *et al.*, 1999). O DNA da amostra de MO foi amplificado utilizando 19 *mixes* de *primers* consenso que flanqueiam as regiões dos rearranjos dos genes Ig e TCR, de acordo com o subtipo de LLA. Para as crianças com LLA de linhagem B, essa triagem inicial foi feita utilizando pares de *primers* para os rearranjos completos e incompletos dos genes IgH (VH-(DH)-JH, DH-JH), IgK (Vk-Kde, Intron-Kde), TCRG (Vg-Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2.1) e TCRD (Vd2-Dd3, Dd2-Dd3). Para as crianças com LLA-T, foram testados os rearranjos completos e incompletos dos genes IgH (DH-JH), TCRG (Vg-Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2.1), TCRD (Vd-(Dd)-Jd1, Dd2-Jd1, Vd2-Dd3, Dd2-Dd3) e a microdeleção nos genes SIL-TAL (SIL-TAL1, SIL-TAL2). Os rearranjos identificados na MO de cada paciente ao diagnóstico foram escolhidos para pesquisa de células clonais no LCR.

Os *primers* utilizados para cada rearranjo pesquisado e o tamanho esperado do fragmento amplificado estão descritos no Quadro 1, e as sequências dos *primers*,

descritas pelo consórcio BIOMED-2 (VAN DONGEN *et al.*, 2003), estão listadas no Anexo 3.

Quadro 1: Combinações de *primers* utilizadas para a triagem inicial nas LLAs -B e T

| Gene | Primer Foward | Primer Reverse | LLA B | LLA T | Tamanho do Fragmento (bp) |
|-----------------------|------------------|-----------------------|----------|----------|------------------------------|
| <i>IgH</i> | VH1-FR2 | JHcon | X | | 250-295 |
| | VH2-FR2 | JHcon | X | | 250-295 |
| | VH3-FR2 | JHcon | X | | 250-295 |
| | VH4-FR2 | JHcon | X | | 250-295 |
| | VH5-FR2 | JHcon | X | | 250-295 |
| | VH6-FR2 | JHcon | X | | 250-295 |
| | VH7-FR2 | JHcon | X | | 250-295 |
| | DH1 | JHcon | | X | 260-290 |
| | DH2 | JHcon | X | X | 230-260 |
| | DH3 | JHcon | X | X | 390-420 |
| | DH4 | JHcon | | X | 175-205 |
| | DH5 | JHcon | | X | 225-255 |
| | DH6 | JHcon | | X | 110-150 |
| | DH7 | JHcon | X | X | 100-130 |
| <i>IgK</i> | Vk1/6 | Kde | X | | 225-245 |
| | Vk2 | Kde | X | | 360-390 |
| | Vk3 | Kde | X | | 270-300 |
| | INTR | Kde | X | | 270-300 |
| <i>TCRG</i> | VgIf | Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2.1 | X | X | 200-255 |
| | Vg9 | Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2.1 | X | X | 160-220 |
| | Vg10 | Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2.1 | | X | 145-200 |
| | Vg11 | Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2.1 | X | X | 80-140 |
| <i>TCRD</i> | Vd1 | Jd1 | | X | 170-210 |
| | Vd2 | Jd1 | | X | 200-240 |
| | Vd3 | Jd1 | | X | 230-270 |
| | Dd2 | Jd1 | | X | ≈130 |
| | Vd2 | Dd3 | X | X | ≈240 |
| | Dd2 | Dd3 | X | X | ≈190 |
| <i>SIL-TAL</i> | Sil5 | Tal1 | | X | ≈300 |
| | Sil5 | Tal2 | | X | ≈359 |

As reações de PCR para a triagem dos rearranjos do diagnóstico no LCR foram realizadas com volume de 6 µL do DNA extraído. Nas amostras em que não houve amplificação, a integridade do DNA foi testada por meio de PCR para amplificação do gene *FLT3* (MESHINCHI *et al.*, 2001). As reações de PCR foram realizadas no

termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)*. Foi utilizado um controle negativo sem DNA, e um controle de amplificação inespecífica contendo DNA de doadores sem doença hematológica (PBL).

Após a PCR, foi realizada análise de homo/heterodúplex para caracterização da clonalidade, adaptada a partir de Langerak (1997) (Figura 2). Em uma alíquota de 20 μL do produto de PCR foi acrescido 5 μL de Tampão de Amostra 6x (azul de bromofenol 0,25% / sacarose 40% em água), desnaturada durante 5 min a 94°C, colocada imediatamente em gelo por 1 min e renaturada por 1 hora a 4°C. A seguir, o produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, durante 5 horas, a 25 mA e temperatura ambiente. Para a visualização das bandas, o gel foi corado com solução 2X de Sybr Safe (Invitrogen) por 30 minutos e exposto à luz UV. As amostras de LCR foram consideradas positivas quando as bandas resultantes da análise homo-heteroduplex, apresentaram o mesmo padrão de migração das amostras de MO ao diagnóstico.

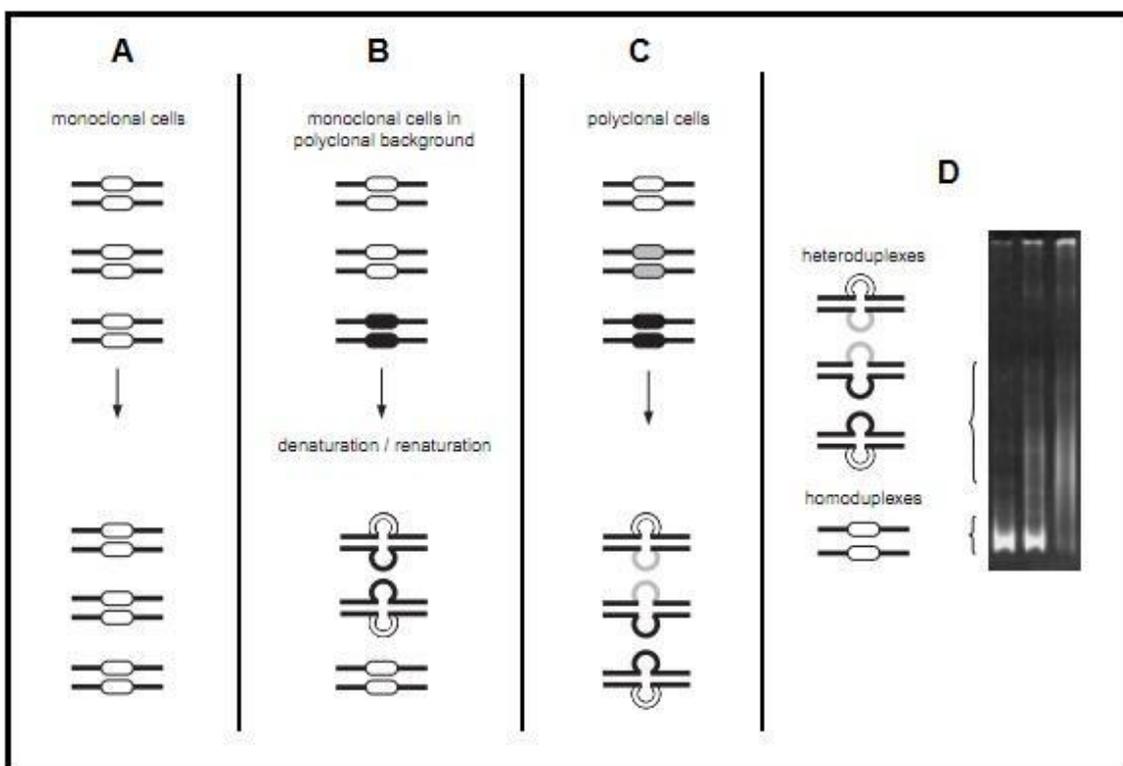


Figura 2: Diagrama esquemático da técnica de análise de homo/heteroduplex de rearranjos dos genes Ig e TCR.

Adaptado de Langerak *et al*, 1997.

4.3.4.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RQ-PCR)

Em função do estudo de DRM preconizado pelo GBTLI-LLA-2009, para alguns pacientes havia disponibilidade de *primers* específicos desenhados para as regiões de junção V-D-J identificados no clone leucêmico na MO ao diagnóstico. Nos pacientes nos quais estes *primers* estavam disponíveis, os mesmos foram testados no LCR pela RQ-PCR, conforme descrito por Paula, 2015.

Para a avaliação do LCR por RQ-PCR, além do *primer* clone-específico desenhado, foram escolhidos no banco de dados do GBTLI outro *primer* (senso ou anti-senso, dependendo do rearranjo) e a sonda TaqMan (*Applied Biosystems*), de acordo com o Anexo 4 (Figura 3).

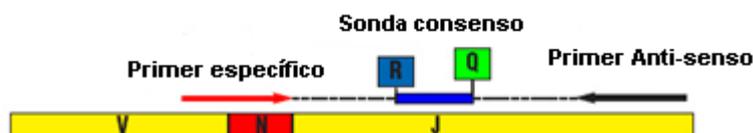


Figura 3: Estratégia de amplificação da região clonal.

(O *primer* clone-específico desenhado em combinação com a sonda fluorescente e o *primer* reverso descritos para a região de cada rearranjo foram utilizados para distinguir as células cancerosas das células normais do paciente). Adaptado de Cazzaniga & Biondi, 2005.

Cada teste foi realizado em duplicata e incluiu a amostra de MO do diagnóstico, a amostra do LCR ao diagnóstico, controle negativo e PBL. Como gene controle foi utilizado o *N-RAS* que serviu como normalizador. A sensibilidade dos *primers* da RQ-PCR variou entre 10^{-3} e 10^{-4} .

A PCR (convencional e RQ-PCR) da MO ao diagnóstico da LLA, foi realizada como parte do trabalho de doutorado de Francisco Danilo Ferreira Paula, doutor pelo Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da UFMG (PAULA, 2015). A PCR do LCR foi realizada pela equipe do laboratório de Hematologia Molecular do HC-UFMG. A doutoranda acompanhou a realização dos exames e participou da etapa de extração do DNA.

REFERÊNCIAS

Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica*. 2005;90(3):382-90.

Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997; 11: 2192-9.

Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, et al. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97(1): 89-94.

Paula FDF. Estudo prospectivo de doença residual mínima em crianças com leucemia linfóide aguda. 2015. 79p. Tese – (Doutorado em Patologia – Área de concentração: Patologia Geral) – Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Pongers-Willemsse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:110-8.

Quijano S, Lopez A, Sancho JM, Panizo C, Deben G, Castilla C, et al. Identification of Leptomeningeal Disease in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Improved Sensitivity of Flow Cytometry. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27 (9): 1462-1469.

van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, 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* 2003; 17(12):2257-317.

4.4. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Diretoria de Ensino e Pesquisa do HC/UFMG (Processo n° 90/11) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (COEP – UFMG/CAAE-0284.0.203.000-11) (Anexo 2).

Para a inclusão dos pacientes em acompanhamento no Serviço de Hematologia, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aos pais ou responsáveis (Apêndice A).

Todos os dados foram registrados pela equipe de pesquisadores respeitando sempre a privacidade dos pacientes e garantindo o sigilo das informações.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o programa *Social Program Statistics Science* (SPSS), versão 20.0. O Kappa foi utilizado para análise de concordância entre os métodos de avaliação do LCR. A análise de possíveis associações entre as variáveis do estudo e os resultados da IMF e PCR do LCR foi realizada pelo teste Qui-quadrado de Pearson exato (para variáveis categóricas) e teste Mann-Whitney (para variáveis contínuas). O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a sobrevida global (SGLO) e a sobrevida livre de eventos (SLE). Para a SLE, o óbito ou a recidiva foram considerados eventos para análise. Para a SGLO, apenas o óbito foi considerado como evento. Pacientes que não apresentaram nenhum destes eventos foram censurados na data da análise. O teste de log-rank foi utilizado para comparação das curvas de sobrevida. Na análise de sobrevida, quando possível, ajustou-se o modelo multivariado de Cox: com as variáveis que apresentaram valor de p menor que 0,20, passo-a-passo, retirou-se aquelas com maiores valores de p, até ficar com modelo que todas as variáveis eram significativas. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. ARTIGO ORIGINAL:

O primeiro artigo refere-se aos dados coletados durante a fase de implantação da técnica de IMF do LCR no laboratório de CF do Serviço de Hematologia do HC-UFMG. O artigo foi publicado no periódico *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*.

Referência:

Cancela CSP, Murao M, Souza MEL, Barcelos JM, Furtado VM, Silva ML, Viana MB, Oliveira BM. Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia: diagnosis by immunophenotyping. *J Bras Patol Med Lab*, v.49, n.4, p.260-263, 2013.

Infiltração do sistema nervoso central na leucemia linfoide aguda: diagnóstico pela técnica de imunofenotipagem

Resumo

O sistema nervoso central (SNC) é o sítio extramedular mais acometido na leucemia linfoide aguda. A avaliação morfológica do líquido cefalorraquidiano (LCR), apesar de ser o exame tradicional para o diagnóstico da infiltração leucêmica no SNC, é um método pouco sensível. O presente estudo pretendeu avaliar a imunofenotipagem como método auxiliar na detecção de blastos no (LCR) em crianças e adolescentes com leucemia linfoide aguda.

Palavras chaves: leucemia linfoide aguda; sistema nervoso central; líquido cefalorraquidiano; imunofenotipagem.

Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia: diagnosis by immunophenotyping

Abstract

The central nervous system is the most commonly affected extramedullary site in acute lymphoblastic leukemia. Although morphologic evaluation of the cerebrospinal fluid has been traditionally used for diagnosing central nervous system involvement, it consists in a method of low sensitivity. The present study aimed at evaluating the use of immunophenotyping in the detection of blasts in the cerebrospinal fluid in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia.

Key words: acute lymphoblastic leukemia; central nervous system; cerebrospinal fluid; immunophenotyping.

5.1.1. INTRODUCTION

The central nervous system (CNS) is the most commonly affected extramedullary site in acute lymphoblastic leukemia (ALL). CNS involvement in ALL is classically defined by the presence of more than 5 leukocytes/ μL and the presence of blasts on microscopic examination after centrifugation of the cerebrospinal fluid (CSF) sample. The involvement of cranial nerves is also part of the diagnostic criteria for CNS involvement⁽³⁾. However, regardless of the number of cells, the presence of blasts in CSF at diagnosis has been associated with a higher incidence of relapse in the CNS⁽⁴⁾. The cytological examination of CSF through microscope, a traditional method for assessing CNS involvement in ALL, is regarded as less sensitive^(2,5). Due to the importance of the diagnosis of leukemic infiltration in the CNS and its implications for prognosis and treatment of ALL, other methods for detecting neoplastic cells in CSF have been investigated, namely immunophenotyping (IMF) by flow cytometry (FC)^(2,3,5,6).

In this study, preliminary results will be presented with the aim to assess IMF by FC as a complementary method for evaluating CSF from children and adolescents with ALL.

5.1.2. RETROSPECTIVE STUDY

The study population consisted of patients aged under 16 years, with an initial diagnosis or relapse of ALL, treated at Universidade Federal de Minas Gerais-Clinical Hospital (HC-UFG) from 2008 to 2012. Patients underwent IMF of CSF during the implementation phase of the technique at the university laboratory in accordance with the protocol of the Brazilian Cooperative Group for the Treatment of Childhood Leukemia (Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Infantil [GBTLI]) LLA99(1). The project was approved by the Ethics Committee of UFG (CAAE – 02840203000-11). The collection of CSF for IMF was performed in the following situations: a) first lumbar puncture in newly diagnosed patients, with collection of CSF for neoplastic cell screening and intrathecal chemotherapy, as outlined in the GBTLI protocols; b) at the time of diagnosis of medullary and/or extramedullary relapse; c) in the presence of clinical diagnosis suggestive of leukemic infiltration in the CNS at any time during treatment. We collected 4 ml of CSF, 1 ml intended for routine examination and the remainder to IMF. Samples with hemorrhachis from patients with blast cells in the peripheral blood were discarded

owing to possible contamination by neoplastic cells. As to FC, the samples were processed and analyzed within 12 hours after collection. The samples were concentrated by centrifugation at 500 g for 5 minutes, hence reducing the initial volume of 4 ml to a final volume of 0.5 ml, which was aliquoted into three tubes: tube one with 0.1 ml (control); tube two with 0.2 ml and antibodies for mature T lymphocyte analysis (CD3/CD8/CD45/CD4); tube three with 0.2 ml and CD1a antibodies or CR α b/CD7/CD45/CD3 in the case of T-lineage ALL or CD10/CD34/CD45/CD19 in the case of B-lineage ALL, depending on the immunophenotype at diagnosis. The sample tubes and antibodies were incubated in the dark for 30 minutes at room temperature, followed by addition of 2 ml of lysis solution, incubation for 10 minutes (dark, room temperature), centrifugation and washing with solvent filtrate (500 g, 5 minutes). Samples were acquired on FACScalibur® with dual lasers and four-color detection. Due to the low cellularity of the samples, all the cells from each tube were acquired. Data were interpreted with CellQuest program (Becton Dickinson). Multiparametric analyses were performed based on morphological properties (size versus internal granularity) and fluorescence intensity (Figure). The detection of any number of cells with the same immunophenotypic profile found at diagnosis or relapse was considered CNS infiltration by ALL.

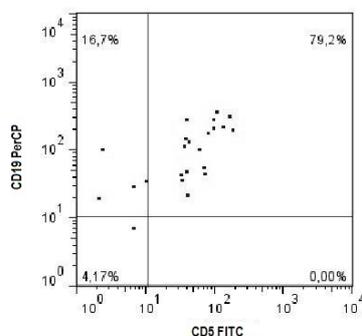


Figure – *Dot-plot of the selected events according to FSC, SSC and CD45 expression consistent with blast sites, with CD19 and CD5 (aberrant) immunostaining similar to diagnosis. CSF, sample 2, patient with B-ALL*

FSC: forward scatter, SSC: side scatter; CSF: cerebrospinal fluid; ALL: acute lymphoblastic leukemia; FITC: fluorescein isothiocyanate; PerCP: peridinin chlorophyll-protein.

We analyzed 23 samples of CSF from 20 patients (Table). Patients were aged from 7 months to 15.8 years (mean: 4.2 years) at diagnosis. Nineteen patients had B-ALL and only one presented T-ALL. In ten patients, the tests were performed at diagnosis of ALL (eight cases – samples 1, 7-10 and 12-14) or when there was medullary relapse (two cases – samples 5 and 11) in the absence of symptoms suggestive of CNS infiltration. The data related to blast screening by traditional cytological exam and IMF are described in the Table. None of these ten patients had subsequent diagnosis of leukemic infiltration in the CNS. In four patients (five samples: 2, 6, 15, 17, 18), the tests were performed at diagnosis of ALL relapse, in the presence of symptoms or cytological alterations in CSF suggestive of infiltration of the CNS. One sample (#6) was negative by both methods and another (#15) was positive by both methods. In this sample, the traditional cytometry showed the presence of 454 cells/ μ L, which were characterized as blasts. The third sample (#2) was positive for the presence of blasts only by IMF. The traditional cytometry showed only one cell/ μ L. This patient had been diagnosed with infiltration of the CNS due to the presence of pleocytosis with blasts (33 cells/ μ L) in CSF collected one week prior to sample collection for IMF. The reduction in cell number was due to intrathecal chemotherapy, which was not sufficient to eradicate neoplastic infiltration. In six patients (samples 3, 4, 16, 19, 20, 21, 22 and 23), samples were obtained during treatment of ALL, in the presence of symptoms or CSF cytology suggestive of infiltration. In all cases, samples were negative for the presence of blast cells in the CSF by IMF, hence aiding in the differential diagnosis of infiltration of the CNS. In one case, with pleocytosis (646 cells/ μ L) and atypical lymphocytes detected by the traditional method (36%), the IMF proved to be useful in the differential diagnosis by demonstrating that they were reactive T lymphocytes. The etiologic diagnosis for this patient was viral meningitis.

Although the sample was relatively small and based on collected data and the literature, it was observed that IMF may assist in the evaluation of leukemic infiltration in the CNS and it is a relevant tool for the differential diagnosis in samples with pleocytosis and atypical lymphocytes or when the presence of blasts is suspected. Furthermore, it is helpful in situations with a small number of neoplastic cells in patients with mild infiltration, in as much as FC enables the detection of these cells in samples with low cellularity. It is particularly worth mentioning that IMF does not preclude cytological analysis. Moreover, the impact of its incorporation in assessing prognosis of patients with ALL is still unclear. The authors are conducting a prospective

study to evaluate the detection of leukemic cells in CSF by traditional cytological methods, IMF by FC and polymerase chain reaction.

Table – Characteristics of 23 samples of CSF from children with acute lymphoblastic leukemia

| Sample | Indication for the collection of CSF | Cellularity of CSF samples (nucleated cells/ μ L) | Blast screening by traditional cytology | IMF result: positive or negative for the presence of blasts |
|-------------|--|---|---|---|
| 1, 8, 9, 13 | Routine diagnosis | 0 | NEGATIVE | NEGATIVE |
| 7 | Routine diagnosis | Data not found | NEGATIVE | NEGATIVE |
| 10,12, 14 | Routine diagnosis | 0 | NEGATIVE | CNR |
| 5 | Routine: medullary relapse | 0 | NEGATIVE | INCONCLUSIVE |
| 11 | Routine: medullary relapse | 0 | NEGATIVE | CNR |
| 2 | Medullary relapse and CNS: ACSF | 0 | NEGATIVE | POSITIVE |
| 6 | Ocular relapse | 0 | NEGATIVE | NEGATIVE |
| 15 | CNS relapse: signs of CNS infiltration (visual deficit) | 454 | POSITIVE (100% blasts) | POSITIVE |
| 17 | CNS relapse: involvement of cranial nerves | 0 | NEGATIVE | INCONCLUSIVE |
| 18 | CNS relapse: involvement of cranial nerves | 0 | NEGATIVE | CNR |
| 3 | ACSF | 0 | 3% atypical lymphocytes | NEGATIVE |
| 4 | ACSF | 0 | NEGATIVE | NEGATIVE |
| 20 | ACSF | 3 | NEGATIVE | NEGATIVE |
| 21 | ACSF | 0 | NEGATIVE | NEGATIVE |
| 22,23 | ACSF | 1 | NEGATIVE | NEGATIVE |
| 16 | Meningeal signs | 646 | 36% atypical lymphocytes | NEGATIVE |
| 19 | Suspected relapse: visual déficit | 2 | NEGATIVE | NEGATIVE |

Patients with two collected samples: patient A – samples 3 and 4; B – 17 and 18; C – 21 and 22.

