

Francisco Danilo Ferreira Paula

ESTUDO PROSPECTIVO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM
CRIANÇAS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Belo Horizonte – MG

2015

Francisco Danilo Ferreira Paula

ESTUDO PROSPECTIVO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM
CRIANÇAS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Patologia, área de concentração em Patologia Geral.

Orientadora: Profa. Silvana Maria Elói Santos

Co-orientadoras: Dra. Juliana Godoy Assumpção

Profa. Sandra Guerra Xavier

Belo Horizonte

2015

Paula, Francisco Danilo Ferreira.

P324e Estudo prospectivo de doença residual mínima em crianças com Leucemia Linfóide Aguda [manuscrito]. / Francisco Danilo Ferreira Paula. - - Belo Horizonte: 2015.

80f.: il.

Orientador (a): Silvana Maria Elói Santos.

Área de concentração: Patologia Geral.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasia Residual. 2. Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras. 3. Sobrevida. 4. Reação em Cadeia Polimerase. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Santos, Silvana Maria Elói. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM: QZ 202

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO FRANCISCO DANILO FERREIRA PAULA

Realizou-se, no dia 15 de julho de 2015, às 09:00 horas, Faculdade de Medicina, sala 062, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *ESTUDO PROSPECTIVO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA*, apresentada por FRANCISCO DANILO FERREIRA PAULA, número de registro 2010657220, graduado no curso de FARMACIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Silvana Maria Elói Santos - Orientador (UFMG), Prof(a). Sandra Guerra Xavier (UFMG), Prof(a). Daniel Dias Ribeiro (HC-UFMG), Prof(a). Agdemir Waleria Aleixo (UFMG), Prof(a). Carlos Alberto Scrideli (USPRP), Prof(a). Ana Flávia L. Tibúrcio (HEMATOLÓGICA), Prof(a). Juliana Godoy Assumpcao (Hermes Pardini).


A Comissão considerou a tese:


() Aprovada

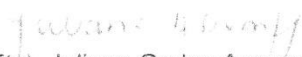
() Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.


Belo Horizonte, 15 de julho de 2015.

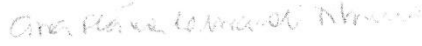

Prof(a). Silvana Maria Elói Santos (Doutora)

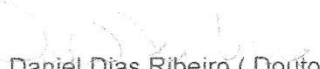

Prof(a). Sandra Guerra Xavier (Doutor)


Prof(a). Juliana Godoy Assumpcao (Doutora)


Prof(a). Agdemir Waleria Aleixo (Doutora)


Prof(a). Carlos Alberto Scrideli (Doutor)


Prof(a). Ana Flávia L. Tibúrcio (Doutora)


Prof(a). Daniel Dias Ribeiro (Doutor)


CONFERE COM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

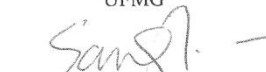
ESTUDO PROSPECTIVO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM CRIANÇAS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

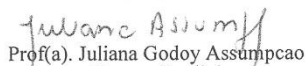
FRANCISCO DANILO FERREIRA PAULA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA GERAL.

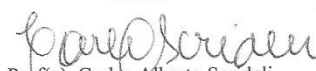
Aprovada em 15 de julho de 2015, pela banca constituída pelos membros:

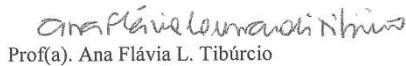

Prof(a). Silvana Maria Elói Santos - Orientador
UFMG



Prof(a). Sandra Guerra Xavier
UFMG


Prof(a). Juliana Godoy Assumpcao
Hermes Pardini


Prof(a). Agdemir Waleria Aleixo
UFMG


Prof(a). Carlos Alberto Scrideli
USPRP


Prof(a). Ana Flávia L. Tibúrcio
HEMATOLÓGICA


Prof(a). Daniel Dias Ribeiro
HC-UFMG

Belo Horizonte, 15 de julho de 2015.

AGRADECIMENTOS

Às Profas. Sandra Guerra e Silvana Elói e à Dra. Juliana Godoy pela paciência, incentivo e orientação.

Ao Dr. Andrés e toda a equipe do Laboratório do Centro Infantil Boldrini, em Campinas-SP, pela colaboração, receptividade e oportunidade de treinamento.

Aos Doutores Joaquim Caetano de Aguirre Neto e Álvaro Pimenta Dutra (Santa Casa de Misericórdia, BH), Eduardo Ribeiro Lima (Hospital da Baleia, Fundação Bernardo Guimarães, BH).

À equipe do Laboratório de Imunofenotipagem do Hospital das Clínicas, em especial à Dra. Mitiko Murao, pela colaboração.

À Valéria pela amizade, incentivo, paciência e por toda a ajuda.

À Cybele pela contribuição com seu conhecimento.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, pelo apoio, carinho e compreensão.

Às minhas filhas, Luísa e Isabela. Razão de tudo.

À Mônica, minha grande incentivadora. Jamais deixarei de reconhecer a sua importância na minha vida.

Aos familiares dos pacientes participantes por acreditarem na seriedade do nosso trabalho.

RESUMO

A detecção da DRM por PCR convencional pode ser uma alternativa eficaz e de baixo custo para a estratificação em grupos de risco de recaída em pacientes com LLA. A proposta deste estudo foi comparar a DRM por PCR qualitativa com um método de referência, RQ-PCR, para detecção de rearranjos de genes *Ig/TCR* no final do período de indução (D28-35) do tratamento, em crianças atendidas em três instituições de referência no tratamento de leucemias. Dos 74 pacientes atendidos e diagnosticados com LLA de 2010-2012, em 57 a DRM foi realizada apenas pelo método qualitativo e em 44 a DRM foi realizada pelos dois métodos. A DRM pelo método convencional foi positiva em 15,8% (9/57) e em 25% (11/44) pelo método quantitativo, considerando o ponto de corte de 1×10^{-3} para LLA-B e 1×10^{-2} para LLA-T. A probabilidade de sobrevida global e de sobrevida livre de leucemia (SLL) em 3,5 anos foi estimada em 73,6% (n=74) e 72,3% (n=72), respectivamente. A SLL em 3,5 anos foi significativamente maior nos pacientes com DRM negativa pelo método qualitativo (p=0,032). Não houve associação significativa entre a DRM realizada por RQ-PCR e a SLL. Em uma análise multivariada com o modelo de COX, a DRM por método qualitativo foi a única variável significativamente relacionada à SLL quando comparada com variáveis que são classicamente utilizadas na categorização de risco (idade, contagem global de leucócitos). A utilização da DRM pelo método qualitativo mostrou-se eficiente para identificar pacientes com alto risco de recaída. Dada as dificuldades de implementação da monitorização da DRM por RQ-PCR na maioria dos centros de tratamento no Brasil, a estratégia de avaliação da DRM com o método qualitativo pode ser uma alternativa custo-efetiva para países em desenvolvimento.

ABSTRACT

MRD analysis of *Ig* and *TCR* genes rearrangements by conventional PCR can be an effective and low cost alternative for risk stratification in patients with ALL. The purpose of this study was to compare *Ig/TCR* gene rearrangements MRD assessment by qualitative PCR with the reference assay, RQ-PCR, at the end of induction period (day 28-35) in children from three leading institutions in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Of the 74 patients diagnosed with ALL and treated from 2010 to 2012, MRD was performed by qualitative PCR in 57 and by both tests in 44. MRD was positive in 9/57 (15.8%) patients by the conventional method and in 11/44 (25%) by the quantitative test, considering the cutoff point of 1×10^{-3} for pB-ALL and 1×10^{-2} for T-ALL. The estimated 3.5-year probabilities of overall and leukemia-free survival (LFS) were 73.6% and 72.3%, respectively. The 3.5-year LFS was significantly higher in consensus primers MRD-negative children ($p=0.032$). There was no significant association between MRD held by RQ-PCR and LFS. In a multivariate analysis using Cox model, MRD qualitative assay was the only variable significantly related to LFS. In conclusion, given the difficulties in the implementation of MRD monitoring by RQ-PCR in most treatment centers in Brazil, we suggest the use of the conventional strategy as a cost-effective alternative in our context.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e biológicas dos 74 pacientes estudados.....	39
Tabela 2 - Frequência do número de rearranjos V-D-J nos genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i> encontrados ao diagnóstico por PCR convencional nos 58 pacientes.....	42
Tabela 3 - Frequência do número de rearranjos V-D-J nos genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i> encontrados ao diagnóstico por PCR convencional nos 47 pacientes com LLA-B.....	42
Tabela 4 - Frequência do número de rearranjos V-D-J nos genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i> encontrados ao diagnóstico por PCR convencional nos 11 pacientes com LLA-T.....	43
Tabela 5 - Frequência de rearranjos V-D-J nos genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i> nos 47 pacientes com LLA-B derivada.....	44
Tabela 6 - Frequência de rearranjos V-D-J nos genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i> e da deleção <i>SIL-TAL</i> nos 11 pacientes com LLA-T.....	45
Tabela 7 - Teste de sensibilidade dos 175 primers por RQ-PCR.....	51
Tabela 8 - Análise da DRM por PCR convencional ao final do período de indução (D28-35) dos 57 pacientes estudados.....	52
Tabela 9 - Análise da DRM por RQ-PCR.....	53
Tabela 10 - Resultados comparativos da análise da DRM por PCR convencional e RQ-PCR.....	55
Tabela 11 - Modelo de Cox para avaliar a influência da DRM por PCR convencional no D28-35 na Sobrevida Livre de Leucemia de 57 pacientes estudados.....	60
Tabela 12 - Modelo de Cox para avaliar a influência da DRM por PCR convencional no D28-35 e das principais variáveis de estratificação de risco em LLA na Sobrevida Livre de Leucemia de 57 pacientes estudados.....	61
Tabela 13 - Influência da PCR convencional na Sobrevida Livre de Leucemia.....	61
Tabela 14 - Modelo de Cox para avaliar a influência da DRM por RQ-PCR no D28-35 na Sobrevida Livre de Leucemia de 57 pacientes estudados.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Combinações de <i>primers</i> utilizadas para a triagem inicial de rearranjos V-D-J nos genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i> nos pacientes com LLAs -B e -T.....	30
Quadro 2 - Protocolo da reação de PCR para a triagem de rearranjos nas amostras de DNA ao diagnóstico (D0).....	31
Quadro 3 - Protocolo da reação de PCR para reamplificação dos rearranjos detectados nas amostras do diagnóstico (D0).....	32
Quadro 4 - Protocolo da reação de PCR para sequenciamento das regiões de rearranjos clonais.....	33
Quadro 5 - Estratégia para desenho de <i>primer</i> clone-específico para determinação da DRM por RQ-PCR.....	34
Quadro 6 - Protocolo da reação de RQ-PCR para o teste de eficiência dos <i>primers</i>	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de formação dos rearranjos gênicos nas regiões variáveis que contêm os sítios de reconhecimento antigênico de uma imunoglobulina.....	20
Figura 2 - Diagrama esquemático da técnica de análise de homo/heteroduplex de rearranjos dos genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i>	22
Figura 3 - Fluxograma da metodologia utilizada para a análise da DRM por PCR convencional e por RQ-PCR.....	28
Figura 4 - Estratégia de amplificação da região clonal.....	36
Figura 5 - Fluxograma das etapas executadas para as amostras dos 74 pacientes estudados.....	40
Figura 6 - Análise homo-heteroduplex para triagem dos rearranjos gênicos <i>TCRG-Vg9</i> e <i>TCRD-VD1</i>	41
Figura 7 - Estratégia para identificação da região N.....	46
Figura 8 - Estratégia para identificação da região N.....	46
Figura 9 - Estratégia para identificação da região N.....	47
Figura 10 - Estratégia para identificação da região N.....	47
Figura 11 - Estratégia para identificação da região N.....	48
Figura 12 - Estratégia para identificação da região N.....	48
Figura 13 - Estratégia para identificação da região N.....	49
Figura 14 - Estratégia para identificação da região N.....	49
Figura 15 - Estratégia de desenho de <i>primers</i> específicos.....	50
Figura 16 - Análise da DRM por PCR convencional para o rearranjo gênico clonal <i>VD1</i> e <i>D2J1</i>	52
Figura 17 - Análise do resultado de DRM por RQ-PCR realizada com <i>primer</i> clone-específico do rearranjo gênico <i>VD1</i> de um paciente estudado.....	53
Figura 18 - Curva de Sobrevida Global dos 74 pacientes incluídos no estudo.....	56

Figura 19 - Curva de Sobrevida Livre de Eventos dos 74 pacientes incluídos no estudo.....	56
Figura 20 - Curva de Sobrevida Livre de Leucemia de 72 pacientes.....	57
Figura 21 - Curvas de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a DRM por PCR convencional.....	58
Figura 22 - Curva de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a idade da criança.....	58
Figura 23 - Curva de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a contagem global de leucócitos ao diagnóstico.....	59
Figura 24 - Curva de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a classificação inicial de risco.....	59
Figura 25 - Curvas de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a DRM por RQ-PCR.....	62
Figura 26 - Curvas de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com DRM por PCR convencional no grupo de 44 crianças analisadas por RQ-PCR.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

D28: Dia 28 da Terapia de Indução

D33: Dia 33 da Terapia de Indução

D35: Dia 35 da Terapia de Indução

dNTP: Desoxirribonucleotídeo Trisfosfatado

DRM: Doença Residual Mínima

GBTLI: Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis

Ig: Imunoglobulina

IgH: Cadeia pesada da imunoglobulina

IgK: Cadeia leve kappa da imunoglobulina

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LLA: Leucemia Linfóide Aguda

LLA B-derivada: Leucemia Linfóide Aguda B-derivada

LLA-T: Leucemia Linfóide Aguda T

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

MO: Medula Óssea

M13: vírus bacteriófago M13

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RQ-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase após transcrição reversa

SG: Sobrevida Global

SLE: Sobrevida Livre de Eventos

SLL: Sobrevida Livre de Leucemia

TCR: Receptor de Célula T

TCRD: Receptor Delta de Célula T

TCRG: Receptor Gamma de Célula T

T7: vírus bacteriófago T7

WBC: Contagem global de leucócitos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. LEUCEMIAS AGUDAS	14
1.2. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA.....	14
1.3. DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA.....	17
1.4. MÉTODOS PARA O ESTUDO DA DRM.....	18
1.4.1. PCR DAS REGIÕES DE REARRANJOS CLONAIOS DOS GENES <i>IG</i> E <i>TCR</i>	19
1.4.1.1. PCR Convencional Para a Detecção de Rearranjos Clonais dos Genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i>	21
1.4.1.2. RQ-PCR Para a Detecção de Rearranjos Clonais dos Genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i>	22
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. PACIENTES E MÉTODOS.....	26
4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO E LEVANTAMENTO DE DADOS CLÍNICOS.....	26
4.2. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS E EXTRAÇÃO DE DNA.....	26
4.3. ANÁLISE DA DRM POR PCR CONVENCIONAL E POR RQ-PCR.....	27
4.3.1. DETECÇÃO DOS REARRANJOS CLONAIOS DOS GENES <i>IG</i> E <i>TCR</i> NO D0 E MONITORAMENTO DA DRM PELO MÉTODO SIMPLIFICADO...	29
4.3.2. TRIAGEM INICIAL DOS REARRANJOS CLONAIOS DA REGIÃO V-D-J.....	29
4.3.3. ANÁLISE DE HOMO/HETERODÚPLEX.....	31
4.3.4. DETERMINAÇÃO DA DRM PELO MÉTODO SIMPLIFICADO.....	31
4.4. SEQUENCIAMENTO DOS REARRANJOS CLONAIOS DE <i>IG</i> E <i>TCR</i> ...	32
4.5. ANÁLISE DA REGIÃO JUNCIONAL E DESENHO DO <i>PRIMER</i> CLONE-ESPECÍFICO.....	33
4.6. MONITORAMENTO DA DRM POR RQ-PCR.....	35

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. DETECÇÃO DOS REARRANJOS V-D-J NOS GENES <i>IG</i> E <i>TCR</i> NAS AMOSTRAS DO DIAGNÓSTICO (D0).....	40
5.1.1. FREQUÊNCIA DOS REARRANJOS V-D-J NOS GENES <i>IG</i> E <i>TCR</i> DETECTADOS AO DIAGNÓSTICO.....	41
5.2. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO DE JUNÇÃO V-D-J DOS REARRANJOS GÊNICOS DE <i>IG</i> E <i>TCR</i>.....	46
5.3. DESENHOS DE <i>PRIMERS</i> CLONE-ESPECÍFICOS.....	50
5.4. AVALIAÇÃO DA DRM AO FINAL DA TERAPIA DE INDUÇÃO.....	51
5.4.1. ANÁLISE DA DRM POR PCR CONVENCIONAL.....	51
5.4.2. ANÁLISE DA DRM POR RQ-PCR.....	52
5.4.3. COMPARAÇÃO ENTRE PCR CONVENCIONAL E RQ-PCR PARA A ANÁLISE DA DRM.....	54
5.5. ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	55
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÕES.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
9. ANEXOS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEUCEMIAS AGUDAS

As leucemias agudas fazem parte de um grupo de doenças neoplásicas que se caracterizam pela expansão clonal desenfreada de células precursoras de origem linfóide ou mieloide, resultando em acúmulo destas células na medula óssea (Zago *et al.*, 2001).

A ocupação física da medula óssea e a competição nutricional entre as células neoplásicas inibem o desenvolvimento e a diferenciação das células hematopoiéticas normais. Adicionalmente, existem várias evidências experimentais de que as células neoplásicas secretam substâncias inibidoras da mielopoiese (Viana, 1996).

Ao se acumularem na medula óssea, ocorre uma substituição progressiva das células hematopoiéticas normais por células do clone leucêmico, com consequente infiltração destas células em diversos órgãos e sistemas (Oliveira *et al.*, 2004). Os principais sintomas da leucemia aguda decorrem do acúmulo de células neoplásicas na medula óssea, o que pode ocasionar anemia, infecções e hemorragias (Zago *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004).

De acordo com a linhagem acometida, as leucemias agudas podem ser classificadas em mieloide, linfóide ou bifenotípica (Stasi *et al.*, 1995).

1.2. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é o câncer mais comum em crianças, correspondendo a cerca de um quarto de todos os distúrbios malignos e a 75-80% das leucemias que ocorrem até a idade de 15 anos. A LLA tem um pico de incidência entre 2 a 5 anos e outro em adultos, mas nessa faixa etária corresponde a apenas 20% dos casos. Há uma ligeira predominância em crianças do sexo masculino e de raça branca (Viana, 1996; Onciu, 2009).