CSF: cerebrospinal fluid; IMF: immunophenotyping, CNS: central nervous system; ACSF: altered CSF; CNR: cells not recovered.

REFERENCES

1. BRANDALISE, S. R. *et al.* Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group-Protocol ALL-99. *J Clin Oncol*, v. 28, p. 1911-8, 2010.
2. BROMBERG, J. E. C. *et al.* CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurol*, v. 68, p. 1674-9, 2007.
3. NÜCKEL, H. *et al.* Detection of malignant haematopoietic cells in the cerebrospinal fluid by conventional cytology and flow cytometry. *Clin Lab Haem*, v. 28, p. 22-9, 2006.
4. PUI, C. H.; HOWARD, S. C. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol*, v. 9, p. 257-68, 2008.
5. SAYED, D. *et al.* Immunophenotyping and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement analysis in cerebrospinal fluid of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, v. 33, p. 655-61, 2009.
6. SUBIRÁ, D. *et al.* Flow cytometry and the study of central nervous disease in patients with acute leukemia. *Brit J Haemat*, v. 112, p. 381-4, 2001.

5.2. ARTIGO ORIGINAL:

O segundo artigo refere-se à análise dos resultados da avaliação do LCR pela CT e IMF e, análise de probabilidade de sobrevida. O artigo foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista *Pediatric Hematology Oncology*, na qual os autores têm a intenção de submetê-lo.

Avaliação da imunofenotipagem do líquido cefalorraquidiano ao diagnóstico como fator prognóstico em crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a imunofenotipagem (IMF) como método de identificação de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). Foram incluídos 67 pacientes com idade até 18 anos. Ao diagnóstico inicial da LLA foram avaliadas 55 amostras de LCR; 17 foram coletadas à recidiva. A citologia (CT) do LCR foi realizada em todas as 72 amostras, a IMF em 63 amostras. Em apenas três amostras foram identificados blastos pela CT, a IMF foi negativa em duas e não foi realizada na terceira. Dentre as amostras analisadas pela IMF, em 11, a pesquisa de blastos foi positiva, incluindo duas amostras inconclusivas pela CT. Não foi observada concordância entre os resultados da CT e IMF ($p = 0,55$). Não foi constatada associação da positividade do LCR pela IMF com fatores de risco para recidiva de LLA. Nos 55 pacientes incluídos no estudo ao diagnóstico de LLA, ocorreram oito recidivas. Dentre as recidivas em SNC, um paciente pertencia ao grupo de pacientes com IMF do LCR positiva (11%) ao diagnóstico e, os outros dois, ao grupo com IMF negativa (5%). A presença de blastos no LCR pela IMF foi associada a pior sobrevida global ($p < 0,0001$) e a pior sobrevida livre de eventos ($p < 0,0001$). Os resultados sugerem que a IMF do LCR pode ser um método auxiliar à CT no diagnóstico da infiltração do SNC na LLA e na identificação de grupos de risco para intensificação do tratamento.

Palavras chaves: leucemia linfóide aguda, sistema nervoso central, líquido cefalorraquidiano, imunofenotipagem, prognóstico

Immunophenotyping of the cerebrospinal fluid as a prognostic factor at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents

Abstract

This study aimed at evaluating the use of immunophenotyping (IMP) in the identification of leukemic blast cells in the cerebrospinal fluid (CSF) of children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia (ALL). A total of 67 patients aged 18 years or younger were included. Fifty-five CSF samples were analysed at initial diagnosis and 17 at the time of relapse. A cytologic analysis (CA) was performed in all 72 samples, while IMP was done in 63. Blasts were identified in only three samples on CA, whereas all three samples were negative on IMP, one of which had no isolation of nucleated cells after centrifugation. Amongst the samples analysed by IMP, 11 showed a positive blast count, two of which had been inconclusive on CA. No equivalence was found between the CA and IMP results ($p = 0.55$). CSF positivity on IMP was not associated with other risk factors for ALL relapse. Among the 55 patients included at the diagnosis of ALL, eight relapsed during follow-up. Considering the cases of central nervous system (CNS) relapse, one of the patients belonged to the IMP-positive CSF group (11%) at diagnosis, and the other two cases, to the IMP-negative (5%) group. Detection of blast cells in CSF using IMP was associated with worse overall ($p < 0.0001$) and event-free survival ($p < 0.0001$). These results show that CSF IMP may be a useful additional method to conventional CA in the diagnosis of CNS involvement in ALL, for the identification of high-risk subgroups that would benefit from an intensified therapy.

Key words: acute lymphoblastic leukemia; central nervous system; cerebrospinal fluid; immunophenotyping, prognosis.

5.2.1. INTRODUÇÃO

O tratamento direcionado ao sistema nervoso central (SNC), introduzido na década de 1970, foi um dos fatores que contribuíram para melhora das taxas de cura da leucemia linfóide aguda (LLA), que, atualmente, nos serviços de referência, aproximam-se dos 90%¹⁻³. O SNC ainda é o sítio extramedular mais acometido ao diagnóstico (< 5% dos pacientes) e às recidivas (5 a 10% dos pacientes)^{2,4}. Em relação às recidivas no SNC, os fatores de risco identificados, ao diagnóstico, são: imunofenótipo T dos blastos leucêmicos, presença de alterações citogenéticas – como t(9;22); t(4;11) e t(1;19), hiperleucocitose (≥ 50.000 leucócitos/mm³) e presença de infiltração no SNC².

A abordagem terapêutica direcionada ao SNC compreende a utilização de radioterapia (RT) cranioespinhal, quimioterapia (QT) intratecal e QT sistêmica (em especial o metotrexate em dose $\geq 0,5\text{g/m}^2$)^{2,5-7}. A toxicidade, especialmente da RT, é uma preocupação frequente nos serviços de tratamento da LLA na infância. Tal fato é o responsável pela elaboração de novos protocolos de tratamento na tentativa de abolir ou restringir a RT para um menor grupo de pacientes, de acordo com a presença de fatores de risco para recidiva no SNC⁸⁻¹².

Uma das principais questões acerca da seleção dos pacientes de maior risco para recidiva no SNC é o diagnóstico correto da infiltração neste sistema. Não existe padrão-ouro para avaliação do acometimento do SNC pela LLA, o exame citológico do líquido cefalorraquidiano (LCR) é o principal método utilizado na maioria dos serviços de tratamento de leucemias¹³. No entanto, a escassez de células no LCR e a presença de linfócitos atípicos com morfologia semelhante à das células leucêmicas podem interferir no correto diagnóstico da infiltração no SNC pela citologia (CT)¹⁴⁻¹⁶. Vários estudos mostraram uma maior possibilidade de diagnóstico da presença de blastos no LCR por meio de outros métodos, como imunofenotipagem (IMF) e reação em cadeia da polimerase (PCR)¹⁴⁻¹⁶.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a imunofenotipagem (IMF) como método para a identificação de células leucêmicas no LCR de crianças e adolescentes diagnosticados com LLA.

5.2.2. PACIENTES E MÉTODOS

A população estudada consistiu de pacientes com idade até 18 anos, com diagnóstico recente de LLA, admitidos no Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), no período de novembro de 2011 a novembro de 2014, submetidos aos protocolos de tratamento do GBTLI: LLA 99¹⁷ e 2009. Também foram incluídos os pacientes, dentro da mesma faixa etária, tratados inicialmente com os referidos protocolos e que apresentaram recidiva (medular e/ou extramedular) da doença no mesmo período. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP – UFMG/CAAE-0284.0.203.000-11). Para a inclusão dos pacientes em acompanhamento na instituição, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aos pais ou responsáveis.

Foram analisados os seguintes dados, extraídos dos prontuários médicos e registros laboratoriais: idade ao diagnóstico, sexo, imunofenótipo, alterações citogenéticas, doença residual mínima (DRM) na medula óssea (MO) por IMF no 15º dia de tratamento, grupo de risco (baixo risco: idade ≥ 1 ano e < 9 anos, contagem de leucócitos ao diagnóstico $< 50.000/\text{mm}^3$, < 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico no 8º dia de tratamento, DRM na MO por IMF $< 10\%$ no 15º dia de tratamento, DRM na MO por PCR $< 10^{-3}$ - para LLA B derivada - e $< 10^{-2}$ - para LLA T derivada - no 35º dia de tratamento e ausência de citogenética de risco – t(9;22) e t(4;11) e/ou hipodiploidia), data e local de realização da primeira punção lombar, data e local da primeira recidiva, data e causa do óbito, situação da criança no momento da análise dos dados (vivo e em remissão, nova recidiva ou óbito).

Para tratamento e profilaxia do SNC, o protocolo GBTLI-LLA 99, preconizava a utilização de quimioterapia intratecal tripla (MADIT), com metotrexate, citarabina e dexametasona e, a RT, apenas para os pacientes com acometimento do SNC ao diagnóstico. Para o protocolo GBTLI LLA 2009, manteve-se o MADIT e ampliou-se a indicação da RT. Além dos pacientes com acometimento do SNC ao diagnóstico, a RT foi indicada para os pacientes com contagem de leucócitos ao diagnóstico $\geq 100.000/\text{mm}^3$ e/ou classificados como respondedores lentos (≥ 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico no 8º dia de tratamento e/ou DRM positiva no 15º dia de tratamento e/ou no 35º dia de tratamento). Conforme orientação do protocolo GBTLI-LLA, para todos os pacientes ao diagnóstico de LLA foi realizado o exame citológico do LCR para pesquisa de blastos. A coleta do LCR deve ser realizada no primeiro dia de tratamento. Para todos os pacientes, a punção lombar foi realizada no bloco cirúrgico, sob sedação, por membros da equipe

com maior experiência. Para os pacientes com contagem de plaquetas abaixo de 50.000/mm³, foi realizada transfusão de plaquetas antes do procedimento.

A classificação do LCR, de acordo com a avaliação citológica, foi: SNC 1 – punção lombar não traumática, ausência de blastos; SNC 2 – punção lombar não traumática, contagem de leucócitos < 5/μL, presença de blastos; SNC 3 – punção lombar não traumática, contagem de leucócitos ≥ 5/μL, presença de blastos; PLT *negativa* – punção lombar traumática (≥10 hemácias/μL), ausência de blastos; PLT *positiva* – punção lombar traumática (≥10 hemácias/μL), presença de blastos. No protocolo GBTLI-LLA, o envolvimento do SNC pela leucemia é definido como SNC3 ou por infiltrados intracerebrais detectados por técnica de imagem ou por acometimento de pares cranianos ou, ainda, pela presença de massa dentro da medula espinhal, identificada por técnica de imagem.

Aproximadamente 3 ml de LCR foram utilizados para realização da IMF. O material foi processado e analisado no mesmo dia da coleta, no intervalo máximo de 8 horas após a mesma. As amostras de LCR foram concentradas por centrifugação, com volume final de 500 μL. Este volume foi, a seguir, distribuído em três tubos, nos quais foram adicionados anticorpos monoclonais (MoAb), de acordo com a disposição a seguir: Tubo 1: controle, volume aproximado de 100 μL a 150 μL de LCR; Tubo 2: 150 μL de LCR e MoAb para análise de linfócitos T maduros (anti-CD3, anti-CD8, anti-CD45, anti-CD4); Tubo 3: 200 μL de LCR e painel de MoAb selecionado de acordo com o imunofenótipo dos blastos na medula óssea ao diagnóstico (imunofenótipo B: anti-CD10, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD19/ imunofenótipo T: anti-CD1a ou anti-CD4, anti-CD7, anti-CD45, anti-CD3). Após a marcação com os MoAb, as amostras foram incubadas no escuro, em temperatura ambiente. Realizada adição de solução de lise em cada tubo e, novamente, foram incubadas no escuro e, a seguir, concentradas por centrifugação. Cada amostra foi fixada com 200 μL de PBS 1x para realização da aquisição, ou conservação em geladeira, para leitura posterior. A aquisição foi realizada no equipamento FACSCalibur® e os dados analisados no microcomputador Macintosh MacPower 7600/132®, por meio do programa CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA). Devido à pouca celularidade do LCR, todas as células de cada tubo foram adquiridas. A detecção de um número ≥ 10 eventos com o mesmo perfil imunofenotípico da medula óssea foi considerada como positiva para infiltração no SNC²⁶.

Não foi realizada nenhuma modificação no protocolo de tratamento, em função da IMF positiva.

Para a análise estatística foi utilizado o programa *Social Program Statistics Science* (SPSS), versão 20.0. O coeficiente kappa foi utilizado para análise de concordância entre os métodos de avaliação do LCR (CT *versus* IMF). A análise de possíveis associações entre as variáveis do estudo e os resultados da IMF do LCR foi realizada pelo teste qui-quadrado de Pearson exato (para variáveis categóricas) e teste Mann-Whitney (para variáveis contínuas). Para a análise de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meier. Pacientes que não apresentaram nenhum evento (óbito ou recidiva) foram censurados na data da análise. O teste de log-rank foi utilizado para comparação das curvas de sobrevida. Para análise multivariada foi utilizado o modelo de regressão de Cox. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.2.3. RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 72 amostras de LCR de 67 pacientes. No período estudado foram diagnosticados 57 casos novos de LLA. Dois pacientes foram excluídos do estudo: um faleceu antes da primeira punção lombar e o outro foi transferido para tratamento em outro serviço. Dessa forma, ao diagnóstico inicial da LLA foram incluídos, sequencialmente, 55 pacientes (55 amostras de LCR).

Um total de 17 amostras de LCR foi coletado à recidiva: três amostras de pacientes também incluídos ao diagnóstico inicial e 14 coletadas apenas à recidiva medular e/ou extramedular (dois destes pacientes foram incluídos duas vezes no estudo, por apresentarem nova recaída da doença).

A distribuição das amostras em cada grupo de pacientes, de acordo com o momento da inclusão no estudo (diagnóstico inicial; diagnóstico inicial e recidiva; recidiva) pode ser vista na Figura 1.

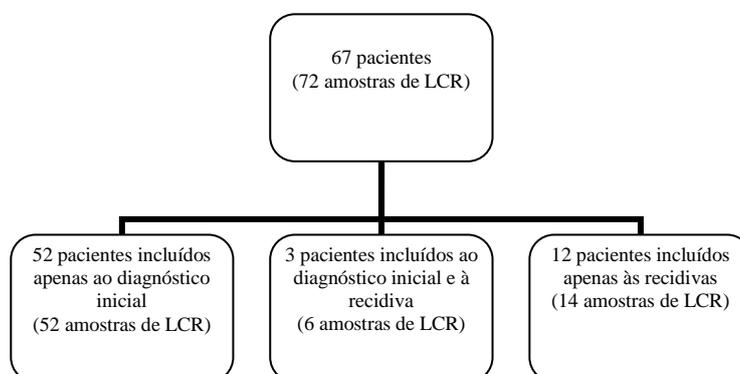


Figura 1: Diagrama da inclusão dos 67 pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA)

As características clínicas dos pacientes estão resumidas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Características clínicas das 67 crianças com leucemia linfóide aguda

| Características | Pacientes (total = incluídos ao diagnóstico inicial e à recidiva) | Pacientes incluídos ao diagnóstico inicial da LLA* |
|--|---|--|
| | número (%) | número (%) |
| Sexo | | |
| Masculino | 35 (52) | 28 (51) |
| Feminino | 32 (48) | 27 (49) |
| Total | 67 (100) | 55 (100) |
| Idade ao diagnóstico inicial | | |
| < 2 anos | 3 (4,4) | 1 (1,8) |
| 2 a 9 anos | 47 (70,1) | 40 (72,7) |
| ≥ 10 anos | 17 (25,3) | 14 (25,4) |
| Total | 67 (100) | 55 (100) |
| Grupo de risco para recidiva | | |
| Baixo risco (BR) | 25 (37,3) | 16 (29) |
| Alto risco (AR) | 42 (62,6) | 39 (71) |
| Total | 67 (100) | 55 (100) |
| Contagem de leucócitos ao diagnóstico inicial | | |
| < 10.000/mm ³ | 36 (58,1) | 31 (57,4) |
| 10.000/mm ³ a < 50.000/mm ³ | 14 (22,6) | 11 (20,4) |
| ≥ 50.000/mm ³ | 12 (19,3) | 12 (22,2) |
| Total | 62 (100) | 54 (100) |
| Imunofenotipagem | | |
| B | 57 (85,1) | 45 (81,8) |
| T | 9 (13,4) | 9 (16,3) |
| Bifenotípica | 1 (1,5) | 1 (1,8) |
| Total | 67 (100) | 55 (100) |
| Citologia do LCR à inclusão no estudo | | |
| SNC 1 | 46 (63,9) | 35 (63,6) |
| SNC 2 | 2 (2,8) | 0 (0) |
| SNC 3 | 0 (0) | 0 (0) |
| PLT <i>negativa</i> | 21 (29,2) | 18 (32,7) |
| PLT <i>positiva</i> | 1 (1,4) | 0 (0) |
| Inconclusiva | 2 (2,8) | 2 (3,6) |
| Total | 72 (100) | 55 (100) |

LCR: líquido cefalorraquidiano; SNC 1: punção lombar não traumática, ausência de blastos; SNC 2: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos < 5/μL, presença de blastos; SNC 3: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos ≥ 5/μL, presença de blastos; PLT *negativa*: punção lombar traumática (≥10 hemácias/μL), ausência de blastos; PLT *positiva*: punção lombar traumática e presença de blastos; INC: inconclusiva

*Todos os pacientes incluídos ao diagnóstico inicial foram tratados pelo protocolo GBTLI-LLA 2009, exceto um, tratado pelo GBTLI-LLA 99.

Tabela 2: Características dos 15 pacientes incluídos à recidiva de leucemia linfoide aguda

| Características | Número |
|--|---------------|
| Pacientes/amostras | 15/17 |
| Protocolo inicial de tratamento | |
| GBTLI LLA 99 | 12 |
| GBTLI LLA 2009 | 3 |
| Local da recidiva: | |
| Medular isolada | 8 |
| Extra medular isolada: | |
| SNC | 3 |
| Testicular | 4 |
| Massa abdominal | 1 |
| Combinada: SNC e MO | 1 |
| Total | 17 |
| Citologia do LCR à inclusão no estudo | |
| SNC 1 | 11 |
| SNC 2 | 2 |
| SNC 3 | 0 |
| PLT <i>negativa</i> | 3 |
| PLT <i>positiva</i> | 1 |
| Inconclusiva | 0 |
| Total | 17 |

CR: líquido cefalorraquidiano; SNC 1: punção lombar não traumática, ausência de blastos; SNC 2: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos < 5/μL, presença de blastos; SNC 3: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos ≥ 5/μL, presença de blastos; PLT *negativa*: punção lombar traumática (≥10 hemácias/μL), ausência de blastos; PLT *positiva*: punção lombar traumática e presença de blastos; INC: inconclusiva

A análise citológica do LCR foi realizada em todas as 72 amostras. A avaliação das amostras pela IMF não obteve sucesso em 9 (12,5%) casos, totalizando 63 resultados (Tabela 3). Os motivos de insucesso da IMF foram: volume insuficiente no momento da coleta em três amostras e, nas demais, não foram recuperadas células para análise.

Dentre as amostras analisadas pela CT, em apenas três foram identificados blastos, duas foram classificadas como SNC 2 e, uma, como PLT *positiva*. Em outras duas amostras, o resultado foi inconclusivo, ou seja, não foi possível definir se as células observadas no LCR eram blastos ou linfócitos reativos, apenas pela morfologia.

Tabela 3: Resultados da avaliação citológica e por imunofenotipagem de 72 amostras de líquido cefalorraquidiano de 67 pacientes com leucemia linfóide aguda

| Número de amostras | Diagnóstico inicial ou recidiva | Pesquisa de blastos pela citologia tradicional | Resultado da IMF: positiva ou negativa para a presença de blastos |
|--------------------|---------------------------------|--|---|
| 29 | Diagnóstico inicial | SNC 1 | NEGATIVA |
| 11 | Diagnóstico inicial | PLT neg | NEGATIVA |
| 3 | Diagnóstico inicial | SNC 1 | NRC |
| 3 | Diagnóstico inicial | PLT neg | NRC |
| 3 | Diagnóstico inicial | SNC 1 | POSITIVA |
| 4 | Diagnóstico inicial | PLT neg | POSITIVA |
| 1 | Diagnóstico inicial | INC (PLT positiva?) | POSITIVA |
| 1 | Diagnóstico inicial | INC (SNC 2?) | POSITIVA |
| 8 | Recidiva | SNC 1 | NEGATIVA |
| 2 | Recidiva | PLT neg | NEGATIVA |
| 1 | Recidiva | SNC 1 | NRC |
| 1 | Recidiva | PLT neg | NRC |
| 2 | Recidiva | SNC 1 | POSITIVA |
| 1 | Recidiva | PLT pos | NEGATIVA |
| 1 | Recidiva | SNC 2 | NRC |
| 1 | Recidiva | SNC 2 | NEGATIVA |

LCR: líquido cefalorraquidiano; SNC 1: punção lombar não traumática, ausência de blastos; SNC 2: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos $< 5/\mu\text{L}$, presença de blastos; SNC 3: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos $\geq 5/\mu\text{L}$, presença de blastos; PLT *negativa*: punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μL), ausência de blastos; PLT *positiva*: punção lombar traumática e presença de blastos; INC: inconclusiva; NRC: não recuperou células

Dentre as 63 amostras analisadas pela IMF, em 11 (17,4%), a pesquisa de blastos foi positiva. Nas três amostras que apresentaram células leucêmicas identificadas pela CT (duas classificadas como SNC2 e uma como PLT *positiva*), a IMF foi negativa em duas e, não houve recuperação de células na terceira. As duas amostras inconclusivas pela análise citológica foram positivas pela IMF.