Alguns trabalhos relacionam fatores de riscos ambientais e genéticos à ocorrência de leucemia na infância. A exposição à radiação ionizante, a certas substâncias químicas como benzeno e

seus derivados e pesticidas, bem como o uso de terapia hormonal, pela mãe, durante a gravidez, têm sido associados a risco para o desenvolvimento da doença (Greaves, 1997; Spector *et al.*, 2006; Belson *et al.*, 2007; Pombo de Oliveira *et al.*, 2009). Além disso, observa-se uma maior frequência de LLA em portadores de distúrbios genéticos (síndrome de Down, síndrome de Bloom, neurofibromatose tipo I) ou síndromes de imunodeficiência, mas na grande maioria dos casos, não há uma causa aparente determinada (Nathan & Orkin, 1998; Spector *et al.*, 2006).

A teoria proposta para a fisiopatologia da LLA relaciona a sua origem com a ocorrência de mutações somáticas aleatórias em uma única célula progenitora indiferenciada ou em um precursor linfóide de linhagem T ou B. O processo de transformação leucêmica tem início quando uma célula acumula alterações que lhe conferem uma vantagem proliferativa ou de sobrevivência sobre as demais (Greaves, 2000). Os eventos que levam a essas mutações são complexos, multifatoriais e ainda não estão totalmente elucidados. (Oliveira *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2007).

Vários genes vêm sendo relacionados à leucemogênese. Estes genes sofrem mutações, o que leva à desregulação transcricional e, conseqüentemente, subversão dos programas normais de proliferação, diferenciação e morte celular. (Greaves, 2000). Nas LLAs, proto-oncogenes podem ser ativados, devido à ação de potentes ativadores transcricionais específicos da linhagem linfóide, ao serem justapostos aos genes do receptor de células T (*TCR*) ou das imunoglobulinas (*Ig*) (Spector *et al.*, 2006).

A transformação leucêmica pode ocorrer em qualquer estágio de maturação no processo de diferenciação linfóide. Conforme as expressões fenotípicas equivalentes ao estágio de diferenciação do precursor B, as LLAs derivadas de células da linhagem B, que constituem aproximadamente 85% dos casos, são classificadas em quatro subtipos: pró-B, B comum ou CALLA (*common acute lymphoblastic leukemia antigen*) positivo, pré-B e B madura (van Dongen *et al.*, 2003; Kroft, 2004; Pui *et al.*, 2004). Já as LLAs derivadas de células T, que equivalem a cerca de 15% dos casos, são classificadas em pré-T, T-intermediária e T madura (van Dongen *et al.*, 2003; Kroft, 2004; Pui *et al.*, 2004).

Até meados do século XX, as leucemias eram consideradas universalmente, uma doença que invariavelmente levava ao óbito. O maior conhecimento sobre a biologia da célula leucêmica

possibilitou a síntese de novos fármacos com atividade antineoplásica. Além disso, a descoberta de novas tecnologias possibilitou o avanço em termos de diagnóstico, estabelecimento de fatores prognósticos e a utilização de tratamentos ajustados a cada grupo de risco estratificado, com consequente aumento das taxas de cura. Estes avanços combinados fizeram do tratamento das LLAs da infância um exemplo de sucesso terapêutico em onco-hematologia, uma vez que as taxas de sobrevida livre globais em cinco anos passaram de menos de 20% antes da década de 1970 para mais de 80% nos dias atuais (Pedrosa & Lins, 2002; Hoelzer *et al*, 2002; Jeha & Pui, 2009; Pui *et al*, 2012).

Com os protocolos de tratamento atuais, a grande maioria das crianças (95%) alcança remissão, definida como menos de 5% de blastos na medula óssea, à observação por microscopia óptica (Cazzaniga & Biondi, 2005). No entanto, 20-25% delas recaem, em geral devido à proliferação de um clone de células leucêmicas idêntico ou relacionado àquele presente no diagnóstico (Pui *et al.*, 2004).

Com o objetivo de melhorar o balanço entre a eficácia e os efeitos adversos do tratamento, os pacientes são estratificados em grupos de risco. Esta estratificação possibilita intensificar o tratamento nos pacientes com maior risco de recaída e reduzir a toxicidade naqueles com maior chance de cura (Pedrosa & Lins, 2002; Onciu, 2009).

Diversos fatores relacionados ao paciente e à doença observados ao diagnóstico, tais como idade, contagem de leucócitos, anormalidades citogenéticas e imunofenotipagem têm sido usados na estratificação de risco dos pacientes com LLA (Greaves, 1997; Pui & Evans, 1998; Onciu, 2009). Esses fatores, contudo, deixam de detectar um número substancial de crianças que inicialmente apresentam bom prognóstico, mas que recaem apesar de receberem o tratamento padrão (Brandalise *et al.*, 1993; Veerman *et al.*, 1996; Pui & Evans, 1998).

A resposta ao tratamento quimioterápico tem-se mostrado altamente relevante para prever o risco de recaída em pacientes com LLA (Gaynon *et al*, 1997; Pui & Robison, 2008). Esta avaliação é feita tradicionalmente pela identificação das células leucêmicas em meio às células normais ao exame morfológico da medula óssea. Entretanto, o paciente pode apresentar um número considerável de células leucêmicas residuais (10^{10}), mas que está abaixo do nível de detecção pela microscopia convencional (Campana & Pui, 1995; Pui & Robison, 2008).

Desta forma, faz-se necessária a determinação da resposta ao tratamento por meio de métodos mais sensíveis que a citologia convencional, como a imunofenotipagem e os métodos moleculares (Henze, 2008).

1.3. DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA

Atualmente, sabe-se que o fator prognóstico em LLA mais importante não está relacionado às características observadas ao diagnóstico, mas sim à velocidade de redução das células neoplásicas na fase inicial do tratamento (Panzer-Grümayer et al., 2000; Coustan-Smith 2000 et al, 2002; Bruggemann et al., 2010). Dá-se o nome de Doença Residual Mínima (DRM) à presença de células neoplásicas remanescentes não detectáveis pela microscopia convencional. Diversos trabalhos têm mostrado o impacto prognóstico da DRM, principalmente quando avaliada no final da terapia de indução (Brisco et al, 1994; Goulden et al., 1998; Jacquy et al, 1997; van Dongen et al, 1998; Cave et al., 1998; Coustan-Smith 2000; Dworzak et al. 2002; Marshall et al., 2003; Conter et al., 2010).

Em 1998, os primeiros relatos de DRM aplicados a estudos clínicos em LLA infantil foram publicados, incluindo o extenso estudo do Grupo de Estudo BFM Internacional (van Dongen et al., 1998). No estudo I-BFM-SG foi empregada uma técnica quantitativa bastante sensível, cujos resultados permitiram distinguir três grupos de pacientes com taxas de recaída significativamente diferentes. A classificação dos grupos foi baseada na cinética de redução das células tumorais durante os primeiros meses do seguimento, medida nos dias 33 (D33) e 78 (D78) da terapia. O grupo de baixo risco apresentou DRM negativa em ambos os momentos (taxa de recaída de 2% em cinco anos); o grupo de alto risco apresentou níveis de DRM $\geq 10^{-3}$ (detecção de uma célula leucêmica em 1.000 células normais) em ambos os momentos (taxa de recaída de 80% em cinco anos); e o restante dos pacientes constituiu o grupo intermediário (taxa de recaída de 22% em cinco anos) (revisto por van der Velden et al., 2007).

No Brasil, um projeto pioneiro realizado em conjunto por três importantes instituições de referência no tratamento de câncer do estado de São Paulo (Centro Infantil Boldrini - Campinas, GRAAC-UNIFESP e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP), estudou o valor preditivo da DRM em pacientes tratados de acordo com o protocolo proposto pelo

Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias da Infância (GBTLI-LLA-99). Para tanto, foi utilizado um método simplificado e extremamente mais barato que os adotados pelos países desenvolvidos. O resultado, publicado no periódico *Hematologica* (Scrideli et al., 2009), mostrou que a detecção da DRM pelo método simplificado com PCR convencional e *primers* consenso no D28 da terapia de indução foi o fator prognóstico independente mais importante quando comparado aos demais adotados pelo GBTLI. Embora eficaz para identificar pacientes com maior quantidade de células residuais e mau prognóstico, o método usado não é verdadeiramente quantitativo e tem sensibilidade limitada (10^{-2} a 10^{-3}), portanto os resultados de DRM negativos não necessariamente traduziram-se em ausência de recaída e melhor prognóstico.

Nota-se, portanto, que a metodologia adotada para a avaliação da DRM tem grande impacto na forma como os resultados obtidos podem ser empregados no tratamento do paciente com LLA. Para a aplicação clínica, o ideal é que a técnica seja quantitativa, altamente sensível, aplicável à maioria dos pacientes e, se possível, de baixo custo (Moppett *et al*, 2003).

1.4. MÉTODOS PARA O ESTUDO DA DRM

Atualmente, três métodos são utilizados no estudo da DRM, com sensibilidade de 10^{-3} a 10^{-5} : (i) Detecção dos transcritos quiméricos (RNA mensageiro - mRNA) resultantes de translocações cromossômicas através de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR); (ii) Imunofenotipagem das células neoplásicas por citometria de fluxo, com a utilização de anticorpos cuja combinação seja “específica” do clone leucêmico; (iii) Reação em cadeia da polimerase (PCR) das regiões de rearranjo clonal dos genes do receptor de células T (*TCR*) e das imunoglobulinas (*Ig*).

Os transcritos quiméricos resultantes de translocações cromossômicas estão diretamente relacionados com a leucemia e, portanto, representam marcadores específicos, além de estáveis. Contudo, esses transcritos estão presentes em apenas 40% dos pacientes com LLA (Hoelzer *et al*, 2002).

O uso da citometria de fluxo, embora inferior à PCR em termos de sensibilidade, permite quantificação direta e precisa do número de células tumorais (Campana & Coustan-Smith, 1999; Coustan-Smith et al., 2000). É um método que exige pouca manipulação e pouco tempo de execução. Por outro lado, apresenta como desvantagem os possíveis erros decorrentes de

alterações na expressão dos antígenos ao longo do tratamento. Além disso, no final da fase de indução, período de recuperação medular, os precursores normais de linhagem B (hematogônias) apresentam características morfológicas e, algumas vezes, imunofenotípicas similares aos linfoblastos das LLAs (Kroft, 2004).

1.4.1. PCR DAS REGIÕES DE REARRANJOS CLONAIIS DOS GENES *IG* E *TCR*

Os rearranjos clonais dos genes *TCR* e *Ig* têm sido amplamente utilizados em estudos de DRM devido à sua alta frequência em LLAs tanto de origem B quanto T. Os rearranjos dos genes *TCR* são observados em mais de 90% dos casos de LLA-T (Szczepanski et al., 2000) e em 50 a 80% dos casos de LLA-B (Szczepanski *et al.*, 1999), e em quase 100% dos casos de LLA-B detectam-se rearranjos dos genes *Ig*.

O processo de formação dos rearranjos gênicos pode ser descrito da seguinte forma: as cadeias proteicas das imunoglobulinas e dos TCR consistem de domínios variáveis e constantes. Os domínios variáveis representam o verdadeiro local de reconhecimento antigênico e são codificados por um éxon único. A formação deste éxon é um processo que ocorre durante o desenvolvimento normal das células B e T, no qual os segmentos V (variável), D (diversidade) e J (junção) dos complexos gênicos *Ig* e *TCR* sofrem rearranjos. Dessa forma, cada linfócito apresenta, no domínio variável, uma combinação específica de segmento V-D-J (Janeway *et al.*, 2007).

As imunoglobulinas apresentam rearranjos das regiões variáveis das cadeias leve (IgL) e pesada (IgH), sendo que, as regiões variáveis da IgL são formadas pelos segmentos V e J, que se reúnem para formar um éxon completo e, na formação da região variável da IgH, há um terceiro segmento (D) entre o V e o J. Em ambas as cadeias, o segmento V é precedido por um éxon que codifica para o peptídeo líder (L), o qual direciona a proteína para a via secretora celular, sendo depois clivado (Figura 1). Além das múltiplas combinações de segmentos V-D-J, uma variabilidade adicional é produzida nas junções V-D, D-J, V-J pela perda de nucleotídeos originais e inserção de novos nucleotídeos entre os segmentos gênicos – é a chamada região N. Este processo gera uma sequência única para cada linfócito (revisto por van Dogen *et al.*, 2003).

Os rearranjos das regiões variáveis dos TCR são produzidos da mesma forma que os dos genes das imunoglobulinas as cadeias α e γ são formadas pelos segmentos gênicos V e J, e as cadeias β e δ contêm o segmento gênico D em adição aos V e J (Janeway *et al*, 2007).

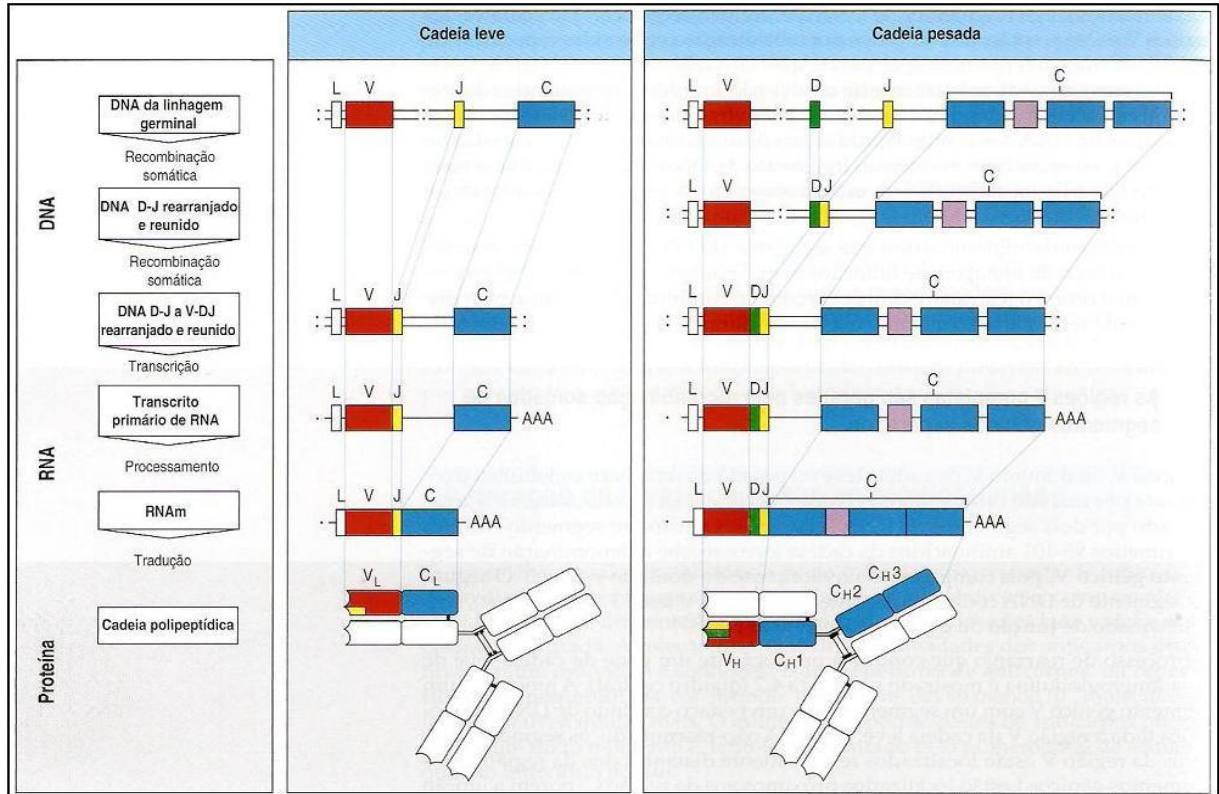


Figura 1 - **Processo de formação dos rearranjos gênicos nas regiões variáveis que contêm os sítios de reconhecimento antígeno de uma imunoglobulina.** Os genes das regiões variáveis da cadeia leve são formados pela junção e recombinação dos segmentos gênicos V e J, e da cadeia pesada dos segmentos gênicos V, D e J. Retirado de Janeway *et al*, 2007.

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

Visto que a LLA deriva de uma única célula linfóide precursora que sofre transformação, todas as células leucêmicas de um paciente, em princípio, têm os mesmos rearranjos gênicos com sequências idênticas da região de junção. Uma vez que as regiões de junção contêm sequências singulares geradas pela deleção e inserção aleatória de nucleotídeos durante o processo de rearranjo (região N), estas regiões podem ser consideradas como marcadores da leucemia e, portanto, tornam-se alvos apropriados para a detecção de DRM.

1.4.1.1. PCR Convencional para a Detecção de Rearranjos Clonais dos Genes *Ig* e *TCR*

Os rearranjos presentes nas amostras de cada paciente ao diagnóstico são identificados através de PCR, utilizando oligonucleotídeos (*primers*) consenso previamente descritos para os segmentos V, D e J dos genes *Ig* e *TCR*. Para distinguir produtos de PCR derivados de populações de células malignas de produtos derivados de células normais, a análise da PCR deve ser complementada com estratégias que possibilitem saber se os produtos da PCR são derivados de populações de células monoclonais ou policlonais. Esta heterogeneidade da região de junção pode ser estudada por análise de homo/heterodúplex (Figura 2) (Langerak *et al.*, 1997; van der Velden *et al.*, 2007).

A distinção entre produtos de PCR derivados de células monoclonais ou policlonais é possível através da desnaturação/aquecimento dos produtos de PCR a 94°C seguida de renaturação/resfriamento a 4°C para induzir a formação de bandas homo ou heteroduplexes, sendo separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante (Figura 2). O surgimento de fitas homoduplex é caracterizado por bandas únicas visíveis no gel, indicando a presença de células linfoides monoclonais (Figura 2A). O surgimento de fitas heteroduplexes evidencia a presença de regiões juncionais heterogêneas e não forma banda no gel, indicando a presença de células linfoides policlonais (Figura 2C). Ao serem renaturadas, as fitas simples dos fragmentos de PCR não se complementam totalmente, formando um duplex heterogêneo, ou seja, duas bandas muito próximas no gel de poliacrilamida, com regiões juncionais diferentes, formando uma espécie de “bolha” nessas regiões. A diferença de um único nucleotídeo de um fragmento para outro já é suficiente para gerar um heteroduplex. No caso de mistura de células monoclonais em um “*background*” policlonal, tanto bandas homoduplexes quanto bandas heteroduplexes são formadas (Figura 2B). No gel de poliacrilamida, bandas homoduplexes migram mais rapidamente do que heteroduplexes (Figura 2D). Os heteroduplexes, quando em grande número, podem formar um rastro em decorrência da lenta migração dos fragmentos (Langerak *et al.*, 1997).