Foi realizada análise de concordâncias entre os dois métodos (para esta análise os dois casos inconclusivos pela CT foram excluídos). Não foi observada concordância entre os resultados ($p = 0,55$). (Tabela 4)

Tabela 4: Análise de concordância entre os métodos de imunofenotipagem e citologia para avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano

| Citologia | Imunofenotipagem | | Total | Kappa | Valor-p |
|------------------|-------------------------|-----------|--------------|--------------|----------------|
| | Positivo | Negativo | | | |
| Positivo | 0 (0,0) | 2 (3,3) | 2 | -0,057 | 0,550 |
| Negativo | 9 (14,8) | 50 (82,0) | 59 | | |
| Total | 9 | 52 | 61 | | |

No grupo de pacientes incluídos ao diagnóstico inicial (n=55), 49 apresentaram resultado na análise do LCR pela IMF. Para estes pacientes foi avaliada a possível associação da presença de blastos no LCR por este método com as variáveis relacionadas ao maior risco de recidiva da LLA. Conforme observado na Tabela 5, não foi constatada nenhuma associação da positividade do LCR pela IMF com os fatores de risco para recidiva de LLA.

Observou-se atraso na primeira punção lombar acima de sete dias, em relação à data do diagnóstico da LLA, em 17 (31%) dos procedimentos realizados. Os principais fatores envolvidos nesse atraso foram: condições clínicas desfavoráveis dos pacientes, hiperleucocitose e indisponibilidade de vagas no centro cirúrgico do hospital. Na análise dos pacientes que realizaram a punção lombar com intervalo superior a 7 dias observou-se um maior número de exames positivos pela IMF no LCR (p=0,016). Adicionalmente, observou-se associação deste grupo de pacientes com contagem de leucócitos ao diagnóstico acima de 50.000/mm³ (p<0,0001), imunofenótipo T (p=0,021) e classificação no grupo de alto risco de recidiva (p=0,003).

Nos 55 pacientes incluídos no estudo ao diagnóstico de LLA, ocorreram oito recidivas (cinco medulares; duas combinadas – medula óssea e SNC; uma isolada em SNC). Dentre as recidivas em SNC, um pertencia ao grupo de pacientes com IMF do LCR positiva (11%) ao diagnóstico e, os outros dois, ao grupo com IMF negativa (5%). Ainda no grupo de pacientes incluídos ao diagnóstico inicial, ocorreram 9 óbitos durante o período de seguimento: 3 na indução e 6 por progressão da doença.

Tabela 5: Associação entre positividade do líquido cefalorraquidiano ao diagnóstico pelo método de imunofenotipagem e fatores de risco para recidiva de leucemia linfóide aguda em 49 pacientes

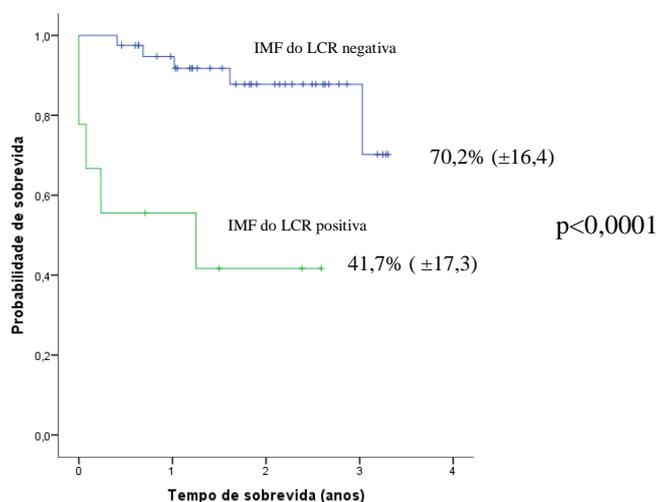
| Variáveis | Imunofenotipagem do LCR | | Valor-p |
|--|-------------------------|------------------------|--------------------|
| | Positivo Número (%) | Negativo Número (%) | |
| Idade | | | |
| < 2 anos | 0 (0) | 1 (100) | 1,000 ¹ |
| 2 a 10 anos | 7 (19,4) | 29 (80,6) | |
| ≥10 anos | 2 (16,7) | 10 (83,3) | |
| Contagem de leucócitos ao diagnóstico | | | |
| < 10000 | 3 (10,7) | 25 (89,3) | 0,192 ¹ |
| 10000 a 50000 | 2 (20) | 8 (80) | |
| ≥ 50000 | 4 (36,4) | 7 (63,6) | |
| Imunofenótipo | | | |
| LLA B | 7 (17,9) | 32 (82,1) | 1,000 ¹ |
| LLA T | 2 (22,2) | 7 (77,8) | |
| Bifenotípica | 0 (0) | 1 (100) | |
| Grupo de risco para recidiva | | | |
| Baixo risco (BR) | 2 (14,3) | 12 (85,7) | 0,712 ¹ |
| Alto risco (AR) | 7 (20) | 28 (80) | |
| Biologia molecular | | | |
| Negativo | 7 (20,6) | 27 (79,4) | 0,938 ¹ |
| BCR- ABL | 0 (0) | 3 (100) | |
| E2A-PBX | 1 (33,3) | 2 (66,7) | |
| TEL-AML | 1 (14,3) | 6 (85,7) | |
| Medula óssea | | | |
| (Citologia) D15 | | | |
| M1 | 3 (12) | 22 (88) | 0,810 ¹ |
| M2 | 2 (28,6) | 5 (71,4) | |
| M3 | 1 (20) | 4 (80) | |
| DRM (IMF) D15 | | | |
| Positiva | 5 (17,9) | 23 (82,1) | 0,569 ¹ |
| Negativa | 0 (0) | 5 (100) | |

¹Teste Qui-quadrado de Pearson exato

D15: 15º dia de tratamento; M1: aspirado medular com < 5% de blastos; M2: aspirado medular com 5 a 25% de blastos; M3: aspirado medular com > 25% de blastos; DRM: doença residual mínima

O tempo de seguimento para crianças que não apresentaram evento variou de 28 dias a 43 meses (mediana: 24,8 meses). A probabilidade estimada de sobrevida global (SGLO) aos 3 anos para os 55 pacientes incluídos no estudo ao diagnóstico inicial de LLA foi de 66,3% (\pm 15,5%). A probabilidade estimada de sobrevida livre de eventos (SLE) foi de 63,4% (\pm 15%).

A SGLO para os pacientes com IMF positiva no LCR foi 35,6% ($\pm 18,6$), e, para o grupo com IMF negativa, 75,4% ($\pm 17,2$) ($p < 0,0001$). Também foi observada pior SLE para o grupo de pacientes com IMF positiva ($p < 0,0001$) (Figura 2). Observou-se uma associação significativa entre pior SGLO e SLE para pacientes com contagem de leucócitos ao diagnóstico maior ou igual a $50.000/\text{mm}^3$ ($p=0,043$ e $p=0,025$, respectivamente). Outro fator associado à pior probabilidade de SGLO e SLE foi o atraso da primeira punção lombar superior a 7 dias do diagnóstico da LLA ($p=0,007$ e $p=0,004$, respectivamente). Os demais fatores de risco avaliados (idade, imunofenótipo, grupo de risco para recidiva, biologia molecular e resposta medular no D15 de tratamento) não influenciaram a SGLO e SLE dos pacientes estudados até o momento da análise. Na análise multivariada, a presença de blastos no LCR pela IMF permaneceu associada à pior SLE ($p=0,028$; RR: 4,80; IC 95%: 1,18-19,46); assim como o atraso na primeira punção lombar acima de 7 dias do diagnóstico ($p=0,037$; RR: 4,64; IC 95%: 1,09-19,66). Não foi possível ajustar o modelo multivariado de Cox para a SGLO.



| | Nº de pacientes expostos | | | |
|--------------|--------------------------|----|----|---|
| IMF negativa | 41 | 32 | 17 | 5 |
| IMF positiva | 8 | 4 | 2 | 0 |

Figura 2: Probabilidade de sobrevivência livre de eventos (SLE) para 49 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com o resultado da imunofenotipagem do líquido cefalorraquidiano

5.2.4. DISCUSSÃO

A utilização da IMF para diagnóstico de neoplasias hematológicas no LCR já é estudada há alguns anos, com resultados satisfatórios¹⁸⁻³¹. As principais neoplasias avaliadas foram os linfomas não Hodgkin de alto risco para acometimento do SNC, a maioria deles em pacientes adultos^{18,22,25,26,28}. Os resultados observados levaram à elaboração de recomendação pelo NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) no sentido do uso rotineiro desse exame no diagnóstico do acometimento do SNC nos linfomas³².

Quanto ao uso da IMF no LCR nas leucemias agudas, mesmo com a observação de aumento da detecção de células leucêmicas por esta técnica, persistem questionamentos sobre seu real significado, e não existem indicações precisas para sua realização e interpretação de resultados^{15,16}.

O presente estudo mostrou maior chance de identificação de células leucêmicas no LCR, em pacientes pediátricos com LLA, utilizando-se a técnica de IMF quando comparada com o exame citológico: 11 (17,4%) casos positivos em 63 amostras pela IMF *versus* três (4,2%) casos positivos em 72 amostras pela CT. Considerando apenas os casos avaliados ao diagnóstico inicial da LLA, observou-se 18,4% de positividade pela IMF. O aumento da detecção de amostras positivas pela IMF é concordante com a literatura, pela qual observa-se que 5,7% a 27,8% de LCR positivos pela IMF, ao diagnóstico da LLA em crianças (Tabela 6)^{29,30,31}. Também em concordância com a literatura^{21,33,34}, a IMF mostrou-se útil na distinção dos casos inconclusivos pela CT: nos dois casos nos quais a CT foi inconclusiva, a IMF foi positiva.

Em duas amostras a CT identificou a presença de blastos no LCR (uma classificada como SNC 2 e outra como PLT *positiva*), porém a IMF foi negativa. Resultados discrepantes como este também foram relatados por outros autores^{18-21,23,26}. Quijano e colaboradores (2009) observaram uma amostra com CT positiva e IMF negativa, que foi considerada falso-positiva após análise imunocitoquímica. Ressalta-se que, no presente estudo, nas duas amostras classificadas como positivas pela CT, posteriormente foi realizada a PCR no LCR que mostrou resultado negativo, concordante com a IMF (comunicação pessoal).

Tabela 6: Comparação entre resultados de estudos de imunofenotipagem do líquido cefalorraquidiano em crianças e adolescentes ao diagnóstico de LLA

| | Período | Número de pacientes | Idade (anos) | CT+ Nº / (%) | IMF+ Nº / (%) |
|--|-----------|---------------------|--------------|-----------------|------------------|
| LIANG <i>et al</i>, 2013³⁰ | 2001-2007 | 313 | 2 a 14 | 5 (1,6) | 18 (5,8) |
| MARTINEZ-LAPERCHE <i>et al</i>, 2013²⁹ | 2007-2009 | 108 | 0 a 15 | 3 (2,8) | 30 (27,8) |
| RANTA <i>et al</i>, 2015³¹ | 2000-2012 | 214 | < 18 | 21 (9,8) | 37 (17,3) |
| Presente estudo | 2011-2014 | 55 | 0 a 18 | 0 (0) | 9 (18,3) |

SNC: sistema nervoso central; NI: não informado; CT: citologia; IMF: imunofenotipagem; NI: não informado

Uma das dificuldades da técnica de IMF no LCR é a escassez de células neste líquido corporal^{18,19,21,23,27}. Em trabalhos mais recentes, por meio de estratégias como utilização de citômetros mais modernos com número mais elevado de cores (≥ 3 cores), tal dificuldade tem sido superada^{15,16}.

Apesar dos cuidados para coleta e processamento do LCR, como volume aproximado de três microlitros e processamento em, no máximo, 8 horas após a coleta, em 12,5% das amostras, a IMF não foi realizada, pois o material coletado foi insuficiente ou não ocorreu recuperação de células pelo citômetro. Outros estudos relataram entre 0,87% a 29% das amostras inadequadas para a IMF^{18,19,21,23,27}. Sabe-se que o intervalo entre a coleta e o processamento da amostra é essencial para o aproveitamento das células no LCR¹⁵. A maioria dos estudos analisou as amostras nas primeiras 3 horas após a coleta (tempo de processamento variou de 3 horas a 3 dias)^{18-20,22-25,28}, ou o tempo para o processamento da amostra não foi especificado pelos autores^{29,30,33}. Alguns autores utilizaram reagentes estabilizantes para preservação da integridade celular das amostras (Transfix® ou RPMI 1640)^{24,26,28,29}. No presente estudo, assim como na maior parte dos trabalhos encontrados, as amostras foram coletadas sem nenhum tipo de conservante^{18-20,22,23,25,27,30}.

Outro fator que pode interferir na realização da IMF é a presença de hemácias no LCR. Na literatura encontram-se estudos que excluíram de suas análises as amostras de LCR contaminadas com hemácias^{19,20,29} e outros que às incluíram^{18,22,30,31,33}. No presente estudo, optou-se por incluir as 23 (32%) amostras que foram traumáticas (≥ 10

hemácias/ μ L) na análise pela IMF e foi utilizada a solução de lise para processamento das amostras, conforme recomendado por outros pesquisadores. Das nove amostras de LCR nas quais a IMF não foi viável, 44,4% pertenciam ao grupo de pacientes com punção traumática. Observou-se, no grupo com punção traumática, cinco (21,7%) amostras positivas pela IMF. Tal fato pode estar relacionado à presença de células leucêmicas introduzidas no LCR de forma iatrogênica. A presença de PLT *positiva* ao diagnóstico da LLA já foi associada à pior sobrevida por vários autores³⁵⁻³⁹. A identificação correta da presença de blastos no LCR traumático é também essencial, visto que a literatura sugere que a intensificação dos protocolos de tratamento poderia anular o efeito prognóstico da PLT *positiva*^{40,41}.

A definição de positividade do LCR pela IMF não está bem estabelecida na literatura, apenas alguns autores citam os critérios adotados para classificação das amostras^{24-26,28,29}. No presente estudo, as amostras com número ≥ 10 eventos na população celular selecionada e com o mesmo imunofenótipo da MO, foram consideradas positivas²⁶.

Outra limitação da casuística apresentada é o fato de 30% das punções lombares terem ocorrido com atraso acima de sete dias do diagnóstico da LLA. Durante esse período os pacientes já estão recebendo tratamento com corticoide, o que pode interferir no resultado da análise do LCR, reduzindo a chance de detecção de células leucêmicas. Portanto, o intervalo prolongado entre o diagnóstico da LLA e a primeira punção pode ser um dos motivos associados à ausência de pacientes classificados como SNC 3. Estudo realizado em pacientes pediátricos com LLA, tratados pelo Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG), utilizou protocolo de tratamento que preconizava a primeira punção lombar no oitavo dia do tratamento de indução, após sete dias de uso de corticoide. O objetivo desse intervalo era minimizar o risco de punção traumática com introdução iatrogênica de blastos no SNC. Os autores observaram um menor número de pacientes classificados como SNC 2, SNC 3 e PLT *positiva* ao diagnóstico. Além disso, não foi observado impacto nos resultados do tratamento, não obstante o protocolo utilizado preconizar RT profilática para um grupo restrito de pacientes⁴².

No presente estudo, entretanto, na análise dos pacientes que realizaram a punção lombar com intervalo acima de sete dias, observou-se número mais elevado de exames positivos pela IMF no LCR. Tal fato deve-se, provavelmente, à presença de outros fatores de mau prognóstico encontrados nesse grupo de pacientes.

Nos resultados apresentados observou-se associação da positividade do LCR pela técnica de IMF com pior probabilidade de SGLO e SLE. O tamanho da amostra e o curto período de seguimento são uma limitação da análise de sobrevida neste estudo. Não foi possível avaliar o impacto da positividade da IMF do LCR nas recidivas em SNC.

Poucos estudos avaliaram o impacto da presença de células leucêmicas no LCR pela IMF na sobrevida dos pacientes com neoplasias hematológicas^{28,29,30,31}. Liang e colaboradores avaliaram o LCR de crianças com diagnóstico de LLA, por meio de CT e IMF, em vários momentos do tratamento. O grupo de pacientes com apenas a IMF positiva ao diagnóstico da LLA foi subdividido, para receber diferentes abordagens na profilaxia do SNC: 34 receberam doses habituais de quimioterapia intratecal, enquanto os 45 restantes receberam doses adicionais. Nenhum paciente foi submetido a RT. Observou-se melhor SGLO e menor risco de recidiva em SNC no grupo de pacientes que recebeu doses extras de quimioterapia intratecal³⁰. Martinez-Laperche e colaboradores também avaliaram o LCR de pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA utilizando as técnicas de CT e IMF, em diversos momentos do tratamento. Dentre os pacientes com IMF positiva no LCR ao diagnóstico, não foi observado maior risco de recidiva ou óbito. Já os pacientes que apresentaram IMF positiva durante o tratamento, especialmente na fase de manutenção, apresentaram pior SLE e tendência a pior SGLO²⁹. Outro estudo, realizado em pacientes menores de 18 anos de idade, ao diagnóstico da LLA, observou pior SLE e uma tendência a pior SGLO nos pacientes que apresentaram LCR com contagem de leucócitos $< 5/\mu\text{L}$ e presença de blastos identificados pela CT e/ou IMF. Os autores observaram, também, maior incidência acumulada de recidiva nos pacientes com apenas a IMF positiva do LCR, quando comparados com os pacientes classificados como SNC1³¹. No entanto, deve-se ressaltar que o método de Kaplan-Meier, utilizado pelos pesquisadores, não é o mais adequado para avaliar a incidência acumulada⁴³.

O presente estudo avaliou o LCR apenas no momento do diagnóstico da LLA ou da recidiva da doença. A IMF é uma técnica que envolve custos mais elevados quando comparada à CT. A utilização desta técnica para avaliação periódica do LCR nas punções lombares de todos os pacientes pode ser inviável, especialmente em centros de tratamento com recursos financeiros mais escassos. A identificação dos melhores momentos durante o tratamento para a sua aplicação se faz necessária, por meio de novos estudos.

Os resultados apresentados, em conjunto com outros dados da literatura, sugerem que a IMF do LCR pode ser método auxiliar de grande valia em complementação à análise citológica de infiltração do SNC na LLA. Adicionalmente ao aumento na detecção de amostras positivas, o resultado da IMF é rápido, permitindo adequações no protocolo de tratamento. O impacto da IMF positiva do LCR ao diagnóstico, na SLE e SGLO, observados neste estudo merece ser reavaliado em uma população maior e por período de seguimento mais prolongado.

REFERÊNCIAS

1. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2013; 381(9881): 1943-55.
2. Pui CH, Thiel E. Central Nervous System Disease in Hematological Malignances: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol* 2009; 36 (Suppl 2): S2-S16.
3. Hutchison JH, Hardisty RM, Bagshawe KD, Bridges JM, Butler N, Deasy PF, et al. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukaemia: Effect of "Prophylactic" Therapy against Central Nervous System Leukaemia. *British Medical Journal*, 1973, 2, 381-384.
4. Gassas A, Krueger J, Alvi S, Sung L, Hitzler J, Lieberman L. Diagnosis os central nervous system relapse of pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of routine cytological CSF analysis at time of intrathecal chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61: 2215-2217
5. Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin N Am* 2008; 55:1–20.
6. Simone JV. History of the treatment of childhood ALL: A paradigm for cancer cure. *Best Practice & Research Clinical Haematology* Vol. 19, No. 2, pp. 353–359, 2006.
7. Richards S, Pui CH, Gayon P. Systematic review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60: 185-195.
8. Manera R, Ramirez I, Mullins J, Pinkel D. Pilot studies of species-specific chemotherapy of childhood acute lymphoblastic leukemia using genotype and immunophenotype. *Leukemia* 2000; 14: 1354–1361.
9. Pui, CH, Campana, D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Prophylactic Cranial Irradiation. *N Engl J Med*. 2009; 360(26): 2730–2741.
10. Veerman AJ, Kamps WA, van den Berg H, van den Berg E, Bökkerink JPM, Bruin MCA, et al. Dexamethasone-based therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the retrospective Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) protocol ALL-9 (1997–2004). *Lancet Oncol* 2009; 10: 957–66.
11. Vilmer E, Suciú S, Ferster A, Bertrand Y, Cavé H, Thyss A, et al. Long-term results of three randomized trials (58831, 58832, 58881) in childhood acute lymphoblastic leukemia: a CLCG-EORTC report. *Leukemia* 2000; 14: 2257–2266.
12. Sirvent N, Suciú S, Rialland X, Millot F, Benoit Y, Plantaz D, et al. Prognostic significance of the initial cerebro-spinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children Leukemia Group study 58881. *European Journal of Cancer* 2011; 47: 239-247.
13. Sayed D, Bradrawy H, Ali AM, Shaker S. Immunophenotyping and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement analysis in cerebrospinal fluid of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* 2009; 655-661.
14. Ahluwalia MS, Wallace PK, Peereboom DM. Flow Cytometry as a Diagnostic Tool in Lymphomatous or Leukemic Meningitis. *Ready for Prime Time? Cancer*; DOI: 10.1002/cncr.26335
15. Crespo-Solis E, López-Karpovitch X, Higuera J, Vega-Ramos B. Diagnosis of Acute Leukemia in Cerebrospinal Fluid (CSF-Acute Leukemia). *Curr Oncol Rep* (2012) 14:369–378.
16. Galati D, Di Noto R, Del Vecchio L. Diagnostic strategies to investigate cerebrospinal fluid involvement in haematological malignancies. *Leuk Res* 2013;37:231-237.
17. Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, Matsuda EI, Otubo R, Yunes JA, et al. Benefits of the Intermittent Use of 6-Mercaptopurine and Methotrexate in Maintenance Treatment for Low-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia in Children: Randomized Trial From the

- Brazilian Childhood Cooperative Group—Protocol ALL-99. *J Clin Oncol* 2010; DOI: 10.1200/JCO.2009.25.6115
18. Finn WG, Peterson LC, James C, Goolsby CL. Enhanced detection of malignant lymphoma in cerebrospinal fluid by multiparameter flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology* 1998; 110: 341-346.
 19. French CA, Dorfman DM, Shaheen G, Cibas ES. Diagnosing Lymphoproliferative Disorders Involving the Cerebrospinal Fluid: Increased Sensitivity Using Flow Cytometric Analysis. *Diagnostic Cytopathology* 2000; 23 (6): 369-374.
 20. Subirá D, Castañón S, Román A, Aceituno E, Jiménez-Garófano C, Jiménez A, et al. Flow cytometry and the study of central nervous disease in patients with acute leukemia. *British Journal of Haematology* 2001; 112: 381-384.
 21. Roma AA, García A, Avagnina A, Rescia C, Elsner B. Lymphoid and myeloid neoplasms involving cerebrospinal fluid: comparison of morphologic examination and immunophenotyping by flow cytometry. *Diagn Cytopathol.* 2002;27:271–5.
 22. Hegde U, Filie A, Little RF, Janik JE, Grant N, Steinberg SM, et al. High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood* 2005; 105(2): 496-502.
 23. Nückel H, Novotny JR, Noppney R, Savidou I, Dührsen U. Detection of malignant haematopoietic cells in the cerebrospinal fluid by conventional cytology and flow cytometry. *Clin Lab Haem* 2006; 28: 22-29.
 24. Bromberg JEC, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der Holt B, Sillevs Smitt P, et al. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology* 2007; 68: 1674-1679.
 25. Di Noto R, Scalia G, Abate G, Gorrese M, Pascariello C, Raia M, et al. Critical role of multidimensional flow cytometry in detecting occult leptomeningeal disease in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas. *Leukemia Research* 32 (2008) 1196–1199.
 26. Quijano S, Lopez A, Sancho JM, Panizo C, Deben G, Castilla C, et al. Identification of Leptomeningeal Disease in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Improved Sensitivity of Flow Cytometry. *J Clin Oncol*, 2009. DOI: 10.1200/JCO.2008.17.7089
 27. Craig FE, Ohori NP, Gorrill TS, Swerdlow SH. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Am J Clin Pathol* 2011;135(1):22–34.
 28. Alvarez R, Dupuis J, Plonquet A, Christov C, Copie-Bergman C, Hemery F, et al. Clinical relevance of flow cytometric immunophenotyping of the cerebrospinal fluid in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol* 2012;23(5):1274–9.
 29. Martinez-Laperche C, Gomez-Garcia AM, Lassaletta A, Moscardo C, Vivanco JL, Molina J, et al. Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am. J. Hematol.* 88:359–364, 2013.
 30. Liang Y, Ca Q, Zhai ZM, Wang NL. A Practical Strategy of Monitoring Minimal Residue Disease and Intervention for Central Nervous System Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Single Chinese Center's Experience. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35 (5):388-393.
 31. Ranta S, Nilsson F, Harila-Saari A, Saft L, Tani E, Söderhäll S, et al. Detection of Central Nervous System Involvement in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Cytomorphology and Flow Cytometry of the Cerebrospinal Fluid. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62:951–956.
 32. Brem SS, Black P, Brem H, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Central nervous system cancers. V.1.2008 ed: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/cns.pdf
 33. Schinstine M, Filie AC, Wilson W, Stetler-Stevenson M, Abati A. Detection of malignant hematopoietic cells in cerebral spinal fluid previously diagnosed as atypical or suspicious. *Cancer (Cancer Cytopathology)* 2006; 108(3): 157-162.

34. Cancela CSP, Murao M, Souza MEL, Barcelos JM, Furtado VM, Silva ML, et al. Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia: diagnosis by immunophenotyping. *J Bras Patol Med Lab*, 2013; 49 (4): 260-263.
35. Bürger B, Zimmermann M, Mann G, Kühl J, Löning L, Riehm H, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21:184-188.
36. Gajjar A, Harrison PL, Sandlund JT, et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in 146 American Society of Hematology childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 3381-3384.
37. Rech A, Carvalho GP, Meneses CF, Hankins J, Howard S, Brunetto AL. The influence of traumatic lumbar puncture and timing of intrathecal therapy on outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Hematology and Oncology* 2005; 22:483-488.
38. Te Loo DM, Kamps WA, van der Does-van den Berg A, van Wering ER, Graaf SSN. Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: experience of the Dutch Childhood Oncology Group. *Journal Clinical Oncology* 2006; 24(15): 2332-2336.
39. Shaikh F, Voicu L, Tole S, To T, Doria AS, Sung L, Alexander S. The risk of traumatic lumbar punctures in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2014; 50(8):1482-1489.
40. Pui CH. Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. *Hematology* 2006; 142-146.
41. Jastaniah W, Elimam N, Abdalla K, Khattab TM, Felimban S, Abrar MB. Does the early intensification of intrathecal therapy improve outcomes in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients with CNS2/TLP+ status at diagnosis? *Hematology* 2015; DOI: <http://dx.doi.org/10.1179/1607845415Y.0000000020> .
42. Hasegawa D, Manabe A, Ohara A, Kikuchi A, Koh K, Kiyokawa N, et al. The utility of performing the initial lumbar puncture on day 8 in remission induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: TCCSG L99-15 study. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 58: 23-30.
43. Viana MB, Oliveira BM, Cancela CSP. Kaplan-Meier method is inappropriate for estimating cumulative incidence of graft-versus-host disease in the presence of competing events. *Am J Hematol*. 2010; 85(6): 458-9. Comment in: *Am J Hematol*. 2008; 83(7):528-30.

5.3. ARTIGO ORIGINAL:

O terceiro artigo refere-se à análise dos resultados da avaliação do LCR pela PCR e comparação dos resultados com a CT e a IMF e, análise de probabilidade de sobrevida.

Avaliação da reação em cadeia da polimerase como método complementar de análise do líquido cefalorraquidiano em crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença de rearranjos nos genes da imunoglobulina (Ig) e do receptor de células T (TCR), identificados previamente na medula óssea (MO) dos pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA), por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) no líquido cefalorraquidiano (LCR) ao diagnóstico inicial ou da recidiva da doença. Foram avaliadas 46 amostras de LCR de 44 pacientes com LLA coletadas ao diagnóstico inicial (n=38) ou à recidiva da doença (n=8), por três métodos: citologia (CT), imunofenotipagem (IMF) e PCR. Em 12 amostras (26%), o gene controle da PCR (FLT3) não amplificou. Todas as amostras foram analisadas pela CT, 44 pela IMF e 34, pela PCR (destas, 14 foram também avaliadas pela PCR quantitativa em tempo real – RQ-PCR). Treze (28,2%) amostras foram positivas por, pelo menos, um dos métodos: 2 apenas pela CT; 4 apenas pela IMF; 4 apenas pela PCR e 3, pela IMF e PCR. Não foi observada concordância entre os métodos. O resultado positivo da PCR no LCR não foi associado a fatores de risco para recidiva da LLA (idade, grupo de risco, contagem de leucócitos ao diagnóstico, imunofenótipo e alterações citogenéticas/moleculares na MO). O único fator associado à pior probabilidade de sobrevida global (SGLO) no grupo de pacientes incluídos ao diagnóstico inicial foi a IMF do LCR positiva ao diagnóstico ($p=0,002$). Para a SLE, a IMF e a PCR positivas do LCR ao diagnóstico foram as únicas variáveis associadas a pior prognóstico ($p=0,006$ e $p=0,048$, respectivamente). Os resultados das análises de sobrevida não permitem conclusões definitivas e merecem ser abordados em novos estudos.

Palavras chaves: leucemia linfóide aguda, sistema nervoso central, líquido cefalorraquidiano, reação em cadeia da polimerase, diagnóstico.

**Use of the polymerase chain reaction as an additional method for
detecting central nervous system disease in children and adolescents
with acute lymphoblastic leukemia**

Abstract

This study aimed at evaluating the use of the polymerase chain reaction (PCR) in the assessment of the cerebrospinal fluid (CSF) for the presence of previously identified immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) gene rearrangements in the leukemic blast cells from the bone marrow (BM) at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia (ALL). A total of 46 CSF samples from 44 patients aged up to 18 years old with ALL were included, 38 of which were obtained at initial diagnosis and 8, at relapse. In this analysis, three techniques were applied: cytology (CT), immunophenotyping (IMP), and PCR. In 12 (26%) samples, the control gene (FLT3) was not amplified. Cytological analysis was performed in all of the samples, whereas IMP was done in 44 of them and PCR, in 34 (amongst these, 14 samples were also tested using real time quantitative PCR – RQ PCR). Thirteen (28.2%) samples displayed positive results: two by CT alone, four by IMP alone, four by PCR alone, and three by both IMP and PCR. There were no matched results between the different methods. Positive CSF PCR results were not associated with tested risk factors for relapse of ALL (age, risk group, leukocyte count at diagnosis, immunophenotype and cytogenetic/molecular abnormalities in BM). Positive CSF IMP at initial diagnosis was the sole factor associated with worse overall survival, $p=0.002$. With regard to event-free survival, CSF IMP and PCR positivity at diagnosis were the only variables found to be associated with worse prognosis ($p=0.006$ and $p=0.048$, respectively). The results observed in these survival analyses do not allow definitive conclusions and should, therefore, be approached in further studies.

Key words: acute lymphoblastic leukemia; central nervous system; cerebrospinal fluid; polymerase chain reaction, diagnosis.

5.3.1. INTRODUÇÃO

A infiltração do sistema nervoso central (SNC) ao diagnóstico da leucemia linfóide aguda (LLA) influencia o prognóstico e o tratamento dos pacientes (LEVINSEN *et al*, 2014; PUI *et al*, 2009; RICHARDS *et al*, 2013). A avaliação citológica do líquido cefalorraquidiano (LCR) ainda é o método mais utilizado na detecção de infiltração pelos diversos centros de tratamento (PUI *et al*, 2009, CRESPO-SOLIS *et al*, 2012). Entretanto, sabe-se que a citologia (CT) não é o ideal, já que os linfócitos no LCR podem apresentar aspecto atípico à morfologia, o que pode dificultar a distinção entre um linfócito maduro e uma célula leucêmica (BOROWITZ *et al*, 1981; CRESPO-SOLIS *et al*, 2012; GALATI *et al*, 2013; GLASS *et al*, 1979).

Vários recursos diagnósticos são utilizados, em associação à análise morfológica, para distinguir as células leucêmicas das demais na medula óssea (MO). São eles, a imunofenotipagem (IMF) e a biologia molecular, em especial as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (CAMPANA *et al*, 2009; INABA *et al*, 2013). A IMF e a PCR têm sido estudadas também como métodos adicionais na avaliação do LCR nas neoplasias hematológicas, com resultados promissores (CRESPO-SOLIS *et al*, 2012, GALATI *et al*, 2013, SAYED *et al*, 2009).

Na LLA, a PCR pode ser usada para detectar as células leucêmicas portadoras de transcritos de fusão, tais como ETV6-RUNX1 (TEL-AML1), MLL-AF4 e outros rearranjos MLL ou BCR-ABL1, alterações essas que estão presentes em aproximadamente 30% dos pacientes (INABA *et al*, 2013, PUI *et al*, 2012). Alternativamente, pode-se utilizar como marcadores da leucemia os rearranjos formados pela junção de segmentos V (variável), D (diversidade) e J (junção) que ocorrem nos genes da imunoglobulina (Ig) e do receptor de células T (TCR) no processo de maturação dos linfócitos B e T (GALOIN *et al*, 1997, RHODES *et al*, 1995). Os rearranjos clonais da Ig ocorrem em quase 100% das LLA B e os do TCR, em mais de 90% das LLA T e em cerca de 50% das LLA B (SZCZEPAŃSKI *et al*, 1999, SZCZEPAŃSKI *et al*, 2000).

Nos protocolos atuais de tratamento da LLA, faz-se uma análise desses rearranjos na MO ao diagnóstico para se definir marcadores a serem utilizados no monitoramento da doença residual mínima (DRM). Os rearranjos detectados na MO podem ser testados no LCR para se avaliar a presença de infiltração no SNC. Para tal,

podem ser utilizadas a PCR convencional ou a PCR quantitativa em tempo real (RQ-PCR) (BIOJONE *et al*, 2012; SCRIDELI *et al*, 2003; PINE *et al*, 2005; SAYED *et al*, 2008; HAAS *et al*, 2002; GALOIN *et al*, 1997). Todavia, ainda não existem recomendações para uso rotineiro destas técnicas no estudo do LCR na LLA.

No presente estudo, foram utilizadas técnicas de PCR para detecção de clonalidade no LCR ao diagnóstico ou à recidiva da doença em crianças e adolescentes com LLA. Os resultados da PCR foram comparados com outros métodos utilizados para avaliação do LCR, quais sejam: CT e IMF.

5.3.2. METODOLOGIA

Pacientes

A população estudada consistiu de pacientes com idade até 18 anos, com diagnóstico recente de LLA, admitidos no Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG), no período de novembro de 2011 a novembro de 2014, submetidos aos protocolos de tratamento do Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemia na Infância (GBTLI): LLA 99 (BRANDALISE *et al*, 2010) e 2009. Também foram incluídos os pacientes, dentro da mesma faixa etária, tratados inicialmente com os referidos protocolos e que apresentaram recidiva (medular e/ou extramedular) da doença no mesmo período. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP – UFMG/CAAE-0284.0.203.000-11). Para a inclusão dos pacientes em acompanhamento na instituição, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aos pais ou responsáveis.

Foram analisados os seguintes dados, extraídos dos prontuários médicos e registros laboratoriais: idade ao diagnóstico, sexo, imunofenótipo, alterações citogenéticas e moleculares, DRM na MO por IMF (definida como negativa se $< 10\%$, no 15º dia de tratamento), grupo de risco (baixo risco: idade ≥ 1 ano e < 9 anos, contagem de leucócitos ao diagnóstico $< 50.000/\text{mm}^3$, < 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico no 8º dia de tratamento, DRM na MO por IMF negativa no 15º dia de tratamento, DRM na MO por PCR $< 10^{-3}$ - para LLA B derivada - e $< 10^{-2}$ - para LLA T derivada - no 35º dia de tratamento e ausência de citogenética de risco – t(9;22) e t(4;11) e/ou hipodiploidia), data e local de realização da primeira punção lombar, data e local da primeira recidiva, data e

causa do óbito, situação da criança no momento da análise dos dados (vivo e em remissão, nova recidiva ou óbito).

Protocolo de tratamento

Para tratamento e profilaxia do SNC, o protocolo GBTLI-LLA 99, preconizava a utilização de quimioterapia intratecal tripla (MADIT), com metotrexate, citarabina e dexametasona e, a radioterapia (RT), apenas para os pacientes com acometimento do SNC ao diagnóstico. Para o protocolo GBTLI LLA 2009, manteve-se o MADIT e ampliou-se a indicação da RT. Além dos pacientes com acometimento do SNC ao diagnóstico, a RT foi indicada para os pacientes com contagem de leucócitos ao diagnóstico $\geq 100.000/\text{mm}^3$ e/ou classificados como respondedores lentos (≥ 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico no 8º dia de tratamento e/ou DRM positiva no 15º dia de tratamento e/ou no 35º dia de tratamento).

Conforme orientação do protocolo GBTLI-LLA, para todos os pacientes ao diagnóstico de LLA foi realizado o exame citológico do LCR para pesquisa de blastos. A coleta do LCR deveria ser realizada no primeiro dia de tratamento. Para todos os pacientes, a punção lombar foi realizada no bloco cirúrgico, sob sedação, por membros da equipe com maior experiência. Para os pacientes com contagem de plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$, foi realizada transfusão de plaquetas antes do procedimento. Para pacientes incluídos no estudo, quando possível, eram coletados 5 ml de LCR, distribuídos da seguinte forma: 1 ml para citologia; 3 ml para realização da IMF e 1 ml foi congelado a -80°C para realização da PCR, posteriormente.

A classificação do LCR, de acordo com a avaliação citológica, foi: SNC 1 – punção lombar não traumática, ausência de blastos; SNC 2 – punção lombar não traumática, contagem de leucócitos $< 5/\mu\text{L}$, presença de blastos; SNC 3 – punção lombar não traumática, contagem de leucócitos $\geq 5/\mu\text{L}$, presença de blastos; PLT *negativa* – punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μL), ausência de blastos; PLT *positiva* – punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μL), presença de blastos. No protocolo GBTLI-LLA, o envolvimento do SNC pela leucemia é definido como SNC3 ou por infiltrados intracerebrais detectados por técnica de imagem ou por acometimento de pares cranianos ou, ainda, pela presença de massa dentro da medula espinhal, identificada por técnica de imagem.

A metodologia da IMF foi descrita por Cancela e colaboradores, 2015. Para a IMF, a detecção de cluster com número ≥ 10 células com o mesmo perfil imunofenotípico da MO foi considerada como positiva para infiltração no SNC (QUIJANO *et al*, 2009).

Não foi realizada nenhuma modificação no protocolo de tratamento, em função do resultado positivo no LCR pelos métodos de IMF e PCR.

PCR do LCR

EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com Biojone e colaboradores, 2009. As amostras foram descongeladas a 4-8°C por 40 minutos. Após descongelamento, foi realizada centrifugação a 13200 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado, com pipeta. Adicionaram-se ao tubo 25 μ L de H₂O milli-Q. Foi realizado aquecimento da amostra em bloco térmico a 94°C por 10 minutos e, após este procedimento, as amostras foram colocadas em geladeira por 18 horas.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A detecção de rearranjos clonais na MO ao diagnóstico foi realizada por metodologia definida pelo grupo de Biologia Molecular do GBTLI (YUNES *et al*, comunicação pessoal, Centro Infantil Boldrini, Campinas/SP), tendo sido adaptada a partir da metodologia do grupo BIOMED (VAN DONGEN *et al*, 2003; PONGERS-WILLEMSE *et al*, 1999). O DNA da amostra de MO foi amplificado utilizando 19 mixes de *primers* consenso que flanqueiam as regiões dos rearranjos dos genes *Ig* e *TCR*, de acordo com o subtipo de LLA. Para as crianças com LLA de linhagem B, essa triagem inicial foi feita utilizando pares de *primers* para os rearranjos completos e incompletos dos genes *IgH* (VH-(DH)-JH, DH-JH), *IgK* (Vk-Kde, Intron-Kde), *TCRG* (Vg-Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2.1) e *TCRD* (Vd2-Dd3, Dd2-Dd3). Para as crianças com LLA-T, foram testados os rearranjos completos e incompletos dos genes *IgH* (DH-JH), *TCRG* (Vg-Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2.1), *TCRD* (Vd-(Dd)-Jd1, Dd2-Jd1, Vd2-Dd3, Dd2-Dd3) e a microdeleção nos genes *SIL-TAL* (SIL-TAL1, SIL-TAL2). Os rearranjos identificados na MO de cada paciente ao diagnóstico foram escolhidos para pesquisa de células clonais no LCR.

Para cada reação de PCR no LCR, utilizaram-se 6 μ L do DNA extraído. Nas amostras em que não houve amplificação, a integridade do DNA no material examinado

foi testada pela amplificação do gene *FLT3* (MESHINCHI *et al*, 2001). As reações de PCR foram realizadas no termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*). Foi utilizado um controle negativo sem DNA, e um controle de amplificação inespecífica contendo DNA de doadores sem doença hematológica (PBL). Após a PCR, foi realizada análise de homo/heterodúplex para caracterização da clonalidade, adaptada a partir de Langerak (1997), descrito por Assumpção. (ASSUMPCÃO *et al*, 2010).

Em função de estudo concomitante de DRM preconizado pelo GBTLI-LLA-2009, para alguns pacientes havia disponibilidade de *primers* específicos desenhados para as regiões de junção V-D-J identificados no clone leucêmico na MO ao diagnóstico. Nos pacientes nos quais estes *primers* estavam disponíveis, o LCR foi testado pela RQ-PCR. Para o RQ-PCR, além do *primer* clone-específico desenhado, foram escolhidos no banco de dados do GBTLI-2009 outro *primer* (senso ou anti-senso, dependendo do rearranjo) e a sonda TaqMan (*Applied Biosystems*). A metodologia para amplificação, normalização e análise dos dados dos RQ-PCR para os rearranjos foi descrita por Paula *et al*. (PAULA, 2015).

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa *Social Program Statistics Science* (SPSS), versão 20.0. O coeficiente kappa foi utilizado para análise de concordância entre os métodos de avaliação do LCR. A análise de possíveis associações entre as variáveis do estudo e os resultados da PCR do LCR foi realizada pelo teste Qui-quadrado de Pearson exato (para variáveis categóricas) e teste Mann-Whitney (para variáveis contínuas). Para a análise de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meyer. Pacientes que não apresentaram nenhum evento (óbito ou recidiva) foram censurados na data da análise. O teste de log-rank foi utilizado para comparação das curvas de sobrevida. Para análise multivariada foi utilizado o modelo de regressão de Cox. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

5.3.3. RESULTADOS

No período estudado foram diagnosticados 55 casos novos de LLA e 12 casos de recidiva da doença. Todos os pacientes incluídos ao diagnóstico inicial foram tratados pelo protocolo GBTLI-LLA 2009, exceto um, tratado pelo GBTLI-LLA 99. As

características clínicas dos pacientes incluídos ao diagnóstico inicial estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1: Características clínicas dos 55 pacientes incluídos ao diagnóstico inicial de leucemia linfóide aguda

| Características | Pacientes incluídos (n=55) número (%) | Pacientes nos quais foi realizada a PCR (n=38) número (%) |
|--|--|--|
| Sexo | | |
| Masculino | 28 (51) | 19 (50) |
| Feminino | 27 (49) | 19 (50) |
| Total | 55 (100) | 38 (100) |
| Idade ao diagnóstico inicial | | |
| < 2 anos | 1 (1,8) | 1 (2,6) |
| 2 a 9 anos | 40 (72,7) | 26 (68,4) |
| ≥ 10 anos | 14 (25,4) | 11 (28,9) |
| Total | 55 (100) | 38 (100) |
| Grupo de risco para recidiva | | |
| Baixo risco (BR) | 16 (29) | 9 (23,6) |
| Alto risco (AR) | 39 (71) | 29 (76,3) |
| Total | 55 (100) | 38 (100) |
| Contagem de leucócitos ao diagnóstico inicial | | |
| < 10.000/mm ³ | 31 (57,4) | 24 (63,1) |
| 10.000/mm ³ a < 50.000/mm ³ | 11 (20,4) | 6 (15,8) |
| ≥ 50.000/mm ³ | 12 (22,2) | 8 (21,1) |
| Total | 54 (100) | 38 (100) |
| Imunofenotipagem | | |
| B | 45 (81,8) | 32 (84,2) |
| T | 9 (16,3) | 6 (15,8) |
| Bifenotípica | 1 (1,8) | 0 (0) |
| Total | 55 (100) | 38 (100) |
| Citologia do LCR | | |
| SNC 1 | 35 (63,6) | 24 (63,2) |
| SNC 2 | 0 (0) | 0 (0) |
| SNC 3 | 0 (0) | 0 (0) |
| PLT <i>negativa</i> | 18 (32,7) | 14 (36,8) |
| PLT <i>positiva</i> | 0 (0) | 0 (0) |
| Inconclusiva | 2 (3,6) | 0 (0) |
| Total | 55 (100) | 38 (100) |

LCR: líquido cefalorraquidiano; SNC 1: punção lombar não traumática, ausência de blastos; SNC 2: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos < 5/μL, presença de blastos; SNC 3: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos ≥ 5/μL, presença de blastos; PLT *negativa*: punção lombar traumática (≥10 hemácias/μL), ausência de blastos; PLT *positiva*: punção lombar traumática e presença de blastos; INC: inconclusiva

Em 12 (17,9%) dos 67 pacientes não houve volume suficiente de LCR para realização da PCR (o volume coletado foi destinado prioritariamente à análise citológica de rotina e à imunofenotipagem). Dos 55 pacientes restantes, em 11 a PCR não foi realizada, pois não havia MO do diagnóstico disponível para pesquisa de rearranjo (n=9), ou não foi identificado rearranjo (n=2). Nos demais 44 pacientes foi realizada a PCR convencional e, em 16 destes foi feita também a RQ-PCR (Figura 1).