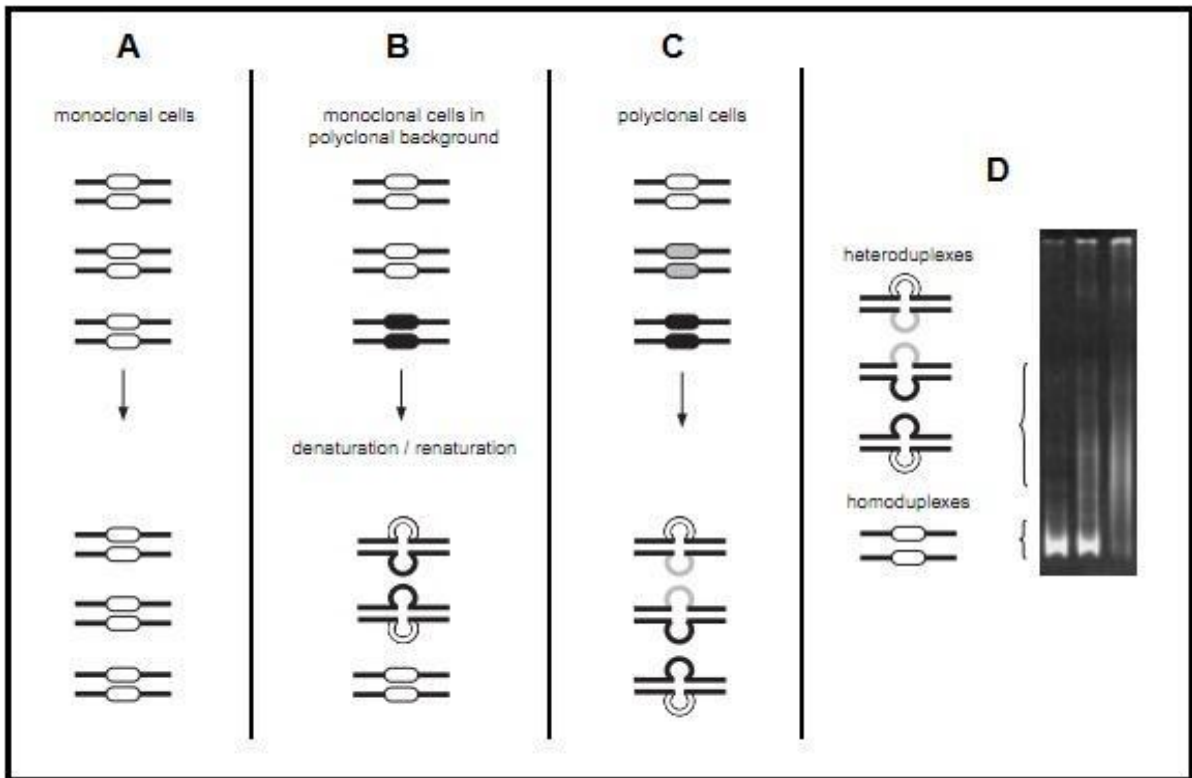


Figura 2 - Diagrama esquemático da técnica de análise de homo/heteroduplex de rearranjos dos genes *Ig* e *TCR*. Adaptado de Langerak *et al*, 1997.

Uma vez que se tenha determinado o tipo de rearranjo presente no clone leucêmico ao diagnóstico, é possível utilizar este rearranjo para detectar as células neoplásicas durante o acompanhamento dos pacientes, através da mesma estratégia.

1.4.1.2. RQ-PCR Para a Detecção de Rearranjos Clonais dos Genes *Ig* e *TCR*

Para obter o máximo de sensibilidade e especificidade, a melhor alternativa para o uso dos rearranjos de *Ig* e *TCR* na avaliação de DRM consiste na utilização da RQ-PCR (*Real time Quantitative PCR*) com *primers* clone-específicos baseados na sequência do rearranjo de cada paciente obtida ao diagnóstico, e sondas TaqMan (Applied Biosystems).

A RQ-PCR permite a quantificação precisa do produto de PCR através da detecção de sinais gerados pela degradação de sondas fluorescentes no início da fase exponencial da PCR. Além de permitir a quantificação numa faixa de 4 a 5 logaritmos (*logs*) de concentrações de DNA-

alvo, o método dispensa qualquer tipo de manipulação pós-PCR, diminuindo o risco de resultados falso-positivos oriundos de contaminações (revisto por Cazzaniga & Biondi, 2005).

A maior desvantagem da detecção de rearranjos pelo RQ-PCR é o seu custo, o que constitui o principal obstáculo para a adoção dessa técnica em países em desenvolvimento como o Brasil.

Tendo em vista a importância do estudo da DRM, a proposta do presente estudo foi comparar os métodos de PCR convencional e RQ-PCR na avaliação da DRM ao final da indução (D28-35) em um grupo de crianças com LLA.

2. JUSTIFICATIVA

Há aproximadamente 50 anos, a LLA infantil era uma doença fatal. No início dos anos 60, com a administração dos primeiros quimioterápicos, apenas 20% das crianças eram curadas, mas já no final dessa década, com o melhor controle da doença no sistema nervoso central, foi possível alcançar índices de cura de até 50%. A partir da década de 80, graças à intensificação e o uso combinado de diferentes quimioterápicos, bem como à estratificação de risco dos pacientes, a sobrevida ultrapassou 80% nos países desenvolvidos (Pui & Evans, 1998; Pui *et al*, 2012).

Nas duas últimas décadas, contudo, as taxas de sobrevivência alcançaram um platô, no qual o benefício potencial de regimes quimioterápicos mais agressivos é contrabalançado pelo excesso de mortalidade devido a complicações, tornando muito importantes os esforços para individualizar o tratamento.

A pesquisa de células neoplásicas residuais (DRM) através de estudo molecular constitui, hoje, uma ferramenta indispensável para detectar precocemente pacientes com alto risco de recaída. Em virtude dos resultados do protocolo GBTLI-LLA-99, que mostraram que a DRM no D28 da terapia foi o fator prognóstico independente mais importante quando comparado aos demais (Scrideli *et al*. 2009), a DRM passou a ser critério de estratificação de pacientes no atual protocolo GBTLI-LLA-2009. De acordo com o GBTLI-LLA-2009, a DRM deve ser avaliada por citometria de fluxo no D15 e por RQ-PCR no D35, para a re-estratificação em

grupos de risco dos pacientes inicialmente estratificados por outros critérios (idade e leucometria).

Atualmente, somente o Centro Infantil Boldrini (Campinas/SP) faz a avaliação da DRM por RQ-PCR nos pacientes tratados de acordo com o GBTLI-LLA-2009. O custo alto de reagentes e equipamentos, além da expertise necessária para a realização e a interpretação desse exame, dificultam a sua implementação em muitos centros do país.

Não existe hoje, em Minas Gerais, uma instituição que realize exames de DRM para reclassificação dos pacientes em grupos de risco ao final da indução. O Hospital das Clínicas da UFMG possui unidade especializada em oncologia pediátrica, com atendimento multidisciplinar, apoio à família do paciente e profissionais com alta qualificação técnica. Dotar seus laboratórios com tecnologia de ponta pode vir a elevar, de forma adicional, a probabilidade de sobrevida das crianças com LLA no estado.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi implementar a técnica de RQ-PCR no Laboratório de Hematologia Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG e compará-la com a PCR convencional, utilizada na rotina. Além disso, os dados obtidos com ambos os métodos foram comparados com os demais dados utilizados para análise de resposta precoce ao tratamento, bem como com dados de sobrevida, para verificar sua importância prognóstica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL:

- Comparar os métodos de PCR convencional e RQ-PCR na detecção de rearranjos da região V-D-J dos genes *Ig* e *TCR* para monitorar a DRM ao final da indução (D28-35) em crianças com LLA.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Detectar rearranjos da região V-D-J dos genes *Ig* e *TCR* em crianças com LLA ao diagnóstico por meio de PCR convencional;
- Sequenciar a região de junção V-D-J dos genes *Ig* e *TCR* dos rearranjos detectados;
- Desenhar *primers* clone-específicos para cada criança com LLA;
- Testar a especificidade e a sensibilidade dos *primers* clone-específicos;
- Utilizar *primers* consenso para monitorar a DRM ao final da terapia de indução (D28-35) por meio de PCR convencional;
- Utilizar os *primers* clone-específicos para monitorar a DRM no D28-35 da terapia de indução por meio de RQ-PCR;
- Comparar os resultados da PCR convencional com os da RQ-PCR;
- Correlacionar os resultados obtidos pelas duas metodologias com os dados clínicos utilizados, ao diagnóstico, para estratificar as crianças com LLA;
- Verificar a importância prognóstica da DRM avaliada por PCR convencional e RQ-PCR.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO E LEVANTAMENTO DE DADOS CLÍNICOS

Foram coletadas amostras de medula óssea de 74 pacientes com LLA pediátrica (0 a 19 anos) tratados na Hematologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012 (n=52) e nos Serviços de Oncologia Pediátrica do Hospital da Baleia (n=14) e da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (n=8) de Abril de 2010 a Maio de 2011. A maioria dos pacientes incluídos (n=45) foi tratada de acordo com o protocolo brasileiro GBTLI-LLA-99; 21 pacientes foram tratados pelo GBTLI-LLA-2009; e os outros oito pacientes foram tratados pelo protocolo italiano (AIEOP-95) (Aricò *et al.*, 2008). Todos tiveram participação voluntária atestada em termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelos setores envolvidos, bem como pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG), do Hospital da Baleia e da Santa Casa de Misericórdia de BH.

O diagnóstico de LLA foi feito a partir de análise morfológica das células da medula óssea, imunofenotipagem por citometria de fluxo, cariotipagem e análise molecular das principais translocações cromossômicas. Os critérios utilizados para a estratificação de risco inicial dos pacientes levaram em conta principalmente a idade e a leucometria ao diagnóstico. Os dados clínicos e laboratoriais de cada paciente foram levantados a partir do prontuário e transferidos para uma base de dados com acesso reservado aos pesquisadores responsáveis pelo projeto.

4.2. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS E EXTRAÇÃO DE DNA

Foram obtidas amostras de medula óssea no diagnóstico (D0) e ao final do período de indução (D28) para os pacientes tratados de acordo com o protocolo GBTLI-LLA-99, D33 para o AIEOP-95 e D35 para o protocolo GBTLI-LLA-2009.

Para a obtenção das células mononucleadas, as amostras de medula óssea foram submetidas à separação através de gradiente de centrifugação com Histopaque® (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), de acordo com especificações do fabricante.

A extração do DNA das células mononucleadas foi realizada segundo o protocolo do fabricante do kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). O DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) conforme instruções do fabricante e armazenado a -20°C.

Um *pool* de DNAs extraídos de células mononucleadas, obtidas de sangue periférico de doadores sem doença hematológica (PBL) e com participação também atestada em TCLE, foi utilizado como controle de ampliações inespecíficas.

4.3. ANÁLISE DA DRM POR PCR CONVENCIONAL E POR RQ-PCR

A metodologia utilizada na análise da DRM está esquematizada no fluxograma mostrado na Figura 3.

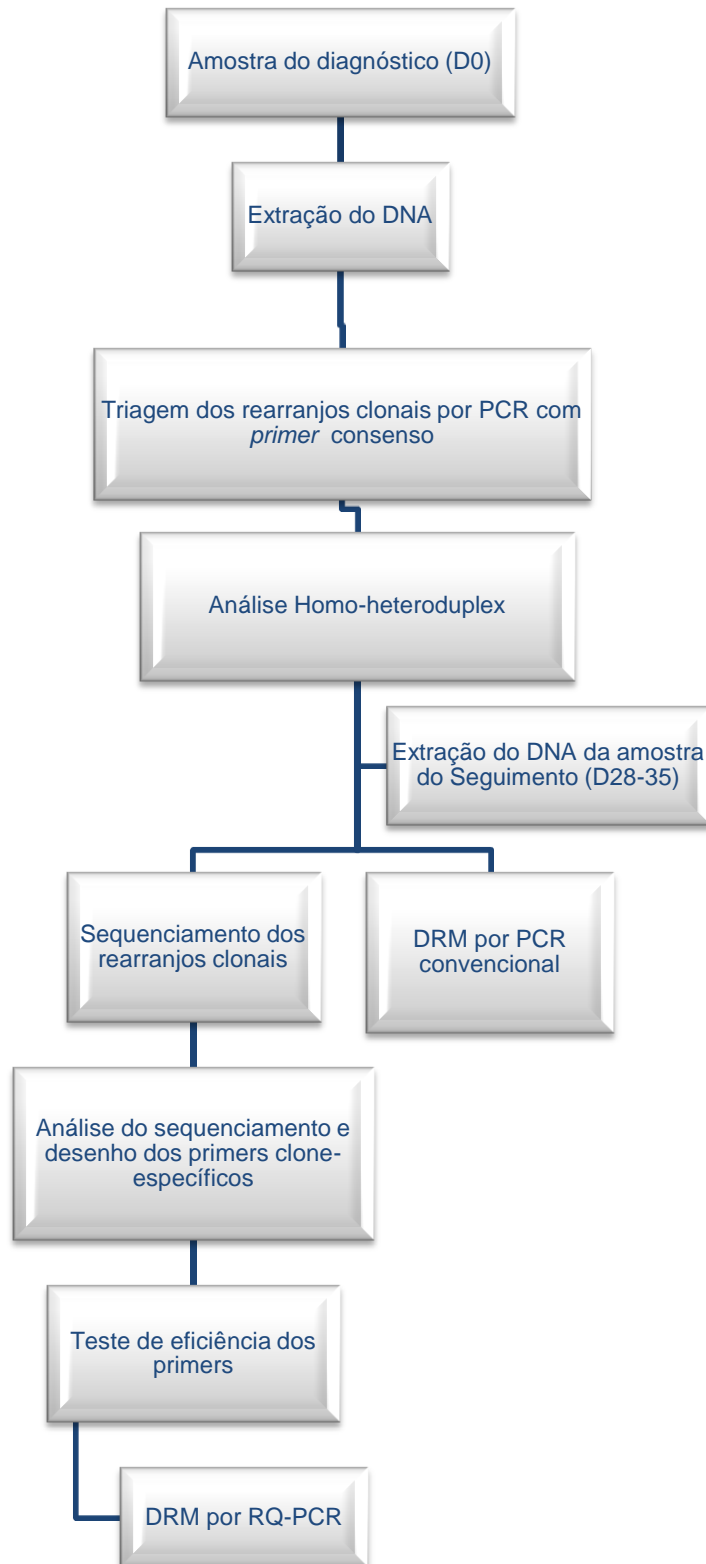


Figura 3 - Fluxograma da metodologia utilizada para a análise da DRM por PCR convencional e por RQ-PCR.

4.3.1. DETECÇÃO DOS REARRANJOS CLONAIIS DOS GENES *IG* E *TCR* NO D0 E MONITORAMENTO DA DRM PELO MÉTODO SIMPLIFICADO

O método simplificado para detecção de rearranjos clonais dos genes *Ig* e *TCR* e monitoramento da DRM foi padronizado pelo grupo de Biologia Molecular do GBTLI, liderado pelo Dr. Andres Yunes do Centro Infantil Boldrini (Campinas/SP), tendo sido adaptado a partir da metodologia desenvolvida pelo grupo BIOMED (van Dongen et al., 2003; Pongers-Willemse et al., 1999).

4.3.2. TRIAGEM INICIAL DOS REARRANJOS CLONAIIS DA REGIÃO V-D-J

O DNA da amostra do D0 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). A junção do gene *SIL* com o gene *TAL*, no braço curto do cromossomo 1, pode resultar em deleções, com a formação de uma região específica naquele ponto de quebra, semelhantes às regiões de junção dos rearranjos dos genes *Ig* e *TCR*. A microdeleção nos genes *SIL-TAL* pode ocorrer em aproximadamente 25% dos casos de LLA-T (Pongers-Willemse *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Mansur *et al.*, 2009). 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 I. As reações de PCR para a triagem dos rearranjos do D0 foram realizadas para um volume final de 25 µL e com uma concentração de DNA de 25 ng/µL, conforme o protocolo descrito no Quadro 2. Nas amostras em que não houve amplificação, a integridade do DNA foi testada através 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). Como controle negativo, foi utilizada água no lugar do DNA e, como controle de amplificações inespecíficas, foi utilizado o PBL.

Quadro 1 - Combinações de *primers* utilizadas para a triagem inicial de rearranjos V-D-J nos genes *Ig* e *TCR* nos pacientes com LLAs -B e -T

Gene	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>	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	X	X	200-255
	Vg9	Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2	X	X	160-220
	Vg10	Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2		X	145-200
	Vg11	Jg1.3/2.3 + Jg1.1/2	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

Quadro 2 - Protocolo de reação de PCR para a triagem dos rearranjos nas amostras de DNA ao diagnóstico (D0)

Reagente	Volume (μL)	Perfil térmico
Tampão (10X)	2,5	95°C – 3 minutos 94°C – 30 segundos 60°C – 30 segundos 72°C – 30 segundos 72°C – 10 minutos } 35x
dNTP (2 mM)	2,0	
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	
Mix de primers (10 pmol cada)	2,0	
DNA polimerase (5 U/ μL)	0,2	
Água Milli Q	14,8	
DNA (25 ng/ μL)	2,0	

4.3.3. ANÁLISE DE HOMO/HETERODÚPLEX

Esta metodologia foi adaptada a partir de Langerak *et al.* (1997). 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. Um marcador de tamanho molecular (DNA ladder 1Kb plus – Invitrogen) foi utilizado para servir de referência de comparação com o fragmento amplificado. A banda clonal específica, identificada para cada rearranjo, de acordo com o tamanho molecular esperado (Quadro 1), foi recortada do gel, dissolvida em água e armazenada a -20°C. Esse fragmento dissolvido serviu de base para a determinação da DRM quantitativa.

4.3.4. DETERMINAÇÃO DA DRM PELO MÉTODO SIMPLIFICADO

Para a análise da DRM por PCR convencional, nas amostras de acompanhamento (D28-35), foi utilizada a mesma metodologia, sendo testados apenas os rearranjos clonais identificados ao diagnóstico. As amostras de seguimento foram consideradas positivas para DRM quando

as bandas resultantes da análise homo-heteroduplex, apresentaram o mesmo padrão de migração daquelas das amostras do D0.

4.4. SEQUENCIAMENTO DOS REARRANJOS CLONAIIS DE *IG* E *TCR*

Os fragmentos correspondentes às amostras positivas, previamente recortados, dissolvidos e armazenados, foram reamplificados utilizando *primers* com as mesmas sequências da PCR inicial, acrescidos de caudas para os promotores virais T7 e M13 (Anexo II). A reação de PCR para essa nova amplificação foi executada para um volume final de 50 μ L, conforme descrito no Quadro 3.

Para a confirmação do rearranjo e verificação da qualidade do DNA reamplificado, o produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose (2%), durante 1 hora, a 80 mA em temperatura ambiente. O gel foi corado com solução 2X de Sybr Safe (Invitrogen) por 30 minutos e exposto à luz UV.