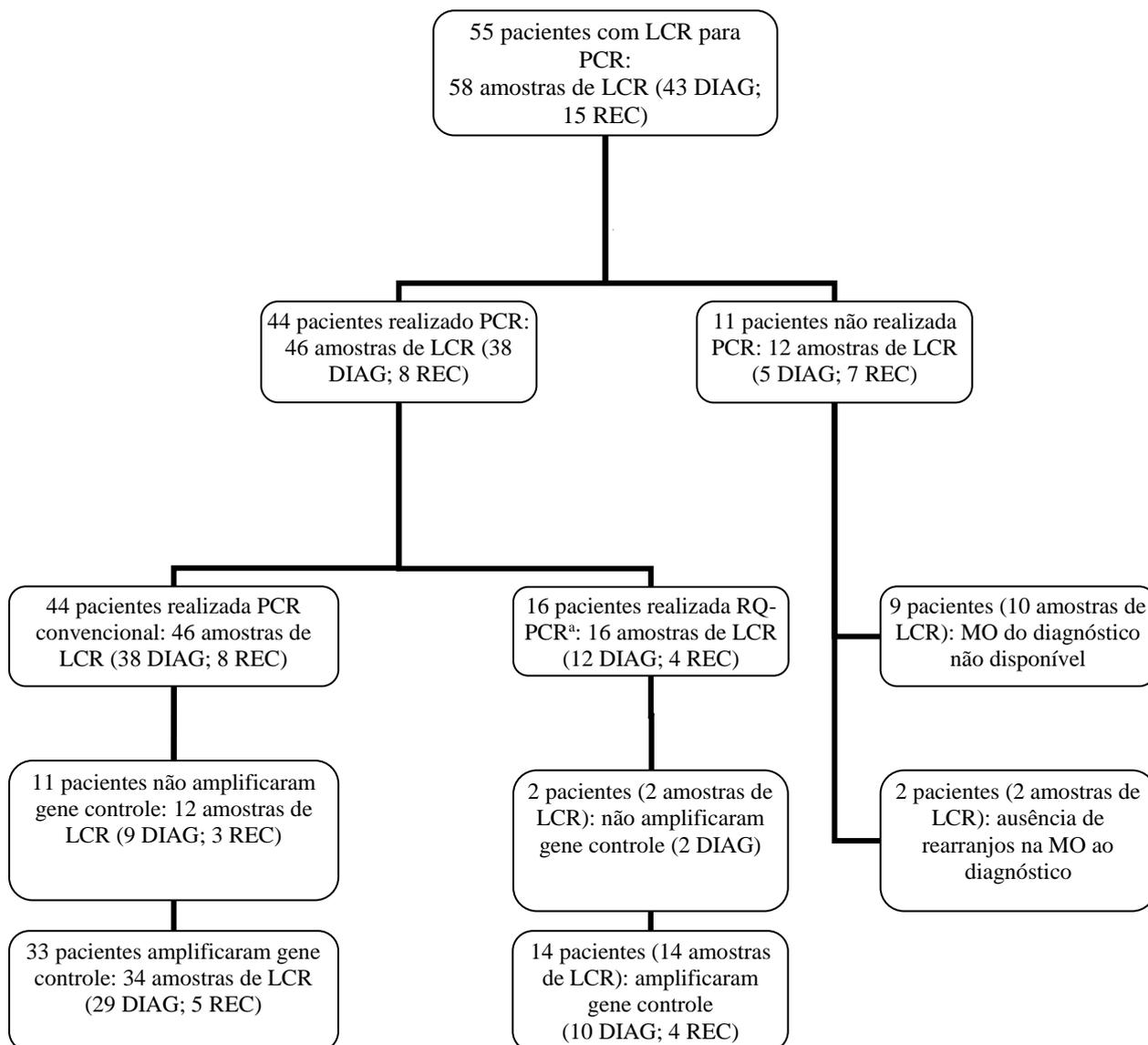


Figura 1: Fluxograma dos pacientes e amostras de LCR incluídos para a PCR

^a dos 44 pacientes nos quais a PCR convencional foi realizada, em 16 foi realizada, também, a RQ-PCR.
DIAG: diagnóstico inicial; REC: recidiva medular e/ou extramedular

Para a PCR convencional foram processadas 46 amostras de LCR dos 44 pacientes (dois pacientes incluídos ao diagnóstico tiveram o LCR incluído também à recidiva da doença). Em 12 amostras (26%) o gene controle (FLT3) não amplificou. Nas 34 amostras restantes, sete (20,6%) apresentaram resultado positivo para a presença dos mesmos rearranjos identificados na MO ao diagnóstico da LLA (Figura 2). Os sete pacientes apresentaram imunofenótipo B. Apenas uma das sete amostras foi coletada à recidiva e as outras seis ao diagnóstico inicial.



Figura 2: Resultados da PCR de três pacientes com LLA: amostras de medula óssea e líquido cefalorraquidiano.

Paciente 1: MO2400 e LCR 24; Paciente 2: MO 3272 e LCR 30; Paciente 3: MO 2196 e LCR 34. No paciente 1 observa-se o mesmo padrão de migração da MO no LCR, compatível com resultado positivo para a pesquisa de blastos.

Dentre os resultados positivos, em um paciente foi observada uma amplificação fraca num único rearranjo; outros três pacientes tiveram resultado divergente entre os dois rearranjos testados (VH3 positivo versus V2D3 negativo em dois pacientes; VGI positivo versus V2D3 negativo no terceiro).

A RQ-PCR foi realizada em 16 pacientes. Em dois, não ocorreu amplificação do gene controle. Das 14 amostras restantes, apenas uma (7,1%) foi positiva. A sensibilidade dos *primers* da RQ-PCR variou entre 10^{-3} e 10^{-4} .

A CT foi realizada em todas as 46 amostras e apenas duas (4,3 %) foram consideradas positivas para a presença de blastos, uma classificada como PLT *positiva* e a outra como SNC 2.

A IMF foi realizada nas 46 amostras, porém em duas não foram recuperadas células para análise. Das 44 amostras restantes, 7 (15,9%) foram consideradas positivas para a presença de blastos.

Das 46 amostras incluídas, 17 (37%) foram traumáticas (o número de hemácias variou de 19 a 4350/ μ L – mediana de 49/ μ L). Observou-se um atraso na coleta do LCR,

superior a 7 dias do diagnóstico ou da recidiva da LLA, em 17 (37%) amostras incluídas.

A Tabela 2 mostra os resultados das amostras positivas pelos 4 métodos testados (CT, IMF, PCR convencional e RQ-PCR).

Tabela 2: Amostras de líquido cefalorraquidiano positivas para a presença de blastos em pelo menos um dos quatro métodos testados em 44 pacientes com leucemia linfóide aguda

| Paciente | Coleta LCR | Citologia | IMF | PCR | RQ-PCR |
|----------|------------|------------------|-----|------------------|--------|
| 14 | DIAG | NEG | POS | NEG | NR |
| 18 | DIAG | NEG | POS | POS | NR |
| 21 | DIAG | NEG | POS | NEG | NEG |
| 24 | REC MO | NEG | POS | POS | POS |
| 28 | DIAG | NEG | NEG | POS ^a | NEG |
| 30 | DIAG | NEG | POS | NEG | NEG |
| 32 | DIAG | NEG | POS | NA | NEG |
| 34 | REC MO | POS ^c | NEG | NA | NEG |
| 38 | DIAG | NEG | NEG | POS ^d | NR |
| 41 | DIAG | NEG | NEG | POS ^f | NR |
| 44 | DIAG | NEG | POS | POS | NR |
| 69 | REC MO | POS ^e | NEG | NEG | NR |
| 74 | DIAG | NEG | NEG | POS ^b | NR |

DIAG: diagnóstico inicial; REC MO: recidiva medular; IMF: imunofenotipagem; PCR: reação em cadeia da polimerase convencional; RQ-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; NEG: negativo; POS: positivo; NA: não amplificou gene controle; NR: não realizado. ^aAmplificação fraca, gerou dúvida na avaliação do resultado; ^b Positivo para o rearranjo VH3 e negativo para o V2D3; ^c PLT *positiva*; ^d Positivo para rearranjo VGI (amplificação fraca) e negativo para V2D3; ^e SNC 2; ^f Positivo para o rearranjo VH3 (amplificação fraca) e negativo para o V2D3

Na comparação entre os métodos: CT, IMF e PCR, não foi observada concordância (Tabela 3).

Tabela 3: Análise da concordância entre os métodos de avaliação do líquido cefalorraquidiano ao diagnóstico de leucemia linfóide aguda

| Concordância | Kappa | Valor-p | Classificação |
|--------------|--------|---------|------------------------------|
| IMF x CT | -0,050 | 0,679 | Não há concordância |
| PCR x CT | -0,054 | 0,605 | Não há concordância |
| RQ-PQR x CT | -0,077 | 0,773 | Não há concordância |
| IMF x PCR | 0,325 | 0,064 | Não há concordância |
| IMF x RQ-PCR | 0,323 | 0,101 | Não há concordância |
| PCR x RQ-PCR | 0,600 | 0,064 | Tendência à boa concordância |

IMF: imunofenotipagem; CT: citologia; PCR: reação em cadeia da polimerase convencional; RQ-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

O resultado positivo da PCR no LCR, analisado apenas no grupo de pacientes incluídos ao diagnóstico inicial e com amplificação do gene controle (n=29), não foi associado aos fatores de risco para recidiva da LLA (grupo de risco, contagem de leucócitos ao diagnóstico, idade, imunofenótipo e alterações citogenéticas/moleculares na MO). Também não foi observada associação entre o resultado positivo da PCR no LCR com a presença de punção traumática (p = 0,644) ou de atraso na punção superior a 7 dias do diagnóstico (p = 0,407).

A probabilidade estimada de sobrevida global (SGLO) aos 3 anos para os 55 pacientes incluídos sequencialmente no estudo, ao diagnóstico inicial de LLA, foi de 66,3% (\pm 15,5%). A probabilidade estimada de sobrevida livre de eventos (SLE) foi de 63,4% (\pm 15%). O tempo de seguimento variou de 28 dias a 43 meses (mediana: 24,8 meses).

Para o grupo de pacientes incluídos ao diagnóstico inicial e com amplificação do gene controle (n=29), a probabilidade de SGLO e SLE aos 3 anos foi 60,0% (\pm 18,4) e 58,7% (\pm 17,9), respectivamente. O tempo de seguimento variou de 30 dias a 42,2 meses (mediana – 26,6 meses). O único fator associado à pior probabilidade de SGLO, neste grupo, foi a IMF do LCR positiva ao diagnóstico (p=0,002). Para os pacientes com a IMF do LCR negativa, a probabilidade de SGLO aos 3 anos foi 71,1% (\pm 20,9), para o grupo com a IMF do LCR positiva foi 40,0% (\pm 21,9).

Para os pacientes com a PCR do LCR negativa a probabilidade de SLE aos 3 anos foi 65,1% (\pm 19,5), para o grupo com a PCR do LCR positiva foi 41,7% (\pm 22,2) (Figura 3). Para a SLE, a IMF positiva do LCR também foi associada à pior prognóstico (p=0,006). Os demais fatores avaliados – gênero, idade ao diagnóstico, contagem de leucócitos ao diagnóstico, imunofenótipo, grupo de risco, biologia molecular da MO ao

diagnóstico e atraso da primeira punção superior a 7 dias do diagnóstico – não influenciaram a SLE. Ao se ajustarem todas as variáveis candidatas à análise multivariada, para a SGLO e a SLE, os amplos intervalos de confiança invalidaram o modelo.

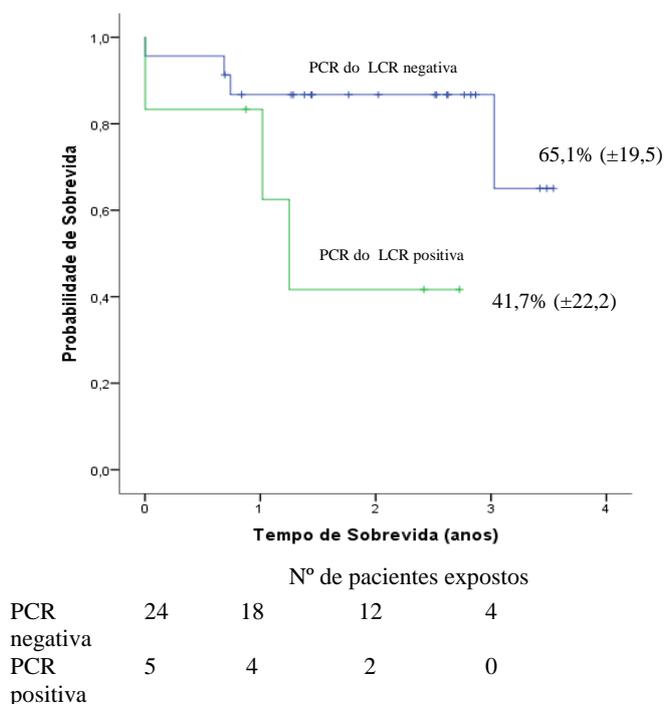


Figura 3: Probabilidade de sobrevivência livre de eventos (SLE) para 29 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com o resultado da PCR do líquido cefalorraquidiano ($p = 0,048$)

5.3.4. DISCUSSÃO

A avaliação do LCR ao diagnóstico da LLA ou da recidiva da doença é essencial para seleção de pacientes que terão maior risco de recidiva no SNC e, conseqüentemente, poderiam beneficiar-se de tratamentos mais intensivos direcionados a este sistema (PUI *et al*, 2006; INABA *et al*, 2013). A citologia do LCR pode ser prejudicada pela escassez de células nesse líquido e pela dificuldade de distinção entre os linfócitos com aspecto reativo e os blastos (CHAMBERLAIN *et al*, 2009; BOROWITZ *et al*, 1981; CRESPO-SOLIS *et al*, 2012; GALATI *et al*, 2013; GLASS *et al*, 1979). Outra questão relaciona-se com a presença de blastos identificados no LCR ao diagnóstico em amostras traumáticas (PLT *positiva*) ou com número de células inferior a $5/\mu\text{L}$ (SNC 2). Alguns autores observaram pior prognóstico para esses pacientes (BURGER *et al*, 2003; GAJJAR *et al*, 2000; MAHMOUD *et al*, 1993),

resultados não confirmados em outros estudos (GILCHRIST *et al*, 1994; Te LOO *et al*, 2006). Os resultados de protocolos atuais sugerem que a intensificação do tratamento pode anular o efeito prognóstico desfavorável das amostras classificadas como SNC 2 e PLT *positiva* (JASTANIAH *et al*, 2015; SIRVENT *et al*, 2011; PUI *et al*, 2003).

Esses aspectos reforçam a importância do diagnóstico correto da infiltração leucêmica no SNC. O presente estudo pretendeu avaliar outras técnicas para análise do LCR na LLA, além da CT convencional. Apesar de possibilitarem maior chance de identificação das células leucêmicas no LCR, as análises por IMF e PCR apresentam desafios metodológicos que podem interferir no sucesso dos exames e devem ser considerados para interpretação dos resultados (CRESPO-SOLIS *et al*, 2012; GALATI *et al*, 2013).

No presente estudo, em 26% das amostras avaliadas pela PCR convencional não ocorreu amplificação do gene controle. Biojone e colaboradores observaram apenas 9% de amostras inadequadas (BIOJONE *et al*, 2012). De forma semelhante à presente casuística, Sayed e colaboradores relataram 33% de amostras nas quais a RQ-PCR não foi realizada devido à inadequação do DNA (SAYED *et al*, 2009). Uma possível justificativa para estes resultados poderia ser a presença de inibidores na reação. Outra hipótese seria uma quantidade de células ou de DNA insuficiente para o exame. A sensibilidade da técnica empregada tem grande impacto no resultado observado. Quando utilizada uma reação com maior sensibilidade, a RQ-PCR, 6 das 12 amostras que não amplificaram o gene controle na PCR convencional apresentaram resultado positivo para o controle.

É possível, ainda, que muitas das amostras avaliadas apresentassem poucas células no LCR em função da coleta tardia. Neste estudo, em 37% dos casos a punção lombar foi realizada com um atraso superior a 7 dias do diagnóstico, quando os pacientes já estavam recebendo tratamento para a LLA. Foi observado que 58,3% (7/12) das amostras nas quais o FLT3 não amplificou foram coletadas após 7 dias do diagnóstico, enquanto 70,6% (24/34) das que amplificaram foram coletadas na primeira semana do diagnóstico. Ressalta-se que não foi observada diferença entre os resultados da PCR do LCR quando analisados os grupos de pacientes com punção realizada no período ≤ 7 dias do diagnóstico ou acima de 7 dias ($p=0,407$).

Outro fator que pode interferir no resultado da PCR é a presença de hemácias no LCR por uma punção lombar traumática. Na literatura não há consenso sobre a inclusão de amostras consideradas traumáticas (≥ 10 hemácias/ μ L de LCR) nas análises pela

PCR (BIOJONE *et al*, 2012; SCRIDELI *et al*, 2003; GALOIN *et al*, 1997; PINE *et al*, 2005; SAYED *et al*, 2009). No presente estudo, não foi observada associação entre as amostras positivas pela PCR e a punção traumática ($p=0,644$).

Assim como relatado na literatura, observou-se uma maior porcentagem de pacientes com células leucêmicas no LCR detectadas utilizando-se a IMF e a PCR, quando comparadas a detecção citológica (BIOJONE *et al*, 2012; SCRIDELI *et al*, 2003; SCRIDELI *et al*, 2004; PINE *et al*, 2005; SAYED *et al*, 2009; HAAS *et al*, 2002; GALOIN *et al*, 1997; MARTINEZ-LAPERCHE *et al*, 2013; LIANG *et al*, 2013). Das 46 amostras avaliadas, 13 (28,2%) foram positivas: 2 apenas pela CT; 4 apenas pela IMF; 4 apenas pela PCR e 3 pela IMF e PCR. Sayed e colaboradores (2009) realizaram estudo semelhante em crianças com LLA e observaram 26 (57,8%) amostras positivas: 10 pela CT; 21 pela IMF e 12 pela RQ-PCR, sendo que apenas 4 amostras foram positivas pelos três métodos. Ressalta-se que no estudo de Sayed *et al*. (SAYED *et al*, 2009), 12 pacientes apresentaram sintomas sugestivos de infiltração do SNC, o que pode ser um dos motivos do maior número de amostras positivas observadas pelos autores.

Comparando-se as metodologias para detectar a presença de células leucêmicas no LCR, não foi observada concordância. Ambas as amostras positivas pela CT foram negativas pelos outros dois métodos (IMF e PCR), o que poderia sugerir um resultado falso-positivo da CT. Dentre as amostras positivas apenas pela PCR, três apresentaram amplificação fraca. Destaca-se que nas três amostras que foram positivas pela IMF e PCR não houve dúvidas na interpretação da amplificação no gel da PCR. A comparação entre a PCR e a RQ-PCR mostrou tendência a concordância, porém o número reduzido de casos amplificados por RQ prejudica esta análise.

Considerando-se apenas a PCR convencional, 20,6% (7/34) das amostras foram positivas. Na literatura a detecção de células leucêmicas no LCR pela PCR convencional mostrou-se superior à avaliação citológica com amostras positivas em até 49,2% dos pacientes ao diagnóstico de LLA (BIOJONE *et al*, 2012). Em outro estudo brasileiro conduzido por Scrideli e colaboradores (2004), observou-se 45,9% de amostras de LCR positivas pela PCR, *versus* 5,4% positivas pela CT, em 37 pacientes avaliados ao diagnóstico de LLA (SCRIDELI *et al*, 2004).

Pine e colaboradores (2005) observaram frequência semelhante (20%) ao presente estudo em 30 pacientes avaliados ao diagnóstico da LLA utilizando apenas a RQ-PCR, sendo que das amostras positivas, apenas uma foi classificada como SNC 3

pela citologia (PINE *et al*, 2005). A RQ-PCR é uma técnica mais sensível, entretanto envolve maior custo e tempo para confecção do *primer* específico, o que implica num período de realização do exame mais longo, que, no caso da avaliação do LCR, pode não ser adequado para determinação de mudanças em condutas terapêuticas em tempo hábil. Como exemplo, no protocolo GBTLI 2009, utilizado neste estudo, para os pacientes classificados como SNC 2 ou PLT *positiva*, a conduta preconizada é a realização de MADIT adicional no 8º dia de indução, quando, mesmo em centros especializados, é inviável obter o *primer* específico para realização da RQ-PCR.

Em relação aos fatores de risco para recidiva na LLA, não foi observada correlação com a PCR do LCR positiva. Conclusões sobre esses achados são limitadas pelo pequeno número de pacientes avaliados (pacientes incluídos ao diagnóstico inicial e com PCR do LCR realizada - n=29).

Além das limitações referentes à metodologia de execução dos exames, outra limitação importante foi o elevado número de perdas das amostras destinadas à PCR. Isso se deveu, provavelmente, ao fato de a PCR do LCR não ser um exame incorporado à rotina da avaliação dos pacientes com LLA e, conseqüentemente, o volume coletado era priorizado para a avaliação citológica e imunofenotípica. Além disso, a pesquisa de rearranjos da Ig e TCR na MO não estava disponível para todos os pacientes incluídos no estudo, pois a técnica estava na fase de implantação no Serviço de Hematologia do HC/UFMG. Também deve ser considerado o curto período de seguimento e o pequeno número de pacientes incluídos. Esses fatores implicam em maior cuidado na interpretação das análises de sobrevida.

A pior probabilidade de SLE foi associada à PCR e à IMF do LCR positivas. Na literatura, poucos estudos avaliaram o impacto da PCR positiva no LCR no prognóstico dos pacientes com LLA. Biojone e colaboradores (2012) observaram pior SLE nos pacientes com PCR do LCR positiva, tratados pelo protocolo GBTLI LLA 93. Quando utilizado um protocolo mais intensivo de tratamento (GBTLI LLA 99), os autores não observaram impacto da PCR na sobrevida (BIOJONE *et al*, 2012).

O presente estudo, assim como a literatura, sugerem que a PCR merece ser considerada na avaliação do LCR ao diagnóstico da LLA, em associação à análise citológica. No estudo apresentado, a PCR apresentou maior capacidade de detecção de células leucêmicas no LCR e, seu resultado, quando positivo, foi associado à uma pior SLE. O impacto da presença de blastos nas amostras com número menor que 5 células/ μ L e a possibilidade destas metodologias adicionais, PCR e IMF, fazerem parte

da seleção de pacientes candidatos a um tratamento mais intensivo para o SNC ainda devem ser estudados em uma população maior e com maior tempo de seguimento.

REFERÊNCIAS

- Assumpção JG, Ganazza MA, de Araújo M, Silva AS, Scrideli CA, Brandalise SR, Yunes JA. Detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia using a low-cost PCR strategy. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55(7):1278-86.
- Biojone ER. Detecção de doença residual mínima através de técnica de PCR em amostras de líquido cefalorraquidiano de crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- Biojone E, Queiróz RP, Valera ET, Odashima NS, Takayanagui OM, Viana MB, et al. Minimal residual disease in cerebrospinal fluid at diagnosis: a more intensive treatment protocol was able to eliminate the adverse prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2012 Jan; 53(1):89-95.
- Borowitz M, Bigner SH, Johnston WW. Diagnostic problem in the cytologic evaluation of cerebrospinal fluid for lymphoma and leukemia. *Acta Cytol.* 1981;25: 665–74.
- Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, Matsuda EI, Otubo R, Yunes JA, et al. Benefits of the Intermittent Use of 6-Mercaptopurine and Methotrexate in Maintenance Treatment for Low-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia in Children: Randomized Trial From the Brazilian Childhood Cooperative Group—Protocol ALL-99. *J Clin Oncol* 2010; DOI: 10.1200/JCO.2009.25.6115
- Bürger B, Zimmermann M, Mann G, Kühl J, Löning L, Riehm H, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21:184-188
- Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009; 46(1): 100–106.
- Chamberlain MC, Glantz M, Groves MD, Wilson WH. Diagnostic tools for neoplastic meningitis: detecting disease, identifying patient risk, and determining benefit of treatment. *Semin Oncol* 2009; 36 (Suppl): S35-S45.
- Crespo-Solis E, López-Karpovitch X, Higuera J, Vega-Ramos B. Diagnosis of Acute Leukemia in Cerebrospinal Fluid (CSF-Acute Leukemia). *Curr Oncol Rep* (2012) 14:369–378.
- Gajjar A, Harrison PL, Sandlund JT, et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in 146 American Society of Hematology childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96: 3381-3384.
- Galati D, Di Noto R, Del Vecchio L. Diagnostic strategies to investigate cerebrospinal fluid involvement in haematological malignancies. *Leuk Res* 2013;37:231-237.

Galoin S, Daste G, Apoil PA, Chollet F, Roda D, Blancher A, et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid of leptomeningeal involvement by B-cell lymphoma and leukaemia: a novel strategy and its implications. *British Journal of Haematology* 1997; 99: 122-130.

Gilchrist GS, Tubergen DG, Sather HN, Coccia PF, O'Brien RT, Waskerwitz MJ, et al. Low numbers of CSF blasts at diagnosis do not predict for the development of CNS leukemia in children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group report. *Journal of Clinical Oncology* 1994; 12: 2594-2600.

Glass JP, Melamed M, Chernik NL, Posner JB. Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. *Neurology* 1979;29:1369-75.

Haas V, Vet RJWM., Verhagen OJHM, Kroes W, van den Berg H, van der Schoot VE. Early detection of central nervous system relapse by polymerase chain reaction in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 2002; 81:59-61.

Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2013; 381(9881): 1943-55.

Jastaniah W, Elimam N, Abdalla K, Khattab TM, Felimban S, Abrar MB. Does the early intensification of intrathecal therapy improve outcomes in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients with CNS2/TLP+ status at diagnosis? *Hematology* 2015; DOI: <http://dx.doi.org/10.1179/1607845415Y.0000000020>.

Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia*. 1997;11(12):2192-9.

Levinsen M, Taskinen M, Abrahamsson J, Forestier E, Frandsen TL, Harila-Saari A, et al. Clinical Features and early treatment response of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61: 1416-1421.

Liang Y, Ca Q, Zhai ZM, Wang NL. A Practical Strategy of Monitoring Minimal Residue Disease and Intervention for Central Nervous System Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Single Chinese Center's Experience. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35 (5):388-393.

Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML, Krance RA, Kun LE, Behm FG, et al. Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine* 1993; 329(5): 314-319.

Martinez-Laperche C, Gomez-Garcia AM, Lassaletta A, Moscardo C, Vivanco JL, Molina J, et al. Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am. J. Hematol* 2013; 88:359-364.

Paula FDF. Estudo prospectivo de doença residual mínima em crianças com leucemia linfóide aguda. 2015. 79p. Tese – (Doutorado em Patologia – Área de concentração: Patologia Geral) – Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Pine SR, Yin C, Matloub YH, Sabaawy HE, Sandoval C, Levendoglu-Tugal O, et al. Detection of central nervous system leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Diagnostics* 2005; 7(1): 127-132.

Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999; 13 (1):110-8.

Pui CH. Toward optimal central nervous system directed treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21(2): 179-181.

Pui CH. Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. *Hematology* 2006; 142-146.

Pui CH, Thiel E. Central Nervous System Disease in Hematological Malignances: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol* 2009; 36 (Suppl 2): S2-S16.

Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012; 120: 1165-1174.

Quijano S, Lopez A, Sancho JM, Panizo C, Deben G, Castilla C, et al. Identification of Leptomeningeal Disease in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Improved Sensitivity of Flow Cytometry. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27 (9): 1462-1469.

Richards S, Pui CH, Gayon P. Systematic review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60: 185-195.

Rhodes CH, Glantz MJ, Glantz L, Lekos A, Sorenson GD, Honsinger C, et al. A comparison of polymerase chain reaction examination of cerebrospinal fluid and conventional cytology in the diagnosis of lymphomatous meningitis. *Cancer* 1996; 77 (3): 543-548.

Sayed D, Bradrawy H, Ali AM, Shaker S. Immunophenotyping and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement analysis in cerebrospinal fluid of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research* 2009; 655-661.

Scrideli CA, Queiroz RP, Takayanagui OM, Bernardes JE, Tone LG. Polymerase Chain Reaction on cerebrospinal fluid in suspected leptomeningeal involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison to cytomorphological analysis. *Diag Molec Pathol* 2003; 12(3): 124-127.

Scrideli CA, Queiroz RP, Takayanagui OM, Bernardes JE, Melo EV, Tone LG. Molecular diagnosis of leukemic cerebrospinal fluid cells in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leucemia. *Hematologica* 2004; 89(8): 1013-1015.

Sirvent N, Suci S, Rialland X, Millot F, Benoit Y, Plantaz D, et al. Prognostic significance of the initial cerebro-spinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children Leukemia Group study 58881. *European Journal of Cancer* 2011; 47: 239-247.

Szczepański T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hählen K, Van Wering ER, Wijkhuijs AJ, Tibbe GJ, De Bruijn MA, Van Dongen JJ. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999;13(2):196-205.

Szczepański T, Langerak AW, Willemse MJ, Wolvers-Tettero IL, van Wering ER, van Dongen JJ. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2000; 14(7):1208-14.

van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, 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*. 2003; 17 (12): 2257-317.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados, aliados à literatura sobre as técnicas de diagnóstico da presença de células leucêmicas no LCR, sugerem que a IMF e a PCR são úteis na avaliação do LCR na LLA.

A realização da pesquisa de blastos no LCR através desses métodos pode aumentar o número de casos positivos, além de esclarecer os casos inconclusivos pela CT.

Os resultados das análises de sobrevida, apesar de sugerirem pior prognóstico para os pacientes com IMF e PCR positivas no LCR ao diagnóstico, não permitem conclusões definitivas e merecem ser abordados em estudos com casuística mais numerosa.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a infiltração do SNC ao diagnóstico da LLA, na maioria dos protocolos de tratamento, não faz parte dos marcadores que classificam os pacientes como de pior prognóstico, mas é importante para determinar quais pacientes seriam candidatos a receber tratamento intensificado para o SNC (como doses adicionais de quimioterapia intratecal e radioterapia).

O presente estudo abre possibilidades para investigações futuras nas quais a IMF e a PCR sejam incorporadas à avaliação do LCR ao diagnóstico da LLA e no seguimento dos pacientes durante o tratamento. A incorporação destes métodos em protocolos de pesquisa com maior número de pacientes será importante para:

- Aperfeiçoamento das técnicas e, conseqüentemente, redução do número de amostras inadequadas para avaliação;
- Melhor definição de critérios de positividade para cada exame;
- Avaliação do impacto da presença de blastos, identificada por essas técnicas, na sobrevida dos pacientes e na incidência acumulada de recidiva em SNC.

Para o Serviço de Hematologia do HC/UFMG, propõem-se as seguintes direções e linhas de pesquisa a serem seguidas:

- Prosseguir com a realização da IMF do LCR ao diagnóstico da LLA e, posteriormente, realizar nova análise dos resultados com maior número de pacientes;
- Manter, quando possível, a coleta e congelamento do LCR ao diagnóstico da LLA para realização da PCR, após implantação da avaliação da MO por esta técnica como rotina para todos os pacientes;
- Desenvolver novos projetos de pesquisa: avaliação da IMF e PCR no LCR em outras fases do tratamento da LLA, como, por exemplo, ao final da consolidação da remissão, intensificação, consolidação tardia e manutenção; avaliação do LCR pela PCR e IMF nos pacientes positivos ou classificados como PLT *positiva* e SNC 2 durante todas as coletas da fase de indução; avaliação do impacto destes resultados na sobrevida e incidência acumulada de recidiva no SNC.

APÊNDICES

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO INFORMAÇÕES DOS PESQUISADORES AOS REPRESENTANTES LEGAIS (Pacientes de 0 a 12 anos de idade)

Título da pesquisa: Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano, pelas técnicas de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda.

Antes de você aceitar participar desta pesquisa é necessário que você compreenda as explicações a seguir. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também estabelece o seu direito de desistir de sua participação a qualquer momento.

1.1.1 Os pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda (LLA) podem apresentar infiltração (invasão) do Sistema Nervoso Central pela doença. A presença de alterações causadas pela leucemia no Sistema Nervoso Central pode ocorrer no momento do diagnóstico ou quando há recaída da doença.

1.1.2 O diagnóstico da infiltração do Sistema Nervoso Central pela leucemia é feito com a realização do exame chamado punção lombar. A punção é feita com agulha apropriada na região inferior da coluna vertebral (região lombar), no espaço que fica entre as vértebras (espaço intervertebral). Durante o exame é coletada pequena quantidade do líquido produzido no sistema nervoso central - o líquido cérebro espinhal (líquor) - para que sejam feitos exames que detectam a presença da doença. Durante esse exame, também, são injetados medicamentos que fazem parte da quimioterapia. A injeção desses medicamentos pela punção lombar é necessária para que eles atinjam o Sistema Nervoso Central, uma vez que a quimioterapia administrada pela veia ou por via oral (pela boca) não penetra adequadamente no Sistema Nervoso. Quando esse exame e a injeção de quimioterápicos não são realizados durante o tratamento da leucemia há um aumento do risco de recaída da doença no Sistema Nervoso Central. Esse exame faz parte da rotina de tratamento dos pacientes com LLA e é realizado com o uso prévio de anestesia (anestesia local ou sedação em bloco cirúrgico).

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a presença de infiltração do Sistema Nervoso Central nas crianças e adolescentes com LLA, através de dois novos exames, que parecem auxiliar no diagnóstico da infiltração do Sistema Nervoso Central pela leucemia. Esses novos exames são chamados imunofenotipagem e a reação de cadeia em polimerase. Para sua realização será necessária a utilização de um pouco do líquido coletado durante a punção lombar. Pretendemos verificar se a realização desses exames auxiliará no diagnóstico mais precoce da infiltração do Sistema Nervoso Central.

Caso concorde com a participação de seu filho (a), ou do paciente pelo qual você é responsável, você estará autorizando que parte do líquido coletado durante a punção lombar seja utilizado para a realização da imunofenotipagem e da reação de cadeia em polimerase.

É importante que você saiba que somente serão realizadas as punções já estabelecidas no esquema de tratamento utilizado por seu filho. Não serão feitas punções apenas para realização da pesquisa e dos exames de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase. A quantidade de líquido que será coletada, 4 ml, não oferece riscos adicionais ao paciente. Os exames que são realizados dentro da rotina do tratamento (citometria e citologia do líquido) não deixarão de ser feitos para que sejam realizados os exames da pesquisa. Você também estará dando seu consentimento para que os prontuários médicos do paciente sejam consultados pelos

pesquisadores para obtenção de dados clínicos (diagnóstico, tipo de tratamento, resposta ao tratamento) e laboratoriais.

O tratamento do paciente não será alterado em função da pesquisa. O paciente continuará a ser atendido no Serviço, sem prejuízo ao seu cuidado, mesmo que não concorde com a sua inclusão no estudo ou, ainda, que desista de participar em qualquer momento. Você não receberá remuneração por participar do estudo.

1.1.3 A sua participação é muito importante. Esperamos que os resultados desta pesquisa possam ajudar a melhorar o tratamento e as chances de cura dos pacientes com LLA. Os dados coletados neste trabalho serão confidenciais. Apenas os responsáveis pela pesquisa e o médico responsável pelo paciente terão acesso aos resultados dos exames.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia são os seguintes: 3409-9397 e 3409-9207. Os nomes dos pesquisadores responsáveis são: Dr^a Camila Silva Peres Cancela (tel:8877-3430) e Prof^a Benigna Maria de Oliveira. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Telefone 3409-4592).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa “Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano, pelas técnicas de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda.”, consinto em participar na qualidade de responsável pelo paciente, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 201__

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do paciente (crianças de 7 a 12 anos): _____

Assinatura do pesquisador: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
INFORMAÇÕES DOS PESQUISADORES AOS REPRESENTANTES LEGAIS
(Pacientes de 13 a 17 anos de idade)

Título da pesquisa: Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano, pelas técnicas de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda.

Antes de você aceitar participar desta pesquisa é necessário que você compreenda as explicações a seguir. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também estabelece o seu direito de desistir de sua participação a qualquer momento.

1.1.4 Os pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda (LLA) podem apresentar infiltração (invasão) do Sistema Nervoso Central pela doença. A presença de alterações causadas pela leucemia no Sistema Nervoso Central pode ocorrer no momento do diagnóstico ou quando há recaída da doença.

1.1.5 O diagnóstico da infiltração do Sistema Nervoso Central pela leucemia é feito com a realização do exame chamado punção lombar. A punção é feita com agulha apropriada na região inferior da coluna vertebral (região lombar), no espaço que fica entre as vértebras (espaço intervertebral). Durante o exame é coletada pequena quantidade do líquido produzido no sistema nervoso central - o líquido cérebro espinhal (líquor) - para que sejam feitos exames que detectam a presença da doença. Durante esse exame, também, são injetados medicamentos que fazem parte da quimioterapia. A injeção desses medicamentos pela punção lombar é necessária para que eles atinjam o Sistema Nervoso Central, uma vez que a quimioterapia administrada pela veia ou por via oral (pela boca) não penetra adequadamente no Sistema Nervoso. Quando esse exame e a injeção de quimioterápicos não são realizados durante o tratamento da leucemia há um aumento do risco de recaída da doença no Sistema Nervoso Central. Esse exame faz parte da rotina de tratamento dos pacientes com LLA e é realizado com o uso prévio de anestesia (anestesia local ou sedação em bloco cirúrgico).

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a presença de infiltração do Sistema Nervoso Central nas crianças e adolescentes com LLA, através de dois novos exames, que parecem auxiliar no diagnóstico da infiltração do Sistema Nervoso Central pela leucemia. Esses novos exames são chamados imunofenotipagem e a reação de cadeia em polimerase. Para sua realização será necessária a utilização de um pouco do líquido coletado durante a punção lombar. Pretendemos verificar se a realização desses exames auxiliará no diagnóstico mais precoce da infiltração do Sistema Nervoso Central.

Caso concorde com a participação de seu filho (a), ou do paciente pelo qual você é responsável, você estará autorizando que parte do líquido coletado durante a punção lombar seja utilizado para a realização da imunofenotipagem e da reação de cadeia em polimerase.

É importante que você saiba que somente serão realizadas as punções já estabelecidas no esquema de tratamento utilizado por seu filho. Não serão feitas punções apenas para realização da pesquisa e dos exames de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase. A quantidade de líquido que será coletada, 4 ml, não oferece riscos adicionais ao paciente. Os exames que são realizados dentro da rotina do tratamento (citometria e citologia do líquido) não deixarão de ser feitos para que sejam realizados os exames da pesquisa. Você também estará dando seu consentimento para que os prontuários médicos do paciente sejam consultados pelos pesquisadores para obtenção de dados clínicos (diagnóstico, tipo de tratamento, resposta ao tratamento) e laboratoriais.

O tratamento do paciente não será alterado em função da pesquisa. O paciente continuará a ser atendido no Serviço, sem prejuízo ao seu cuidado, mesmo que não concorde com a sua inclusão no estudo ou, ainda, que desista de participar em qualquer momento. Você não receberá remuneração por participar do estudo.

1.1.6 A sua participação é muito importante. Esperamos que os resultados desta pesquisa possam ajudar a melhorar o tratamento e as chances de cura dos pacientes com LLA. Os dados coletados neste trabalho serão confidenciais. Apenas os responsáveis pela pesquisa e o médico responsável pelo paciente terão acesso aos resultados dos exames.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia são os seguintes: 3409-9397 e 3409-9207. Os nomes dos pesquisadores responsáveis são: Dr^a Camila Silva Peres Cancela (tel:8877-3430) e Prof^a Benigna Maria de Oliveira. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Telefone 3409-4592).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa “Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano, pelas técnicas de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda.”, consinto em participar na qualidade de responsável pelo paciente, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 201__

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do pesquisador: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
INFORMAÇÕES DOS PESQUISADORES AO PACIENTE
(Pacientes de 13 a 17 anos de idade)

Título da pesquisa: Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano, pelas técnicas de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda.

Antes de você aceitar participar desta pesquisa é necessário que você compreenda as explicações a seguir. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também estabelece o seu direito de desistir de sua participação a qualquer momento.

1.1.7 Os pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda (LLA) podem apresentar infiltração do Sistema Nervoso Central pela doença. A presença de alterações causadas pela leucemia no Sistema Nervoso Central pode ocorrer no momento do diagnóstico ou quando há recaída da doença.

Durante o seu tratamento você vai fazer um exame chamado punção lombar. Durante esse exame será colhido um líquido que vem do seu Sistema Nervoso Central. Esse exame é feito para verificar se existem sinais da sua doença neste líquido. Durante o exame você receberá medicamentos que chegarão diretamente no Sistema Nervoso Central, o que é muito importante para a cura da sua doença. Esse exame faz parte do seu tratamento e será indicado e acompanhado pelo seu médico.

Caso você e seus pais, ou responsáveis, concordem com a participação na pesquisa, parte do líquido coletado será utilizado para a realização de dois novos exames (imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase) que parecem ajudar no diagnóstico da doença no Sistema Nervoso Central. Você fará apenas as punções lombares que já estavam previstas no seu tratamento, ou seja, se você participar da pesquisa será feito o mesmo número de punções que você faria durante o seu tratamento. O seu prontuário médico (ficha médica) será consultado pelos pesquisadores para que eles obtenham informações sobre os seus exames e o seu tratamento. O seu tratamento não será modificado.

Você continuará a ser atendido no Serviço, sem prejuízo ao seu cuidado, mesmo que não concorde com a sua participação no estudo ou, ainda, que desista de participar em qualquer momento. A sua participação é muito importante. Apenas os responsáveis pela pesquisa poderão consultar ou ver os seus dados.

Nós responderemos a qualquer dúvida que você tiver sobre a pesquisa. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia são os seguintes: 3409-9397 e 3409-9207. Os nomes dos pesquisadores responsáveis são: Dr^a Camila Silva Peres Cancela (tel: 8877-3430) e Prof^a Benigna Maria de Oliveira. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Telefone 3409-4592).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que entendi as informações sobre a pesquisa “Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano, pelas técnicas de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda.”, consinto em participar na qualidade de paciente, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 201__

Assinatura do paciente (idade \geq 13 anos até $<$ 18anos): _____

Assinatura do pesquisador: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
INFORMAÇÕES DOS PESQUISADORES AO PACIENTE
(Pacientes de 18 a 21 anos de idade)

Título da pesquisa: Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano, pelas técnicas de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda.

Antes de você aceitar participar desta pesquisa é necessário que você compreenda as explicações a seguir. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também estabelece o seu direito de desistir de sua participação a qualquer momento.

1.1.8 Os pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda (LLA) podem apresentar infiltração do Sistema Nervoso Central pela doença. A presença de alterações causadas pela leucemia no Sistema Nervoso Central pode ocorrer no momento do diagnóstico ou quando há recaída da doença.