Quadro 3 - Protocolo da reação de PCR para reamplificação dos rearranjos detectados nas amostras do diagnóstico (D0)

Reagentes	Volume (μ L)	Perfil térmico
Tampão (10X)	5,0	95°C – 3 minutos 94°C – 30 segundos 60°C – 30 segundos 72°C – 30 segundos } 40x
dNTP (2 mM)	4,0	
MgCl ₂ (25 mM)	3,0	
Mix de <i>primers</i> (10 pmol cada)	4,0	
DNA polimerase (5 U/ μ L)	0,4	
Água Milli Q	28,6	72°C – 10 minutos
DNA	5,0	

O produto da reação de reamplificação foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) conforme instruções do fabricante. Aproximadamente 120 ng de produto reamplificado foram sequenciados com o uso do *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Applied Biosystems) e os *primers* universais para T7 e

M13. A PCR para o sequenciamento foi realizada para um volume final de 11 μL , de acordo com o protocolo descrito no Quadro 4.

Quadro 4 - Protocolo da reação de PCR para sequenciamento das regiões de rearranjos clonais

Reagentes	Volume (μL)	Perfil térmico
Tampão (5X)	1,0	95°C – 1 minutos 96°C – 20 segundos 50°C – 15 segundos 60°C – 4 segundos } 30x
<i>BigDye</i>	1,0	
<i>Primer</i> (10 pmol/ μL)	1,0	
Água Milli Q	5,0	
Produto de reamplificação (40 ng/ μL)	3,0	

A sequência foi precipitada com EDTA, acetato de sódio e etanol, conforme as recomendações do fabricante do kit BigDye®. Para ressuspender o DNA precipitado, foi utilizado o tampão formamida Hi-Di (Applied Biosystems). As amostras foram incubadas a 95°C por 5 minutos, para desnaturação do DNA, e em seguida, submetidas a análise no sequenciador automático de DNA *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems).

4.5. ANÁLISE DA REGIÃO JUNCIONAL E DESENHO DO *PRIMER* CLONE-ESPECÍFICO

As sequências dos rearranjos obtidas para cada paciente foram analisadas com o auxílio do programa Chromas Lite versão 2.1 (Technelysium Pty Ltd) e em seguida submetidas ao programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para detecção de similaridades e identificação da classe de segmentos V-D-J envolvidos nos rearranjos. Além disso, foi utilizado o programa IMGT/V-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/) para a identificação da região N de inserção de nucleotídeos nos segmentos V-D-J.

Uma vez identificada a região N, foi desenhado o *primer* clone-específico, complementar ao rearranjo sequenciado e identificado ao diagnóstico, com o auxílio do programa Primer 3.0 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Foi evitado o desenho de *primers* contendo região de inserção N rica em guanina (G) e/ou citosina (C) bem como a presença destas bases no término da porção 3' dos mesmos.

Nem todos os rearranjos encontrados na triagem por PCR convencional tiveram um sequenciamento adequado para o desenho de *primer* (falha no sequenciamento ou região N rica em bases G/C). Como regra geral, foram desenhados, sempre que possível, dois *primers* por rearranjo, utilizando a estratégia para a amplificação por RQ-PCR descrita no Anexo III e resumida no Quadro 5. Para os pacientes com apenas um rearranjo com sequenciamento adequado, o número de *primers* desenhados variou de um a quatro. Nos casos em que foi encontrada a microdeleção *SIL-TAL*, foram utilizados os *primers* consenso descritos no Anexo I.

Quadro 5 - Estratégia para desenho de *primer* clone-específico para determinação da DRM por RQ-PCR

Rearranjo	Segmento	Sentido do Primer e da Sonda Consenso	Sentido do Primer específico
IGH	JH1; JH2; JH3; JH4; JH5; JH6	Anti-senso	Senso
IGK	Kde	Anti-senso	Senso
TCRG	JG1.3/2.3 JG1.1/2.1 VG2; VG3; VG4; VG5; VG9; VG10; VG11	Anti-senso Senso Senso	Senso Anti-senso Anti-senso
TCRD	JD1; DD3 VD2	Anti-senso Senso	Senso Anti-senso

Uma vez sintetizados, os *primers* foram testados quanto à sensibilidade e especificidade por uma reação de RQ-PCR, utilizando *primers* e sondas descritas previamente para *IgH* (Verhagen et.al., 2000), *IgK* (van der Velden et al., 2002a), *TCRG* (van der Velden et. al., 2002b), *TCRD* (Szczepanski et. al., 2004) e *SIL-TAL* (Chen et al., 2001).

Para a avaliação e escolha do *primer* com melhor sensibilidade para a análise da DRM, cada *primer* foi testado com 100ng de DNA da amostra do D0 diluídos em PBL para 10^{-3} e 10^{-4} . Também foram utilizados 100 ng de PBL, para cada rearranjo, como controle de amplificação inespecífica. Todos os pontos de diluição e o PBL foram testados em duplicata. A reação foi feita no aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), usando sondas do tipo Taqman® com a concentração ajustada para 5 μ M, num volume final de reação de 25 μ L. O protocolo com as condições da reação de RQ-PCR está descrito no Quadro 6.

Quadro 6 - Protocolo da reação de RQ-PCR para o teste de eficiência dos primers

Reagentes	Volume (μ L)	Perfil térmico
Taq Man Universal Master mix (2X)	12,5	$\left. \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C} - 10 \text{ minutos} \\ 95^{\circ}\text{C} - 15 \text{ segundos} \\ 60^{\circ}\text{C} - 1 \text{ minuto} \end{array} \right\} 50\text{x}$
Primer Foward (7,5 μ M)	1,0	
Primer Reverse (7,5 μ M)	1,0	
Sonda Taq Man (5 μ M)	1,0	
Água Milli Q	4,5	
DNA (20ng)	5,0	

Os resultados do teste de eficiência dos *primers* clone-específicos foram analisados com o auxílio do StepOne software v2.3, e a sensibilidade foi definida como o ponto com a maior das diluições em que o *Cycle Threshold* (Ct) alcançado foi pelo menos 1 Ct inferior ao ponto de menor Ct do PBL. Para a avaliação da especificidade, o *primer* foi considerado mais específico, quanto maior a diferença entre o Ct do ponto identificado como a sensibilidade e o Ct do PBL. Sempre que possível, foram escolhidos dois *primers* clone-específicos de rearranjos diferentes e com maior sensibilidade por paciente. Quando o paciente apresentou apenas um rearranjo clonal, somente um *primer* específico foi escolhido.

4.6. MONITORAMENTO DA DRM POR RQ-PCR

Para o monitoramento da DRM 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 para a realização do exame, de acordo com o Anexo III (Figura 4).

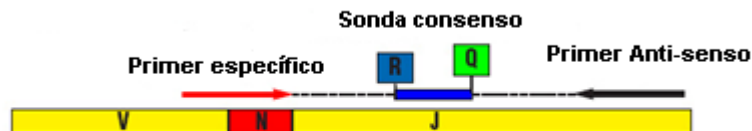


Figura 4 - Estratégia de amplificação da região clonal.

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.

Uma vez selecionado o *primer* clone-específico mais sensível, foi realizada a determinação da DRM na amostra de seguimento do paciente (D28-35), seguindo as diretrizes recomendadas por van der Velden et al (2007), que estão descritas resumidamente a seguir: (i) cada teste foi realizado com uma curva de diluição seriada da amostra de DNA do D0 em PBL, amostra do seguimento (D28-35) e o gene endógeno *N-RAS*; (ii) os pontos 10^{-2} e 10^{-3} da curva de diluição foram feitos em duplicata, e os pontos 10^{-4} , 10^{-5} e a amostra do seguimento (D28-35) foram testados em triplicata. Foram também testados o controle PBL, em triplicata, para a determinação do *background*, ou seja, amplificação inespecífica de rearranjos *Ig* e *TCR* de células normais, e um controle negativo (água) em amostra única; (iii) o gene endógeno *N-RAS* foi testado para cada paciente e serviu como normalizador da quantificação de cada rearranjo específico.

A partir da regressão linear dos valores dos Cts gerados pela curva padrão confeccionada com a amostra ao diagnóstico obteve-se o valor de *y-intercept* (coeficiente linear) e *slope* (inclinação) que foram utilizados para a quantificação das amostras no seguimento (D28-35). Para isso, utilizou-se a fórmula ($y = ax + b$), onde “y” corresponde à diferença entre o Ct

médio das triplicatas do seguimento (D28-35) e o Ct do *N-RAS*, “a” corresponde ao *slope*, “b” corresponde ao *y-intercept* e “x” corresponde ao valor da DRM.

As condições da reação para a DRM foram as mesmas utilizadas para o teste de eficiência dos *primers* (Quadro 5, Anexo III). Porém, a quantidade de DNA por reação foi de 500 ng.

Foram utilizados os pontos de corte para a determinação da DRM estabelecidos pelo protocolo GBTLI-2009, o qual considera positivos os resultados superiores a 1×10^{-3} para LLA-B e superiores a 1×10^{-2} para LLA-T.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo de sobrevida global (SG), foram consideradas a data do diagnóstico e a data do óbito ou do último acompanhamento. Já para o cálculo de sobrevida livre de eventos (SLE), foram consideradas a data do diagnóstico e a data do óbito, recaída ou segunda neoplasia, e para a sobrevida livre de leucemia (SLL), a data da remissão e a data da recaída. A última data considerada de acompanhamento dos pacientes foi 22 de Outubro de 2014.

As curvas de SG, SLE e SLL foram construídas com o método de Kaplan-Meier. As curvas para os diferentes grupos de DRM foram comparadas utilizando-se o teste de log-rank de acordo com o sexo, instituição de origem, protocolo de tratamento, grupo de risco inicial, idade, imunofenótipo e contagem de global de leucócitos ao diagnóstico. Todas as análises foram realizadas com o software Statistical Program for the Social Sciences (SPSS) versão 20.0, com nível de significância de $p \leq 0,05$. A associação entre SLL e DRM por PCR convencional e RQ-PCR foi ajustada para os efeitos das variáveis clínicas e biológicas em uma análise multivariada utilizando o modelo de COX.

5. RESULTADOS

Setenta e quatro pacientes, com idade entre 0 e 19 anos, foram atendidos e diagnosticados com LLA nas unidades de onco-hematologia pediátricas das três instituições envolvidas neste estudo, no período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012. As características clínicas e biológicas ao diagnóstico e a resposta terapêutica inicial estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas e biológicas dos 74 pacientes estudados

Variável	Nº de Casos (Frequência)
Gênero (n=74)	
Masculino	38 (51,4%)
Feminino	36 (48,6%)
Idade (n=74)	
≤ 1 ano	0
>1 ano e <9 anos	45 (60,8%)
≥ 9 anos	29 (39,2%)
Imunofenótipo (n=74)	
LLA-B	
LLA-T	60 (81,1%)
	14 (18,9%)
SNC^a D0 (n=70)	
SNC 1	70 (100%)
SNC 2 ou 3	0 (0%)
Grupo de risco inicial (n=74)	
Baixo Risco	28 (37,8%)
Alto Risco	46 (62,2%)
WBC^b ao diagnóstico (n=74)	
<50x10 ⁹ /L	57 (77%)
≥50x10 ⁹ /L	17 (23%)
Transcritos de fusão BCR/ABL ou MLL/AF4 (n=68)	
Positivo	5 (7,4%)
Negativo	63 (92,6%)
Evento na Indução (n=74)	
Remissão completa	72 (97,3%)
Óbito na indução	2 (2,7%)

^aSNC: Sistema Nervoso Central - SNC1: ausência de células ou blastos; SNC2: presença de células (<5) e presença de blastos; SNC3: presença de células (≥5) e presença de blastos.

^bWBC: Contagem Global de Leucócitos.

5.1. DETECÇÃO DOS REARRANJOS V-D-J NOS GENES *IG* E *TCR* NAS AMOSTRAS DO DIAGNÓSTICO (D0)

Dos 74 pacientes incluídos no estudo, 14 não tiveram amostra de medula coletada ao final da indução ou não havia quantidade de DNA suficiente para os testes e dois pacientes foram a óbito durante a indução. Portanto, a triagem inicial para a detecção dos rearranjos clonais foi realizada em 58 casos, conforme demonstrado na Figura 5.

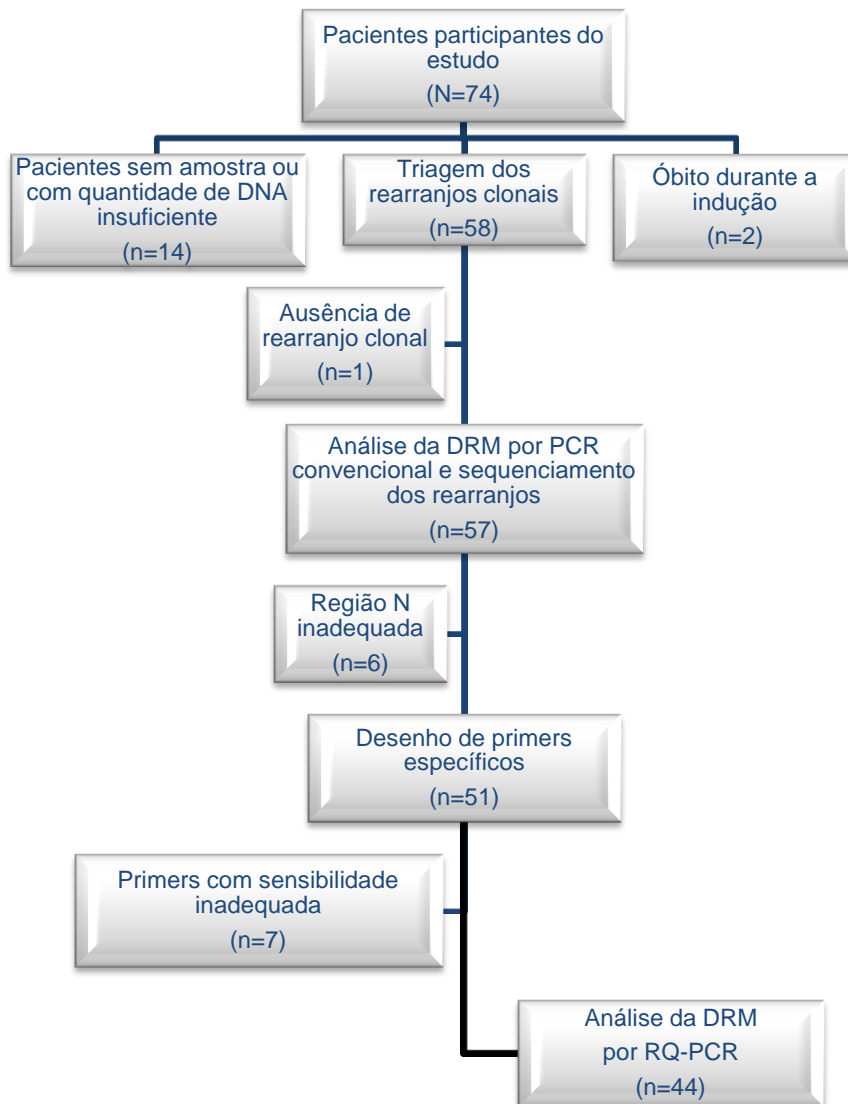


Figura 5 - Fluxograma das etapas executadas para as amostras dos 74 pacientes estudados.

DRM – doença residual mínima; RQ-PCR – PCR quantitativa em tempo real.

5.1.1. FREQUÊNCIA DOS REARRANJOS V-D-J NOS GENES *IG* E *TCR* DETECTADOS AO DIAGNÓSTICO

Na análise homo-heteroduplex, exemplificada na Figura 6, foram consideradas positivas para o rearranjo gênico clonal pesquisado as que apresentaram uma banda visível do tamanho esperado (homoduplex).

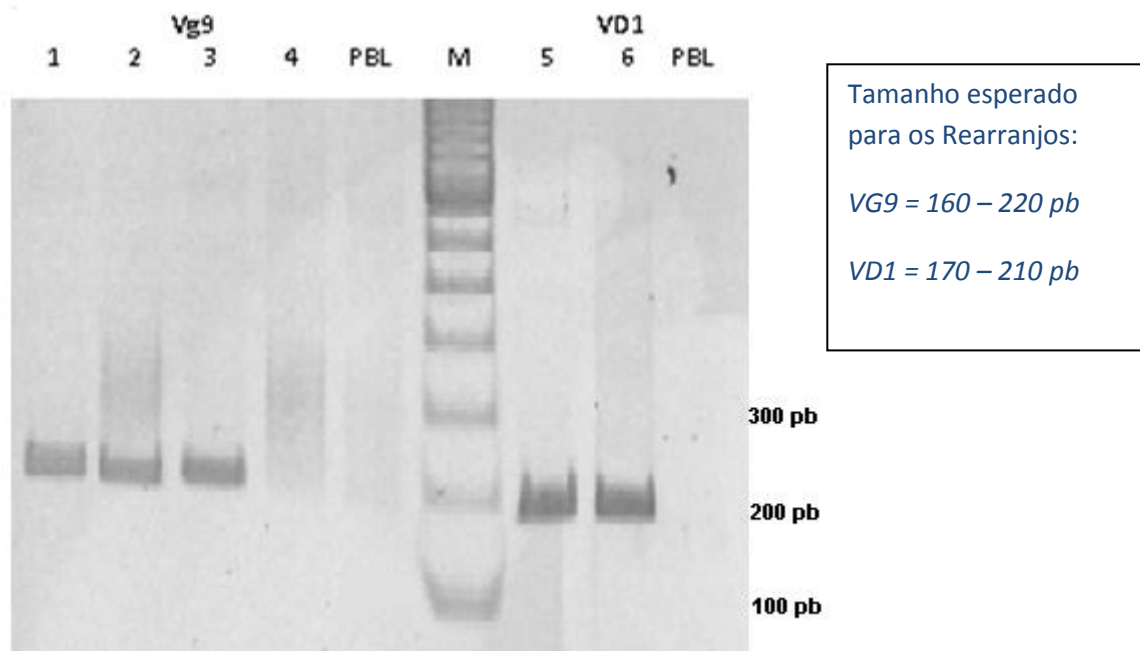


Figura 6 - Análise homo-heteroduplex para triagem dos rearranjos gênicos *TCRG-Vg9* e *TCRD-VD1*. Rearranjo *Vg9* - pacientes 1, 2, e 3: resultado positivo e paciente 4: resultado negativo. Rearranjo *VD1* - pacientes 5 e 6: resultado positivo. Poliacrilamida 12%. M=marcador de tamanho molecular. PBL= controle negativo.

Não foi detectado qualquer rearranjo em apenas um dos 58 casos (1,7%). Pelo menos um rearranjo foi encontrado em 98,3% (57/58) das amostras testadas, 100% (47/47) nos pacientes com LLA-B e 90,9% (10/11) nos pacientes com LLA-T. Dois ou mais marcadores clonais foram detectados em 79,3% (46/58) dos casos: 87,2% (41/47) em casos de LLA-B e 45,5% (5/11) de LLA-T. Considerando todos os casos e somente as LLA-B, os números de rearranjos mais frequentemente encontrados na mesma amostra, foram dois (22,4% e 23,4%, respectivamente) e três (20,7% e 23,4%, respectivamente), conforme apresentado nas Tabelas 2 e 3. Já para as LLA-T, em quase metade dos casos (45,4%) só foi encontrado um rearranjo clonal (Tabela 4).

Tabela 2 - Frequência do número de rearranjos V-D-J nos genes *Ig* e *TCR* encontrados ao diagnóstico por PCR convencional nos 58 pacientes

Nº de Rearranjos Detectados	Nº de pacientes	Frequência (%)
0	1	1,7
1	11	19
2	13	22,4
3	12	20,7
4	5	8,6
5	11	19
6	4	6,9
7	1	1,7
TOTAL	58	100

Tabela 3 - Frequência do número de rearranjos V-D-J nos Genes *Ig* e *TCR* encontrados ao diagnóstico por PCR convencional nos 47 pacientes com LLA-B

Nº de Rearranjos Detectados	Nº de pacientes	Frequência (%)
0	0	0
1	6	12,8
2	11	23,4
3	11	23,4
4	4	8,5
5	10	21,3
6	4	8,5
7	1	2,1
TOTAL	47	100

Tabela 4 - Frequência do número de rearranjos V-D-J nos genes *Ig* e *TCR* encontrados ao diagnóstico por PCR convencional nos 11 pacientes com LLA-T

Nº de Rearranjos Detectados	Nº de pacientes	Frequência (%)
0	1	9,1
1	5	45,4
2	2	18,2
3	1	9,1
4	1	9,1
5	1	9,1
6	0	0
7	0	0
TOTAL	11	100

Nas amostras triadas das 47 crianças com LLA-B derivada, os rearranjos mais frequentemente encontrados foram *IgH* (74,5%), *TCRD* (59,6%), *IgK* (53,2%) e *TCRG* (38,3%) (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência de rearranjos V-D-J nos genes *Ig* e *TCR* nos 47 pacientes com LLA-B derivada

Rearranjo Gênico	Nº de Casos (Frequência)
<i>IgH</i>	35 (74,5%)
<i>VH1</i>	9 (19,1%)
<i>VH2</i>	1 (2,1%)
<i>VH3</i>	14 (29,8%)
<i>VH4</i>	10 (21,3%)
<i>VH5</i>	4 (8,5%)
<i>VH6</i>	5 (10,6%)
<i>VH7</i>	13 (27,7%)
<i>DH2</i>	7 (14,9%)
<i>DH3</i>	4 (8,5%)
<i>DH7</i>	1 (2,1%)
<i>IgK</i>	25 (53,2%)
<i>VKI</i>	10 (21,3%)
<i>VKII</i>	14 (29,8%)
<i>VKIII</i>	7 (14,9%)
<i>INTRON</i>	8 (17,0%)
<i>TCRG</i>	18 (38,3%)
<i>VgI</i>	17 (36,2%)
<i>Vg9</i>	5 (10,6%)
<i>TCRD</i>	28 (59,6%)
<i>V2D3</i>	21 (44,7%)
<i>D2D3</i>	8 (17,0%)

Na triagem realizada nos pacientes com LLA-T, o rearranjo mais frequentemente encontrado foi *TCRG* (90,9%), seguido por *TCRD* (27,3%) e o rearranjo *SIL-TAL1* foi encontrado em 18,2% dos casos (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência de rearranjos V-D-J nos Genes *Ig* e *TCR* e deleção *SIL-TAL* nos 11 pacientes com LLA-T

Rearranjo Gênico	Nº Casos (Frequência)
<i>IgH</i>	1 (9,1%)
<i>DH5</i>	1 (9,1%)
<i>TCRG</i>	10 (90,9%)
<i>Vg1</i>	9 (81,8%)
<i>Vg9</i>	2 (18,2%)
<i>Vg10</i>	1 (9,1%)
<i>Vg11</i>	2 (18,2%)
<i>TCRD</i>	3 (27,3%)
<i>D2J1</i>	2 (18,2%)
<i>VD1</i>	2 (18,2%)
<i>SIL-TAL</i>	2 (18,2%)
<i>SIL-TAL 1</i>	2 (18,2%)
<i>SIL-TAL 2</i>	0 (0,0%)

5.2. SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO DE JUNÇÃO V-D-J DOS REARRANJOS GÊNICOS DE *IG* E *TCR*

A estratégia de análise do sequenciamento, comparação da similaridade e identificação da região N está exemplificada nas Figuras 7, 8, 9 e 10. As sequências contendo o segmento V-D-J do rearranjo clonal foram analisadas, gerando um eletroferograma (Figura 7). A seguir, foram extraídas com o programa Chromas Lite (Figura 8) e comparadas com as sequências de um banco de dados (BLAST) para a verificação da similaridade e identificação dos segmentos V-D-J (Figura 9). Após a confirmação do segmento, as sequências foram submetidas ao programa IMGT e novamente comparadas com as sequências do banco de dados para a identificação da região N (Figura 10).

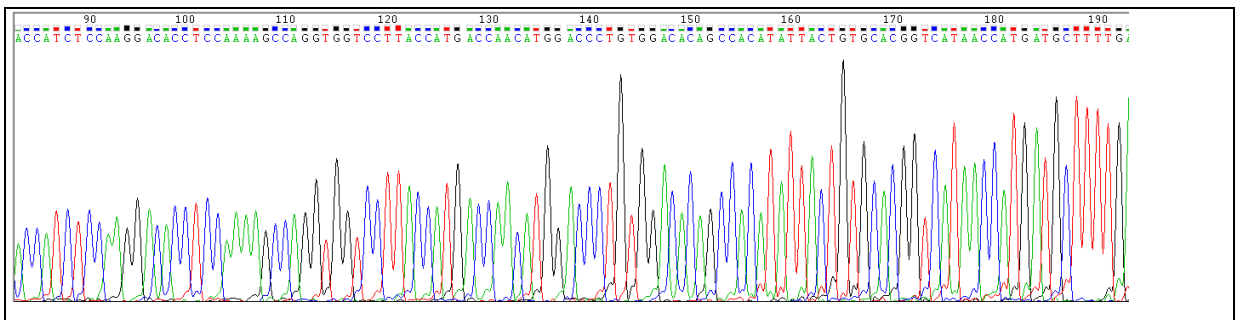


Figura 7 - **Estratégia para identificação da região N.** Eletroferograma referente ao sequenciamento do rearranjo VH2 na amostra de um paciente estudado.

>65 sequence exported from 65_A09_2026 (LOM) VH2 F

```
TTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAG
GCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAAC
ATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGTCATAACCATGATGCT
TTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGCCCTATA
GTGAGTCGTAT
```

Figura 8 - **Estratégia para identificação da região N.** Sequência do rearranjo mostrado na figura 7, extraída pelo programa Chromas Lite.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
276 bits(149) Features: IGHV2-26	4e-72	149/149(100%)	0/149(0%)	Plus/Minus
Query 1	TTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCA 60			
Sbjct 106301547	TTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAAAATCCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCA 106301488			
Query 61	CCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTG 120			
Sbjct 106301487	CCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACATGGACCCTG 106301428			
Query 121	TGGACACAGCCACATATTA <u>CTGTGCACGG</u> 149			
Sbjct 106301427	TGGACACAGCCACATATTA <u>CTGTGCACGG</u> 106301399			
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
97.1 bits(52) Features: IGHJ3	4e-18	54/55(98%)	0/55(0%)	Plus/Minus
Query 159	<u>TGATGCTTTT</u> GATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTAAG 213			
Sbjct 105864636	<u>TGATGCTTTT</u> GATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTAAG 105864582			

Figura 9 - **Estratégia para identificação da região N.** Verificação da similaridade e identificação do segmento V-D-J envolvido no rearranjo VH2 mostrado na figura 8 e a comparação com as sequências do BLAST. Em destaque, o final da sequência do segmento V (IGHV2-26) e o início do segmento J (IGHJ3).

Result summary:							
V-GENE and allele	Homsap IGHV2-26*01 E	score = 681	identity = 90,36% (150/166 nt)				
J-GENE and allele	Homsap IGHJ3*02 F	score = 241	identity = 98,00% (49/50 nt)				
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalys is	Homsap IGHD1-14*01 ORF	D-REGION is in reading frame 3					
Input	V name	3'V-REGION	N	D- REGION	P	5'J-REGION	J name
exported_from_65_A	Homsa IGHV2-26*01	tgtgcacgg	tc	.ataacc.	a	tgatgcttttgatatctgg	Homsap IGHJ3*02

Figura 10 - **Estratégia para identificação da região N.** Confirmação da similaridade e identificação do segmento V-D-J da sequência extraída com a identificação da região N (em destaque e indicada pela seta) feita pelo programa IMGT.

Após a análise de todos os rearranjos sequenciados, 89,5% (51/57) dos pacientes apresentaram rearranjos com sequências adequadas para o desenho do *primer* específico. Em seis pacientes, as sequências dos rearranjos não apresentaram região N ou apresentaram esta região rica em G e/ou C (Figura 11, 12, 13 e 14).

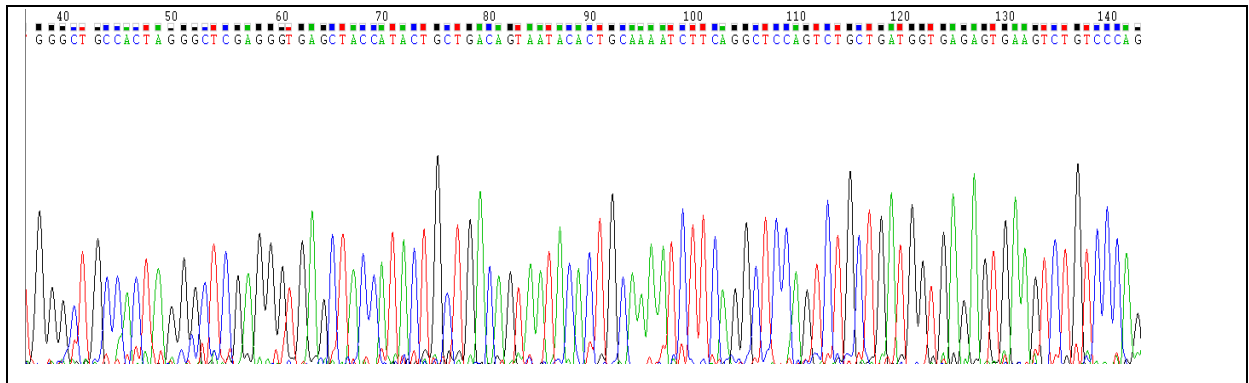


Figura 11 - **Estratégia para identificação da região N.** Eletroferograma referente ao sequenciamento do rearranjo DH2 na amostra de um paciente estudado.

>60 sequence exported from 60_D08_1909 (NKS) DH2 F

```
TCTGAAAACCTGAGTTCAGACACAACCCGCTGGATGCACAGTCTCAGCAGGAGA
ACAGACCAAAGCCAGCAAAAGGGACCTCGGTGACACCAGTAGGGACAGGAGGA
TTTTGTGGGGGCTCGTGTC ACTGTGAGGATATTGTAGTGGTGGTAGCTGCTACCG
GGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG
CCCTATAGTGAGTCGTAT
```

Figura 12 - **Estratégia para identificação da região N.** Sequência do rearranjo mostrado na figura 11, extraída pelo programa Chromas Lite.

5.3. DESENHO DE *PRIMERS* CLONE-ESPECÍFICOS

Para os 51 pacientes, foi desenhado um total de 173 *primers* clone-específicos, conforme exemplificado na Figura 15. Além disso, foram usados dois *primers* de consenso para o rearranjo *SIL-TAL*. O maior número de *primers* foi para o rearranjo *IGH* (75), seguido por *TCRD* (43), *TCRG* (33), *IGK* (22) e *SIL-TAL* (2).

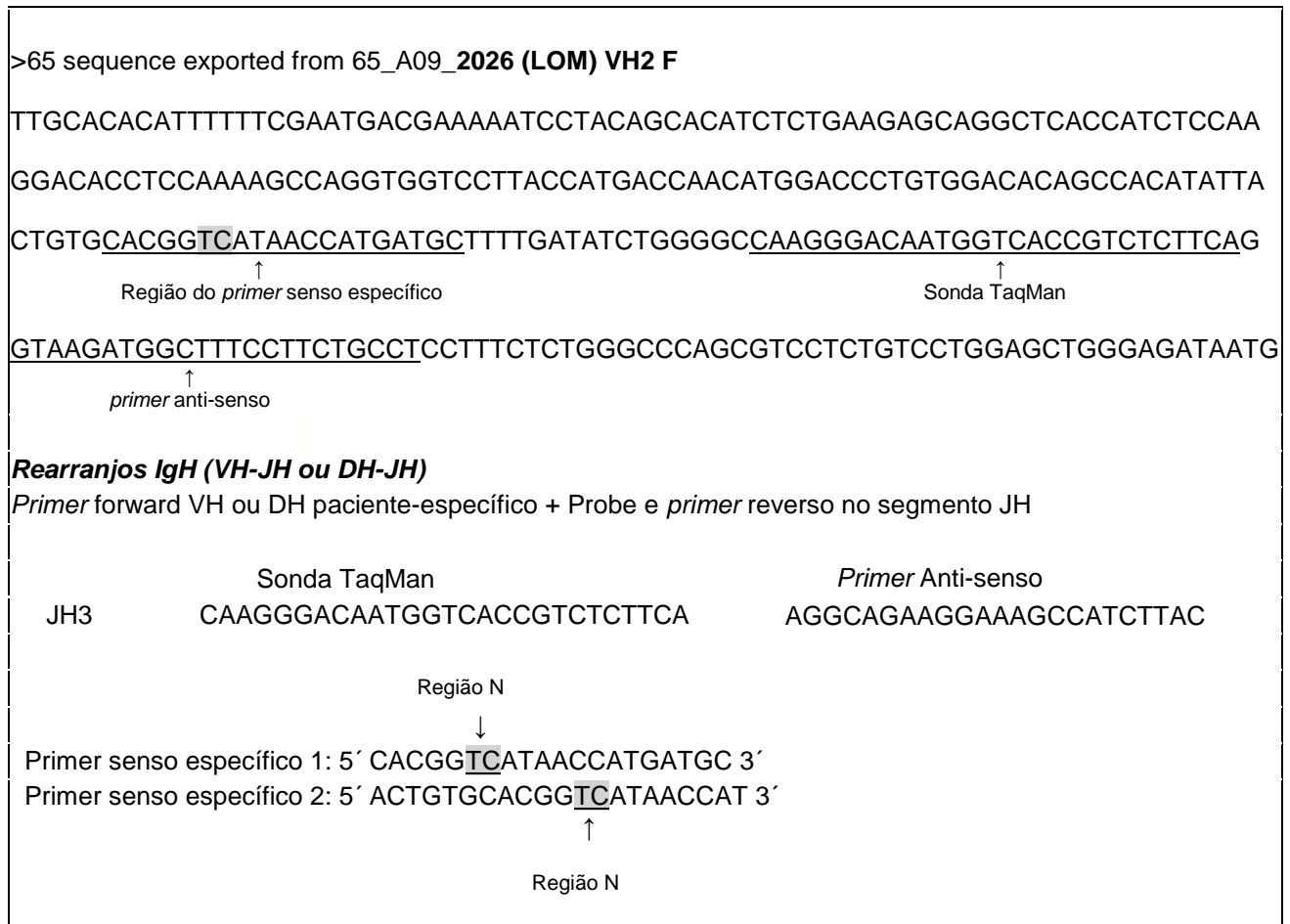


Figura 15 - **Estratégia de desenho de *primers* específicos.** Dois *primers* para o rearranjo VH2 específicos para o paciente 2026 (LOM) foram desenhados com o auxílio do programa Primer 3.0, abrangendo a região N. A sonda e o *primer* anti-senso, indicados na sequência do rearranjo constam no banco de dados da estratégia do GBTLI (Anexo III).

Dos *primers* sintetizados, os que alcançaram a maior sensibilidade (10^{-4}) foram *IGH* (66,7%) e *IGK* (50%). Os *primers* para os rearranjos *TCRG* e *TCRD* foram os mais inespecíficos (66,7% e 55,8% respectivamente), apresentando amplificação tanto da amostra do paciente quanto do controle PBL. Os dois *primers* testados para o rearranjo *SIL-TAL* alcançaram sensibilidade de 10^{-4} (Tabela 7).

Tabela 7 - Teste de sensibilidade dos 175 primers por RQ-PCR

Rearranjo	Nº de <i>primers</i>	Inespecificidade	Sensibilidade	
			10^{-3}	10^{-4}
<i>IGH</i>	75	15 (20%)	10 (13,3%)	50 (66,7%)
<i>TCRD</i>	43	24 (55,8%)	6 (14%)	13 (30,2%)
<i>TCRG</i>	33	22 (66,7%)	8 (24,2%)	3 (9,1%)
<i>IGK</i>	22	7 (31,8%)	4 (18,2%)	11(50%)
<i>SIL-TAL</i>	2	0	0	2 (100%)

Como resultado do teste de eficiência dos *primers*, 44 pacientes apresentaram pelo menos um *primer* com sensibilidade adequada para a análise da DRM.

5.4. AVALIAÇÃO DA DRM AO FINAL DA TERAPIA DE INDUÇÃO

5.4.1. ANÁLISE DA DRM POR PCR CONVENCIONAL

Todos os rearranjos clonais encontrados ao diagnóstico foram testados por PCR convencional ao final do período de indução (D28-35), como exemplificado na Figura 16. Dos 57 pacientes analisados, nove (15,8%) apresentaram DRM positiva (Tabela 8). Oito dos nove pacientes com DRM positiva foram alocados, ao diagnóstico, no grupo de alto risco de recaída; um deles foi positivo para o gene de fusão BCR-ABL e outro para o gene de fusão MLL-AF4. Dos 47 pacientes com LLA-B, a DRM foi positiva em seis (12,8%), e para os pacientes com LLA-T a positividade foi de 30% (3/10).

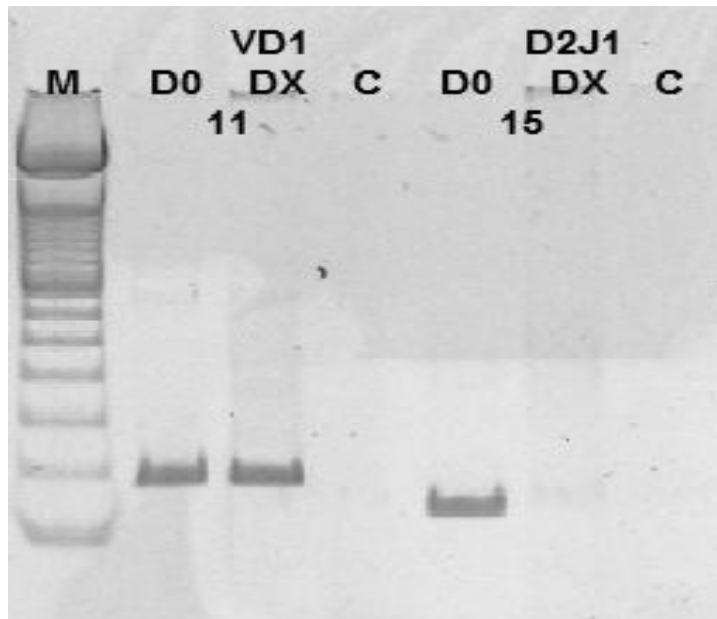


Figura 16 - Análise da DRM por PCR convencional para o rearranjo gênico clonal *VDI* e *D2J1*. Rearranjo *VDI* - Paciente 11: DRM positiva. Rearranjo *D2J1* - Paciente 15: DRM negativa. Poliacrilamida 12%. M= marcador de tamanho molecular. D0= amostra do diagnóstico. DX= amostra do acompanhamento. C= controle negativo (PBL).

Tabela 8 – Resultado da análise da DRM por PCR convencional ao final do período de indução (D28-35) dos 57 pacientes estudados

DRM por PCR convencional	Número de Casos	Frequência (%)
NEGATIVO	48	84,2
POSITIVO	9	15,8
TOTAL	57	100

5.4.2. ANÁLISE DA DRM POR RQ-PCR

Dos 44 pacientes analisados por RQ-PCR, foi possível avaliar a DRM com dois rearranjos em 14 (32%) e, nos demais (30/44, 68%), a avaliação foi feita utilizando apenas um rearranjo. Foram aprovados e utilizados para a análise da DRM, 27 rearranjos para *IGH*, 12 para *IGK*, cinco para *TCRG* e 11 para *TCRD*. Onze pacientes (25%) tiveram DRM positiva por RQ-PCR

(Tabela 9) e, quando considerados separadamente os pacientes com LLA-B e LLA-T, a positividade foi de 25,6% (10/39) e 20% (1/5), respectivamente. Oito dos 11 pacientes com DRM positiva foram alocados, ao diagnóstico, no grupo de alto risco de recaída; dois deles foram positivos para o gene de fusão *BCR-ABL* e outro foi positivo para *MLL-AF4*. Na Figura 17, pode-se observar um exemplo da análise de um resultado de DRM por RQ-PCR.

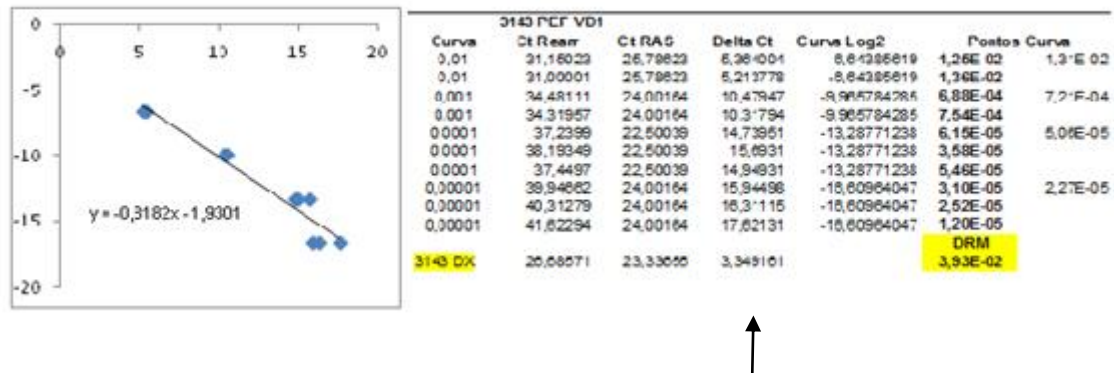


Figura 17 - Análise do resultado de DRM por RQ-PCR realizada com *primer clone-específico do rearranjo gênico VDI* de um paciente estudado.

Valores e fórmula utilizados para o cálculo da DRM; $y = ax + b$, “y” corresponde ao Delta Ct (↑) que foi calculado com a diferença entre a média das triplicatas do seguimento (DX) e o Ct do RAS (gene normalizador); “a” corresponde ao *slope* (inclinação da reta), que foi obtido a partir da regressão linear dos Cts da curva padrão confeccionada com a amostra ao diagnóstico; “b” corresponde ao Y-intercept (coeficiente linear) obtido da mesma forma que o *slope*; “x” corresponde à DRM.

Tabela 9 – Resultado da análise da DRM por RQ-PCR

DRM por RQ-PCR	Número de Casos	Frequência (%)
NEGATIVO	33	75
POSITIVO	11	25
TOTAL	44	100

5.4.3. COMPARAÇÃO ENTRE PCR CONVENCIONAL E RQ-PCR PARA A ANÁLISE DA DRM

Considerando o ponto de corte estabelecido pelo protocolo GBTLI-2009 para a LLA-B (1×10^{-3}), foi observada uma concordância (Índice Kappa) de 40% entre as duas metodologias. Os 29 casos com DRM por RQ-PCR inferior a 1×10^{-3} foram negativos na análise por PCR convencional. Dos 39 pacientes com LLA-B, quatro apresentavam DRM superior a 1×10^{-2} por RQ-PCR e destes, três foram positivos por PCR convencional, o que representa uma concordância de 75% entre os métodos considerando este ponto de corte. Outros seis pacientes apresentaram valores de DRM entre 1×10^{-2} e 1×10^{-3} , e apenas um deles foi positivo na análise qualitativa, representando 16,7% de concordância entre os métodos para essa faixa de valores (Tabela 10).

Dos cinco pacientes com LLA-T, um apresentou valor de DRM superior a 1×10^{-2} por RQ-PCR e também foi positivo na análise da DRM por PCR convencional. Em outro caso, a DRM foi positiva entre 1×10^{-2} e 1×10^{-3} por RQ-PCR e negativa na PCR convencional. De acordo com o ponto de corte estabelecido pelo GBTLI-2009 para a LLA-T (1×10^{-2}), observou-se uma concordância de 100% entre os métodos (Tabela 10). Como observado para a LLA-B, os três pacientes com DRM inferior a 1×10^{-3} também foram negativos na análise por PCR convencional.

Tabela 10 – Resultados comparativos da análise da DRM* por PCR convencional e RQ-PCR

LLA-B (n=39)				
	RQ-PCR	PCR Convencional		Concordância (%)
		Negativo	Positivo	
$>1 \times 10^{-2}$	4	1	3	75%
$>1 \times 10^{-3}$ e $\leq 1 \times 10^{-2}$	6	5	1	16,7%
$<1 \times 10^{-3}$ *	29	29	0	100%

LLA-T (n=5)				
	RQ-PCR	PCR Convencional		Concordância (%)
		Negativo	Positivo	
$>1 \times 10^{-2}$ *	1	0	1	100%
$>1 \times 10^{-3}$ e $\leq 1 \times 10^{-2}$	1	1	0	0
$<1 \times 10^{-3}$	3	3	0	0

* Pontos de corte estabelecidos pelo GBTLI-2009: 1×10^{-3} para LLA-B; 1×10^{-2} para LLA-T.

5.5. ANÁLISE DA SOBREVIDA

As probabilidades estimadas de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE) em 3,5 anos para os 74 pacientes do estudo foram 73,6% e 68,2%, respectivamente (Figuras 18 e 19). A probabilidade estimada de sobrevida livre de leucemia (SLL) em 3,5 anos para 72 pacientes foi de 72,3% (Figura 20).

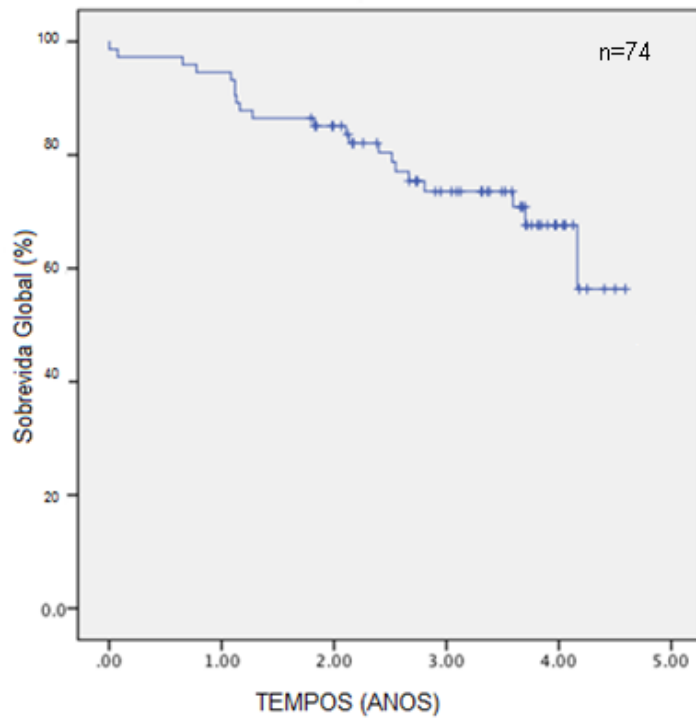


Figura 18 - Curva de Sobrevida Global dos 74 pacientes incluídos no estudo.

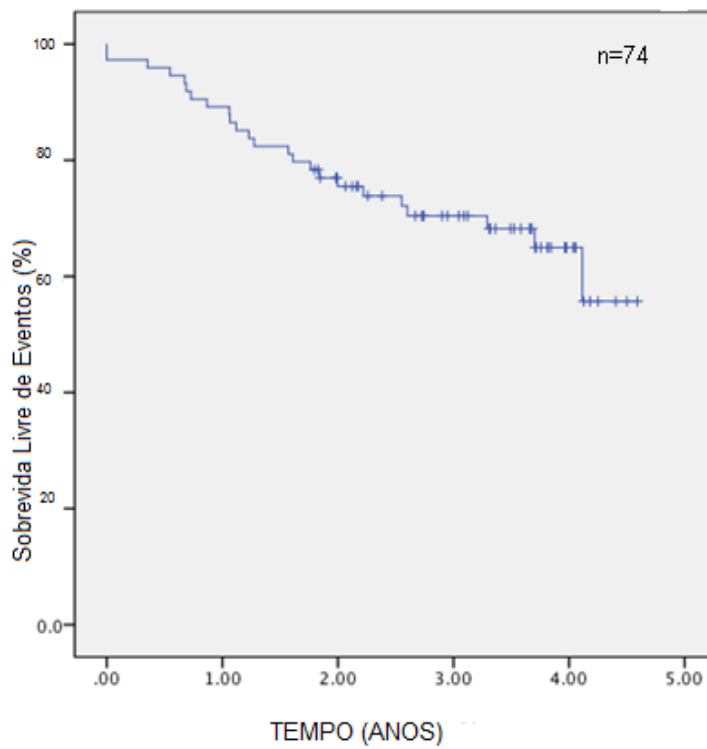


Figura 19 - Curva de Sobrevida Livre de Eventos dos 74 pacientes incluídos no estudo.

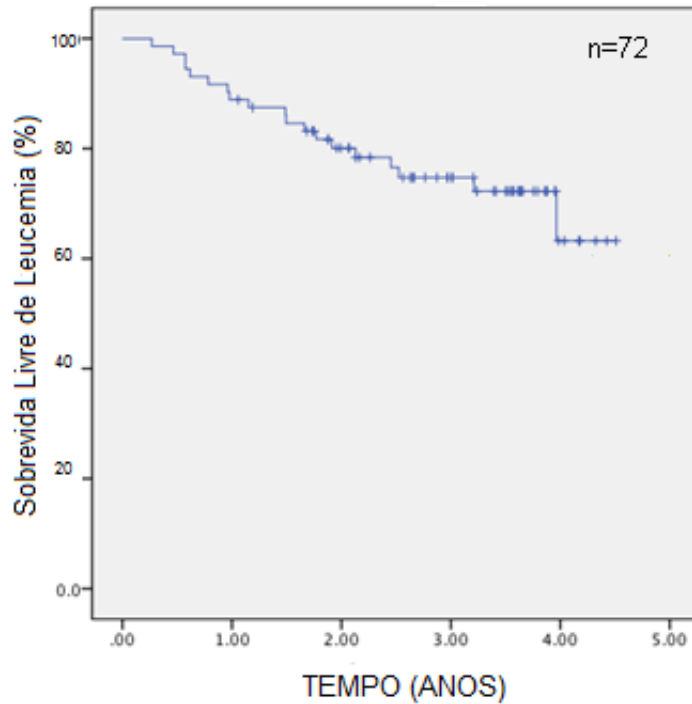


Figura 20 - Curva de Sobrevida Livre de Leucemia de 72 pacientes.

A SLL em 3,5 anos foi significativamente maior para as crianças com DRM negativa por PCR convencional ($81,1\% \pm 5,6$) quando comparada com aquelas com DRM positiva ($41,7\% \pm 17,3$; $p=0,004$) (Figura 21). Não houve associação significativa entre a SLL e qualquer outra variável clínica ou biológica avaliada (Figuras 22, 23 e 24).

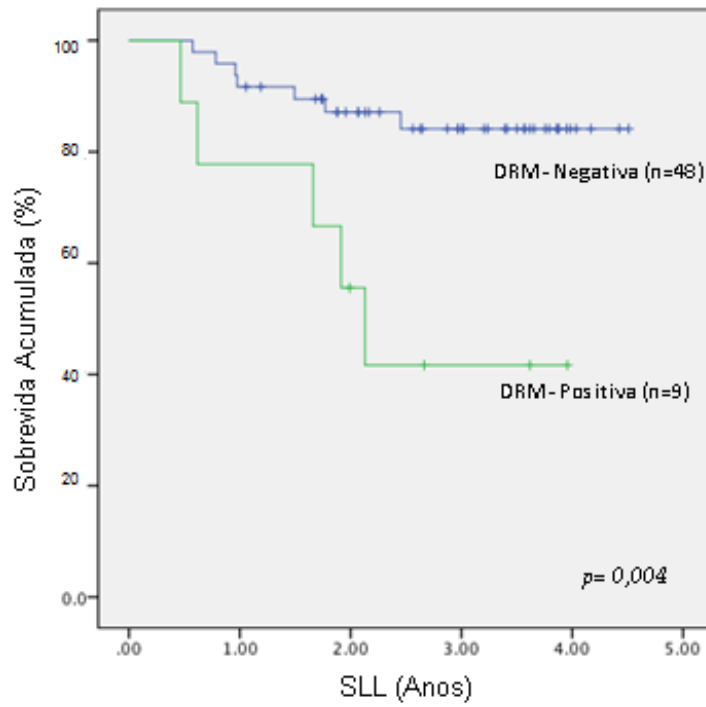


Figura 21 - Curvas de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a DRM por PCR convencional.

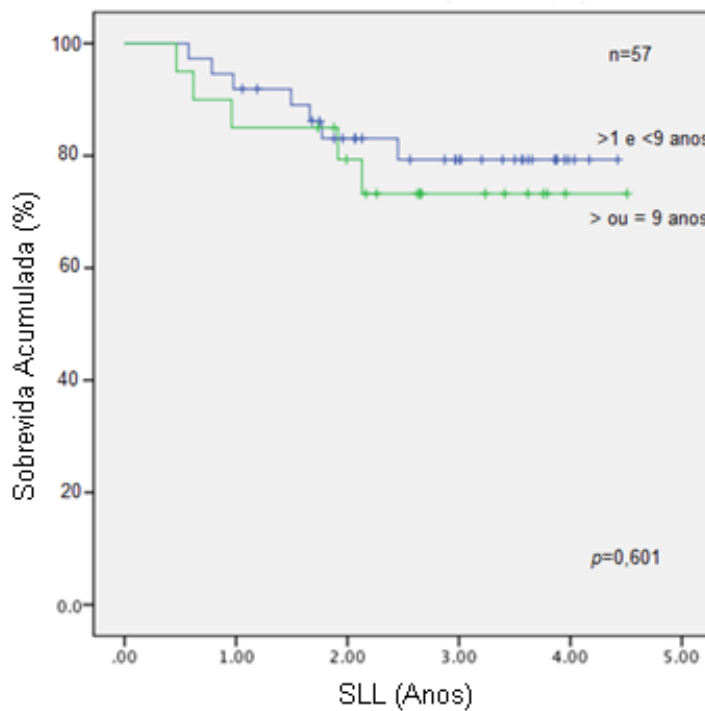


Figura 22 - Curva de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a idade da criança.

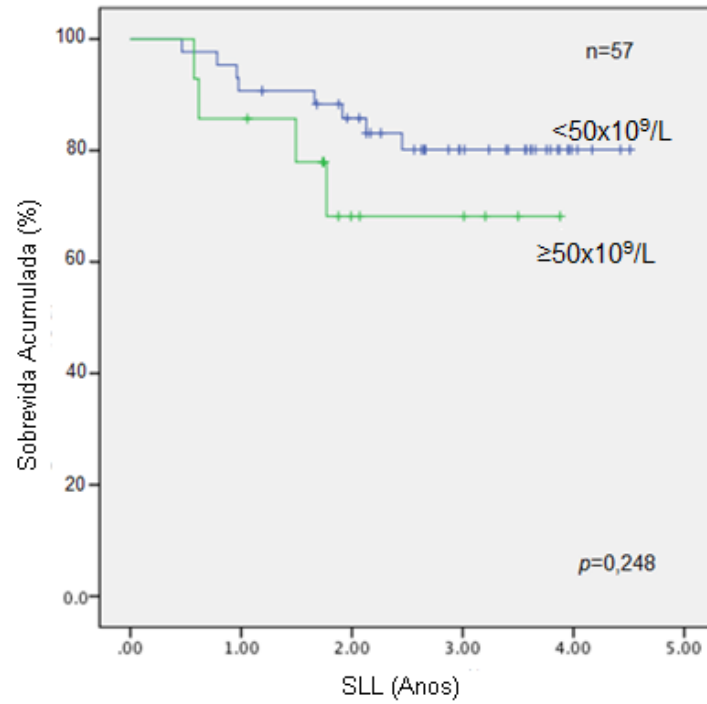


Figura 23 - Curva de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a contagem global de leucócitos ao diagnóstico.

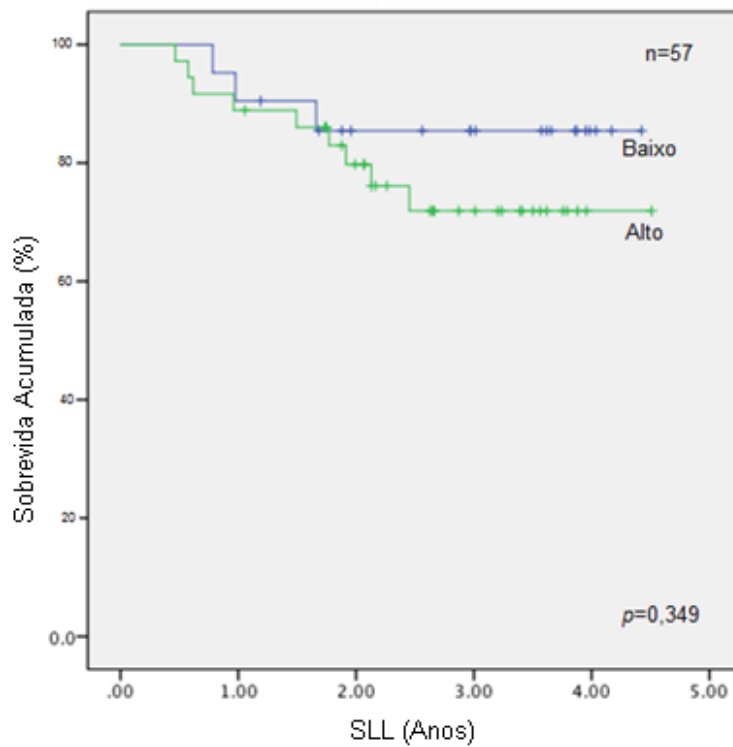


Figura 24 - Curva de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a classificação inicial de risco.

O modelo de regressão de Cox foi usado para determinar o impacto prognóstico da DRM por PCR convencional no final do período de indução. Na análise multivariada, após ajustá-la aos efeitos de sexo, instituição de origem, protocolo de tratamento utilizado, grupo de risco inicial, idade e leucometria inicial, somente a DRM por PCR convencional mostrou associação estatisticamente significativa ($p=0,015$) com a SLL (Tabela 11).

Tabela 11 - Modelo de Cox para avaliar a influência da DRM por PCR convencional no D28-35 na Sobrevida Livre de Leucemia de 57 pacientes estudados

Variável	Erro padrão	p^*	Risco Relativo Estimado
Sexo	0,694	0,589	0,687
Hospital	0,882	0,383	2,160
GBTLI-1999		0,571	
GBTLI-2009	1,884	0,385	5,141
AIEOP-95	2,138	0,563	3,446
Risco	1,090	0,614	1,733
Idade	1,294	0,282	0,249
Leucometria Inicial	1,057	0,521	1,971
PCR Convencional	1,138	0,015	15,827

* p : Significância estatística.

Aplicando-se ainda o modelo de Cox para avaliar o impacto prognóstico da DRM por PCR convencional, numa análise multivariada incluindo somente as principais variáveis adotadas ao diagnóstico para estratificação de risco dos pacientes (idade e leucometria) (Tabela 12), somente a DRM mostrou associação significativa com a SLL ($p=0,011$).

Tabela 12 - Modelo de Cox para avaliar a influência da PCR convencional e das principais variáveis de estratificação de risco em LLA na Sobrevida Livre de Leucemia de 57 pacientes estudados

	Erro padrão	p^*	Risco Relativo Estimado
Idade	0,858	0,314	0,421
Leucometria inicial	0,627	0,192	2,264
PCR Convencional	0,868	0,011	9,146

* p : Significância estatística.

Após excluir todas as outras variáveis, uma a uma, a DRM positiva por PCR convencional ao final do período de indução mostrou associação estatisticamente significativa a uma menor SLL ($p = 0.009$), com um risco de recaída 4,6 vezes maior para as crianças com DRM positiva (Intervalo de confiança de 95%: 1,5 a 14,6) (Tabela 13).

Tabela 13 - Influência da PCR convencional na Sobrevida Livre de Leucemia

Variável	p^*	Risco Relativo	
		Estimado	Intervalo de Confiança (95%)
PCR Convencional	0,009	4,6	1,458 – 14,567

* p : Significância estatística.

Não foi observada associação da DRM por RQ-PCR com a SLL (Figura 25).

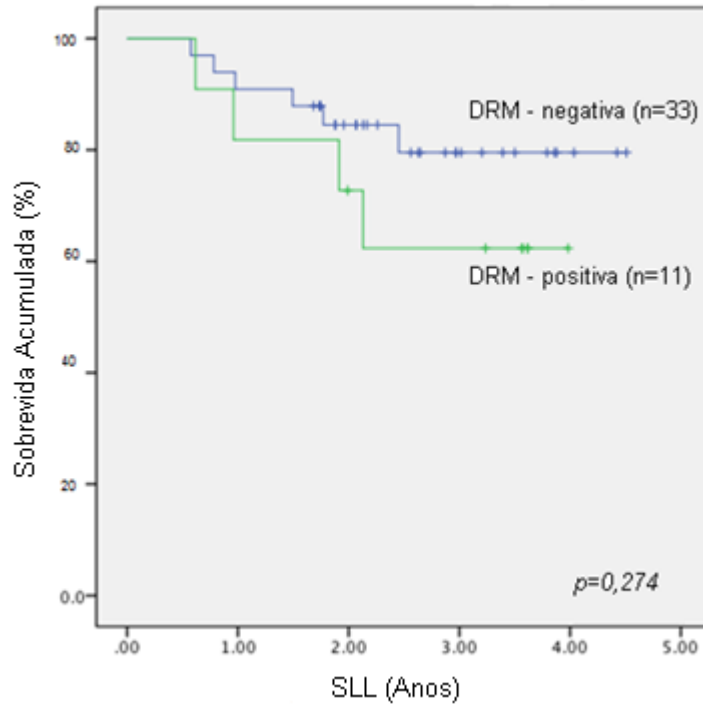


Figura 25 - **Curvas de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com a DRM por RQ-PCR.**

Aplicando o modelo de regressão de Cox para determinar o impacto prognóstico da DRM por RQ-PCR no final do período de indução na SLL e após o ajuste aos efeitos de sexo, instituição de origem, protocolo de tratamento utilizado, grupo de risco inicial, idade, imunofenotipagem e leucometria inicial na análise multivariada, nenhuma variável mostrou associação estatisticamente significativa com a SLL (Tabela 14).

Tabela 14 - Modelo de Cox para avaliar a influência da DRM por RQ-PCR no D28-35 na Sobrevida Livre de Leucemia de 57 pacientes estudados

Variável	p^a	Risco Relativo (RR)	
		RR Estimado	95% IC ^b
DRM por RQ-PCR no D28-35	0,427	1,993	0,364 – 10,909
Sexo	0,319	0,482	0,115 – 2,027
Hospital	0,847	1,216	0,167 – 8,850
GBTLI-1999	0,695	-	-
GBTLI-2009	0,939	1,163	0,024 – 55,731
AIEOP-95	0,759	0,496	0,006 – 43,854
Grupo de risco inicial	0,828	1,276	0,141 – 11,530
Idade	0,721	1,406	0,217 – 9,110
Imunofenotipagem	0,970	1,045	0,103 – 10,647
Leucometria inicial	0,246	3,703	0,405 – 33,873

^a p : Significância estatística.

^bIC: Intervalo de confiança.

Para evitar viés na seleção de pacientes, a SLL estimada em 3,5 anos foi também avaliada apenas nos pacientes com DRM analisada pelas duas técnicas. Mais uma vez, a SLL foi significativamente mais alta nos pacientes com DRM negativa por PCR convencional ($p = 0,032$) (Figura 26). E, verificando o nosso banco de dados, observamos que, de seis crianças (todas com imunofenótipo B) com DRM positiva por RQ-PCR e negativas por PCR convencional, apenas uma recaiu até o momento.

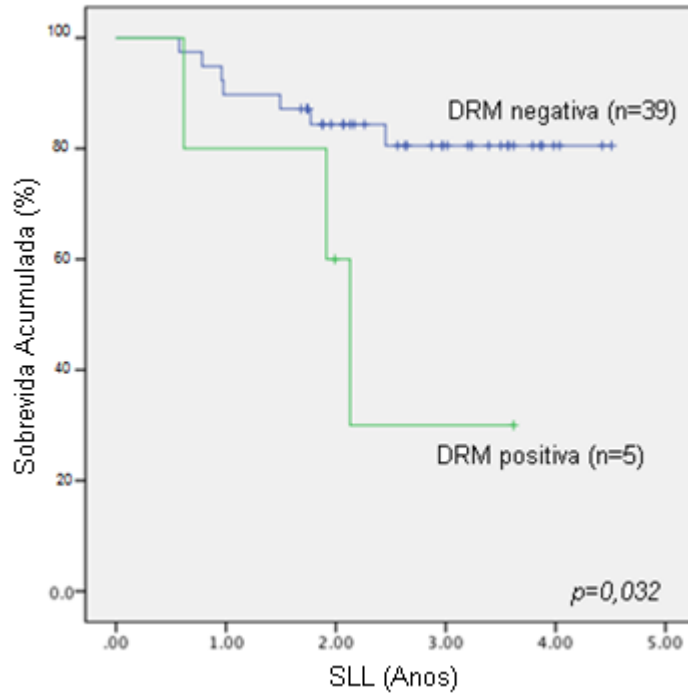


Figura 26 - Curvas de Sobrevida Livre de Leucemia de acordo com DRM por PCR convencional no grupo de 44 crianças analisadas por RQ-PCR.

6. DISCUSSÃO

A classificação adequada em grupos de risco ainda constitui um desafio no tratamento de crianças com LLA. A estratificação dos pacientes baseada na DRM por RQ-PCR ao final da terapia de indução foi incluída no protocolo do GBTLI pela primeira vez em 2009 e ainda está sob avaliação. O objetivo principal do presente estudo foi comparar uma técnica de PCR de baixo custo para detecção e monitoramento da DRM, com a metodologia de referência, RQ-PCR.

No presente estudo, a detecção de pelo menos um rearranjo clonal de *Ig* e *TCR* ou da deleção *SIL-TAL* em 98,3% dos pacientes confirma a aplicabilidade dessa estratégia para a triagem dos rearranjos na grande maioria das crianças com LLA.

Nos pacientes com LLA-B, a frequência de rearranjos encontrada em nosso estudo foi similar à observada por van der Velden *et al.*, 2003, Dawidowska *et al.*, 2006, Flohr *et al.*, 2008 e por outros dois grupos brasileiros utilizando a mesma metodologia (Scrideli *et al.*, 2009; Assumpção *et al.*, 2010). O rearranjo *IgH* foi o mais frequente, seguido por *TCRD* e *IgK*, como observado por Thörn *et al.*, 2009. Na triagem dos pacientes com LLA-T, o rearranjo mais frequentemente encontrado foi *TCRG* (90,9%), como observado em outros estudos: 90%-100% (Ganazza *et al.*, 2009; Scrideli *et al.*, 2009), seguido por *TCRD* em 27,3%. O rearranjo *SIL-TAL1* foi encontrado em 18,2% dos casos, frequência também similar à observada por outro grupo brasileiro (Mansur *et al.*, 2009).

No presente estudo, dois ou mais rearranjos clonais foram encontrados em 87% e 45% dos pacientes com LLA-B e LLA-T, respectivamente. Considerando que a literatura recomenda o uso de pelo menos dois rearranjos clonais para a avaliação da DRM (Cazzaniga & Biondi, 2005), nossos resultados apontam para a necessidade de incluir, no protocolo brasileiro, a pesquisa de outros rearranjos gênicos para as LLA-T, a exemplo do *TCRB*. Apesar da complexidade estrutural desse gene, os rearranjos *TCRB* têm sido utilizados com frequência como rearranjos adicionais na triagem de pacientes com LLA-T (Brüggemann *et al.*, 2004; Thor *et al.*, 2009). Além disso, como o rearranjo *SIL-TAL2* não foi detectado em nenhum paciente avaliado, talvez seja possível excluí-lo da triagem inicial dos pacientes com LLA-T.

Por outro lado, considerando o curto período de indução, poder-se-ia considerar a possibilidade da utilização de um alvo único para a avaliação da DRM. De fato, em nosso estudo foi detectado pelo menos um rearranjo clonal em 100% dos pacientes com LLA-B e em 91% dos pacientes com LLA-T. O grupo sueco encontrou pelo menos um rearranjo em 97% e 94% das crianças com LLA-B e LLA-T, respectivamente (Thor *et al.*, 2009).

No que diz respeito à RQ-PCR, como já observado em estudos anteriores (revisado por Salari *et al.*, 2014), os *primers* sintetizados para os rearranjos *IGH* e *IGK* em nosso estudo foram os mais sensíveis e específicos, devendo, portanto, ser o conjunto de escolha para a análise da DRM nos pacientes com LLA-B. O rearranjo *TCRG* mostrou-se altamente inespecífico visto que, dos nove *primers* submetidos ao teste de eficiência, apenas dois foram aprovados. A baixa especificidade do rearranjo *TCRG* pode estar relacionada ao tamanho da região N (van der Velden *et al.*, 2002-b) e ao conteúdo de GC, embora este aspecto não tenha sido avaliado no presente estudo.

No presente estudo, a frequência de DRM positiva no D28-35 pela PCR qualitativa foi de 15,8%, de acordo com outro estudo brasileiro que utilizou metodologia similar (13,2%) (Scrideli *et al.*, 2009). Já a frequência de DRM positiva por RQ-PCR, considerando os pontos de corte estabelecidos pelo GBTLI-2009 e considerando os dois grupos de pacientes (LLA-B e T) foi de 25%.

Diversos trabalhos na literatura já comprovaram a importância da DRM tanto por técnicas qualitativas (Scrideli *et al.*, 2009; Assumpção *et al.*, 2010), quanto por técnicas quantitativas (van dongen *et al.*, 1998; Coustan-Smith *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2003; Conter *et al.*, 2010; Karsa *et al.*, 2013; Paganin *et al.*, 2014) na estratificação de pacientes com LLA em grupos de risco de recaída. Nos pacientes do nosso estudo, de todas as variáveis analisadas, incluindo as tradicionalmente utilizadas para estratificação de risco dos pacientes, como idade e contagem de leucócitos ao diagnóstico (Coustan-smith *et al.*, 2000; Scrideli *et al.*, 2006), somente a DRM no D28-35 por PCR convencional apresentou associação estatisticamente significativa com a SLL ($p=0,004$).

No presente trabalho, a DRM por RQ-PCR não se associou à SLL, em contraste com os achados de outros grupos (Coustan-Smith *et al.*, 2000; Zhou, 2007; Flohr, 2008; Paganin, 2014). Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esse achado: em primeiro lugar,

é importante ressaltar que o número de pacientes avaliados foi pequeno. Ademais, o tempo de seguimento do presente estudo foi curto e os pacientes com DRM positiva por RQ-PCR poderão recair tardiamente. Um outro ponto importante diz respeito ao esquema de estratificação adotado pelo GBTLI-2009, que classifica os pacientes em apenas dois grupos - baixo e alto risco, diferentemente da maioria dos protocolos europeus que consideram ainda um grupo de risco intermediário. Neste sentido, os pontos de corte adotados para a classificação pelo GBTLI-2009 fazem com que sejam incluídos no grupo de baixo risco pacientes que estariam no grupo intermediário nos protocolos europeus (Conter et al., 2010; Eckert et al., 2013). Por outro lado, pode haver pacientes com DRM próxima a 10^{-3} , identificados como positivos por RQ-PCR e negativos por PCR convencional, que podem não recair. A falta de associação entre a DRM por RQ-PCR e as taxas de sobrevida em nossos pacientes é intrigante e necessita ser mais bem investigada em uma coorte maior e com tempo de acompanhamento mais longo.

Dos seis casos positivos por RQ-PCR e negativos por PCR convencional, em nosso estudo, todos LLA-B, apenas um recaiu até o momento, sendo necessário acompanhar estes pacientes durante um tempo mais longo para avaliar uma possível recaída tardia. Entretanto, a sensibilidade do teste qualitativo (entre 10^{-2} e 10^{-3}) talvez seja suficiente para identificar os pacientes com alto risco de recaída e que necessitem de intensificação da terapia ou de um protocolo alternativo para evitar uma recaída.

Em uma análise de concordância entre o método qualitativo e quantitativo, observou-se que, para a LLA-B, na faixa de valores superiores a 10^{-3} , a concordância foi de 40%, n=10 (sendo 75% de concordância até 10^{-2} , n=4; e 17% entre 10^{-2} e 10^{-3} , n=6). Para a LLA-T, a concordância para 10^{-3} foi de 50%, n=2 (sendo 100% de concordância no ponto de corte do GBTLI-2009, 10^{-2}). Todos os casos negativos no teste quantitativo também o foram no teste qualitativo. A baixa concordância entre os dois métodos nos pacientes com LLA-B não causa surpresa, uma vez que os *primers* consenso têm baixa sensibilidade (10^{-2} - 10^{-3}) (van der Velden et al., 2002-b), podendo portanto não identificar pacientes com LLA-B caracterizados como positivos pelo ponto de corte de 10^{-3} . No estudo prospectivo em andamento na Unicamp, em três anos de acompanhamento, os valores encontrados até o momento para crianças com LLA-B, para a faixa superior a 10^{-3} foi de 68% (n=19), sendo 88% de concordância até 10^{-2} (n=8) e 55% de concordância no grupo 10^{-2} a 10^{-3} (n=11). Para o grupo

de crianças com LLA-T, a concordância em 10^{-3} foi de 66,7% (n=6), mas 100% em 10^{-2} (n=3) (Yunes J.A.– Comunicação pessoal).

Podemos afirmar, com base nos nossos resultados, que a SLE em 3,5 anos em Minas aumentou de 43% (Viana et al., 1998) para 68% com os protocolos quimioterápicos adotados nas instituições brasileiras de referência no tratamento da LLA. No estudo de Scrideli *et al.*, a SLE em 5 anos para o grupo estudado no estado de São Paulo foi de $77,6\% \pm 3,1\%$ (Scrideli *et al.*, 2009).

O método de RQ-PCR é altamente sensível e específico, como demonstrado por vários grupos internacionais, e também é recomendado pelo GBTLI-2009 para a análise da DRM em crianças com LLA. Os achados do presente estudo, no entanto, sugerem que a DRM por PCR qualitativo parece ser uma alternativa eficaz de estratificação de risco. Sem dúvida, trata-se de uma estratégia simples e custo-efetiva para instituições e países com recursos técnicos e financeiros limitados. Estima-se que o custo dos reagentes e do material de consumo para estabelecer marcadores de DRM ao diagnóstico seja de €250,00 por paciente, com um adicional de €55,00 para cada amostra analisada durante o seguimento do tratamento (Kerst *et al.*, 2005). O custo de reagentes e consumíveis usados na DRM por PCR convencional foi calculado em torno de U\$10,00 por paciente ao diagnóstico e U\$8,00 para cada amostra de acompanhamento (Scrideli et al., 2009).

7. CONCLUSÕES

- No presente estudo, pelo menos um rearranjo gênico foi encontrado em 98,3% das amostras testadas ao diagnóstico por PCR convencional e a frequência dos diversos rearranjos nos pacientes com LLA-B e LLA-T foi similar à observada na literatura.
- Os *primers* clone-específicos mais sensíveis foram aqueles envolvendo os rearranjos *IgH* e *IgK*. Já os *primers* mais inespecíficos foram aqueles envolvendo os rearranjos *TCRG* e *TCRD*.
- A concordância entre os métodos de análise da DRM por PCR convencional e RQ-PCR, considerando os pontos de corte estabelecidos pelo protocolo GBTLI-2009 para a LLA-B e para a LLA-T, foi de 40% e 100%, respectivamente.
- Houve associação estatisticamente significativa entre a DRM por PCR convencional e a SLL.
- A DRM por PCR convencional foi a única variável que mostrou associação estatisticamente significativa com a SLL quando ajustada às outras variáveis analisadas.
- Não foi observada associação entre a DRM por RQ-PCR e a SLL.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aricò M, Valsecchi MG, Rizzari C, Barisone E, Biondi A, Casale F, Locatelli F, Lo Nigro L, Luciani M, Messina C, et al. Long-Term Results of the AIEOP-ALL-95 Trial for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Insight on the Prognostic Value of DNA Index in the Framework of Berlin-Frankfurt-Muenster–Based Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(2):283-289.

Assumpção JG, Ganazza MA, de Araújo M, Silva AS, Scrideli CA, Brandalise SR et al. 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.

Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*. 2007;115(1):138-145.

Brandalise S, Odone V, Pereira W, Andrea M, Zanichelli M, Aranega V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. ALL Brazilian Group. *Leukemia*. 1993 ;7 Suppl 2:S142-5.

Brisco MJ, Condon J, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, Seshadri R, Toogood I, Waters K, Tauro G, Ekert H, et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet*. 1994;343:196-200.

Brüggemann M, van der Velden VHJ, Raff T, Droese J, Ritgen M, Pott C, Wijkhuijs AJ, Gökbüget N, Hoelzer D, van Wering ER, van Dongen JJM, Kneba M. Rearranged T-cell receptor beta genes represent powerful targets for quantification of minimal residual disease in childhood and adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18(4):709-719.

Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottman OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia*. 2010;24:521-35.

Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 1995; 85:1416–1434.

Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*. 1999;38(4):139-52.

Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 1998;339(9):591-8.

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.

Chen X, Pan Q, Stow P, Behm FG, Goorha R, Pui C-H, Neale GAM. Quantification of minimal residual disease in T-lineage acute lymphoblastic leukemia with the TAL-1 deletion using a standardized real-time PCR assay. *Leukemia*. 2001;15:166-170.

Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Möricke A, Aricò M, Zimmermann M, Mann G, De Rossi G, Stanulla M, Locatelli F, Basso G, Niggli F, Barisone E, Henze G, Ludwig W, Haas AO, Cazzaniga G, Koehler R, Silvestri D, Brattke J, Parasole R, Beier R, van Dongen JJM, Biondi A, Schrappe M. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010;115:3206–3214.

Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000; 96:2691-2696.

Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;100(1):52-8.

Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, Fritsch G, Gadner H; Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002;99(6):1952-8.

Dawidowska M, Derwich K, Szczepanski T, Jolkowska J, van der Velden VH, Wachowiak J, Witt M. Pattern of immunoglobulin and T-cell receptor (Ig/TCR) gene rearrangements in Polish pediatric acute lymphoblastic leukemia patients – implications for RQ-PCR-based assessment of minimal residual disease. *Leuk Res*. 2006;30:1119–25.

Eckert C, von Stackelberg A, Seeger K, Groeneveld TWL, Peters C, Klingebiel T, Borkhardt A, Schrappe M, Escherich G, Henze G. Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia – Long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96. *European Journal of Cancer*. 2013;49:1346-55.

Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schäfer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Valsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJ, Biondi A, Bartram CR; International BFM Study Group (I-BFM-SG). Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008;22(4):771-82.

Ganazza MA, Assumpção JG, de Araújo M, Scrideli CA, Tone LG, Brandalise SR et al. TCRG gene rearrangement patterns in Brazilian children with ALL: An update. *Leuk Res*. 2009;33(12):228-9.

Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, Hutchinson RJ, Lange BJ, Nachman JB, Reaman GH, Sather HN, Steinherz PG, Trigg ME, Tubergen DG, Uckun FM. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. *Cancer*. 1997; 80:1717–26.

GBTLL. Grupo Brasileiro para o Tratamento de Leucemia Infantil. Protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, 2009.

Greaves MF. Aetiology of acute leukemia. *Lancet*. 1997; 349: 344-349.

Greaves MF. Childhood leukaemia. *British Medical Journal*. 2000; 324: 383-387.

Goulden NJ, Knechtli CJC, Garland RJ, Langlands K, Hancock JP, Potter MN, Steward CG, Oakhill A. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol*. 1998;100: 235.

Henze G. Early postinduction intensification therapy is essential in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008;5:502-503.

Hoelzer D, Gökbuget N, Ottmann O, Pui C-H, Relling MV, Appelbaum FR, van Dongen JJ, Szczepanski T. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002;162-168.

Jacqy C, Delepaut B, Van Daele S, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B, Vermynen C, Cornu G, Martiat P. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol*. 1997;98(1):140-6.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik. *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença*. Artmed, Porto Alegre. 6ª ed, 848pp. 2007.

Jeha S, Pui CH. Risk-adapted Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(5):973-990.

Karsa M, Dalla Pozza L, Venn NC, Law T, Shi R, Giles JE, Bahar AY, Cross S, Catchpole D, Haber M, Marshall GM, Norris MD, Sutton R. Improving the identification of high risk precursor B acute lymphoblastic leukemia patients with earlier quantification of minimal residual disease. *PLoS One*. 2013;8(10):e76455.

Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Coustan-Smith E, Campana D, Koscielniak E, Niemeyer C, Schlegel PG, Müller I, Niethammer D, Bader P. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Hematol*. 2005;128:774-82.

Kroft SH, Role of Flow Cytometry in Pediatric Hematopathology. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(Suppl 1):S19-S32.

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.

Mansur MB, Emerenciano M, Brewer L, Sant'Ana M, Mendonça N, Thuler LC, Koifman S, Pombo-de-Oliveira MS. SIL-TAL1 fusion gene negative impact in T-cell acute lymphoblastic leukemia outcome. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(8):1318-25.

Marshall GM, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, Xue C, Brisco MJ, Sykes PJ, Morley A, Webster B, Dalla Pozza L, Waters K, Norris MD. Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2003; 21(4):704-9.

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

Moppett J, Burke GA, Steward CG, Oakhill A, Goulden NJ. The clinical relevance of detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Pathol*. 2003; 56(4): 249-253.

Nathan DG, Orkin SH. *Hematology of Infancy and Childhood*. Philadelphia: W.B. Saunders. 1998; 5ed.

Oliveira BM, Diniz MS, Viana MB. Leucemias Agudas na Infância. *Rev Med Minas Gerais* 2004; 14 (1 Supl. 1): S33-S39.

Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(4): 655-674.

Paganin M, Fabbri G, Conter V, Barisone E, Polato K, Cazzaniga G, Giraldi E, Fagioli F, Aricò M, Valsecchi MG, Basso G. Postinduction Minimal Residual Disease Monitoring by Polymerase Chain Reaction in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(31):3553-58.

Panzer-Grümayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(3):790-4.

Pedrosa F & Lins M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. *Rev. Bras. Saúde Matern Infant*. 2002;2(1):63-68.

Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, Novaes CO. Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2009;42:121-125.

Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13(1):110-8.

- Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 1998; 339(9):605-15.
- Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350(15):1535-48.
- Pui CH, Robison LL, Look AT: Acute lympho-blastic leukaemia. *Lancet* 2008;371:1030-1043.
- Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, et al: Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how do we get there? *Blood.* 2012 120:1165-1174.
- Reis RS, Santos MO, Thuler LCS. Incidência de tumores pediátricos no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53(1): 5-15.
- Salari F, Shahjahani M, Shahrabi S, Saki N. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: optimal methods and clinical relevance, pitfalls and recent approaches. *Med Oncol.* 2014 Nov;31(11):266.
- Scrideli CA, de Paula Queiróz R, Bernardes JE, Defavery R, Valera ET, Tone LG. Use of simplified strategies to evaluate early treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2006;30(8):1049-52.
- Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza M A, Yunes JA, Toledo S, Lee M L M, Delbuono E, Petrilli A S, Queirós RP, Biondi A, Viana MB, Brandalise SR, Tone LG. A simplified Minimal Residual Disease (MDR) PCR method at early treatment points stratifies children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica.* 2009;94(6):781-9.
- Spector LG, Ross JA, Robison LL, et al. Epidemiology and etiology. In:Pui CH, editor. *Childhood leukemias.* New York: Cambridge University Press: 2006. p.48–66.
- Stasi R, Taylor CG, Venditti A, Del Poeta G, Aronica G, Bastianelli C, Simone MD, Buccisano F, Cox MC, Bruno A, Piccioni D, Abruzzese E, Sargent JM, Tribalto M, Amadori S. Contribution of immunophenotypic and genotypic analysis to the diagnosis of acute leukemia. *Ann Hematol.* 1995;71: 13-27.
- 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.
- Szczepanski T, van der Velden VHJ, Hoogeveen PG, de Brie M, Jacobs DCH van Wering ER, van Dongen JJ. Vdelta2-Jalpha rearrangements are frequent in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia but are rare in normal lymphoid cells. *Blood* 2004; 103:3788-3804.

Thorn I, Forestier E, Thuresson B, Wasslavik C, Malec M, Li A, Lindstrom-Eriksson E, Botling J, Barbany G, Jacobsson S, Olofsson T, Porwit A, Sundstrom C, Rosenquist R. Applicability of IG/TCR gene rearrangements as targets for minimal residual disease assessment in a population-based cohort of Swedish childhood acute lymphoblastic leukaemia diagnosed 2002–2006. *European Journal of Haematology*. 2009;84:117-27.

van der Velden V, Willemse M, Van der Schoot C, Hählen K, Van Wering E, Van Dongen J. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2002;16(5):928–36.

van der Velden VHJ, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hählen K, van Wering ER, van Dongen JJM. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2002(a); 16:928-936.

van der Velden VHJ, Wijkhuijs JM, Jacobs DCH, van Wering ER, van Dongen JJM. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia*. 2002(b); 16:1372-1380.

van der Velden VHJ, Szczepanski T, Wijkhuijs JM, Hart PG, Hoogeveen PG, Hop WCJ, van Wering ER, van Dongen JJM. Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 2003;17:1834-1844.

van der Velden VH, Panzer-Grümayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, Basso G, Schrappe M, Wijkhuijs JM, Konrad M, Bartram CR, Masera G, Biondi A, van Dongen JJ. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia*. 2007;21(4):706-13.

van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gardner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettlinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998;352(9142):1731-8.

van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. 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.

Veerman AJ, Hähnen K, Kamps WA, Van Leeuwen EF, De Vaan GA, Solbu G, Suci S, Van Wering ER, Van der Does-Van der Berg A. High cure rate with a moderately intensive treatment regimen in non-high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. Results of protocol ALL VI from the Dutch Childhood Leukemia Study Group. *J Clin Oncol.* 1996;14(3):911-8.

Verhagen OJ, Willemse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJ, Jacobs DC, Joosten SA, van Wering ER, van Dongen JJ, van der Schoot CE. Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2000;14(8):1426-35.

Viana MB. Leucemias e linfomas pediátricos. In: Murad AM, ed. *Oncologia. Bases clínicas do tratamento.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1996. p.372-383.

Viana MB, Fernandes RA, de Carvalho RI, Murao M. Low socioeconomic status is a strong independent predictor of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer Suppl.* 1998;11:56-61.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Práticas.* Atheneu, São Paulo. 2001.

Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberg D, Wang H, Dalton V, McBride KD, Sallan SE, Silverman LB, Gribben JG; Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood.* 2007 Sep;110(5):1607-11.

9. ANEXOS

Anexo I - *Primers* selecionados para triagem inicial dos rearranjos clonais e para a análise da DRM por PCR convencional nas LLAs-B e T

<i>Primer Forward</i>	(Sequencia 5'→3')	<i>Primer Reverso</i>	(Sequencia 5'→3')	LLA*	
				B	T
gene IgH					
VH1-FR2	CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	
VH2-FR2	TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	
VH3-FR2	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	
VH4-FR2	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	
VH5-FR2	GGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGG	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	
VH6-FR2	TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	
VH7-FR2	TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	
DH1	GGCGGAATGTGTGCAGGC	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC		x
DH2	GCACTGGGCTCAGAGTCTCT	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	x
DH3	GTGGCCCTGGGAATATAAAA	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	x
DH4	AGATCCCCAGGACGCAGCA	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC		x
DH5	CAGGGGACACTGTGCATGT	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC		x
DH6	TGACCCCAGCAAGGGAAGG	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC		x
DH7	CACAGGCCCCCTACCAGC	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	x
gene IgK					
Vk1/6	TCAAGGTTTCAGCGCAGTGGATCTG	Kde	CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA	x	
Vk2	GGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTC	Kde	CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA	x	
Vk3	CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATC	Kde	CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA	x	
C					
INTR	CGTGGCACCGCGAGCTGTAGAC	Kde	CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA	x	
gene TCRG					
		Jg1.3/2.3	GTGTTGTTCCACTGCCAAAGAG		
Vg1f	GGAAGGCCCCACAGCRTCTT	+	+	x	x
		Jg1.1/2.1	TTACCAGGCGAAGTTACTATGAGC		
Vg9	CGGCACTGTCAGAAAGGAATC	“	“	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	AGCGGGTGGTGATGGCAAAGT	Jd1	GTTCCACAGTCACACGGGTTC		x
Vd2	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG	Dd3	TGGGACCCAGGGTGAGGATAT	x	x
Dd2	AGCGGGTGGTGATGGCAAAGT	Dd3	TGGGACCCAGGGTGAGGATAT	x	x
SIL-TAL					
Sil	AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA	Tal1	AGAGCCTGTCGCCAAGAA		x
Sil	AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA	Tal2	TTGTAATAATGGGGAGATAATGTGCAC		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 II - *Primers* para reamplificação de rearranjos clonais Ig/TCR/SIL-TAL e seqüenciamento com M13 e T7.

Primer	Sequencia 5'→3'
<i>Primers para reamplificação</i>	
VH1-FR2-M13	gtaaaacgacggccagtCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
VH2- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtTGGATCCGTCAGCCCCAGGAAGG
VH3- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
VH4- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtTGGATCCGCCAGCCCCAGGAAGG
VH5- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAAGG
VH6- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG
VH7- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
DH1-M13	gtaaaacgacggccagtGGCGGAATGTGTGCAGGC
DH2-M13	gtaaaacgacggccagtGCACTGGGCTCAGAGTCCTCT
DH3-M13	gtaaaacgacggccagtGTGGCCCTGGGAATATAAAA
DH4-M13	gtaaaacgacggccagtAGATCCCCAGGACGCAGCA
DH5-M13	gtaaaacgacggccagtCAGGGGACACTGTGCATGT
DH6-M13	gtaaaacgacggccagtTGACCCAGCAAGGAAGG
DH7-M13	gtaaaacgacggccagtCACAGGCCCTACCAGC
JHcon-T7	taatacgaactactatagggCTTACCTGAGGAGACGGTGACC
Vk1/6-M13	gtaaaacgacggccagtTCAAGGTTAGCGGCAGTGGATCTG
Vk2-M13	gtaaaacgacggccagtGGCCTCCATCTCTGCAGGTCTAGTC
Vk3-M13	gtaaaacgacggccagtCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
INTR-M13	gtaaaacgacggccagtCGTGGCACCGGAGCTGTAGAC
kde-T7	taatacgaactactatagggCCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA
VgIf-M13	gtaaaacgacggccagtGGAAGGCCCCACAGCRTCTT
Vg9-M13	gtaaaacgacggccagtCGGCACTGTCAGAAAGGAATC
Vg10-M13	gtaaaacgacggccagtAGCATGGGTAAGACAAGCAA
Vg11-M13	gtaaaacgacggccagtCTTCCACTTCCACTTTGAAA
Jg1.3/2.3-T7	taatacgaactactatagggGTGTTGTTCCACTGCCAAAGAG
Jg1.1/2.1-T7	taatacgaactactatagggTTACCAGGCGAAGTTACTATGAGC
Vd1-M13	GtaaaacgacggccagtATGCAAAAAGTGGTCGCTATT
Vd2-M13	gtaaaacgacggccagtATACCGAGAAAAGGACATCTATG
Vd3-M13	GtaaaacgacggccagtGTACCGGATAAGGCCAGATTA
Jd1-T7	taatacgaactactatagggGTTCCACAGTCACACGGGTTC
Dd2-M13	gtaaaacgacggccagtAGCGGGTGGTGATGGCAAAGT
Dd3-T7	taatacgaactactatagggTGGGACCCAGGGTGAGGATAT
Sil5-M13	gtaaaacgacggccagtAAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA
Tal1-T7	TaatacgaactactatagggAGAGCCTGTGCGCAAGAA
Tal2-T7	taatacgaactactatagggTTGTAAAATGGGGAGATAATGTGCGAC
<i>Primers para sequenciamento</i>	
M13 (universal)	Gtaaaacgacggccagt
T7	Taatacgaactactataggg

Obs : em letras minúsculas, sequencia correspondente aos *primers* M13 e T7. Em letras maiúsculas, sequencia correspondentes aos *primers* do Anexo I.

Anexo III - *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	GGTGCTGGACAGAGAAGACT
JH3	CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTCA	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	TACAGACAGGTCCTCAGAGGTCAG
Kde*	AGCCAGGGGCGACTCCTCATGAGT	ATATGGCAAAAATGCAGCTGC
Kde2*	GGACAACCTGCTCTGACCTCTGAGGA	GACCTTCAGGCACATGCTT

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	TTCCTGC(T/C)TTCCCTCTATTACCT
JG1.1/2.1	CTGAAGGGACTAAGCTCATAGTAACTTCACCTGGT	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
	TTGAGATTGATACTGCGAAATCTAATTGAAAATGAC	
VG2	TC	CTTACGCAAGCACAAGGAACAA
VG3	ACTCATAACCCAGGAGGTGGAGCTGGATATT	CTCCACCGCAAGGGATGT
VG4	CTTGAGAATGATACTGCGAAATCTTATTGAAAATGA	GATACTTACGGAAGCACAAGGAAGA
VG5*	ATCAATATCCAGCTCCACCTCTGGGT	GGACTCAGTCCAGGAAAGTATTACTCAT
VG9	TAGGATACCTGAAACGTCTACATCCACTCTCACC	GGCATTCCGTCAGGCAAA
	CAATCCTTACCATCAAGTCCGTAGAGAAAGAAGAC	
VG10*	AT (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*	ATATCCTCACCTGGGTCCCATGCC3'	CTGCTTGCTGTGTTGTCTCTCT

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

	Probe TaqMan	Primer Forward
VD2	AGACCCTTCATCTCTCTCTGATGGTGCAAGTA	TGCAAAGAACCTGGCTGTACTTAA

Gene N-RAS: Controle interno (normalizador)⁵

<i>Primer forward</i>	ACCTGTTTGTGGACATACTGG
<i>Primer Reverso</i>	CGCCTGTCCTCATGTAT
Probe TaqMan N-RAS	TCATGGCACTGACTCTTCTGGTCCAGCT

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.