Durante o seu tratamento você vai fazer um exame chamado punção lombar. Durante esse exame será colhido um líquido que vem do seu Sistema Nervoso Central. Esse exame é feito para verificar se existem sinais da sua doença neste líquido. Durante o exame você receberá medicamentos que chegarão diretamente no Sistema Nervoso Central, o que é muito importante para a cura da sua doença. Esse exame faz parte do seu tratamento e será indicado e acompanhado pelo seu médico.

Caso você concorde com a participação na pesquisa, parte do líquido coletado será utilizado para a realização de dois novos exames (imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase) que parecem ajudar no diagnóstico da doença no Sistema Nervoso Central. Você fará apenas as punções lombares que já estavam previstas no seu tratamento, ou seja, se você participar da pesquisa será feito o mesmo número de punções que você faria durante o seu tratamento. O seu prontuário médico (ficha médica) será consultado pelos pesquisadores para que eles obtenham informações sobre os seus exames e o seu tratamento. O seu tratamento não será modificado.

Você continuará a ser atendido no Serviço, sem prejuízo ao seu cuidado, mesmo que não concorde com a sua participação no estudo ou, ainda, que desista de participar em qualquer momento. A sua participação é muito importante. Apenas os responsáveis pela pesquisa terão acesso aos seus dados.

Nós responderemos a qualquer dúvida que você tiver sobre a pesquisa. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia são os seguintes: 3409-9397 e 3409-9207. Os nomes dos pesquisadores responsáveis são: Dr^a Camila Silva Peres Cancela (tel: 8877-3430) e Prof^a Benigna Maria de Oliveira. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Telefone 3409-4592).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que entendi as informações sobre a pesquisa “Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano, pelas técnicas de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda.”, consinto em participar na qualidade de paciente, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 201__

Assinatura do paciente (idade \geq 18 anos): _____

Assinatura do pesquisador: _____

ANEXOS

Anexo 1

GBTLI – LLA 2009

Grupos de risco do estudo GBTLI LLA-2009

LLA B derivada

GRUPO DE BAIXO RISCO (BR) – Serão incluídos os pacientes com idade acima de 1 ano e abaixo de 9 anos, leucometria inicial inferior a $50000/\text{mm}^3$, B-derivação, ausência dos achados citogenéticos de risco $t(9;22)$ ou fusão BCR/ABL e $t(4;11)$ ou fusão MLL/AF4, sem acometimento leucêmico em SNC, e que obrigatoriamente apresentam menos de 1000 blastos/ mm^3 em análise do sangue periférico no dia 8, após a prefase com corticóide (e uma injeção IT MTX), MO $M_{1/2}$ no dia 15 do tratamento **com** CF-DRM $<10\%$, e, adicionalmente, ausência de blastos na MO no dia 35 da indução e PCR-DRM $<10^{-3}$, medida com pelo menos 2 marcadores. **Todos** os critérios deverão ser preenchidos para a adequada classificação no grupo de Baixo Risco. A determinação da DRM será realizada por Citometria de fluxo no dia 15 e pelo PCR em tempo real no D35.

Dentre os pacientes do Grupo de Baixo Risco, haverá a subdivisão pra 2 Subgrupos adicionais (abaixo especificados), com base nos achados citomorfológicos e da CF-DRM do dia 15 (prevalecendo este último). O objetivo desta subdivisão no Grupo de Baixo Risco, consiste na redução da quimioterapia para os pacientes com excelente resposta nas primeiras semanas do tratamento (Subgrupo RBV).

- ✓ **Baixo Risco Verdadeiro (BRV):** < 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico do dia 8, MO M_1 **com** CF-DRM negativa ($<0,01\%$) no D15 e MO M_1 **com** PCR-DRM negativo ($<10^{-3}$) no D35.

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou do PCR-DRM (D35), será considerado o critério citomorfológico da Medula Óssea. O estado leucêmico M_1 será obrigatório nos dias 15 e 35. Nos casos de discordância de resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM para as decisões terapêuticas. Os casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

- ✓ **Baixo Risco Intermediário (BRI):** <1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico do dia 8, MO $M_{1/2}$ **com** CF-DRM positiva em níveis intermediários ($\geq 0,01\%$ $<10\%$) no D15 e, adicionalmente, MO M_1 **com** PCR-DRM negativo ($<10^{-3}$) no D35).

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou do PCR-DRM (D35), será considerado o critério citomorfológico da Medula Óssea. Estado leucêmico $M_{1/2}$ no D15 e obrigatoriamente M_1 no D35. Nos casos de discordância de resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM para as decisões terapêuticas. Os casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

No caso destes pré-requisitos **não** serem todos preenchidos, o plano de tratamento para o grupo de **ALTO RISCO** somente deverá ser usado de acordo com os critérios clínicos e citológicos ao diagnóstico, além da resposta da contagem dos blastos no sangue periférico no dia 8, estado leucêmico da MO avaliada no D15 e D35 do tratamento. Em algumas situações especiais na avaliação da DRM (somente um marcador; somente um ponto crítico de tempo avaliável), o grupo de risco ainda poderá ser determinado pelo Laboratório de Referência, a partir da análise dos resultados da DRM. O Coordenador do estudo revisará cada caso individual

GRUPO DE ALTO RISCO (AR) - Serão incluídos os pacientes com idade ≥ 9 anos e abaixo de 18 anos e/ou com leucemia inicial $\geq 50000/\text{mm}^3$, e/ou acometimento leucêmico em SNC (CNS-3) ao diagnóstico, e/ou hipodiploidia (< 46 cromosomas) ou com a presença de achados citogenéticos desfavoráveis t(4;11) e/ou fusão do gene MLL/AF4; os portadores das translocações t(9;22) ou a fusão do gene BCR/ABL (seguirão protocolo específico)] e/ou que apresentarem ≥ 1000 blastos/ mm^3 no esfregaço do sangue periférico no dia 8 após a prefase com corticóide (e uma injeção IT MTX) e/ou que apresentarem MO M_3 no D15 do tratamento **com** CF-DRM $\geq 10\%$ e/ou que não obtenham a remissão medular (MO $M_{2/3}$) no dia 35 da terapia **com** PCR-DRM em tempo real positiva no final das 5 primeiras semanas da terapia ($< 10^{-3}$). Níveis inferiores a 10^{-3} traduzem alta quantidade da doença residual. **Um** único critério destes será suficiente para a classificação no Grupo de Alto Risco.

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou PCR-DRM (D35), MO M_3 no D15 e/ou $M_{2/3}$ no D35, indicará o paciente de **Alto Risco -Respondedor Lento (Subgrupo RL)**. Se houver discordância dos resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM. Casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo

De acordo com a resposta no D8, D15 e D35 os pacientes do Grupo de Alto Risco serão subdivididos em dois subgrupos:

- ✓ **Respondedor Rápido (Subgrupo RR):** < 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico do dia 8, MO $M_{1/2}$ **com** CF-DRM $< 10\%$ no D15 e MO M_1 **com** PCR-DRM negativo ($< 10^{-3}$) no D35.

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou do PCR-DRM (D35), será considerado o critério citomorfológico da Medula Óssea. O estado leucêmico $M_{1/2}$ será obrigatório no D 15 e o estado M_1 no D35. Nos casos de discordância de resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM para as decisões terapêuticas. Os casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

- ✓ **Respondedor Lento (Subgrupo RL):** ≥ 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico do dia 8, MO M_3 **com** CF-DRM positiva ($\geq 10\%$) no D15 e, adicionalmente, MO $M_{2/3}$ **com** PCR-DRM positivo ($< 10^{-3}$) no D35.

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou do PCR-DRM (D35), será considerado o critério citomorfológico da Medula Óssea. Estado leucêmico M_3 no D15 e $M_{2/3}$ no D35 definem os pacientes do Subgrupo RL. Nos casos de discordância de resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM para as decisões terapêuticas. Os casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

LLA T derivada

- ✓ **Respondedor Rápido (Subgrupo RR):** são aqueles que apresentarem < 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico no dia 8 e estado leucêmico $M_{1/2}$ **com** CF-DRM $< 10\%$ no dia 15 do tratamento e, adicionalmente, medula M_1 **com** PCR-DRM negativo ($< 10^{-2}$) no final da indução (D35)

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou PCR-DRM (D35), é necessário que a medula seja considerada $M_{1/2}$ no D15 e M_1 no D35. Se houver discordância dos resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM. Casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

- ✓ **Respondedor Lento (Subgrupo RL):** são aqueles que apresentarem ≥ 1000 blastos/ mm^3 no sangue periférico do dia 8 e/ou estado leucêmico M_3 **com** CF-DRM $\geq 10\%$ no dia 15 do tratamento e/ou, medula $M_{2/3}$ **com** PCR-DRM positivo ($\geq 10^{-2}$) no final da indução. Em qualquer circunstância PCR-DRM $\geq 10^{-2}$ no D35 indicará respondedor lento.

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou PCR-DRM (D35), MO M₃ no D15 e/ou M_{2/3} no D35, indicará o paciente Responder Lento (**Subgrupo RL**). Se houver discordância dos resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM. Casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

LLA DO LACTENTE

Quanto ao grupo dos lactentes (< 12 meses): serão divididos de acordo com a presença ou não do rearranjo MLL, seguindo protocolos específicos. De acordo com a resposta no D8, D15 e D35 os pacientes do Grupo Ph+ de Lactentes serão subdivididos em dois subgrupos:

- ✓ **Respondedor Rápido (Subgrupo RR):** são aqueles que apresentarem < 1000 blastos/mm³ no sangue periférico no dia 8 e estado leucêmico M_{1/2} **com** CF-DRM <10% no dia 15 do tratamento e, adicionalmente, medula M₁ **com** PCR-DRM negativo (<10⁻³) no final da indução (D35).

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou PCR-DRM (D35), é necessário que a medula seja considerada M_{1/2} no D15 e M₁ no D35. Se houver discordância dos resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM. Casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

- ✓ **Respondedor Lento (Subgrupo RL):** são aqueles que apresentarem ≥ 1000 blastos/mm³ no sangue periférico do dia 8 e/ou estado leucêmico M₃ **com** CF-DRM ≥ 10% no dia 15 do tratamento e/ou medula M_{2/3} **com** PCR-DRM positivo (≥ 10⁻³) no final da indução.

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou PCR-DRM (D35), MO M₃ no D15 e/ou M_{2/3} no D35, indicará o paciente Responder Lento (Subgrupo RL). Se houver discordância dos resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM. Casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

LLA Ph⁺

De acordo com a resposta terapêutica nas primeiras semanas, serão subdivididos em dois grupos:

- ✓ **Respondedor Rápido (Subgrupo RR):** < 1000 blastos/mm³ no sangue periférico do dia 8, MO M_{1/2} **com** CF-DRM <10 % no D15 e MO M₁ **com** PCR-DRM negativo (<10⁻³) no D35.

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou do PCR-DRM (D35), será considerado o critério citomorfológico da Medula Óssea. O estado leucêmico M_{1/2} será obrigatório no D15 e o estado M₁ no D35. Nos casos de discordância de resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM para as decisões terapêuticas. Os casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

- ✓ **Respondedor Lento (Subgrupo RL):** ≥ 1000 blastos/mm³ no sangue periférico do dia 8, MO M₃ **com** CF-DRM positiva (≥10%) no D15 e, adicionalmente, MO M_{2/3} **com** PCR-DRM positivo (<10⁻³) no D35.

Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou do PCR-DRM (D35), será considerado o critério citomorfológico da Medula Óssea. Estado leucêmico M₃ no D15 e M_{2/3} no D35 definem os pacientes do Subgrupo RL. Nos casos de discordância de resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM para as decisões terapêuticas. Os casos duvidosos deverão ser discutidos com a Coordenação do Protocolo.

Para os pacientes do GBTLI LLA-2009 determinaremos a DRM pela citometria de fluxo com multiparâmetro e por RT-PCR, nos Laboratórios de Referência. Amostras de MO serão coletadas em 5 pontos : 1) ao diagnóstico; 2) no dia 15 da terapia de indução, 3) no final da indução (dia 35). Adicionalmente 2 coletas serão realizadas na semana 12 e no final do terapia. Para os pacientes Ph⁺ serão coletadas também, MO antes da Intensificação e antes da terapia de Manutenção. Para aqueles pacientes candidatos ao TMO, níveis da DRM serão avaliados além dos 3 primeiros momentos anteriormente descritos, no momento pré-transplante e, posteriormente, nas semanas 24 e 48 pós TMO. Serão considerados **pré-requisitos** para esta avaliação, os seguintes pontos:

1. Pelo menos dois marcadores clonais específicos com uma sensibilidade de 10⁻³ deverão ser inicialmente identificados na Medula Óssea (aceitável sangue periférico somente quando a proporção de blastos for superior a 80%); pelo menos 10 milhões de células mononucleares deverão ser obtidas ao diagnóstico.
2. Suficiente material para a realização do exame (pelo menos 10 milhões de células, se somente MO) deverá estar disponível em ambos os pontos críticos de análise (Ponto 1 = dia 15 e Ponto 2 = dia 35). Um Ponto 3 de avaliação da DRM será feito na semana 12, não servindo entretanto como critério de risco ao diagnóstico, nem para ajustes na quimioterapia. Já está provado que a DRM no final da indução (dia 35) se correlaciona com o prognóstico, mas não exatamente reproduz os achados citomorfológicos da medula do dia 15 ²⁷².

Caracterização de acometimento de sistema nervoso central

- SNC-3: ≥ 5 células/mm³ com blastos ou,
- infiltrados intracerebrais detectados por técnica de imagem ou
- acometimento de pares craneanos ou
- presença de massa na medula espinhal, identificada por técnica de imagem

Não será considerada infiltração no SNC:

SNC-2: <5 células/mm³ com blastos: fazer MADIT no D8

TLP+: punção traumática com blastos: MADIT no D8

TLP-: punção traumática sem blastos

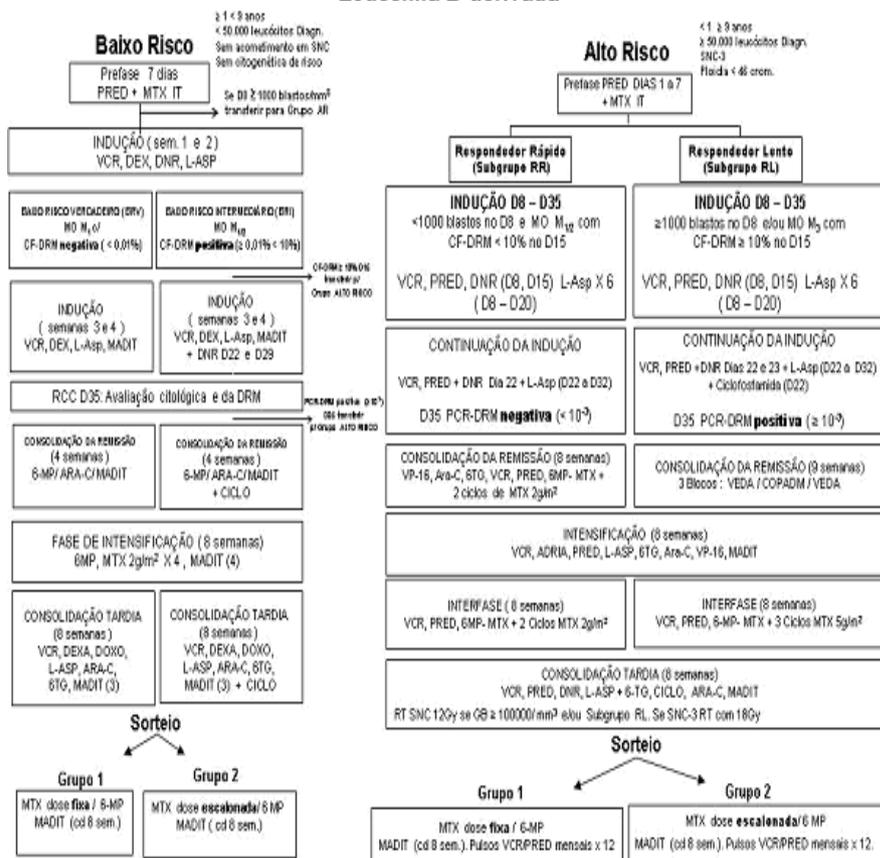
Irradiação craniana:

- 12 Gy para os pacientes com LT ≥ 100.000 /mm³ ao diagnóstico e/ou do Subgrupo RL.
- 18 Gy para aqueles com SNC-3 ao diagnóstico.

LLA B derivada

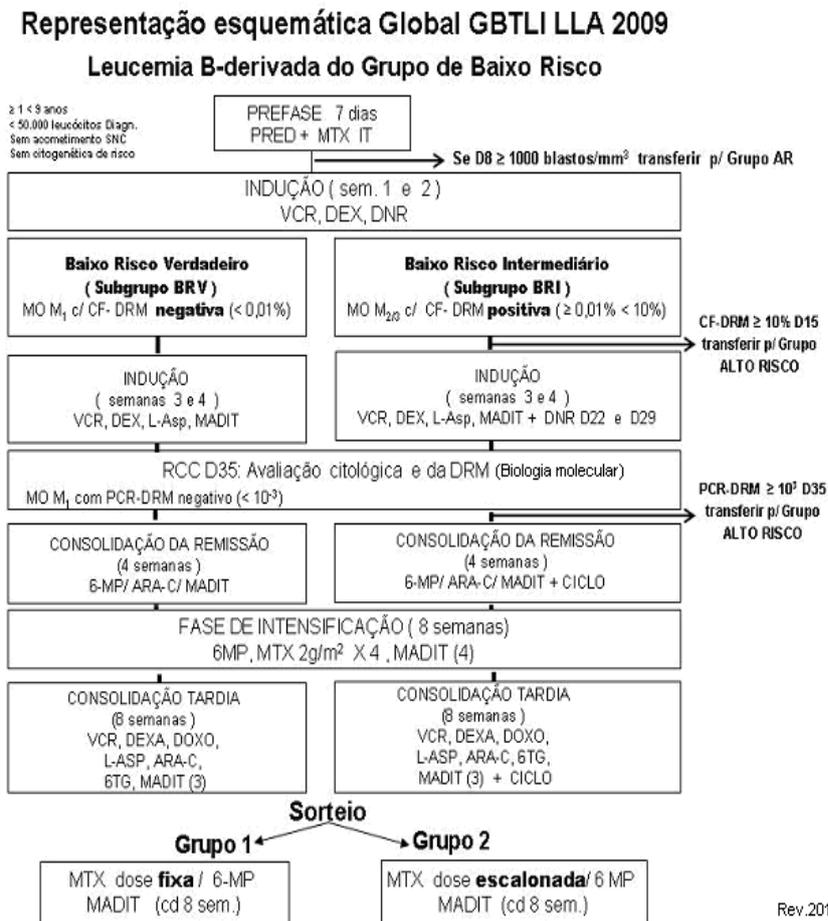
Representação Esquemática Global do GBTLI LLA-2009

Leucemia B-derivada

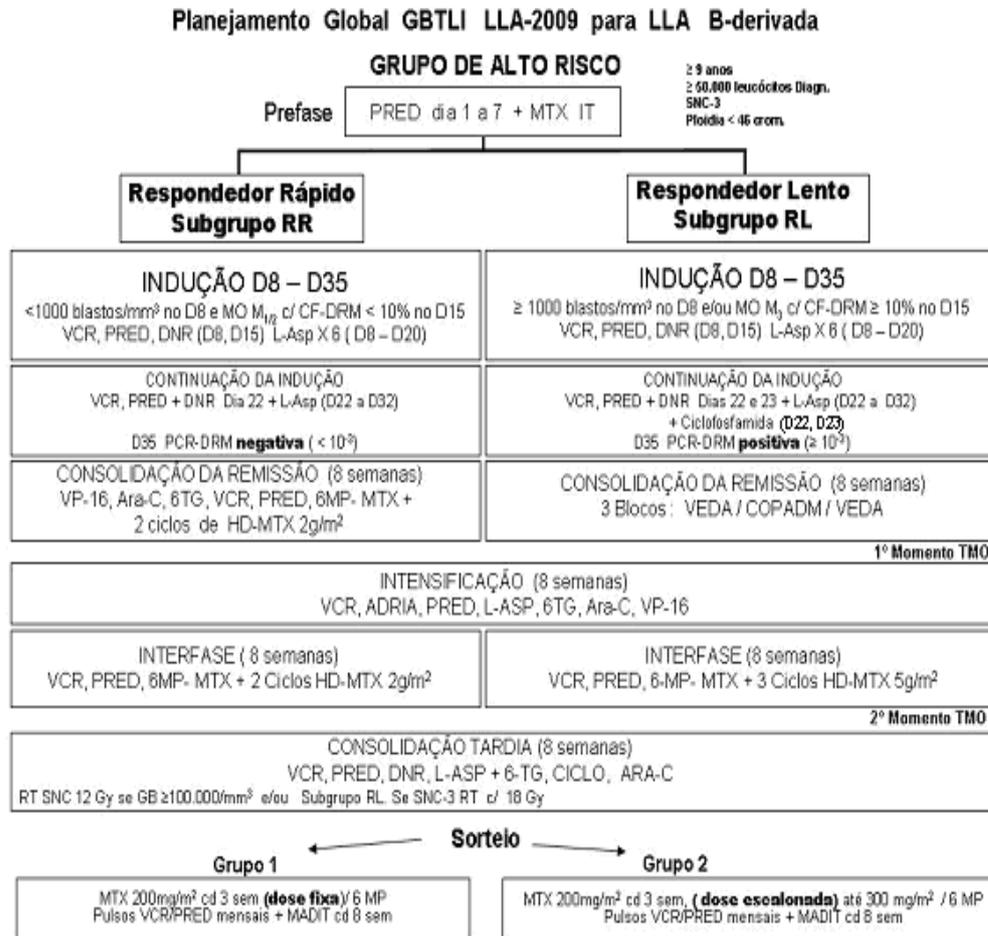


Rev. 2013

LLA B derivada - Grupo de Baixo Risco (BR)



LLA B derivada Grupo De Alto Risco (AR)



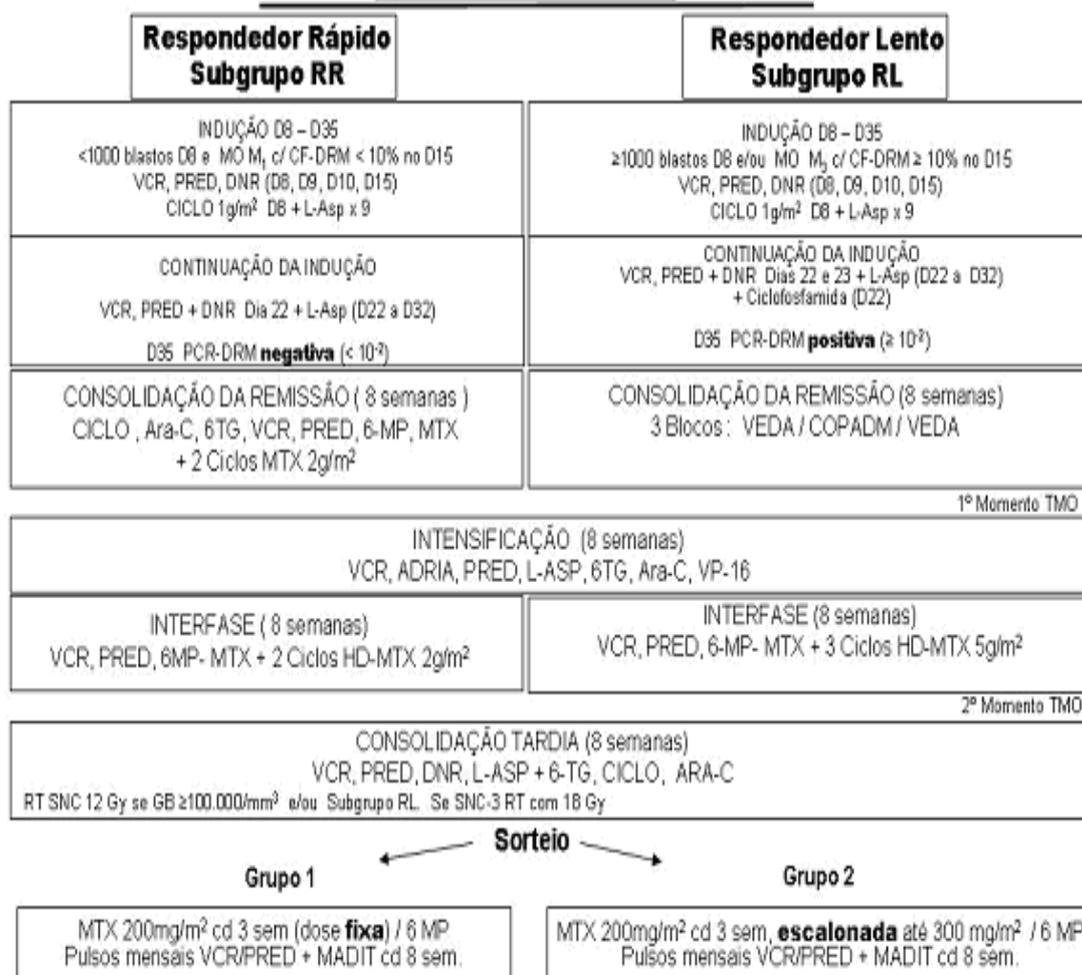
Rev.2013

LLA T derivada

Planejamento Global GBTLI LLA-2009

LLA T-DERIVADA

Prefase PRED dia 1 a 7 + MTX IT



Rev.2013

LLA Ph⁺Protocolo GBTLI LLA-2009 LLA Ph⁺

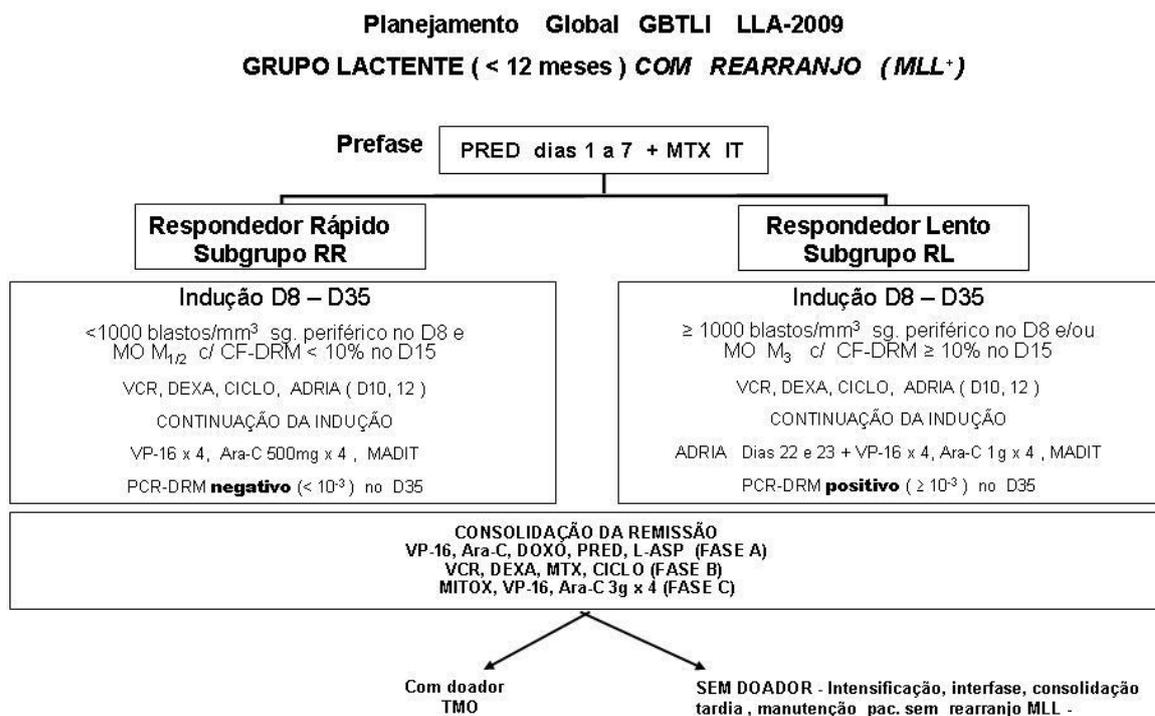
Prefase PRED dias 1 a 7 + MTX IT

**Respondedor Rápido
Subgrupo RR****Respondedor Lento
Subgrupo RL**

| | | | |
|---|--|---|--|
| INDUÇÃO D8 – D35 Blast. <1000/mm ³ no D8 e M ₀ M ₁ c/ CF-DRM < 10% no D15 VCR, PRED, DNR(D8,D15) L-Asp X 6 (D16 – 28) CF(D8) | | INDUÇÃO D8 – D35 Blast. ≥ 1000/mm ³ no D8 e/ou M ₀ M ₁ c/ CF-DRM ≥ 10% no D15 VCR, PRED, DNR(D8,D9,D10) L-Asp X 6 (D16 – 28) CF(D8) | |
| Continuação da indução VCR, PRED + DNR D22 + L-Asp x 9 (D16 a 33) D35 PCR-DRM negativo (< 10 ⁻²) | | Continuação da indução VCR, PRED + DNR (D15) + L-Asp x 3 (D22 a 26) + Imatinibe(D10-33)+ Ciclotofamida D22 D35 PCR-DRM positivo (≥ 10 ⁻²) | |
| CONSOLIDAÇÃO DA REMISSÃO (3 semanas) VP-16, Ara-C, 6TG + Imatinibe D1- 21 | | BLOCO 1 IFO, VP-16 + Imatinibe D1- 21 | |
| BLOCO 2 MTX 2g/m ² , 6TG, CICLO, Ara-C, Imatinibe | | BLOCO 2 MTX 5g/m ² , 6TG, CICLO, Ara-C, Imatinibe | |
| BLOCO 3 MTX 2g/m ² , 6MP, Ara-C, L-Asp, Imatinibe | | BLOCO 3 MTX 5g/m ² , 6MP, Ara-C, L-Asp, Imatinibe | |
| 1º Momento TMO | | | |
| Intensificação (8 semanas) VCR, PRED, ADRIA, L-ASP, Ara-C, 6TG + Imatinibe (dias 1- 22 e 36-57) , VP-16 | | | |
| BLOCO 2 MTX 2g/m ² , 6TG, CICLO, Ara-C, Imatinibe | | BLOCO 3 MTX 5g/m ² , 6MP, Ara-C, L-Asp, Imatinibe | |
| BLOCO 3 MTX 2g/m ² , 6MP, 6TG, Ara-C, L-Asp, Imatinibe | | BLOCO 2 MTX 5g/m ² , 6TG, CICLO, Ara-C, Imatinibe | |
| | | BLOCO 1 IFO, VP-16 + Imatinibe D1-21 | |
| 2º Momento TMO | | | |
| CONSOLIDAÇÃO TARDIA (8 semanas) VCR, PRED, DNR, L-ASP, CICLO, 6-TG, ARA-C + Imatinibe (dias 1-21 e 29-57 RT SNC 12Gy se a 100.000/mm ³ e/ou Subgrupo RL. Se SNC-3 RT com 18Gy | | | |
| MANUTENÇÃO (18 meses) 6MP + MTX intermitente dose fixa 200 mg/m ² . Pulsos a cd 6 semanas c/ VCR/DEXÁ, Imatinibe (PULSO A) alternando c/ CICLO/Ara-C/Imatinibe (PULSO B). MADIT a cd 8 sem. durante toda a Terapia de Manutenção (exceto p/ os pacientes irradiados). | | | |

Rev 2013

LLA do lactente



Anexo 2

Aprovação do projeto: Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC-UFMG e Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



**Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas**

Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão

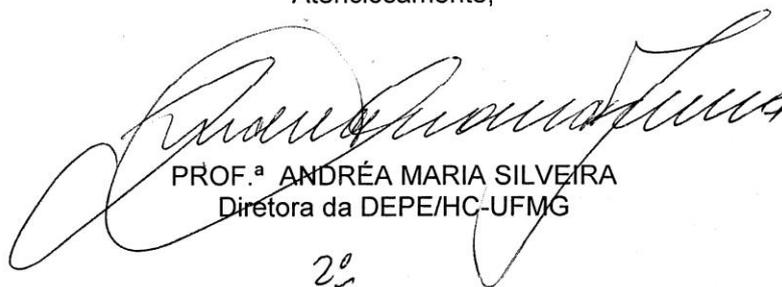
Belo Horizonte, 16 de setembro de 2011.

PROCESSO: Nº 90/11 “AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS LEUCÊMICAS NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO, PELAS TÉCNICAS DE IMONOFENOTIPAGEM E REAÇÃO DE CADEIA EM POLIMERASE, EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA”

SR(A) PESQUISADOR(A):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG e 19/08/2011, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE **relatório** parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,



PROF.ª ANDRÉA MARIA SILVEIRA
Diretora da DEPE/HC-UFMG

À Sr.ª
Prof.ª Benigna Maria de Oliveira
Depto. Pediatria
Faculdade de Medicina- UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0284.0.203.000-11

Interessado(a): Profa. Benigna Maria de Oliveira
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 19 de agosto de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da presença de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano, pelas técnicas de imunofenotipagem e reação de cadeia em polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo 3

Primers selecionados para triagem inicial dos rearranjos clonais e para a análise do LCR por PCR convencional nas LLAs-B e T

| Primer Forward | (Sequencia 5'→3') | Primer Reverso | (Sequencia 5'→3') | LLA* | |
|------------------|---|--------------------|--|--------|---|
| | | | | B | T |
| gene IgH | | | | | |
| VH1-FR2 | CTGGGTGCGACAGGCCCTGGAC AA | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | x | |
| VH2-FR2 | TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAA GG | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | x | |
| VH3-FR2 | GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAA | JHcon JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | x x | |
| VH4-FR2 | GG GGGTGCGCCAGATGCCCGGAAA | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | x | |
| VH5-FR2 | GG TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAG | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | x | |
| VH6-FR2 | AG TTGGGTGCGACAGGCCCTGGAC | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | x | |
| VH7-FR2 | AA GGCGGAATGTGTGCAGGC | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | | x |
| DH1 | GCACTGGGCTCAGAGTCCTCT | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | x | x |
| DH2 | GTGGCCCTGGGAATATAAAA | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | x | x |
| DH3 | AGATCCCCAGGACGCAGCA | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | | x |
| DH4 | CAGGGGGACACTGTGCATGT | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | | x |
| DH5 | TGACCCAGCAAGGGAAGG | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | | x |
| DH6 | CACAGGCCCCCTACCAGC | JHcon | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC | x | x |
| DH7 | | | | | |
| gene IgK | | | | | |
| Vk1/6 | TCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATC TG | Kde | CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCC TA | x | |
| Vk2 | GGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTA GTC | Kde | CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCC TA | x | |
| Vk3 | CCCAGGCTCCTCATCTATGATGC ATCC | Kde | CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCC TA | x | |
| INTR | CGTGGCACCGCGAGCTGTAGAC | Kde | CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCC TA | x | |
| gene TCRG | | | | | |
| VgIf | GGAAGGCCCCACAGCRTCTT | Jg1.3/2. 3 + | GTGTTGTTCCACTGCCAAAGAG | x | x |
| Vg9 | CGGCACTGTCAGAAAGGAATC | Jg1.1/2. 1 “ | TTACCAGGCGAAGTTACTATGAGC “ | x | x |
| Vg10 | AGCATGGGTAAGACAAGCAA | “ | “ | | x |
| Vg11 | CTTCCACTTCCACTTTGAAA | “ | “ | x | x |
| gene TCRD | | | | | |
| Vd1 | ATGCAAAAAGTGGTCGCTATT | Jd1 | GTTCCACAGTCACACGGGTTC | | x |
| Vd2 | ATACCGAGAAAAGGACATCTATG | Jd1 | GTTCCACAGTCACACGGGTTC | | x |
| Vd3 | GTACCGGATAAGGCCAGATTA | Jd1 | GTTCCACAGTCACACGGGTTC | | x |
| Dd2 | AGCGGGTGGTGTGGCAAAGT | Jd1 | GTTCCACAGTCACACGGGTTC | | x |
| Vd2 | ATACCGAGAAAAGGACATCTATG | Dd3 | TGGGACCCAGGGTGAGGATAT | x | x |
| Dd2 | AGCGGGTGGTGTGGCAAAGT | Dd3 | TGGGACCCAGGGTGAGGATAT | x | x |
| SIL-TAL | | | | | |
| Sil | AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA | Tal1 | AGAGCCTGTGCGCCAAGAA | | x |
| Sil | AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA | Tal2 | TTGTAATAATGGGGAGATAATGTCTGA C | | x |

Referencias: van Dongen et al., 2003 e Pongers-Willemsse et al., 1999.

* 'x' indica quais as reações de PCR a serem testadas de acordo com linhagem fenotípica da LLA, sendo B, para as LLA B-derivadas, e T, para as LLA-T

Anexo 4

Primers e sondas utilizados para análise da DRM por RQ-PCR

Rearranjos IgH (VH-JH ou DH-JH)

Primer forward VH ou DH paciente-específico + Probe e primer reverso no segmento JH ¹

| | Probe TaqMan | Primer Reverso |
|-----|-----------------------------|----------------------------|
| JH1 | CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG | CGCTATCCCCAGACAGCAGA |
| JH2 | CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG | GGTGCCTGGACAGAGAAGACT |
| JH3 | CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA | AGGCAGAAGGAAAGCCATCTTAC |
| JH4 | CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG | CAGAGTTAAAGCAGGAGAGAGGTTGT |
| JH5 | CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG | AGAGAGGGGGTGGTGAGGACT |
| JH6 | CACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAA | GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT |

Rearranjos IgK (Vk-Kde ou INTRON-Kde)

Primer forward Vk ou INTRON paciente-específico + Probe e primer reverso no segmento Kde ^{2, *}

| | Probe TaqMan | Primer Reverso |
|-------|-----------------------------------|-------------------------|
| Kde | AGCTGCATTTTTGCCATATCCACTATTTGGAGT | TACAGACAGGTCTCAGAGGTCAG |
| Kde* | AGCCCAGGGCGACTCCTCATGAGT | ATATGGCAAAAATGCAGCTGC |
| Kde2* | GGACAACCTGCTCTGACCTCTGAGGA | GACCCTTCAGGCACATGCTT |

Rearranjos TCRG (Vg-Jg1.3/2.3 ou Vg-Jg1.1/2.1)

Primer forward Vg paciente-específico + Probe e primer reverso no segmento Jg (estratégia preferida para casos Jg1.3/2.3) ³

| | Probe TaqMan | Primer Reverso |
|-----------|--------------------------------------|------------------------------|
| JG1.3/2.3 | TGTCACAGGTAAGTATCGGAAGAATACAACATTTCC | TTCCCTGC(T/C)TTCCCTCTATTACCT |
| JG1.1/2.1 | CTGAAGGGACTAAGCTCATAGTAACCTCACCTGGT | TATACTGAGGCCAGGAATGTGACATA |

Primer forward e probe no segmento Vg + primer reverso paciente específico (estratégia preferida para casos Jg1.1/2.1) ^{*-3}

| | Probe TaqMan | Primer Forward |
|-------|---|-------------------------------|
| VG2 | TTGAGATTGATACTGCGAAATCTAATTGAAAATGACTC | CTTACGCAAGCACAAGGAACAA |
| VG3 | ACTCATAACCCAGGAGGTGGAGCTGGATATT | CTCCACCGCAAGGGATGT |
| VG4 | CTTGAGAATGATACTGCGAAATCTTATTGAAAATGA | GATACTTACGGAAGCACAAGGAAGA |
| VG5* | ATCAATATCCAGCTCCACCTCCTGGGT | GGACTCAGTCCAGGAAAGTATTATCTCAT |
| VG9 | TAGGATACCTGAAACGTCTACATCCACTCTCACCC | GGCATTCCGTCAGGCAAA |
| VG10* | CAATCCTTACCATCAAGTCCGTAGAGAAAGAAGACAT (R) | CAAAGTGGAGGCAAGAAAGAATTC |
| VG11* | TCAAGTTTCTTAGTCTTCCACCTGAGCAATCT (R) | CATGTCTTCTTGACAATCTCTGCTC |

Rearranjos TCRD (Vd-Jd1, Dd2-Jd1, Vd2-Dd3 ou Dd2-Dd3)

Primer forward Vd ou Dd2 paciente-específico + Probe e primer reverso no segmento Jd1 ou Dd3 ^{*}

| | Probe TaqMan | Primer Reverso |
|--------|----------------------------------|--------------------------|
| JD1* | CCCGTGTGACTGTGGAACCAAGTAAGTAACTC | TTAGATGGAGGATGCCTTAACCTT |
| DD3* | CGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTG | TTTGCCCTGCAGTTTTTGT |
| DD3-2* | ATATCCTCACCTGGGTCCCATGCC' | CTGCTTGCTGTGTTTGTCTCT |

Primer forward e probe no segmento Vd2 + primer reverso paciente específico ⁴

| | Probe TaqMan | Primer Forward |
|-----|--------------------------------|--------------------------|
| VD2 | AGACCCTTCACTCTCTCTGATGGTGAAGTA | TGCAAAGAACCTGGCTGTACTTAA |

Gene N-RAS: Controle interno (normalizador) ⁵

| | |
|--------------------|--------------------------------|
| Primer forward | ACCTGTTTGTGGACATACTGG |
| Primer Reverso | CGCCTGCCTCATGTAT |
| Probe TaqMan N-RAS | TCATGGCACTGTACTCTTCTTGGTCCAGCT |

Sequências estão na orientação 5'→3'. Probes com (R) significa que são da fita reversa. Ref : 1, Verhagen et al, 2000, 2, van der Velden et al, 2002b, 3, van der Velden et al, 2002a, 4, Szczepanski et al, 2004.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

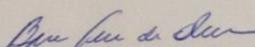
FOLHA DE APROVAÇÃO

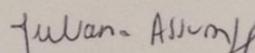
AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS LEUCÊMICAS NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO PELAS TÉCNICAS DE IMUNOFENOTIPAGEM E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

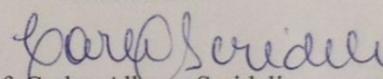
CAMILA SILVA PERES CANCELA

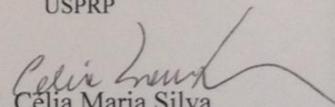
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde.

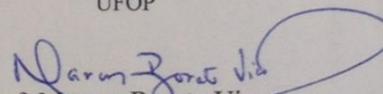
Aprovada em 31 de agosto de 2015, pela banca constituída pelos membros:

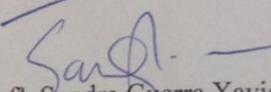

Prof.^ª Benigna Maria de Oliveira - Orientadora
UFMG


Dra. Juliana Godoy Assumpção - Coorientadora
Hermes Pardini


Prof. Carlos Alberto Scrideli
USPRP


Prof.^ª Célia Maria Silva
UFOP


Prof. Marcos Borato Viana
UFMG


Prof.^ª Sandra Guerra Xavier
UFMG

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2015.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA CAMILA SILVA PERES CANCELA

Realizou-se, no dia 31 de agosto de 2015, às 13:30 horas, na sala de videoconferência do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada "AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS LEUCÊMICAS NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO PELAS TÉCNICAS DE IMUNOFENOTIPAGEM E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA", apresentada por CAMILA SILVA PERES CANCELA, número de registro 2011655735, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, à seguinte Comissão Examinadora formada pelos Professores Doutores: Benigna Maria de Oliveira - Orientadora (UFMG), Juliana Godoy Assumpção - Coorientadora (Hermes Pardini), Carlos Alberto Scrideli (USPRP), Célia Maria Silva (UFOP), Marcos Borato Viana (UFMG) e Sandra Guerra Xavier (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 31 de agosto de 2015.

Benigna Maria de Oliveira
Prof.^a Benigna Maria de Oliveira (Doutora)

Juliana Godoy Assumpção
Dr.^a Juliana Godoy Assumpção (Doutora)

Carlos Alberto Scrideli
Prof. Carlos Alberto Scrideli (Doutor)

Célia Maria Silva
Prof.^a Célia Maria Silva (Doutor)

Marcos Borato Viana
Prof. Marcos Borato Viana (Doutor)

Sandra Guerra Xavier
Prof.^a Sandra Guerra Xavier (Doutor)

Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG
Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - 8º andar
CEP - 30130-100 - Funcionários - BH/MG

23/08/2015
CÓNFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG