

JULIANA MARIA CAMARGOS ROCHA

Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda

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

ORIENTADORA:

Profa. Benigna Maria de Oliveira
Faculdade de Medicina, UFMG

COORIENTADORA:

Profa. Sandra Guerra Xavier
Faculdade de Medicina, UFMG

Belo Horizonte – MG

2017

R672e Rocha, Juliana Maria Camargos.
Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda [manuscrito]. / Juliana Maria Camargos Rocha. -- Belo Horizonte: 2017.
111f: il.
Orientador: Benigna Maria de Oliveira.
Coorientador: Sandra Guerra Xavier.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras. 2. Neoplasia Residual. 3. Citometria de Fluxo. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Oliveira, Benigna Maria de. II. Xavier, Sandra Guerra. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título. NLM: WS 300

Bibliotecária Responsável: Cibele de Lourdes Buldrini Filogônio Silva CRB-6/999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Profa. Sandra Goulart Almeida

Pró-Reitora de Pós-Graduação

Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Ado Jorio de Vasconcelos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor

Prof. Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

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

Coordenadora

Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Subcoordenadora

Profa. Roberta Maia de Castro Romanelli

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

À minha orientadora Profa. Benigna Maria de Oliveira, pelo apoio, confiança, ensinamentos e pela forma tão objetiva de conduzir este estudo;

À minha coorientadora Profa. Sandra Guerra Xavier, pela constante presença, amizade e dedicação;

Ao Prof. Marcos Borato Viana, pelo apoio durante todo o estudo;

Ao Dr. Marcelo Lima e à Dra. Mitiko Murao, por todos os ensinamentos em citometria de fluxo, por terem permitido a realização deste trabalho no laboratório, pela amizade e apoio;

À Cristina e à Marília, pelo suporte nos ensaios de citometria de fluxo;

Aos amigos do Laboratório de Hematologia Molecular - Danilo, Valéria e Bárbara, pelo treinamento e suporte nos testes moleculares;

Aos médicos e residentes do Serviço de Hematologia Pediátrica do HC/UFGM, pela enorme contribuição na coleta das amostras dos pacientes;

Aos pacientes e familiares, que permitiram a realização deste estudo;

Às alunas de iniciação científica, pela grande contribuição na coleta dos dados clínicos;

A todos os amigos do Serviço de Medicina Laboratorial do HC/UFGM;

Aos colegas do Departamento de Propedêutica da Faculdade de Medicina/UFGM;

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia/UFGM, especialmente ao Prof. Gifone, pela presença e auxílio em diferentes momentos deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente;

Ao Gláucio, pela constante presença, compreensão, firmeza e companheirismo;

À minha filha Gabi, fonte de inspiração e motivação em todos os momentos, a quem eu dedico este trabalho;

A todos os meus familiares, especialmente à minha mãe, sempre disposta a ajudar, e a minha irmã Andreia, exemplo a ser seguido e para a qual não tenho palavras...

NOTA EXPLICATIVA

De acordo com a Resolução N^o03/2010, que regulamenta o formato de teses e dissertações do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente, o formato de artigo é considerado preferencial para apresentação das teses de doutorado. Diante disso, esta tese inclui, no capítulo de revisão da literatura, um artigo de revisão sobre as estratégias atuais para a detecção de doença residual mínima na leucemia linfóide aguda infantil, publicado em periódico científico; uma seção específica sobre a avaliação de DRM por PCR convencional; e uma seção de atualização da literatura com trabalhos publicados após a divulgação do referido artigo de revisão.

Logo, a tese foi elaborada de acordo com o seguinte roteiro:

1. Introdução;
2. Revisão da literatura, incluindo um artigo de revisão;
3. Objetivos;
4. Pacientes e Métodos;
5. Resultados;
6. Discussão;
7. Conclusões;
8. Anexos/Apêndices.

*Observação: como o formato de tese inclui o artigo de revisão, com referências próprias, optou-se por apresentar as referências bibliográficas após o final de cada capítulo e não em seção única.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| AR | Grupo de alto risco |
| APC | Aloficocianina |
| BR | Grupo de baixo risco |
| BRI | Grupo de baixo risco intermediário |
| BRV | Grupo de baixo risco verdadeiro |
| CALLA | <i>Common ALL antigen</i> (antígeno LLA comum) |
| CD _{cy} | <i>Cluster of differentiation</i> – expressão citoplasmática |
| CD _s | <i>Cluster of differentiation</i> – expressão de superfície |
| CF | Citometria de fluxo |
| COEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| D8 | Dia 8 do tratamento quimioterápico |
| D15 | Dia 15 do tratamento quimioterápico |
| D35 | Dia 35 do tratamento quimioterápico |
| D78 | Dia 78 do tratamento quimioterápico |
| DEPE | Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão |
| DRM | Doença residual mínima |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| EGIL | <i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i> |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FSC | <i>Forward scatter</i> (dispersão frontal do laser) |
| GBTLLA-2009 | Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Agudas da Infância |
| HC-UFMG | Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais |
| Ig | Imunoglobulina |
| IgM | Imunoglobulina de cadeia pesada μ |
| IgK | Imunoglobulina de cadeia leve <i>Kappa</i> |
| LAIP | Imunofenótipo associado à leucemia |
| LLA | Leucemia linfóide aguda |
| mA | Miliampere |
| μ L | Microlitro |
| mL | Mililitro |

| | |
|--------|---|
| MO | Medula óssea |
| MO M1 | Medula óssea com percentual de blastos inferior a 5% |
| MO M2 | Medula óssea com percentual de blastos na faixa entre 5 e 25% |
| MO M3 | Medula óssea com percentual de blastos superior a 25% |
| NGS | <i>Next-generation sequencing</i> (sequenciamento de próxima geração) |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PE | Ficoeritrina |
| PerCP | Proteína clorofila peridina |
| Ph | Cromossomo Philadelphia |
| RL | Subgrupo respondedor lento |
| rpm | Rotações por minuto |
| RQ-PCR | Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real |
| RR | Subgrupo respondedor rápido |
| SGLO | Sobrevida global |
| SLE | Sobrevida livre de eventos |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SP | Sangue periférico |
| SOBOPE | Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica |
| SSC | <i>Side scatter</i> (dispersão lateral do laser) |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TCR | Receptor de células T |
| TCRD | Receptor de células T <i>delta</i> |
| TCRG | Receptor de células T <i>gamma</i> |
| TdT | <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i> |
| UV | Ultravioleta |

LISTA DE FIGURAS

| | Pag |
|--|-----|
| Figura 1 – Modelo de análise da DRM por citometria de fluxo, representado pela estratégia de combinação de <i>gates</i> sequenciais..... | 52 |
| Figura 2 – Diagrama esquemático da técnica de análise de homo/heteroduplex de rearranjos dos genes <i>Ig</i> e <i>TCR</i> | 55 |
| Figura 3 – Fluxograma das etapas executadas para análise da DRM por citometria de fluxo nas amostras dos 42 pacientes estudados..... | 63 |
| Figura 4 – Exemplos de detecção da DRM por citometria de fluxo, tendo como base o imunofenótipo aberrante detectado ao diagnóstico (amostra D0)..... | 65 |
| Figura 5 – Análise de DRM em amostra do D78 de paciente com LLA-B (nº 29), com o imunofenótipo inicial: CD45 ⁺ fraco, CD19 ⁺ , CD10 ⁺ , CD34 ⁺ , CD123 ⁺ , CD38 ⁺ fraco..... | 66 |
| Figura 6 – Fluxograma das etapas executadas para análise da DRM por PCR convencional nas amostras dos 42 pacientes estudados..... | 70 |
| Figura 7 – Exemplo de avaliação da DRM através da detecção do rearranjo de <i>TCRG</i> (VgIf) por PCR convencional (análise homo/heteroduplex), com peso molecular esperado entre 200 e 255 pb..... | 73 |
| Figura 8 – Probabilidade de sobrevida global para 42 pacientes com diagnóstico de LLA..... | 81 |
| Figura 9 – Probabilidade de sobrevida livre de eventos para 42 pacientes com diagnóstico de LLA..... | 81 |
| Figura 10 – Probabilidade de sobrevida global (SGLO) para 41 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com a linhagem celular acometida..... | 82 |

| | |
|---|----|
| Figura 11 – Probabilidade de sobrevida global (SGLO) para 42 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com a contagem global de leucócitos ao diagnóstico..... | 83 |
| Figura 12 – Probabilidade de sobrevida livre de eventos (SLE) para 41 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com a linhagem celular acometida..... | 84 |
| Figura 13 – Probabilidade de sobrevida livre de eventos (SLE) para 42 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com a contagem global de leucócitos ao diagnóstico..... | 84 |

LISTA DE TABELAS

| | Pag |
|--|-----|
| ARTIGO DE REVISÃO | |
| Tabela 1– Characteristics of the two most frequently used MRD detection methods..... | 29 |
| Tabela 2 – Examples of markers used in MRD detection by flow cytometry in B-ALL, with a description of the antigen expression expected pattern and/or possible anomalous antigen expression of blast cells, in relation to the usual antigen expression of normal B-cell precursors..... | 30 |
| Tabela 3 – Commonly used markers in the MRD analysis by flow cytometry in T-ALL, with a description of the aberrant antigen expression possibly noted..... | 31 |
| PACIENTES E MÉTODOS | |
| Tabela 1 – Classificação imunológica das leucemias linfoides agudas..... | 49 |
| Tabela 2 – <i>Primers</i> selecionados para triagem inicial dos rearranjos clonais e para a análise da DRM por PCR convencional nas LLAs B e T derivadas..... | 54 |
| Tabela 3 – Descrição das características clínicas e biológicas da população de estudo..... | 62 |
| Tabela 4 – Frequência de expressão dos marcadores determinantes dos imunofenótipos associados à leucemia nos pacientes com LLA-B (n=35)..... | 64 |
| Tabela 5 – Frequência de expressão dos marcadores determinantes dos imunofenótipos associados à leucemia nos pacientes com LLA-T (n=7)..... | 65 |
| Tabela 6 – Comparação entre a avaliação morfológica do esfregaço de medula óssea e a DRM por citometria de fluxo das amostras colhidas no D15, nas 42 crianças estudadas..... | 68 |
| Tabela 7 – Comparação entre a avaliação morfológica do esfregaço de medula | |

| | |
|---|----|
| óssea e a DRM por citometria de fluxo das amostras colhidas no D35, nas 42 crianças estudadas..... | 69 |
| Tabela 8 – Frequência de rearranjos de <i>Ig/TCR</i> em 34 crianças com LLA-B..... | 71 |
| Tabela 9 – Frequência de rearranjos de <i>Ig/TCR</i> em 7 crianças com LLA-T..... | 72 |
| Tabela 10 – Comparação entre a avaliação da DRM por citometria de fluxo e por PCR convencional das amostras colhidas no D35, nas 42 crianças estudadas..... | 74 |
| Tabela 11 – Comparação entre a avaliação da DRM por citometria de fluxo e por PCR convencional das amostras colhidas no D78 ou período equivalente, nas 26 crianças estudadas..... | 74 |
| Tabela 12 – Avaliação de concordância entre os resultados da análise de DRM pelos métodos de CF e PCR, nos pontos D35 e D78..... | 74 |
| Tabela 13 – Comparação entre as análises de DRM por citometria de fluxo, PCR convencional e RQ-PCR das 7 amostras com resultados discordantes, analisadas pelo Laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil Boldrini, Campinas/SP | 75 |
| Tabela 14 – Análise de associação entre a avaliação de DRM no ponto D35, por CF e PCR, e fatores clínicos e biológicos determinantes do prognóstico em LLA infantil..... | 77 |
| Tabela 15 – Análise de associação entre a avaliação de DRM no ponto D78, por CF e PCR, e fatores clínicos e biológicos determinantes de prognóstico em LLA infantil..... | 78 |
| Tabela 16 – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes que evoluíram com recidiva da LLA..... | 80 |

RESUMO

Introdução: As estratégias atuais de tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA) da infância resultam em remissão de longo prazo em cerca de 90% das crianças acometidas, entretanto a probabilidade de evolução para a cura é menor dentre os pacientes que apresentam recidiva da doença. São propostos sistemas de estratificação do risco de recidiva, através de fatores clínicos e biológicos, visando à oferta de tratamento eficaz aos pacientes classificados nos grupos de alto risco. A doença residual mínima (DRM) - persistência de células leucêmicas residuais em proporções submicroscópicas, verificada durante o tratamento - representa hoje o principal indicador prognóstico da LLA em crianças, podendo determinar a redefinição da quimioterapia iniciada. Os métodos laboratoriais atualmente recomendados para a detecção de DRM são a imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) e a análise de rearranjos clonais dos genes de *Ig* e *TCR* por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RQ-PCR). Ambos apresentam bom desempenho na detecção de células leucêmicas residuais, entretanto são onerosos, demandam pessoal qualificado para a sua realização e são restritos a centros especializados, especialmente a RQ-PCR. **Objetivos:** Comparar as análises de DRM por CF e PCR convencional, em amostras colhidas ao final das fases de indução da remissão (D35) e consolidação da remissão (D78), e correlacionar os dados obtidos com as principais características clínicas dos pacientes com LLA. **Metodologia:** A população de estudo foi constituída por 42 pacientes com diagnóstico recente de LLA (35 LLA B e 7 LLA T), admitidos no Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG) no período entre setembro de 2013 e dezembro de 2016, e tratados de acordo com o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Agudas da Infância (GBTLI LLA-2009). As amostras de medula óssea (MO) dos pacientes incluídos no estudo foram avaliadas ao diagnóstico por CF, para caracterização imunofenotípica dos blastos e, por PCR convencional, para detecção de rearranjos clonais dos genes de *Ig* e *TCR*. A DRM foi avaliada por CF nas amostras de MO colhidas nos dias 15, 35 e 78 do tratamento e, por PCR convencional, nas amostras dos pontos D35 e D78. **Resultados:** Foram realizadas 107 análises de DRM por CF e 63 por PCR convencional. Considerando o ponto de corte de 0,01% para definição de positividade, a DRM foi detectada por CF em 87,8%, 17,1% e 28% das amostras analisadas nos tempos D15, D35 e D78, respectivamente. Por PCR convencional, a DRM foi detectada em 13,2% e 12% das amostras analisadas nos tempos D35 e D78, respectivamente. Avaliações pareadas de DRM por CF e PCR convencional foram realizadas em 61/68 (89,7%) amostras de MO colhidas nos pontos D35 e D78. A taxa de concordância geral entre as duas metodologias foi de 88,5%, sendo maior nas análises do D35

(91,9%; *Kappa*: 0,62), em comparação com as análises do D78 (83,3%; *Kappa*: 0,52). Os resultados discordantes foram esclarecidos pela metodologia de RQ-PCR, que evidenciou quatro resultados falso-positivos da CF, um falso-negativo da CF e dois falso-negativos da PCR convencional. Em análise de associação envolvendo os fatores prognósticos, foi verificada associação significativa entre linhagem celular acometida e DRM por PCR convencional, nos dois pontos de avaliação (D35: $p = 0,037$; D78: $p = 0,032$), sendo maior a frequência de detecção de DRM na LLA-T. O tempo de seguimento clínico dos pacientes variou de 6 a 46 meses (mediana: 27 meses). A probabilidade estimada de sobrevida global (SGLO) aos 3,8 anos foi de 75,1% ($\pm 9,9\%$) e a probabilidade estimada de sobrevida livre de eventos (SLE) foi de 50,5% ($\pm 21,4\%$). Foram observadas maiores SGLO e SLE no grupo de pacientes com LLA-B, em comparação ao grupo de pacientes com LLA-T ($p = 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente), assim como no grupo de pacientes com contagem de leucócitos ao diagnóstico inferior a 50.000 cel/ μ L, se comparado ao grupo com leucometria igual ou superior a 50.000 cel/ μ L ($p = 0,0001$ e $p = 0,00009$, respectivamente). **Conclusão:** As metodologias de CF e PCR convencional apresentam resultados comparáveis na detecção de DRM na LLA infantil, em amostras colhidas em fases de regeneração medular. Constituem métodos acessíveis a regiões com recursos financeiros e tecnológicos restritos, podendo ser utilizadas de forma complementar, com o intuito de propiciar a monitorização do tratamento quimioterápico a um maior número de crianças com LLA. Maior tempo de seguimento e maior número de casos são necessários para que sejam obtidos resultados consistentes nas análises de sobrevida.

Palavras chave: Leucemia linfóide aguda da infância, Doença Residual Mínima (DRM), citometria de fluxo, reação em cadeia da polimerase (PCR), rearranjos clonais de *Ig* e *TCR*.

ABSTRACT

Introduction: Current treatment strategies of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) result in a long-term remission rate of about 90%, however the chance of cure is less among patients who relapse. Stratification schemes using clinical and biological factors have been proposed to classify patients for the relapse risk, with the ultimate goal of offering high-risk patients an effective treatment. The detection of minimal residual disease (MRD) – leukemic residual cells in small proportions, verified during the treatment – currently represents the main prognostic factor of ALL in children and can suggest a change in the previously started chemotherapeutic treatment. The methods currently recommended to detect MRD are multiparameter flow cytometry (FC) and quantitative real time polymerase chain reaction (RQ-PCR) of the clonal rearrangements regions of T-cell receptor (TCR) and/or immunoglobulin (Ig) genes. Both methods show good performance in detecting leukemic residual cells, but they are expensive, require qualified staff and are frequently restricted to reference centers, especially the RQ-PCR. Thus, the aim of this study was to investigate whether FC and conventional PCR have good concordance in the detection of MRD at the end of the remission induction phase (D35) and at the end of the remission consolidation phase (D78) of childhood ALL treatment. We also evaluated associations between the DRM results and clinical data of ALL patients. **Methods:** Between September 2013 and December 2016, 42 children admitted to the Hospital das Clínicas/UFMG with recent ALL diagnosis (35 with B-ALL and 7 with T-ALL) were prospectively studied. The patients were treated according to the protocol of the Brazilian Group for the Treatment of Childhood Acute Leukemia (GBTLI LLA-2009). The bone marrow (BM) samples collected at diagnosis were evaluated by FC, for the immunophenotypic characterization of leukemic cells, and by PCR, for the detection of clonal rearrangements of *Ig* and *TCR* genes. The MRD was monitored by FC in the BM samples collected on days 15, 35 and 78 of the treatment and, by PCR, on days 35 and 78. **Results:** MRD measurements were performed in 107 samples by FC and in 63 samples by conventional PCR. Using 0.01% as a cutoff point, MRD was detected by FC in 87.8%, 17.1% and 28% of the samples taken at D15, D35 and D78, respectively. Otherwise, by PCR, MRD was detected in 13.2% and 12% of the samples analyzed at D35 and D78, respectively. MRD was evaluated by both assays in 61/68 (89.7%) samples collected at D35 and D78. The overall concordance between the two methods was 88.5%, being greater at D35 (91.9%; *Kappa*: 0.62) in comparison with the D78 analysis (83.3%; *Kappa*: 0.52). The discordant results were elucidated by the RQ-PCR. When prognostic factors were analyzed, the affected cellular lineage was significantly associated with PCR in

both time points (D35: $p = 0.037$; D78: $p = 0.032$), being greater the MRD detection frequency in T-ALL subjects. The clinical follow-up period varied from 6 to 46 months (median: 27 months). The overall survival rate (OS) at 3.8 years was 75.1% ($\pm 9.9\%$) and the event-free survival rate (EFS) was 50.5% ($\pm 21.4\%$). Higher OS and EFS were observed in B-ALL patients than in T-ALL patients ($p = 0,001$ and $p = 0,001$, respectively) and also in patients with white blood cell (WBC) less than 50.000 cells/ μL when compared to those with WBC greater than or equal to 50.000 cells/ μL ($p = 0.0001$ and $p = 0,00009$, respectively). **Conclusion:** MRD detection by FC and conventional PCR showed comparable results in childhood ALL, when samples were collected at medullar regeneration phases. Both methods are accessible to regions with restricted financial and technological resources and, when concurrently used, may be an effective tool to monitor the chemotherapeutic treatment of children with ALL. Further studies including additional time and a larger number of cases are needed to obtain a more consistent survival analysis.

Keywords: Childhood acute lymphoblastic leukemia, Minimal Residual Disease (MRD), flow cytometry, polymerase chain reaction (PCR), clonal rearrangements of Ig and TCR genes.

SUMÁRIO

| | Pag |
|--|-----|
| 1. Introdução e justificativa..... | 17 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 20 |
| 2. Revisão da literatura..... | 26 |
| 2.1 Artigo de revisão – Rocha JM, Xavier S, Souza ME, Assumpção J, Murao M, de Oliveira B.M. <i>Current strategies for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Mediterr J Hematol Infect Dis 2016;8(1):e2016024,DOI:http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2016.024.....</i> | 26 |
| 2.2 Avaliação da DRM por PCR convencional..... | 39 |
| 2.3 Atualização da literatura..... | 39 |
| 2.3.1 Avaliação da DRM por citometria de fluxo..... | 39 |
| 2.3.2 Avaliação da DRM pelo método de sequenciamento de próxima geração..... | 41 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 42 |
| 3. Objetivos..... | 45 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 45 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 45 |
| 4. Pacientes e métodos..... | 46 |
| 4.1 População..... | 46 |
| 4.2 Protocolo de tratamento..... | 46 |
| 4.3 Métodos..... | 48 |
| 4.3.1 Avaliação da DRM por citometria de fluxo..... | 48 |
| 4.3.2 Avaliação da DRM por PCR convencional..... | 52 |
| 4.3.3 Avaliação da DRM por PCR quantitativa em tempo real..... | 55 |
| 4.3.4 Análise estatística..... | 56 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 57 |
| 5. Resultados..... | 61 |
| 5.1 Análise da DRM por citometria de fluxo..... | 62 |
| 5.2 Avaliação da concordância entre as técnicas de CF e microscopia..... | 67 |
| 5.3 Análise da DRM por PCR..... | 69 |
| 5.4 Avaliação da concordância entre as técnicas de CF e PCR..... | 73 |

| | |
|--|-----|
| 5.5 Avaliação da associação entre os resultados de DRM e outros fatores prognósticos em LLA infantil..... | 75 |
| 5.6 Avaliação da influência da detecção de DRM e de outros fatores prognósticos nas probabilidades de sobrevida global e livre de eventos..... | 79 |
| 6. Discussão..... | 85 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 91 |
| 7. Conclusões..... | 96 |
| Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) /UFMG..... | 98 |
| Anexo 2 – Parecer da Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE)..... | 99 |
| Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido..... | 100 |
| Anexo 4 – Planejamento global GBTLI LLA-2009..... | 104 |
| Anexo 5 – Dados clínicos e laboratoriais da população de estudo..... | 108 |
| Anexo 6 – Declaração de aprovação da defesa de tese..... | 112 |

1. Introdução e justificativa

A leucemia linfóide aguda (LLA) apresenta maior incidência na infância, sendo que as estratégias atuais de tratamento resultam em remissão de longo prazo em até 90% das crianças acometidas. As demais evoluem com recidiva da doença, sendo menor a probabilidade de evolução para a cura nesse grupo de pacientes (Conter *et al.*, 2010; Hunger *et al.*, 2012; Inaba *et al.*, 2013).

O diagnóstico da LLA é baseado na identificação e quantificação de linfoblastos por microscopia em amostra de medula óssea (MO) e imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF), para definição da linhagem celular acometida e estágio de maturação celular, permitindo adequada classificação da doença. A abordagem propedêutica inclui ainda as análises citogenética e molecular de amostra de MO, para detecção de anormalidades cromossômicas e genéticas associadas, com implicações prognósticas e terapêuticas (Basso *et al.*, 2001; Béné *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2011; Inaba *et al.*, 2013).

Fatores clínicos e biológicos são associados ao prognóstico desfavorável em crianças com LLA – pacientes menores de 1 ano ou com idade igual ou superior a 9 anos; contagem de leucócitos à apresentação igual ou superior a 50.000 cel/ μ L; acometimento do sistema nervoso central (SNC) ao diagnóstico; imunofenótipo de células T; e anormalidades genéticas associadas, como hipodiploidia (< 44 cromossomos) e os genes de fusão *BCR-ABL1* e *MLL-AF4* (Campana *et al.*, 1999; Pui *et al.*, 2006; GBTLI, 2009; Bowman *et al.*, 2011; Inaba *et al.*, 2013; Teachey *et al.*, 2013; Ceppi *et al.*, 2015). Outras alterações genéticas têm sido consideradas na avaliação prognóstica da LLA, como as deleções do gene *IKZF1*, a superexpressão do gene *CRLF2*, a amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (*iAMP21*), o perfil LLA *Philadelphia-like*, dentre outros. Alguns destes marcadores têm sido avaliados ainda como possíveis alvos terapêuticos, possibilitando o desenvolvimento futuro de tratamentos mais específicos e eficazes (Ceppi *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, vários estudos avaliaram a presença de células leucêmicas residuais, em diferentes momentos após o início do tratamento, como fator preditor de evolução desfavorável. Inicialmente, a pesquisa destas células era feita por análise morfológica de amostra de MO, sendo considerado o ponto de corte de 5% de células blásticas para definição de remissão da doença (Campana *et al.*, 1995; Campana *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 2001; Dworzak *et al.*, 2003). Atualmente, são preconizados métodos de análise mais sensíveis, que permitam a detecção de células leucêmicas em proporções inferiores àquelas alcançadas pela avaliação morfológica, sendo a presença destas células denominada Doença Residual Mínima (DRM) (Campana *et al.*, 1995; Coustan-Smith *et al.*, 2000; Campana, 2008; Inaba *et al.*, 2013). O

encontro de DRM é hoje considerado o principal indicador prognóstico da LLA em crianças, mesmo em pacientes com características de baixo-risco de recidiva à apresentação, conforme demonstrado por vários estudos (Campana *et al.*, 1999; Coustan-Smith *et al.*, 2000, 2006; Borowitz *et al.*, 2008; Flohr *et al.*, 2008; Conter *et al.*, 2010; Schrappe *et al.*, 2011). A DRM refina a estratificação de risco determinada por características tradicionais, podendo orientar a redefinição do tratamento (Coustan-Smith *et al.*, 2000; Conter *et al.*, 2010; Stow *et al.*, 2010). A resposta precoce à quimioterapia, com rápida redução das células neoplásicas, especialmente no final da fase de indução, é considerada importante fator indicador de boa evolução e de baixo risco de recaída (Coustan-Smith *et al.*, 2000; Dworzak *et al.*, 2002; Borowitz *et al.*, 2008; Béné *et al.*, 2009; Scrideli *et al.*, 2009; van der Velden *et al.*, 2009; Conter *et al.*, 2010; Stow *et al.*, 2010; Bowman *et al.*, 2011).

As metodologias atualmente disponíveis para a avaliação da DRM permitem a detecção média de uma célula leucêmica entre 10.000 a 100.000 células normais (sensibilidade analítica de 10^{-4} a 10^{-5}), o que representa um aumento de sensibilidade superior a 100 vezes em relação à pesquisa por microscopia óptica convencional (Campana *et al.*, 1999; Dworzak *et al.*, 2003; Cazzaniga *et al.*, 2005; Coustan-Smith *et al.*, 2011). Os dois métodos mais frequentemente utilizados para a detecção de DRM são: 1 - Imunofenotipagem por citometria de fluxo, visando o encontro de células com imunofenótipos aberrantes específicos dos clones leucêmicos; 2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR) das regiões de rearranjo clonal dos genes dos receptores de células T (*TCR*) e/ou das imunoglobulinas (*Ig*), visando o encontro de sequências específicas dos clones leucêmicos (Malec *et al.*, 2004; Bruggemann *et al.*, 2010; Campana, 2010; Schrappe, 2012; Gaipa *et al.*, 2013; Inaba *et al.*, 2013).

A avaliação da DRM por citometria de fluxo alcança sensibilidade de 10^{-3} a 10^{-4} e apresenta como vantagens a rapidez de execução, o que permite fornecer resultados logo após o início do tratamento, a ampla aplicabilidade e a grande disponibilidade (Basso *et al.*, 2001; Dworzak *et al.*, 2002; Borowitz *et al.*, 2008; Campana, 2008; Irving *et al.*, 2009; Campana, 2012). Além disso, técnicas acuradas e sensíveis são passíveis de execução e economicamente viáveis, mesmo em regiões com recursos financeiros restritos (Delbuono *et al.*, 2008; Patkar *et al.*, 2012).

A detecção de rearranjos gênicos de *Ig* e *TCR* por PCR quantitativa em tempo real (RQ-PCR) é considerada o padrão-ouro para avaliação da DRM na LLA (Mejstriková *et al.*, 2010). Representa um avanço em relação aos métodos convencionais de PCR, pois não exige técnicas adicionais de detecção do produto amplificado, como separação eletroforética ou hibridização, e permite a quantificação precisa do produto de amplificação. Apresenta elevada

sensibilidade analítica (10^{-4} a 10^{-5}), alto nível de padronização do método e aplicabilidade à maioria dos pacientes com a doença (Malec *et al.*, 2004; Cazzaniga *et al.*, 2005; van der Velden *et al.*, 2007a; van der Velden *et al.*, 2007b; Flohr *et al.*, 2008; Bruggemann *et al.*, 2010; Campana, 2010; Stow *et al.*, 2010; Campana, 2012). Entretanto, trata-se de uma metodologia de custo elevado e alta complexidade, de execução limitada aos centros de referência.

Diversos autores propõem o uso complementar das duas metodologias, quando possível e economicamente viável, com o intuito de garantir o benefício da estratificação por DRM à maioria dos pacientes e prevenir resultados falso-negativos em função de evolução clonal ou alterações fenotípicas (Kerst *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2008; Coustan-Smith *et al.*, 2010; Gaipa *et al.*, 2012).

A análise de DRM, pelas técnicas de citometria de fluxo e/ou PCR, tem sido amplamente empregada em estudos de LLA na infância. As publicações apresentam resultados da avaliação da DRM utilizando técnicas com limites de sensibilidade analítica distintos, amostras de acompanhamento colhidas em diferentes momentos e grupos de pacientes submetidos a diferentes protocolos de tratamento (Coustan-Smith *et al.*, 2000, 2002, 2006; Dworzak *et al.*, 2002; Cazzaniga *et al.*, 2005; Borowitz *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2009; Scrideli *et al.*, 2009; van der Velden *et al.*, 2009; Conter *et al.*, 2010; Stow *et al.*, 2010; Thörn *et al.*, 2011; Campana, 2012). Por outro lado, são unânimes em afirmar o valor do encontro de células leucêmicas residuais em pequenas proporções na avaliação do risco de recaída da doença e na redefinição do esquema quimioterápico (Borowitz *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2009; Ratei *et al.*, 2009; Scrideli *et al.*, 2009; Conter *et al.*, 2010; Stow *et al.*, 2010).

Tendo em vista a importância da avaliação da DRM, este estudo objetivou comparar as análises por citometria de fluxo e PCR convencional ao final das fases de indução (D35) e consolidação da remissão (D78 ou período correspondente), e correlacionar os dados obtidos com as principais características clínicas dos pacientes com LLA, tratados de acordo com o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Agudas da Infância (GBTLI LLA-2009), no Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG). A proposta inicial do estudo incluía a RQ-PCR como método comparativo da CF, entretanto sua execução não foi possível, devido à restrição de recursos financeiros. Sendo assim, a equipe envolvida no estudo, em conformidade com sugestões apresentadas no exame de qualificação, decidiu pela análise comparativa dos resultados de DRM obtidos pelas técnicas de CF e PCR convencional, esta última que apresenta limite de sensibilidade analítica de 10^{-2} a 10^{-3} e fornece apenas resultados qualitativos.

O protocolo GBTLI LLA-2009 preconiza a avaliação de DRM por CF apenas no D15, sendo que a detecção de células imaturas nesta fase, utilizando painel restrito de anticorpos,

denota a presença de células leucêmicas residuais de forma precisa (Dworzak *et al.*, 2002; Coustan-Smith *et al.*, 2006; Luria *et al.*, 2010; Campana, 2012). Entretanto, a avaliação de DRM nos dias 35 e 78 do tratamento, por CF, requer a utilização de painel amplo de anticorpos, que permita a diferenciação acurada entre células leucêmicas residuais e células progenitoras normais, presentes na medula óssea em recuperação após quimioterapia (Coustan-Smith *et al.*, 2010). Assim, a validação de técnica de CF mais complexa é essencial para a detecção de DRM nestes dois pontos, podendo permitir o seu uso como método alternativo ou complementar ao método molecular, na monitorização dos pacientes em tratamento para LLA.

Por fim, cabe salientar que, apesar da extensa literatura já disponível, torna-se necessário gerar e avaliar dados sobre DRM como fator prognóstico na LLA, separadamente para cada regime terapêutico, considerando as diferenças na intensidade dos protocolos de tratamento, momentos propícios para avaliação e diferenças metodológicas dos ensaios de detecção utilizados (Dworzak *et al.*, 2002; Cazzaniga *et al.*, 2005; Thörn *et al.*, 2011; Campana, 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basso G, Buldini B, De Zen L, *et al.* New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001;86(7):675-692.

Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, *et al.* Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5168-5174.

Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukemiaNet. *Haematologica* 2009;94(8):1135-1150.

Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25:567-574.

Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, *et al.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477-5485.

Bowman WP, Larsen EL, Devidas M, *et al.* Augmented therapy improves outcome for pediatric high risk acute lymphocytic leukemia: results of Children's Oncology Group Trial P9906. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:569-577.

Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, *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;24:521-535.

Campana D. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignances. *British Journal of Haematology* 2008;143:481-489.

Campana D. Progress of Minimal Residual Disease Studies in Childhood Acute Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2010;5:169-176.

Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol* 2012;19:313-318.

Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999;38:139-152.

Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995;85(6):1416-1434.

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):382-390.

Ceppi F, Cazzaniga G, Colombini A, *et al.* Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: prediction and prevention. *Expert Rev Hematol* 2015;8(1):57-70.

Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, *et al.* 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(16):3206-3214.

Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23:347-358.

Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, *et al.* A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006;108(1):97-102.

Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, *et al.* Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(1):52-58.

Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, *et al.* Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691-2696.

Coustan-Smith E, Song G, Clark C, *et al.* New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011;117(23):6267-6276.

Delbuono E, Maekawa YH, Latorre MRDO, *et al.* Simplified flow cytometric assay to detect minimal residual disease in childhood with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008;30(4):281-286.

Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, *et al.* Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952-1958.

Dworzak MN, Panzer-Grümayer ER. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2003;44(9):1445-1455.

Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, *et al.* Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22:771-782.

Gaipa G, Basso G, Biondi A, *et al.* Detection of minimal residual disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry Part B* 2013;84B:359-369.

Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, *et al.* Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012;97(10):1586-1593.

GBTLI (Grupo Brasileiro para o Tratamento das Leucemias da Infância). Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda da criança e do adolescente. *SocBrasOncolPediatr* 2009 [versão revisada – 2011].

Hunger SP, Lu X, Devidas M, *et al.* Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30(14):1663-1669.

Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2013;381(9881):1943-1955.

Irving J, Jesson J, Virgo P, *et al.* Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009;94(6):870-874.

Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, *et al.* Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry and real-time PCR. *British Journal of Haematology* 2005;128:774-782.

Luria D, Rosenthal E, Steinberg D, *et al.* Prospective comparison of two flow cytometry methodologies for monitoring minimal residual disease in a multicenter treatment protocol of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B* 2010;78B:365-371.

Malec M, van der Velden VHJ, Björklund E, *et al.* Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TCR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia* 2004;18:1630-1636.

Mejstriková E, Fronková E, Kalina T, *et al.* Detection of residual B precursor lymphoblastic leukemia by uniform gating flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:62-70.

Patkar N, Alex AA, Bargavi B, *et al.* Standardizing minimal residual disease by flow cytometry for precursor B lineage acute lymphoblastic leukemia in a developing country. *Cytometry Part B* 2012;82B:252-258.

Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:44-54.

Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354(2):166-178.

Ratei R, Basso G, Dworzak M, *et al.* Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2009;23:528-534.

Ryan J, Quinn F, Meunier A, *et al.* Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia patients at multiple time points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *British Journal of Haematology* 2008;144:107-115.

Schrapppe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing and clinical relevance for an individual patient. *Hematology, Am Soc Hematol Educ Program* 2012;1:137-142.

Schrapppe M, Valsecchi MG, Bartram CR, *et al.* Late MRD response determine relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 2011;118(8):2077-2084.

Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza MA, *et al.* A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica* 2009;94(6):781-789.

Stow P, Key L, Chen X, *et al.* Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115(23):4657-4663.

Teachey DT, Hunger SP. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2013;162:606-620.

Thörn I, Forestier E, Botling J, *et al.* Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolor flow cytometry. *British Journal of Haematology* 2011;152:743-753.

van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, *et al.* Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007a;21:604-611.

van der Velden VHJ, Corral L, Valsecchi MG, *et al.* Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 2009;23:1073-1079.

van der Velden VHJ, Panzer-Grümayer ER, Cazzaniga G, *et al.* Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007b;21:706-713.

2. Revisão da literatura

2.1 Artigo de revisão

Estratégias atuais para a detecção de doença residual mínima na leucemia linfoblástica aguda infantil.

Rocha JM, Xavier S, Souza ME, Assumpção J, Murao M, de Oliveira BM. Current strategies for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Mediterr J Hematol Infect Dis 2016;8(1):e2016024, DOI:<http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2016.024>



Review Articles

Current Strategies for the Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

Juliana Maria Camargos Rocha, Sandra Guerra Xavier, Marcelo Eduardo de Lima Souza, Juliana Godoy Assumpção, Mítiko Murao and Benigna Maria de Oliveira

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children. Current treatment strategies for childhood ALL result in long-term remission for approximately 90% of patients. However, the therapeutic response is worse among those who relapse. Several risk stratification approaches based on clinical and biological aspects have been proposed to intensify treatment in patients with high risk of relapse and reduce toxicity on those with a greater probability of cure.

The detection of residual leukemic cells (minimal residual disease, MRD) is the most important prognostic factor to identify high-risk patients, allowing redefinition of chemotherapy. In the last decades, several standardized research protocols evaluated MRD using immunophenotyping by flow cytometry and/or real-time quantitative polymerase chain reaction at different time points during treatment. Both methods are highly sensitive (10^{-3} a 10^{-5}), but expensive, complex, and, because of that, require qualified staff and frequently are restricted to reference centers.

The aim of this article was to review technical aspects of immunophenotyping by flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction to evaluate MRD in ALL.

Citation: Rocha J.M., Xavier S., Souza M.E., Assumpção J., Murao M., de Oliveira B.M. Current strategies for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016, 8(1): e2016024, DOI: <http://dx.doi.org/10.4084/MJHD.2016.024>

Published: April 10, 2016

Received: January 19, 2016

Accepted: March 25, 2016

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Correspondence to: Juliana Maria Camargos Rocha. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: camargos.juliana@gmail.com

Introduction. The incidence of acute lymphoblastic leukemia (ALL) is higher in childhood and adolescence, and current treatment strategies result in long-term remission in up to 90% of children affected. However, therapeutic responses are worse in relapsed patients, indicating the value of identifying cases at high risk of relapse in order to intensify treatment and increase the survival.^{1,2,3}

Diagnosis of ALL is based on the identification and quantification of lymphoblasts by the microscopic evaluation of a bone marrow (BM) sample and immunophenotypic assessment by flow cytometry, used to define the affected cell lineage and cell maturation stage and accurately classify the disease. A diagnostic approach also includes cytogenetic and

molecular analyzes of a BM sample to detect chromosomal and genetic abnormalities that have prognostic and therapeutic implications.^{3,4,6}

There are clinical and biological factors associated with poor prognosis in children with ALL.^{3,7-10} In the last few decades, several studies have evaluated the presence of residual leukemic cells at different times after the start of the treatment as a predictive factor for the adverse evolution of the disease. Initially, those cells were detected by morphological analysis of a BM sample, with a cutoff of 5% blast cells defining disease remission.^{4,7,11,12} Currently, analytical methods with better sensitivity are recommended that allow the detection of leukemic cells in lower proportions than those achieved by morphological evaluation, termed

minimal residual disease (MRD).^{3,11,13,14} The occurrence of MRD is now considered the main prognostic indicator of ALL in children, even in patients with features that suggest a low risk of relapse, as demonstrated by many studies.^{1,7,13,15-18} MRD refines the risk stratification based on traditional features and may be used to redirect treatment.^{1,13,19} An early response to chemotherapy, with rapid reduction of neoplastic cells, especially at the end of the induction phase, is considered an important indicator of a favorable evolution and low risk of relapse.^{1,9,13,16,19-23}

Treatment protocols for childhood ALL recommend MRD monitoring at multiple time points to evaluate the effectiveness of the various stages of chemotherapy in the elimination of leukemic cells. The evaluations carried out in the first 3 months of treatment are considered the most informative for relapse risk stratification. The absence of MRD at the end of induction therapy is considered the main favorable outcome predictor^{1,16,19,22} and, an even earlier MRD evaluation – within 2 to 3 weeks of the initiation of remission induction chemotherapy, has shown additional benefit in risk stratification.^{15,24,25}

In a study by Conter et al. (2010), 3184 patients with B-ALL, participants of AIEOP - BFM ALL 2000 multicenter study, were stratified by MRD measured on days 33 and 78 of treatment, using RQ-PCR. Patients defined as standard risk (42%) showed a 5-year event-free survival (EFS) estimated at 92.3 %, while intermediate (52%) and high-risk patients (6%) showed a 5-year EFS of 77.6 % and 50.1 %, respectively.¹ Basso et al. (2009) published MRD analysis results by flow cytometry on day 15 (D15) of treatment of 830 patients who underwent the same therapeutic protocol and have identified three risk groups - standard (42%), intermediate (47%) and high (11%), which showed increasing relapse incidences in five years - 7.5%, 17.5% and 47.2%. In multivariate analysis, they concluded that the assessment of MRD on D15 of treatment was the main predictor of early relapse and might complement MRD stratification in later time points.²⁴ Due to the slow clearance of leukemic cells in T-ALL, Schrappe et al. (2011), when evaluating MRD by RQ-PCR in 464 children with T-lineage ALL, concluded that MRD positivity in D78 is the most important relapse risk predictor in this group of patients.¹⁸ Researchers of the Children's Oncology Group (COG), analyzing data from 2143 children with B-ALL, concluded not only that MRD quantified on D29 of treatment is the most important prognostic factor for patient outcome, considering all risk groups, but also, that MRD measured in peripheral blood on D8 by flow cytometry provides additional information.¹⁶ Data from a study involving 99 children under 1 year indicated that the assessment of MRD (RQ-PCR for the detection of Ig/TCR genes and MLL rearrangements) allows risk stratification also in this

subgroup of patients with clinical and prognostic features distinct, and can be used to redefine treatment.²³

The accurate risk stratification using MRD evaluation requires methodologies that achieve high analytical sensitivity (10^{-4} - 10^{-5}), enabling the detection of small proportions of residual leukemic cells. Less sensitive techniques (10^{-2} - 10^{-3}) allow MRD detection at clinically significant levels, associated with high risk of relapse, but do not detect patients with lower levels of MRD, which also have a high risk compared to MRD-negative patients.^{26,27}

Due to the proven association between detectable MRD and higher relapse risk, various protocols indicate the need to intensify treatment for children with detectable MRD and to reduce the intensity of chemotherapy in those who have a rapid response to treatment, with the objective of reducing toxicity.^{1,8,14,15,24,28,29}

Additionally, assessing MRD offers prognostic information in patients with ALL relapse who have entered a second remission, and allows prediction of disease evolution in patients after hematopoietic stem cell transplant (HSCT).^{14,28,30} A review on this subject, published by Campana et al. (2013), after analyzing the results of several studies evaluating the MRD prognostic role in the pre- and post-HSCT periods, concluded that the risk of disease recurrence after transplantation is significantly higher among patients with detectable MRD prior to the procedure, as well as MRD detection in the post-HSCT points to an unfavorable outcome, associated with higher relapse rates.³¹ MRD detection in the pre-HSCT can also help defining strategies to improve patient outcomes, such as: establishment of the appropriate time for the procedure, choice of chemotherapy regimen, and/or use of new drug treatments that show high effectiveness in the clearance of the residual tumor cells in patients resistant to conventional chemotherapy.³¹ As an example, it should be noted the use of Blinatumomab, which represents a new class of anti-CD19 antibody-drug, that redirects T lymphocytes for selective lysis of tumor cells. A study evaluating the utilization of this drug in patients with chemotherapy-refractory ALL and an HSCT indication demonstrated its ability to eradicate resistant tumor cells in pre-transplant, and its association with higher survival rates and lower incidence of post-transplant recurrence of the disease.³²

The prognostic value of MRD monitoring was also demonstrated in the therapeutic approach of ALL in adults, helping in the recognition of high-risk patients who have an indication for HSCT. On the other hand, those classified as true low risk, with undetectable MRD during chemotherapy induction/consolidation, may be spared from HSCT and its associated risks.^{33,34}

Detection Methods of MRD. The methodologies, currently available for assessing MRD, allow an average detection of one leukemic cell among 10^4 to 10^5 normal cells, which represents a 100-fold increase in sensitivity compared to conventional optical microscopy.^{7,12,35,36} Available methods include: 1) immunophenotyping of neoplastic cells by flow cytometry, which is aimed at finding cells with aberrant immunophenotypes of leukemic clones; 2) polymerase chain reaction (PCR) of the clonal rearrangement regions of T-cell receptor (TCR) and/or immunoglobulin (Ig) genes; and 3) detection of chimeric transcripts (mRNA) resulting from chromosomal translocations by reverse transcription PCR (RT-PCR).^{3,37-41}

Chimeric transcripts arising from chromosomal translocations represent specific markers of leukemic clones, although only a small proportion of patients present such alterations, limiting the value of this approach.^{4,14,35,38} As an example, BCR-ABL fusion transcripts can be highlighted. These transcripts are present in approximately 5% of ALL in children and are considered highly relevant, due to the association of this finding with more aggressive disease, that may result in early relapse after a period of remission.^{11,38}

In this review, the two most frequently used MRD detection methods will be covered in more detail: immunophenotyping by flow cytometry and analysis of clonal rearrangements of TCR and Ig by quantitative real-time PCR (RQ-PCR).^{19,35,41,42} Table 1 summarizes the main characteristics of the two methodologies, which will be addressed in the text.

The search for scientific articles was conducted in PubMed and SciELO databases, using the following keywords: minimal residual disease, acute lymphoblastic leukemia, flow cytometry, PCR, and gene rearrangements of Ig/TCR. Original and review articles published between 2005 and 2015 were

initially selected and, later, relevant references cited in these items were added.

MRD Evaluation by Flow Cytometry. The use of flow cytometry as an MRD analysis methodology emerged in the late 1980s,^{43,44} and its use has been increasing since then, because of further technological and methodological advances.

Immunophenotypic characterization of leukemic cells at diagnosis provides relevant information for treatment monitoring by enabling the detection of residual leukemic cells while allowing classification of the disease according to the affected cell lineage and cell maturation stage.⁵ For this purpose, it is necessary to build informative panels of monoclonal antibodies that allow an evaluation of aberrant patterns of antigen expression, including coexpression of antigens normally expressed by cells in a different maturation stage (asynchronous antigen expression); cross or aberrant expression of antigens from other cell lineages (myeloid, B-lymphoid, or T-lymphoid); and/or changes in the usual intensity of antigen expression, including overexpression, low expression, or even loss of expression.^{4,5,21,45,46} It is noteworthy that the anomalous antigen expression of blast cells reflects a genetic abnormality in the leukemic clone.⁴

MRD evaluation by flow cytometry achieves a sensitivity of 10^{-3} to 10^{-4} , which is lower than the sensitivity achieved by RQ-PCR. It has the advantages of rapid turnaround time of results, which is especially important at the beginning of treatment; and broad applicability, since most ALL present identifiable leukemia-associated immunophenotypes (LAIP) at diagnosis.^{4,14,16,20,33,42,47} The main limitation of the method is associated with the phenotypic similarities between leukemic lymphoblasts and nonmalignant B-lymphocyte precursors, at the stages of bone marrow regeneration during and after chemotherapy, when

Table 1. Characteristics of the two most frequently used MRD detection methods*

| | Detection of aberrant immunophenotypes by Flow Cytometry | Analysis of clonal rearrangements of Ig and TCR genes by RQ-PCR |
|------------------------|---|--|
| Analytical sensitivity | 10^{-3} - 10^{-4} | 10^{-4} - 10^{-5} |
| Applicability | > 90% of patients | > 90% of patients |
| Advantages | <ul style="list-style-type: none"> - Rapid turnaround time of results - Allows early MRD analyses - Ability to distinguish between viable and apoptotic cells - Relatively less expensive | <ul style="list-style-type: none"> - Standardized methods - High sensitivity |
| Disadvantages | <ul style="list-style-type: none"> - False positive results due to phenotypic similarities between leukemic lymphoblasts and regenerating B-lymphocyte precursors - False negative results due to phenotypic changes in residual leukemic cells throughout treatment - Limited standardization | <ul style="list-style-type: none"> - High cost - Technical complexity - Difficulty in providing fast results - Difficulty to rapidly design clone-specific primers for early MRD analyses - False negative results due to oligoclonality or clonal evolution - Inability to distinguish between viable and apoptotic cells |

Ig, immunoglobulin; TCR, T-cell receptor; RQ-PCR, real time quantitative polymerase chain reaction; MRD, minimal residual disease.

*Based on van Dongen et al.,²⁶ Scrideli et al.,²⁷ Campana et al.,³¹ Schrappe.⁴⁰

false-positive results are more common. It is worth highlighting the possibility of phenotypic changes in residual leukemic cells throughout treatment, compared to the antigen expression pattern at diagnosis.^{7,13,33,38,48} The use of new cell markers and antibody panels with combinations of four or more fluorochromes is associated with improvement in sensitivity and specificity of the method.^{16,36,38,39,42} Moreover, accurate and sensitive techniques are technically and economically feasible in places with limited financial resources.^{49,50}

MRD can be detected by flow cytometry in the early stages of remission induction chemotherapy, about two weeks after the beginning of the treatment, using a restricted panel of antibodies, since the detection of immature cells at this stage indicates the presence of residual leukemic cells.^{15,20,42,51}

However, distinguishing between residual leukemic cells and nonmalignant B-lymphocyte precursors in samples collected in phases of chemotherapy associated with bone marrow recovery (the end of the induction phase of remission and the consolidation phase of treatment) is a challenge with this method. Prior knowledge of the standard antigen expression of lymphoid precursors in different stages of maturation and meticulous immunophenotyping of the leukemic clone at diagnosis is essential.^{21,41,52,53} Thus, MRD evaluation by flow cytometry at the time mentioned above points requires the use of a large antibody panel that will allow for an adequate characterization of the leukemic clone.²⁸

Although there is no consensus on the panel that should be used for this purpose, different authors recommend working with strategic combinations of monoclonal antibodies conjugated with four or more distinct fluorochromes, using a relatively fixed backbone in different tubes. This strategy involves selecting three or more monoclonal antibodies that are consistently present in all of the combinations used and that define lymphoid precursor cells. One or more

additional antibodies are added to each tube, in order to detect aberrant antigen expression of the leukemic clone.^{4,13,21,24,25,29,36,47,48,50,54-56}

The core set of antibodies used to compound the backbone in the different combinations useful for MRD detection in B-lineage ALL (B-ALL) usually include CD45, CD34, CD19, and CD10 - antigen initially named CALLA (common ALL antigen), expressed with high frequency in childhood B-ALL.^{5,13,24,29,36,41,50,54,56} The additional antibodies should be chosen based on the immunophenotype of each case at diagnosis. Several studies have reported the applicability of different markers, among which are the following: CD123,^{12,50,57} CD58,^{12,46,50,58-60} CD38,^{50,61} CD66c,^{46,62,63} CD304,^{36,64} CD49f,⁶⁵ CD81,⁶⁶ and CD11b,⁶⁷ as well as aberrant T-lymphoid or myeloid cell markers such as CD2, CD7, CD13, CD15, and CD33.¹³ Table 2 describes the antigen expression of the above-described markers that may be observed in leukemic cells and highlights the markers to be included in the backbone of the different combinations of monoclonal antibodies in an MRD detection panel in B-ALL, following the mentioned strategy.

Modulated antigen expression in the early stages of chemotherapy has been reported, including transient changes in the intensity of expression of CD10 and CD34 markers.^{48,68} To account for this issue, Irving et al. recommend avoiding the use of predefined gates and considering, at least, two aberrant immunophenotypes per patient.⁴⁷

To precisely differentiate between nonmalignant B-lymphoid precursors, called hematogones, and residual leukemic precursor cells, it is important to consider the immunophenotype of normal B-cell precursors in their three different stages of maturation: early, intermediate, and late. Early B-cell precursors express the CD34 and TdT immaturity markers in combination with CD19, CD38, CD10 (bright), CD22 (weak), and CD45 (intermediate). With maturation, these cells lose their expression of CD34 and show a progressive

Table 2. Examples of markers used in MRD detection by flow cytometry in B-ALL, with a description of the antigen expression expected pattern and/or possible anomalous antigen expression of blast cells, in relation to the usual antigen expression of normal B-cell precursors.

| Marker | Antigen expression noted in blast cells |
|---------|---|
| CD45* | Reduced expression or eventually absent |
| CD34* | Frequently present (immaturity cell marker) |
| CD10* | Frequently present and overexpressed in childhood B-ALL |
| CD19* | Maintained expression (cell lineage marker) |
| CD11b | Aberrant expression |
| CD38 | Reduced expression |
| CD49f | Increased expression (overexpression) |
| CD58 | Increased expression (overexpression) |
| CD66c** | Aberrant expression |
| CD81 | Reduced expression |
| CD123 | Increased expression (overexpression) |
| CD304 | Aberrant expression |

MRD, Minimal Residual Disease; B-ALL, B-acute lymphoblastic leukemia.

* Backbone markers to be included in different combinations of monoclonal antibodies in an MRD detection panel in B-ALL.

**The most frequently aberrant myeloid antigen observed.

reduction in their expression of CD10, whereas they gain CD20, CD22, and CD45 expression. Surface immunoglobulin acquisition coincides with the gain of CD20 expression. Mature B-lymphocytes show bright expression of CD22 and CD45, reduced or no expression of CD38, and no expression of CD10. On the other hand, leukemic lymphoblasts are characterized by the overexpression of CD10 and reduced or no expression of CD45, in addition to the asynchronous expression of early and late antigens, and aberrant expression of other markers.^{6,12,52,53,69}

The immunophenotype of malignant T-lymphoblasts for the most differs significantly from that of normal marrow and blood T-cells, allowing easier detection of MRD. The identification of immature T-cells in the peripheral blood (PB) or BM of T-cell ALL (T-ALL) patients indicates MRD, as only cells confined to the thymus (thymocytes) should show these characteristics.^{34,65} Table 3 presents commonly used markers in the MRD analysis of T-ALL samples, including CD3cy (cytoplasm), CD3s (surface), CD7, CD34, TdT, and CD99, with a description of the antigen expression changes that are observed.^{5,7,12,24,28,46,55,70} The panel could also include other markers of T-lineage cells, such as CD1a, CD2, CD4, CD5, and CD8, and/or aberrant B-lymphoid and myeloid markers, such as CD19, CD13, and CD33, depending on the phenotype determined at diagnosis.^{28,49,70}

In order to allow appropriate determination of residual leukemic clones, the characterization of a cluster of at least 10 events within a given sample is recommended. Thus, to achieve a sensitivity of 1×10^{-4} , corresponding to the detection limit of 0.01%, analysis of a minimum of 10^5 leukocytes is necessary.^{4,7,21,25,29,51,56} The proportion of blast cells should be determined among the total viable nucleated cells, marked with the nuclear dye SYTO, thus eliminating the inclusion of anucleated events like erythrocytes, platelets, and debris.^{25,48,51,56,68}

The evaluation of MRD should preferably be performed with BM samples. MRD levels show a good

correlation in PB and BM in T-ALL; however, the correlation is weak in B-ALL, with lower levels of MRD in PB.^{49,71}

The preparation of PB or BM samples for analysis might include mononuclear cells isolation by centrifugation gradient using Ficoll-Hypaque solution.^{15,36,45,51,62} However, the processing of whole blood samples or whole BM has been the procedure of choice in several studies as it presents the following advantages: it prevents the selection or arbitrary loss of specific cell populations; it enables the reliable enumeration of cell populations present in the sample; it minimizes the chances of modification of antigen expression; and it reduces the processing time of the samples.^{4,20,37} A study by Luria et al.,⁵¹ comparing these two ways of sample processing, revealed high correlation coefficients in samples collected on days 15 (0.875) and 33 (0.82) of treatment. Gaipa et al.⁴¹ obtained a similar result in an analysis of 266 samples collected on days 15, 33, and 78 of treatment, with 91% concordant results between the mononuclear cell and total nucleated cell preparations, using a cutoff value of 0.01%. Higher sensitivity was observed in the analysis of mononuclear cells, which was attributed to the greater number of cells acquired.²⁹ Irving et al. found a concordance rate of 86% between molecular methods and flow cytometry in MRD detection in BM samples processed in different ways, including mononuclear cell preparations for molecular methods and red blood cells lysis in whole BM samples for immunophenotyping by flow cytometry.⁴⁷

A study conducted by Dworzak et al., which was aimed for interlaboratory standardization of flow cytometry assays for MRD detection at multiple time points in treatment, showed a high concordance of results obtained in an analysis of 202 samples from four participating centers, with concordant results in 76% (four centers) and 96% (three centers) of the samples.⁵⁶ In order to understand the discordant results, technical difficulties inherent to the analysis of samples with normal lymphoid regeneration, low MRD levels (levels close to the detection limit) and technical flaws (contamination of tubes and compensation failures, for example) were considered. Additionally, Luria et al., in a comparative analysis of the results of two different laboratories, highlighted the importance of the standardization of data analysis procedures, revealing that half of the discrepancies between results could be explained by variations in data interpretation.⁵¹

Analysis of Clonal Rearrangements of the Ig and TCR Genes by RQ-PCR. Antigen receptor genes (Ig and TCR) include various discontinuous segments (regions V, variable; D, diversity; and J, junction), which undergo variable rearrangements during early stages of B and T-lymphoid cell differentiation. Ig and TCR diversity is generated by a random joining of a

Table 3. Commonly used markers in the MRD analysis by flow cytometry in T-ALL, with a description of the aberrant antigen expression possibly noted.

| Marker | Antigen expression noted in blast cells |
|---------------|--|
| CD3 cytoplasm | Maintained expression (cell lineage marker) |
| CD3 surface | Reduced expression or absence |
| CD7 | Maintained expression (cell lineage marker) |
| CD34 | Frequently present (immaturity cell marker) |
| TdT | Nuclear expression frequently present |
| CD99 | Overexpression in thymic immature T-cells and T-lymphoblasts; weak expression or absence in circulating T-lymphocyte |

TdT, terminal deoxyribonucleotidyl transferase

V(D)J exon. During this process, the deletion and/or random insertion of nucleotides at segment's junctions can also occur by forming the so-called N regions. Thus, the regions resulting from Ig and TCR gene rearrangements represent sequences that are unique to each lymphocyte.^{11,21,35,72-74} In leukemia, Ig and TCR rearrangements can occur in either B or T-cells. Therefore, rearrangements of the immunoglobulin heavy chain gene (IgH), light chain kappa (IgK), TCR delta (TCRD), TCR gamma (TCRG), TCR beta (TCRB) and light chain lambda (IgL) may be detected at different frequencies in ALL of B and T-cell lineages.^{11,17,19,35,37,41,62,68,72-79}

An analysis of clonal rearrangements of Ig and TCR genes by PCR, at diagnosis, aims at finding specific sequences of leukemic clones, usually present in ALL of T and precursor B-cells, which can be used as a target in MRD evaluation.^{11,72} The sensitivity of PCR assays can vary, depending on the identified gene rearrangement regions, on the use of specific primers for individual V, D, and J regions or consensus primers for conserved regions, on the total amount of DNA analyzed, on the background identified in normal lymphoid cells, and on the methodological approach used.^{11,72,80}

Conventional PCR methods, developed in the 1990s, require post-PCR detection techniques (electrophoresis or dot blotting and hybridization) to identify the final products of the amplification reaction.^{38,72} As an example, the amplified clonal rearrangements using consensus primers can be identified based on the size and signal intensity after electrophoretic separation and subsequent heteroduplex analysis, to distinguish PCR products derived from monoclonal and polyclonal lymphoid cells. In follow-up samples, the electrophoretic profiles obtained are compared with those found at diagnosis. This conventional technique shows a maximum sensitivity of 0.1%. However, from a methodological point of view, it is considered relatively simple, fast and low-cost. Although it does not identify residual leukemic cells in proportions lower than 10^{-3} , it allows the identification of patients with greater residual tumor burdens and those at high risk of relapse, and can be considered a cost-effective methodology for MRD monitoring in countries with limited financial resources.^{27,79} A qualitative MRD result (presence or absence) provides limited information and does not allow for an evaluation of tumor kinetics, making it impossible to correlate the final amount of PCR product and the initial amount of target molecules.¹¹

The RQ-PCR technique represents a significant advance, as it allows the accurate quantification of a PCR product during the early exponential phase of the amplification reaction, eliminating the variability of the late exponential phase and the need for post-PCR manipulation.^{35,38,72} RQ-PCR methods require the

design of primers specific for each patient and, therefore, the additional step of sequencing the clonal rearrangement identified at diagnosis, and detection of the signal in follow-up samples is considered specific for the malignant clone.¹¹ The detection of Ig and TCR gene rearrangements by RQ-PCR is currently considered the gold standard for MRD assessment in ALL.⁴⁶ It has the advantages of high analytical sensitivity (10^{-4} to 10^{-5}), use of standardized methods, and applicability to most patients with the disease.^{17,19,35,37,38,39,42,76,80} Disadvantages include the high cost; the difficulty in providing fast results, due to the time required to design clone-specific primers; and the possibility of false-negative results due to oligoclonality or new gene rearrangements during disease.^{14,17,35,38} It is noteworthy that the use of this technique may be restricted to specialized laboratories, due to the complexity of the analyses.^{33,35,76}

In the context of the analysis of Ig and TCR gene rearrangements by PCR methods, it is important to highlight the relevance of the BIOMED-2 Concerted Action – a European collaborative study, conducted by van Dongen et al., that has developed and standardized PCR primer sets for the detection of the gene rearrangements. Since the completion of the study, all primers and multiplex tubes are available on a commercial basis.⁷³

In addition to Ig and TCR gene rearrangements, genomic breakpoints that are secondary to specific translocations, such as rearrangements of the MLL gene or SIL-TAL fusion genes, represent alternative DNA targets, although they are less frequently seen.^{17,23,38,75}

Summary of the Technical Recommendations for RQ-PCR. Although BM samples are recommended for the analysis of Ig and TCR clonal rearrangements by RQ-PCR, PB yields comparable results in T-ALL.^{38,81} The tests should be performed on mononuclear cells separated by centrifugation gradient, using Ficoll-Hypaque solution, which increases the sensitivity and reproducibility of the method.^{38,75}

For RQ-PCR analyses, standard procedures are described in the literature,^{17,33,35,37,38,68,72,73,75,76,80} and recommendations for each step are as follows: 1) DNA amplification by conventional PCR using consensus primers for the search of Ig and/or TCR gene rearrangements; 2) Detection of the PCR product by polyacrylamide gel electrophoresis; 3) Heteroduplex analysis (or gene scanning) for the differentiation of PCR products derived from monoclonal and polyclonal lymphoid cells,⁸² followed by excision and elution of the band from the polyacrylamide gel if a homoduplex within the expected size range is confirmed; 4) Sequencing of the junction regions of the rearrangements; 5) Comparison to known sequences obtained from available electronic databases for the

identification of the V, D, J segments involved, and the identification of the N region; 6) Design of clone-specific primers for the junctional regions; 7) Execution of RQ-PCR using specific primers for each patient and standard curves generated from serial dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) of the sample collected at the initial diagnosis in a DNA pool of mononuclear cells obtained from 5 to 10 healthy donors, tested in replicates; 8) Detection of the reaction products by nonspecific systems (dyes, e.g., SYBR Green I) or specific systems (hydrolysis probes or hybridization probes conjugated to fluorochromes); 9) Analysis of the fluorescent signal obtained, based on the fluorescence intensity of the background, often determined during the first three to 15 PCR cycles – parameter used to calculate the cycle threshold (C_T) of each sample (the PCR cycle at which the fluorescence exceeds the cutoff for the first time); and 10) Correction for the amount and quality of DNA by the amplification of control genes in parallel with the test sample.

Highly sensitive RQ-PCR assays require accurate identification of the sequences of the junctional regions of Ig and TCR clonal rearrangements in each case, which allows the design of specific oligonucleotides.³⁸ The specificity of the reaction is assessed by parallel amplification of a DNA pool control sample obtained from healthy donors. The sensitivity is defined based on dilution assays that can be performed with the diagnostic sample or reference materials. The limit of detection is determined by the last dilution able to generate a positive signal in the absence of a signal of the polyclonal DNA control sample, and that can detect each junctional region identified as a target within the reproducibility range or quantitative range of the test.^{38,72,75,80} In an evaluation of the reproducibility, the variation in the C_T values of the replicates should be less than 1.5 if the average C_T value of the replicates is less than 36. It may be higher if the average C_T value of the replicates is greater. In the case of nonspecific amplification, the difference in C_T values between specific and nonspecific amplifications must be at least one cycle, although preferably greater than or equal to three, to minimize false positive results.^{72,75,80} The standard curve, obtained from at least three dilutions, must present an acceptable slope (between -3.1 and -3.9) and correlation coefficient (>0.98), according to van der Velden et al.⁸⁰ The quantitative range and the analytical sensitivity of the test must be determined for the RQ-PCR reaction of the diagnostic sample to establish the parameters for follow-up samples from the same patient. If follow-up samples present MRD results out of the quantitative range of the test, the data should be considered non-reproducible and, therefore, unable to generate accurate quantitative results.⁸⁰ To interpret the results adequately, the laboratory report

should specify the quantitative range and the analytical sensitivity of the test.⁸⁰

False positive results from PCR reactions may be due to the presence of contaminating DNA or non-specific hybridization to amplified DNA from normal lymphocytes. False negative results may depend on oligoclonality or clonal evolution during the disease, leading to the loss of targets identified at diagnosis.^{11,72} Therefore, the use of at least two Ig/TCR targets per patient is recommended for greater accuracy of MRD tests.^{17,35,37,38,72,80}

Due to the technical complexity, RQ-PCR assays for MRD detection in ALL should be performed by reference molecular hematology laboratories that regularly participate in external quality control programs and preferably carry out the analysis for a significant number of new cases per year (minimum of 50 cases).^{38,80}

Comparative Studies Between Molecular Techniques and Flow Cytometry. MRD detection by flow cytometry and/or PCR techniques has been widely used in studies of childhood ALL. Publications report MRD evaluations using techniques with different analytical sensitivities, follow-up samples collected at various times, and groups of patients submitted to different treatment protocols.^{1,13,15,16,19,20,22-24,35,42,54,83} On the other hand, all of these studies confirm the value of detecting small numbers of residual leukemic cells to assess the risk of disease relapse and determine the chemotherapy regimen.

Comparative studies have shown that MRD analyses by flow cytometry and RQ-PCR methodologies estimate similar levels of residual leukemic cells in most samples obtained from children with ALL, when present in amounts greater than 0.01%.^{14,19,29,37,47,62,84} With the current techniques, samples with residual leukemic cells detected by RQ-PCR at levels below 0.01% are often negative by flow cytometry.^{28,29} Thus, concordance between the results obtained by the two methods may depend on the cutoff used and on the evaluation time.^{29,37,84} Gaipa et al., in a simultaneous analysis of 3,565 BM samples by both methods, at day 15, day 33, and day 78, found a general concordance rate of 80% using a cutoff value of 0.01%.²⁹ However, in an evaluation of the times of sample collection, concordance between the results obtained at day 33 was lower (70%) than at days 15 and 78 (86% and 87%, respectively). The discordant results were most often negative by flow cytometry and positive by RQ-PCR, in samples with low MRD levels ($<0.1\%$). Using RQ-PCR as a reference, the sensitivity of flow cytometry was 87% at day 15, decreasing to 47% at day 33 and to 27% at day 78, due to the progressive reduction in MRD levels during follow-up of patients. The specificity of flow cytometry was high at all three-time points: 74% at day 15, 88% at day 33,

and 99% at day 78. Similarly, Mejstříková et al., using a strategy of "predefined gates" observed a higher concordance between the two methodologies at day 15, when compared to day 33 and to week 12 of treatment.⁴⁶ Malec et al. described similar results for an analysis of 71 follow-up samples, with 89% concordance between the two methods, using a cutoff value of 0.01%.³⁷ Kerst et al. observed an even higher concordance (97.1%) in a comparative analysis of 105 follow-up samples, with no indication of the collection times.⁶² Using the same cutoff value, Ryan et al. observed a qualitative concordance between the methods in 93.8% of 151 samples analyzed at multiple collection time points over a period of three years. However, the concordance of the results at day 28 (25 samples) and in the consolidation phase (weeks 7 to 12, 17 samples) was lower (84% and 88%, respectively).⁸⁴ In order to explain the false RQ-PCR results, the authors considered the inability to distinguish between viable and apoptotic cells and the possibility of subclone emergence. In a view to explain the false results by flow cytometry, they examined the difficulty of a phenotypic distinction between leukemic cells and normal B-precursors of the regenerating BM, in addition to the possible modulation of antigen expression during treatment.

Novel Technologies. A very sensitive sequencing assay, recently developed and described by Faham et al., allows the detection and monitoring of all leukemic rearrangements in a given sample, enabling the detection of clonal evolution in follow-up samples and reducing false negative results.⁸⁵ This methodology is based on next-generation sequencing (NGS) and uses consensus primers to amplify all Ig and TCR rearrangements present in the leukemic clone at diagnosis, allowing their monitoring during treatment. NGS shows an analytical sensitivity of 10^{-6} , higher than that achieved by RQ-PCR, and do not demand specific primer design for each patient, requiring less time to execute. On the other hand, it has disadvantages such as high complexity and cost.

Conclusions. Despite the extensive literature already available, it is necessary to evaluate data on MRD as a prognostic factor in ALL for each therapeutic regimen, considering the differences in the intensity of treatment protocols, favorable times for evaluation and methodological differences among the assays.^{20,33,35,83,86}

It is recommended that MRD cutoffs for therapeutic decision are defined within each treatment protocol for ALL, since they depend on the detection method, the treatment administered before MRD follow-up, the prognostic stratification of patients and the protocol treatment goals.^{33,38} The cutoff value used by most studies to define MRD positivity is 0.01%, which is the

detection limit of routine tests.^{14,19,29} The recent introduction of high-sensitivity techniques might change the cutoff point for risk stratification in the near future if very low levels of MRD are proven to be of clinical value.

If properly standardized, immunological and molecular methods are equally effective in the detection of clinically significant levels of MRD.^{7,14,19,29,37,47,62,83,84} In general, PCR-based methods are considered more laborious than immunological methods, and they may have the additional difficulty to rapidly design clone-specific primers for early MRD analyses.^{42,50}

The detection of residual leukemic cells by flow cytometry in stages of treatment associated with bone marrow regeneration requires more complex technical validation to achieve results comparable to those obtained with the RQ-PCR. Thus, it is possible to use flow cytometry as an alternative or a complement to the molecular method in monitoring patients undergoing treatment for ALL.

As an example, it is worth mentioning the strategy defined by Coustan-Smith et al., who chose to use flow cytometry to monitor MRD during remission induction therapy, reserving Ig and TCR rearrangements amplification assays for inconclusive cases.²⁸ Other authors also suggest the complementary use of the two methodologies, whenever possible and economically feasible, to accurately stratify patients by MRD and prevent false negative results due to clonal evolution or phenotypic changes.^{1,7,13,14,29,62,84,86}

MRD monitoring during chemotherapy treatment of childhood ALL is recommended by guidelines adopted by the main reference institutions of onco-hematology, even in areas with limited technical and financial resources. MRD detection by flow cytometry is a viable alternative for services located in such regions. In contrast, analysis of Ig and TCR gene rearrangements by RQ-PCR is considered an expensive method, which can limit its use. Alternatively, some authors have proposed the detection of Ig/TCR rearrangements by conventional PCR using consensus primers and homo/heteroduplex analysis, despite its lower analytical sensitivity, considering that this approach allows identification of patients with greater residual tumor burden, and then at high risk of relapse.^{22,27,49,50,78,79,87,88}

On the other hand, technological development incorporated by laboratories in regions with greater resources can facilitate and enhance the assessment of MRD. Thus, methodologies such as next-generation sequencing and multiparameter flow cytometry (≥ 8 colors) with automation of data analysis tend to replace progressively currently available methods.^{26,86}

References:

- Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Mörnicke A, Arico M, Zimmermann M, Mann G, De Rossi G, Stanulla M, Locatelli F, Basso G, Niggli F, Barisone E, Henze G, Ludwig W-D, Haas OA, Cazzaniga G, Koehler R, Silvestri D, Bradtke 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(16):3206-3214. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-10-248146>
- Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, Reaman GH, Carroll WL. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30(14):1663-1669. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2011.37.8018>
- Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2013;381(9881):1943-1955. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62187-4 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)
- Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001;86(7):675-692. PMID:11454522
- Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, Lacombe F, Lemez P, Marinov I, Matutes E, Maynadié M, Oelschlagel U, Orfao A, Schabath R, Solenthaler M, Tschurtschenthaler G, Vladareanu AM, Zini G, Faure GC, Porwit A. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25:567-574. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2010.312>
- Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:44-54. PMID:21204710
- Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999;38:139-152. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19990815\)38:4<139::AID-CYTO1>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19990815)38:4<139::AID-CYTO1>3.0.CO;2-H)
- Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354(2):166-178. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMa052603> PMID:16407512
- Bowman WP, Larsen EL, Devidas M, Linda SB, Blach L, Carroll AJ, Carroll WL, Pullen DJ, Shuster J, Willman CL, Winick N, Camitta BM, Hunger SP, Borowitz MJ. Augmented therapy improves outcome for pediatric high risk acute lymphocytic leukemia: results of Children's Oncology Group Trial P9906. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:569-577. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.22944>
- Teachey DT, Hunger SP. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2013;162:606-620. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12442>
- Campana D, Pui C-H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995;85(6):1416-1434. PMID:7888664
- Dworzak MN, Panzer-Grümayer ER. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2003;44(9):1445-1455. <http://dx.doi.org/10.1080/1042819031000090174>
- Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui C-H, Campana D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691-2696. PMID:11023499
- Campana D. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. *British Journal of Haematology* 2008;143:481-489. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07350.x>
- Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, Zhou Y, Pui C-H, Rivera GK, Pedrosa F, Campana D. A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006;108(1):97-102. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-01-0066>
- Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, Linda S, Martin PL, Pullen DJ, Viswanatha D, Willman CL, Winick N, Camitta BM. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477-5485. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-01-132837>
- Flohrl 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 JJM, Biondi A, Bartram CR. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22:771-782. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.5>
- Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Mörnicke A, Parasole R, Zimmermann M, Dworzak M, Buldini B, Reiter A, Basso G, Klingebiel T, Messina C, Ratei R, Cazzaniga G, Koehler R, Locatelli F, Schäfer BW, Arico M, Welte K, van Dongen JJM, Gadner H, Biondi A, Conter V. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 2011;118(8):2077-2084. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-03-338707>
- Stow P, Key L, Chen X, Pan Q, Neale GA, Coustan-Smith E, Mullighan CG, Zhou Y, Pui C-H, Campana D. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115(23):4657-4663. doi:10.1182/blood-2009-11-253435 <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-11-253435>
- Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, Fritsch G, Gadner H. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952-1958. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V99.6.1952>
- Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukemiaNet. *Haematologica* 2009;94(8):1135-1150. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2008.004267>
- Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza MA, Araújo M, Toledo SR, Lee MLM, Delbuono E, Petrilli AS, Queiróz RP, Biondi A, Viana MB, Yunes JA, Brandalise SR, Tone LG. A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica* 2009;94(6):781-789. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2008.003137>
- van der Velden VHJ, Corral L, Valsecchi MG, Jansen MWJC, De Lorenzo P, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, Schrappe M, Schrauder A, Meyer C, Marschalek R, Nigro LL, Metzler M, Basso G, Mann G, Den Boer ML, Biondi A, Pieters R, van Dongen JJM. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 2009;23:1073-1079. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.17>
- Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, Benetello A, Buldini B, Maglia O, Masera G, Conter V, Arico M, Biondi A, Gaipa G. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5168-5174. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.20.8934>
- Ratei R, Basso G, Dworzak M, Gaipa G, Veltroni M, Rhein P, Biondi A, Schrappe M, Ludwig W-D, Karawajew L. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2009;23:528-534. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.324>
- van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015;125(26):3996-4009. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-03-580027>
- Scrideli CA, Tone LG. Qualitative polymerase chain reaction versus quantitative polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015.

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.08.010>
28. Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23:347-358. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beha.2010.07.007>
 29. Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, Panzer-Grümayer R, Buldini B, Silvestri D, Karawajew L, Maglia O, Ratei R, Benetello A, Sala S, Schumich A, Schrauder A, Villa T, Veltroni M, Ludwig W-D, Conter V, Schrappe M, Biondi A, Dworzak MN, Basso G. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012;97(10):1586-1593. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.060426>
 30. Elorza I, Palacio C, Dapena JL, Gallur L, Toledo JS, Heredia CD. Relationship between minimal residual disease measured by multiparametric flow cytometry prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010; 95(6):936-941. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2009.010843>
 31. Campana D, Leung W. Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* 2013;162:147-161. <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12358>
 32. Topp MS, Kufer P, Nicola Gokbuget N, Goebeler M, Klinger M, Neumann S, Horst HA, Raff T, Viardot A, Schmid M, Stelljes M, Schaich M, Degenhard E, Kohne-Volland R, Brüggemann M, Ottmann O, Pfeifer H, Burnmeister T, Nagorsen D, Schmidt M, Lutterbuese R, Reinhardt C, Baeuerle PA, Kneba M, Einsele H, Riethmüller G, Hoelzer D, Zugmaier G, Bargou RC. Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody Blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(18):2493-2498. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.32.7270>
 33. Spinelli O, Tosi M, Peruta B, Montalvo MLG, Maino E, Scatolin AM, Parolini M, Viero P, Rambaldi A, Bassan R. Prognostic significance and treatment implications of minimal residual disease studies in Philadelphia-negative adult acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014, 6(1): e2014062. <http://dx.doi.org/10.4084/mjhid.2014.062>
 34. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, Rossi G, Borlenghi E, Pogliani EM, Terruzzi E, Fabris P, Cassibba V, Lambertenghi-Deliliers G, Cortelezzi A, Bosi A, Gianfaldoni G, Ciceri F, Bernardi M, Gallanini A, Mattei D, Di Bona E, Romani C, Scatolin AM, Barbui T, Rambaldi A. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2009;113(18):4153-4162. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-11-185132>
 35. 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):382-390. PMID:15749670
 36. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, Stow P, Su X, Shurtleff S, Pui C-H, Downing JR, Campana D. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011;117(23):6267-6276. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-12-324004>
 37. Malec M, van der Velden VHJ, Björkstrand E, Wijkhuijs JM, Söderhäll S, Mazur J, Björkholm M, Porwit-MacDonald. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TCR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia* 2004;18:1630-1636. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2403444>
 38. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, Asnafi V, Baruchel A, Bassan R, Benoit Y, Biondi A, Cavé H, Dombret H, Fielding AK, Foà R, Gökbuget N, Goldstone AH, Goulden N, Henze G, Hoelzer D, Janka-Schaub GE, Macintyre EA, Pieters R, Rambaldi A, Ribera J-M, Schmiegelow K, Spinelli O, Stary J, von Stackelberg A, Kneba M, Schrappe M, van Dongen JJM. 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;24:521-535. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.268>
 39. Campana D. Progress of Minimal Residual Disease Studies in Childhood Acute Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2010;5:169-176. <http://dx.doi.org/10.1007/s11899-010-0056-8>
 40. Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Hematology, Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 1:137-142.
 41. Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of minimal residual disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry Part B* 2013;84B:359-369. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21101>
 42. Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol* 2012;19:313-318. <http://dx.doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283543d5c>
 43. Visser JWM, Martens ACM, Hagenbeek A. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Ann NY Acad Sci* 1986; 468:268-275. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb42045.x> PMID:3089116
 44. Drach J, Drach D, Glassl H, Gattringer C, Huber H. Flow cytometric determination of atypical antigen expression in acute leukemia for the study of minimal residual disease. *Cytometry* 1992;13:893-901. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.990130813> PMID:1459006
 45. Griesinger F, Pirò-Noack M, Kaib N, Falk M, Renziehausen A, Troff C, Grove D, Schnitter S, Büchner T, Ritter J, Hiddemann W, Wörmann B. Leukemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *British Journal of Haematology* 1999;105:241-255. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1999.01300.x> PMID:10233388
 46. Mejstriková E, Fronková E, Kalina T, Omelka M, Batinic D, Dubravcic K, Pospisilová K, Vásková M, Luria D, Cheng SH, Ng M, Leung Y, Kappelmayer J, Kiss F, Izraeli S, Stark B, Schrappe M, Trka J, Stary J, Hrusák O. Detection of residual B precursor lymphoblastic leukemia by uniform gating flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:62-70. <http://dx.doi.org/10.1002/psc.22261>
 47. Irving J, Jesson J, Virgo P, Case M, Minto L, Eyre L, Noel N, Johansson U, Macey M, Knotts L, Helliwell M, Davies P, Whitby L, Barnett D, Hancock J, Goulden N, Lawson S. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009;94(6):870-874. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2008.000414>
 48. Dworzak MN, Gaipa G, Schunich A, Maglia O, Ratei R, Veltroni M, Husak Z, Basso G, Karawajew L, Gardner H, Biondi A. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW MRD Study Group. *Cytometry Part B* 2010;78B:147-153. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.20516>
 49. Delbuono E, Maekawa YH, Latorre MRDO, Seber A, Petrilli AS, Braga JAP, Lee MLM. Simplified flow cytometric assay to detect minimal residual disease in childhood with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008;30(4):281-286. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842008000400010>
 50. Patkar N, Alex AA, Bargavi B, Ahmed R, Abraham A, George B, Vishwabandya A, Srivastava A, Mathews V. Standardizing minimal residual disease by flow cytometry for precursor B lineage acute lymphoblastic leukemia in a developing country. *Cytometry Part B* 2012;82B:252-258. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21017>
 51. Luria D, Rosenthal E, Steinberg D, Kodman Y, Safanaiev M, Amariglio N, Avigad S, Stark B, Izraeli S. Prospective comparison of two flow cytometry methodologies for monitoring minimal residual disease in a multicenter treatment protocol of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B* 2010;78B:365-371. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.20532>
 52. Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MWM, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Björkstrand E, Gaipa G, Biondi A, Orfão A, Janossy G, van Dongen JJM, San Miguel JF. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999;13:419-427. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2401279> PMID:10086733
 53. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Pickler LJ, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte

- precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood* 2001;98(8):2498-2506. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V98.8.2498>
54. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui C-H, Campana D. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(1):52-58. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-01-0006>
 55. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, De Zen L, Gaipa G, Ratei R, Basso G, Biondi A, Ludwig W-D, Gadner H. CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia* 2004;18:703-708. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2403303>
 56. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, Veltroni M, Schumich A, Maglia O, Karawajew L, Benetello A, Pötschger U, Husak Z, Gadner H, Biondi A, Ludwig W-D, Basso G. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible. *Cytometry Part B* 2008;74B:331-340. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.20430>
 57. Djokic M, Björklund E, Blennow E, Mazur J, Söderhäll S, Porwit A. Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2009;94(7):1016-1019. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2008.000299>
 58. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui C-H, Campana D. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001;97(7):2115-2120. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V97.7.2115>
 59. Veltroni M, De Zen L, Sanzari MC, Maglia O, Dworzak MN, Ratei R, Biondi A, Basso G, Gaipa G. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2003;88(11):1245-1252. PMID:14607753
 60. Lee RV, Braylan RC, Rimsza LM. CD58 expression decreases as nonmalignant B cells mature in bone marrow and is frequently overexpressed in adult and pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2005;123:119-124. <http://dx.doi.org/10.1309/X5VV6FKJQ6MUBLPX>
 61. Wilson K, Case M, Minto L, Bailey S, Bown N, Jesson J, Lawson S, Vormoor J, Irving J. Flow minimal residual disease monitoring of candidate leukemic stem cells defined by the immunophenotype, CD34+ CD38lowCD19+ in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010;95(4):679-683. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2009.011726>
 62. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, 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 leukemia by flow cytometry and real-time PCR. *British Journal of Haematology* 2005;128:774-782. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05401.x>
 63. Guillaume N, Penther D, Vaida I, Gruson B, Hamivel V, Claisse JF, Capidot JC, Lefrere JJ, Damaj G. CD66c expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia: strength and weakness. *Int Jnl Lab Hem* 2011;33:92-96. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-553X.2010.01254.x>
 64. Solly F, Angelot F, Garand R, Ferrand C, Seillès E, Schillinger F, Decobecq A, Billot M, Larosa F, Plouvier E, Deconinck E, Legrand F, Saas P, Rohrlrich P-S, Gamache-Ottou F. CD 304 is preferentially expressed on a subset of B-lineage acute lymphoblastic leukemia and represents a novel marker for minimal residual disease detection by flow cytometry. *Cytometry Part A* 2012;81A:17-24. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.21162>
 65. DiGiuseppe JA, Fuller SG, Borowitz MJ. Overexpression of CD49f in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: potential usefulness in minimal residual disease detection. *Cytometry Part B* 2009;76B:150-155. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.20440>
 66. Muzzafar T, Medeiros LJ, Wang AS, Brahmandam A, Thomas DA, Jorgensen JL. Aberrant underexpression of CD81 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. Utility in detection of minimal residual disease by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2009;132:692-698. <http://dx.doi.org/10.1309/AJCP02RPVOKTNWEC>
 67. Rhein P, Mitlohner R, Basso G, Gaipa G, Dworzak MN, Kirschner-Schwabe R, Hagemeyer C, Stanulla M, Schrappe M, Ludwig W-D, Karawajew L, Ratei R. CD11b is a therapy resistance - and minimal residual disease - specific marker in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115(18):3763-3771. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-10-247585>
 68. Gaipa G, Basso G, Maglia O, Leoni V, Faini A, Cazzaniga G, Bugarin C, Veltroni M, Michelotto B, Ratei R, Coliva T, Valsecchi MG, Biondi A, Dworzak MN. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 2005;19:49-56. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2403559>
 69. Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, Printz D, Fröschl G, Buchinger P, Mann G, Gadner H. Multiparameter phenotype mapping of normal and post-chemotherapy B lymphopoiesis in pediatric bone marrow. *Leukemia* 1997;11:1266-1273. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2400732> PMID:9264380
 70. Porwit-MacDonald A, Björklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Pereira A, van den Beemd MWM, van Wering ER, Baars E, Gaipa G, Biondi A, Ciudad J, van Dongen JJM, San Miguel JF, Orfao A. BIOMED-1 Concerted Action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000;14:816-825. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2401741> PMID:10803512
 71. Volejnikova J, Mejstrikova E, Valova T, Reznickova L, Hodonska L, Mihal V, Sterba J, Jabali Y, Prochazkova D, Blazek B, Hak J, Cerna Z, Hrusak O, Sary J, Trka J, Fronkova E. Minimal residual disease in peripheral blood at day 15 identifies a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with superior prognosis. *Haematologica* 2011;96(12):1815-1821. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.042937>
 72. van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-1034. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2402922>
 73. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurig E, Garcia-Sanz R, van Krieken JHJM, 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;17:2257-2317. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2403202>
 74. Kraszewska MD, Dawidowska M, Szczepanski T, Witt M. T-cell acute lymphoblastic leukaemia: recent molecular biology findings. *British Journal of Haematology* 2011;156:303-315. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08957.x>
 75. Brüggemann M, van der Velden VHJ, Raff T, Droese J, Ritgen M, Pott C, Wijkhuijs AJ, Gökbuget 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):709-719. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2403263>
 76. van der Velden VHJ, 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 JJM. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia* 2007;21:706-713. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404535>
 77. Dawidowska M, Jółkowska J, Szczepanski T, Derwich K, Wachowiak J, Witt M. Implementation of the standard strategy for identification of Ig/TCR targets for minimal residual disease diagnostics in B-cell precursor ALL pediatric patients: Polish experience. *Arch Immunol Ther Exp* 2008;56:409-418. <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-008-0045-y>
 78. Assumpção JG, Paula FDF, Xavier SG, Murao M, Neto JCA, Dutra AP, Lima ER, Oliveira BM, Viana MB. Gene rearrangement study for minimal residual disease monitoring in children with acute lymphocytic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35(5):337-342. <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20130115>
 79. Paula FDF, Santos SME, Xavier SG, Ganazza MA, Jotta PY,

- Yunes JA, Viana MB, Assumpção JG. Comparison between qualitative and real-time polymerase chain reaction to evaluate minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015; 37(6): 373-380. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.08.003>
80. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trika J, Eckert C, Foroni L, zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJM. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007;21:604-611. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404586>
 81. van der Velden VHJ, Jacobs DCH, Wijkhuijs AJM, Comans-Bitter WM, Willemsse MJ, Hählen K, Kamps WA, van Wering ER, van Dongen JJM. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia* 2002;16:1432-1436. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2402636>
 82. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997;11:2192-2199. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2400887> PMID:9447840
 83. Thörn I, Forestier E, Botling J, Thuresson B, Wasslavik C, Björklund E, Li A, Lindström-Eriksson E, Malec M, Grönlund E, Torikka K, Heldrup J, Abrahamsson J, Behrendtz M, Söderhäll S, Jacobsson S, Olofsson T, Porwit A, Lönnerholm G, Rosenquist R, Sundström C. Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolor flow cytometry. *British Journal of Haematology* 2011;152:743-753. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08456.x>
 84. Ryan J, Quinn F, Meunier A, Boublikova L, Crampe M, Tewari P, O'Marcaigh A, Stallings R, Neat M, O'Meara A, Breatnach F, McCann S, Browne P, Smith O, Lawler M. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *British Journal of Haematology* 2008;144:107-115. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07429.x>
 85. Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VEH, Stow P, Coustan-Smith E, Pui C-H, Campana D. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012;120(26):5173-5180. DOI:10.1182/blood-2012-07-444042 <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-07-444042>
 86. Campana D. Should minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia be standard of care? *Curr Hematol Malig Rep* 2012;7:170-177. <http://dx.doi.org/10.1007/s11899-012-0115-4>
 87. Scrideli CA, Kashima S, Cipollotti R, Defavery R, Bernardes JE, Tone LG. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoid leukemia: comparison of three detection methods by PCR. *Leukemia Research* 2002;26:431-438. [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-2126\(01\)00153-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-2126(01)00153-9)
 88. Stanulla M, Schrauder A. Bridging the gap between the north and south of the world: the case of treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2009;94(6):748-752. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2009.006783>

2.2 Avaliação da DRM por PCR convencional

Os métodos de PCR convencionais, desenvolvidos a partir da década de 1990, exigem técnicas de detecção pós-PCR para identificação dos produtos finais da reação de amplificação. A PCR convencional é usada, ao diagnóstico, para a identificação de rearranjos clonais de *Ig* e *TCR*, que são amplificados com o uso de *primers* de consenso e, após separação eletroforética em gel de poliacrilamida, são identificados com base no peso molecular e intensidade de sinal, por análise de homo/heteroduplex. Nas amostras de acompanhamento, os perfis eletroforéticos obtidos são comparados com os achados ao diagnóstico, em relação à presença de bandas dominantes similares em peso molecular e padrão de migração (Langerak *et al.*, 1997; Scrideli *et al.*, 2009; Scrideli *et al.*, 2015).

A técnica convencional alcança sensibilidade aproximada de 10^{-3} , não sendo capaz de detectar células leucêmicas residuais em proporções inferiores. Outra limitação reside no fato de oferecer apenas resultados qualitativos (van der Velden *et al.*, 2003; Scrideli *et al.*, 2015). Entretanto, do ponto de vista metodológico, é considerada relativamente simples e acessível a serviços com recursos financeiros e tecnológicos restritos. Estudos sugerem que, diante da impossibilidade de realização da RQ-PCR, a PCR convencional pode se mostrar útil para identificar pacientes com DRM em níveis relativamente mais elevados, que apresentam maior risco de recaída e demandam intensificação do tratamento. Contudo, métodos mais sensíveis são essenciais para reconhecer os pacientes que apresentam risco muito baixo de recaída, potenciais candidatos à redução da quimioterapia (Scrideli *et al.*, 2009; Stanulla *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2015; Scrideli *et al.*, 2015).

Dentro desta proposta, estudos brasileiros avaliaram a detecção de blastos residuais por PCR convencional durante e ao final da fase de indução e demonstraram que a DRM representa fator prognóstico independente, mesmo quando avaliada pelo método qualitativo (Scrideli *et al.*, 2003; Assumpção *et al.*, 2013; Paula *et al.*, 2015).

2.3 Atualização da literatura

2.3.1 Avaliação da DRM por citometria de fluxo

Publicações recentes abordam a evolução dos ensaios de CF na detecção da DRM, alcançada por meio do avanço tecnológico dos citômetros e da experiência adquirida pelos profissionais envolvidos com a metodologia. Os estudos trazem propostas de padronização do método, especialmente quanto ao painel de anticorpos a ser utilizado, o número de eventos a ser

adquirido, as estratégias de *gating* para análise e os critérios de positividade do teste (Garand *et al.*, 2013; Fossat *et al.*, 2015; Ikoma *et al.*, 2015; Wood, 2016; Theunissen *et al.*, 2017).

Cabe ressaltar o estudo multicêntrico publicado por Theunissen e colaboradores (2017), que propôs a padronização de um ensaio de alta sensibilidade para a detecção de DRM por CF multiparamétrica. Para alcançar a sensibilidade analítica de 10^{-5} , foram utilizados dois tubos com combinações de oito anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos e um novo procedimento de preparo da amostra de MO, permitindo a aquisição de um grande número de eventos (> 4 milhões de células). O novo protocolo de preparo consistiu em lisar um volume de amostra contendo mais de 10 milhões de células e ressuspender os leucócitos em um pequeno volume de solução salina, permitindo a marcação de milhões de células por tubo. A DRM foi considerada positiva e quantificável quando encontradas mais de 40 células em um *cluster*, dentre o mínimo de quatro milhões de eventos adquiridos, garantindo o limite de sensibilidade de 10^{-5} .

Outros autores demonstraram o benefício do uso de combinações de 6 a 8 cores, com marcadores padronizados, propiciando distinção acurada entre as células neoplásicas e células precursoras B normais. Para tal, foi mantida a estratégia já descrita de combinar anticorpos que permitem a definição homogênea das células precursoras linfoides (ex. CD10, CD19, CD34, CD45) com anticorpos adicionais, que permitem detectar o imunofenótipo aberrante da célula neoplásica. Dentre os anticorpos adicionais, tem sido reforçada a importância dos marcadores CD9, CD20, CD38, CD58, CD66c, CD81 e CD123, considerados altamente informativos na detecção do clone leucêmico, apesar de ainda não haver consenso entre os trabalhos a respeito de um painel fixo (Denys *et al.*, 2013; Borowitz *et al.*, 2015; Fossat *et al.*, 2015; Karawajew *et al.*, 2015; Shaver *et al.*, 2015). Novos marcadores têm sido descritos (CD73, CD304) em estudos isolados e demonstram ser promissores na análise da DRM (Theunissen *et al.*, 2017). Wood (2016) ressalta a impossibilidade de uso do CD19 como marcador de linhagem B nos pacientes em tratamento com imunoterápicos, como o Blinatumomab. O uso do CD22, nesses casos, pode se mostrar mais adequado para a separação das células B (Karawajew *et al.*, 2015).

Uma publicação do Grupo de Trabalho em DRM da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea propôs a padronização dos ensaios de CF para a detecção de DRM, utilizando combinações de quatro cores e maior número de tubos, considerando a realidade de grande parte dos laboratórios brasileiros (Ikoma *et al.*, 2015).

A proposta de utilizar múltiplos marcadores em um só tubo e a estratégia de análise de *gates* sequenciais determinam aumento da acurácia dos ensaios de DRM por CF, mesmo nas amostras de MO colhidas em fases do tratamento associadas à regeneração medular. A

possibilidade de combinar múltiplos marcadores em um só tubo traz ainda a vantagem de permitir a redução do número de tubos do painel e, assim, propiciar a aquisição de um número progressivamente maior de eventos por tubo, o que é essencial para alcançar maior sensibilidade analítica. A estratégia atual consiste em selecionar um ou dois tubos fixos, altamente informativos, e utilizar estes tubos nas análises de todas as amostras, considerando o imunofenótipo inicial para interpretação dos resultados (Fossat *et al.*, 2015; Karawajew *et al.*, 2015; Shaver *et al.*, 2015; Theunissen *et al.*, 2017).

A padronização e a evolução dos ensaios de CF multiparamétrica na avaliação da DRM têm permitido alcançar resultados precisos, mesmo em fases do tratamento associadas à regeneração medular, e propiciado a incorporação do método na análise da DRM ao final das fases de indução e consolidação nos protocolos de tratamento clínico (Fossat *et al.*, 2015).

2.3.2 Avaliação da DRM pelo método de sequenciamento de próxima geração

O ensaio de DRM baseado em sequenciamento de próxima geração (*next-generation sequencing* – NGS), inicialmente descrito por Faham e colaboradores (2012), tem sido avaliado em novos estudos, que ressaltam as suas vantagens em relação à RQ-PCR. O teste consiste na amplificação dos rearranjos de *Ig/TCR* por PCR multiplex e posterior sequenciamento dos rearranjos possivelmente encontrados na amostra. O método alcança maior sensibilidade analítica (10^{-6} a 10^{-7}) na detecção de DRM, se comparado à RQ-PCR, e apresenta menor complexidade, por não exigir a confecção de *primers* específicos para cada paciente (Faham *et al.*, 2012; Logan *et al.*, 2014; Pulsipher *et al.*, 2015).

Considerando a alta sensibilidade do NGS, Logan e colaboradores (2014) avaliaram o mesmo na detecção da DRM em amostras de sangue periférico (SP), com resultados promissores, podendo esta se mostrar uma aplicabilidade futura dos testes altamente sensíveis. Pulsipher e colaboradores (2015) demonstraram o valor do teste na identificação do risco de recaída em pacientes avaliados nos períodos pré e pós-transplante de MO. A definição da ausência de blastos residuais no pré-transplante, pelo método molecular de alta sensibilidade, identificou pacientes considerados de baixo risco, permitindo a indicação de tratamentos menos intensivos. Por outro lado, a detecção da DRM pelo método NGS no pós-transplante mostrou alta acurácia na predição do risco de recaída, determinando a indicação de outras intervenções terapêuticas.

Outros benefícios do NGS incluem a possibilidade de detecção de subclones e de linfoblastos residuais que apresentem evolução clonal durante o tratamento, superando

possíveis limitações da RQ-PCR. Entretanto, trata-se de metodologia onerosa e de disponibilidade restrita (Faham *et al.*, 2012; Logan *et al.*, 2014; Pulsipher *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Assumpção JG, Paula FDF, Xavier SG, *et al.* Gene rearrangement study for minimal residual disease monitoring in children with acute lymphocytic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35(5):337-342.

Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, *et al.* Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood* 2015;126(8):964-971.

Denys B, van der Sluijs-Gelling AJ, Homburg C, *et al.* Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013;27:635-641.

Faham M, Zheng J, Moorhead M, *et al.* Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012;120(26):5173-5180.

Fossat C, Roussel M, Arnoux I, *et al.* Methodological aspects of minimal residual disease assessment by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter study. *Cytometry Part B* 2015;88B:21-29.

Garand R, Beldjord K, Cavé H, *et al.* Flow cytometry and Ig/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia* 2013;27:370-376.

Ikoma MRV, Beltrame MP, Ferreira SIACP, *et al.* Proposal for the standardization of flow cytometry protocols to detect minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37(6):406-413.

Karawajew L, Dworzak M, Ratei R, *et al.* Minimal residual disease analysis by eight-color flow cytometry in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2015;100(7):935-944.

Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, *et al.* Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997;11:2192–2199.

Logan AC, Vashi N, Faham M, *et al.* Immunoglobulin and T cell receptor gene High-Throughput Sequencing quantifies minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and predicts post-transplantation relapse and survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:1307-1313.

Paula FDF, Santos SME, Xavier SG, *et al.* Comparison between qualitative and real-time polymerase chain reaction to evaluate minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37(6):373-380.

Pulsipher MA, Carlson C, Langholz B, *et al.* IgH-V(D)J NGS-MRD measurement pre- and early post-allotransplant defines very low- and very high-risk ALL patients. *Blood* 2015;125(22):3501-3508.

Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza MA, *et al.* A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica* 2009;94(6):781-789.

Scrideli CA, Queiroz RGP, Bernardes JE, *et al.* PCR detection of clonal IgH and TCR gene rearrangements at the end of induction as a non-remission criterion in children with ALL: comparison with standard morphologic analysis and risk group classification. *Med Pediatr Oncol* 2003;41:10-16.

Scrideli CA, Tone LG. Qualitative polymerase chain reaction versus quantitative polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37(6):366-368.

Shaver AC, Greig BW, Mosse CA, *et al.* B-ALL minimal residual disease flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2015;143:716-724.

Stanulla M, Schrauder A. Bridging the gap between the north and south of the world: the case of treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2009;94(6):748-752.

Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, *et al.* Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017;129(3):347-357.

van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, *et al.* Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-1034.

Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry Part B* 2016;90B:47-53.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Comparar as técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e de PCR, como métodos de avaliação da Doença Residual Mínima, em crianças e adolescentes com LLA, em tratamento de acordo com o protocolo GBTLI LLA-2009.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Detectar “imunofenótipos associados à leucemia” (LAIPs) em amostras de medula óssea de crianças e adolescentes com LLA, ao diagnóstico, para monitorização da DRM nos dias 35 e 78 do tratamento, por citometria de fluxo;
- 2- Detectar os rearranjos clonais dos genes dos receptores de células T e/ou das imunoglobulinas em amostras de MO de crianças e adolescentes com LLA, ao diagnóstico, para monitorização da DRM nos dias 35 e 78 do tratamento, por PCR convencional;
- 3- Comparar os dados obtidos com as duas metodologias e correlacioná-los com outros fatores prognósticos em LLA infantil e com as probabilidades de sobrevida global e livre de eventos.

4. Pacientes e métodos

Trata-se de estudo longitudinal prospectivo, desenvolvido no Serviço de Medicina Laboratorial do HC/UFMG (setores de Citometria de Fluxo e Hematologia Molecular), em Belo Horizonte, Minas Gerais. O projeto inseriu-se na linha de pesquisa “Distúrbios Onco-hematológicos” do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – COEP/UFMG (CAAE: 20800713.9.0000.5149; parecer nº 509.601 - **ANEXO 1**), e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão – DEPE (processo nº 166/13 – **ANEXO 2**).

4.1 População

A população de estudo foi constituída por todos os pacientes admitidos no HC-UFMG, no período de setembro de 2013 a dezembro de 2016, com diagnóstico de LLA, que preencheram os critérios de inclusão. Os pacientes incluídos no estudo tiveram participação voluntária, atestada em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), assinado pelos pais ou responsáveis e pelos participantes acima de 7 anos (**ANEXO 3**).

Foram considerados os critérios de inclusão: idade até 18 anos; diagnóstico de LLA feito por mielograma, imunofenotipagem por citometria de fluxo, análise citogenética e análise molecular de amostra de medula óssea, realizados pelos métodos convencionais, de acordo com as padronizações do Serviço de Medicina Laboratorial do HC-UFMG; e tratamento de acordo com o protocolo GBTLI LLA-2009.

Foram considerados os critérios de exclusão: tratamento inicial de acordo com outros protocolos terapêuticos; não concordância em participação no estudo (pelo paciente e/ou responsáveis legais); e amostra de MO inadequada (volume insuficiente, coleta ou armazenamento inapropriados) para realização dos procedimentos laboratoriais.

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram levantados a partir dos prontuários de atendimento e do sistema informatizado laboratorial, e transferidos para uma base de dados com acesso reservado aos pesquisadores responsáveis pelo projeto.

4.2 Protocolo de tratamento

De acordo com o protocolo GBTLI LLA-2009, da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica (SOBOPE) (GBTLI, 2009), resumido no **ANEXO 4**, os pacientes com LLA-B derivada são classificados, ao diagnóstico, em grupos de baixo ou alto risco. O grupo de baixo risco (BR) inclui pacientes com idade acima de 1 e abaixo de 9 anos, leucometria inicial inferior a 50.000 cel/ μ L, ausência dos achados citogenéticos de risco - t(9;22) ou fusão *BCR-ABL* e

t(4,11) ou fusão *MLL/AF4*, e ausência de acometimento leucêmico em SNC. De acordo com a intensidade de resposta à terapia inicial, os pacientes são subdivididos em dois subgrupos adicionais: baixo risco verdadeiro (BRV) - < 1000 blastos/ μ L em sangue periférico no D8, MO M₁ (MO em remissão, com contagem de blastos inferior a 5%), com DRM negativa por CF (< 0,01%) no D15 e MO M₁ com DRM negativa por RQ-PCR (< 10⁻³) no D35; e baixo risco intermediário (BRI) - < 1000 blastos/ μ L em sangue periférico no D8, MO M₁ ou MO M₂ (aspirado medular com presença de blastos na faixa entre 5 e 25%), com DRM positiva por CF em níveis intermediários (\geq 0,01% e < 10%) no D15 e MO M₁ com DRM negativa por RQ-PCR (< 10⁻³) no D35. O objetivo desta subdivisão no grupo de baixo risco consiste na redução da quimioterapia para os pacientes com excelente resposta nas primeiras semanas do tratamento (subgrupo BRV).

O grupo de alto risco (AR) inclui os pacientes com idade igual ou superior a 9 anos e inferior a 18 anos e/ou leucometria inicial \geq 50.000 cel/ μ L e/ou acometimento leucêmico em SNC ao diagnóstico e/ou achados citogenéticos desfavoráveis (hipodiploidia, t(4;11) e/ou fusão *MLL/AF4*). Os portadores da t(9;22) e/ou fusão *BCR-ABL* seguem protocolo específico. De acordo com a resposta nos dias 8, 15 e 35 do tratamento quimioterápico, os pacientes do grupo de alto risco são reclassificados em dois subgrupos – respondedores rápidos (subgrupo RR) - < 1000 blastos/ μ L em sangue periférico no D8, MO M_{1/2} com DRM por CF < 10% no D15 e MO M₁ com DRM negativa por RQ-PCR (< 10⁻³) no D35; e respondedores lentos (subgrupo RL) - \geq 1000 blastos/ μ L em sangue periférico no D8, MO M₃ (aspirado medular com percentual de blastos superior a 25%), com DRM por CF \geq 10% no D15 e MO M_{2/3} com DRM positiva por RQ-PCR (\geq 10⁻³) no D35.

Os pacientes com LLA-T derivada seguem protocolo específico de tratamento e são subdivididos, no decorrer do mesmo, em: respondedores rápidos (subgrupo RR) - < 1000 blastos/ μ L em sangue periférico no D8, MO M_{1/2} com DRM por CF < 10% no D15 e MO M₁ com DRM negativa por RQ-PCR (< 10⁻²) no D35; e respondedores lentos (subgrupo RL) - \geq 1000 blastos/ μ L em sangue periférico no D8, MO M₃ com DRM por CF \geq 10% no D15 e MO M_{2/3} com DRM positiva por RQ-PCR (\geq 10⁻²) no D35.

Assim, o protocolo GBTLI LLA-2009 define que a DRM deve ser avaliada em dois pontos críticos – D15, por CF; e D35, por RQ-PCR. Recomenda ainda a avaliação em um ponto adicional (semana 12 do tratamento), entretanto não utiliza este ponto como fator para a redefinição de risco ou para estabelecer ajustes na quimioterapia.

O Serviço de Medicina laboratorial do HC-UFG realiza, como rotina, a análise de DRM nas amostras do D15, por CF, e a pesquisa de transcritos quiméricos detectados ao

diagnóstico (*BCR-ABL*, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *MLL-AF4*) nas amostras do D35, por PCR após transcrição reversa. A análise da DRM através da pesquisa de rearranjos clonais de *Ig/TCR* por RQ-PCR não é realizada, como preconizado pelo protocolo, por falta de recursos financeiros.

Cabe ressaltar que o tratamento dos pacientes incluídos não foi alterado pelos resultados do estudo, exceto nos casos previstos pelo GBTLI-2009 (redefinição do tratamento após reclassificação do risco, com base no resultado da análise de DRM no D15 por CF).

4.3 Métodos

As amostras de MO dos pacientes incluídos no estudo foram avaliadas, ao diagnóstico, pela metodologia de CF, para detecção de células com imunofenótipos aberrantes específicos dos clones leucêmicos, e, por PCR convencional (daqui em diante chamada de “PCR”), visando o encontro de rearranjos clonais dos genes de *Ig* e *TCR*. A DRM foi avaliada por CF nas amostras de MO colhidas nos dias 15, 35 e 78 do tratamento e, por PCR, nas amostras de MO colhidas nos dias 35 e 78 do tratamento. As amostras foram processadas por CF dentro das primeiras 24 horas após a coleta do material. O DNA extraído das amostras para as reações de PCR foi inicialmente congelado e armazenado, para processamento posterior.

A definição dos imunofenótipos associados à leucemia nas amostras do diagnóstico e a análise de DRM por CF nas amostras do D15 foram executadas pela equipe técnica do setor de Citometria de Fluxo, da qual a doutoranda faz parte. A triagem dos rearranjos clonais de *Ig/TCR* por PCR nas amostras do diagnóstico foi inicialmente realizada pela equipe técnica do setor de Hematologia Molecular, como parte de outro estudo em andamento no serviço, tendo sido, em seguida, complementada pela doutoranda. As reações de CF e PCR das amostras colhidas nos pontos D35 e D78 foram executadas pela doutoranda, na sua totalidade, nos setores de Citometria de Fluxo e Hematologia Molecular do Serviço de Medicina Laboratorial do HC-UFMG.

4.3.1 Avaliação da DRM por citometria de fluxo

Para detecção dos “imunofenótipos associados à leucemia” (LAIPs) ao diagnóstico, foram utilizados anticorpos monoclonais dirigidos aos marcadores de superfície e intracelulares de células B, células T e possíveis marcadores aberrantes (CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD15, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD38, CD45, CD56, CD58, CD79a, CD99, CD117, CD123, TdT, HLA-DR, *Ig* de cadeia pesada - *IgM*, *Ig*s de cadeia leve – *Kappa* e *Lambda*, *TCR* α/β e *TCR* γ/δ).

A classificação imunológica, quanto à linhagem acometida e estágio de maturação celular, seguiu os critérios propostos pelo grupo Europeu designado EGIL (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*), descritos na **Tabela 1** (Béné *et al.*, 1995).

Tabela 1 – Classificação imunológica das leucemias linfoides agudas

| | |
|---|---|
| 1- LLA de linhagem B (CD19 ⁺ e/ou CD79a ⁺ e/ou CD22 ⁺)* | |
| LLA pró-B (B-I) | Ausência de expressão de outros antígenos de diferenciação de células B |
| LLA B comum (B-II) | CD10 ⁺ |
| LLA pré-B (B-III) | IgM ⁺ citoplasma |
| LLA B madura (B-IV) | <i>Kappa</i> ou <i>Lambda</i> ⁺ (citoplasma ou superfície) |
| 2- LLA de linhagem T (CD3 ⁺ citoplasma ou superfície) | |
| LLA pró-T (T-I) | CD7 ⁺ |
| LLA pré-T (T-II) | CD2 ⁺ e/ou CD5 ⁺ e/ou CD8 ⁺ |
| LLA-T cortical (T-III) | CD1a ⁺ |
| LLA-T madura (T-IV) | CD3 ⁺ superfície, CD1a ⁻ |
| LLA-T α/β ⁺ (grupo a) | anti-TCR α/β ⁺ |
| LLA-T γ/δ ⁺ (grupo b) | Anti-TCR γ/δ ⁺ |
| 3- LLA (linhagem B ou T) com expressão de 1 ou 2 marcadores mieloides (LLA My+) | |

*LLA de linhagem B é definida pela expressão de pelo menos dois dos três marcadores precoces de células B citados.

LLA – leucemia linfóide aguda.

Adaptado de Béné *et al.*, 1995.

Após caracterização do imunofenótipo aberrante, foram definidos os painéis de anticorpos monoclonais a serem utilizados no monitoramento da DRM, selecionando marcadores conjugados a quatro fluorocromos distintos (isotiocianato de fluoresceína - FITC, ficoeritrina - PE, proteína clorofila peridina - PerCP, e alofocianina - APC), em combinações estratégicas - CD2 PE (RPA-2.10), CD7 FITC (M-T701), CD10 PE (HI10a), CD33 PE (WM53), CD38 PE (HIT2), CD79a PE (HM47), CD99 FITC (TU12), CD123 FITC (7G3), TdT FITC (E17-1519), controle isotípico IgG₁ FITC (BD Biosciences Pharmingen; San Jose, CA); CD3 PerCP (UCHT1), CD10 FITC (MEM-78), CD19 APC (4G7), CD45 PerCP (MEM-28), CD58 FITC (MEM-63) (Exbio; Praha, Czech Republic); CD20 PerCP (B-ly1) (IQ Products; Groningen, The Netherlands); CD34 PE (581) (Beckman Coulter; Marseille, France); CD1a FITC (HI149), CD3 APC (UCHT1) (Biolegend; San Diego, CA); controle isotípico IgG2a FITC (Invitrogen; Camarillo, CA). O corante de ácidos nucleicos *SYTO 13 green fluorescent* foi adquirido da Life Technologies (Carlsbad, CA).

As combinações foram construídas utilizando uma estrutura relativamente fixa (“esqueleto”) nos diferentes tubos. Esta estratégia consistiu em selecionar dois ou três anticorpos

para estarem presentes, sistematicamente, em todas as combinações utilizadas, sendo úteis na definição homogênea das células precursoras linfoides. Um ou dois anticorpos adicionais foram acrescentados em cada tubo, com base na caracterização imunofenotípica de cada caso ao diagnóstico, com o intuito de detectar a expressão antigênica aberrante ou anômala do clone leucêmico (Coustan-Smith *et al.*, 2000; Basso *et al.*, 2001; Coustan-Smith *et al.*, 2002; Dworzak *et al.*, 2004; Dworzak *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2009; Béné *et al.*, 2009; Irving *et al.*, 2009; Ratei *et al.*, 2009; Dworzak *et al.*, 2010; Coustan-Smith *et al.*, 2011; Gaipa *et al.*, 2012; Patkar *et al.*, 2012).

Para compor o esqueleto das diferentes combinações úteis na detecção de DRM em LLA-B foram utilizados os marcadores CD45, CD34, CD19 e/ou CD10 - antígeno inicialmente denominado CALLA (*common ALL antigen* ou antígeno LLA comum), frequentemente expresso na LLA-B da infância (Coustan-Smith *et al.*, 2000, 2002, 2011; Dworzak *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2009; Béné *et al.*, 2011; Gaipa *et al.*, 2012; Patkar *et al.*, 2012; Gaipa *et al.*, 2013). Os marcadores adicionais acrescentados em cada tubo foram selecionados dentre os seguintes: CD123 (Dworzak *et al.*, 2003; Djokic *et al.*, 2009; Patkar *et al.*, 2012), CD58 (Chen *et al.*, 2001; Dworzak *et al.*, 2003; Veltroni *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Mejstriková *et al.*, 2010; Patkar *et al.*, 2012), CD38 (Wilson *et al.*, 2010; Patkar *et al.*, 2012), e marcadores linfoides T ou mieloides aberrantes, como CD2, CD7 e CD33 (Coustan-Smith *et al.*, 2000).

Para composição do painel de detecção de DRM em LLA-T, os marcadores CD45 e CD3_{cy} (citoplasma) e/ou CD3_s (superfície) foram utilizados como estrutura fixa nos diferentes tubos, para definição das células linfoides T. Outros marcadores de células de linhagem T (CD2 e CD7) foram utilizados com menor frequência. Marcadores adicionais aberrantes foram adicionados em cada tubo, de acordo com o imunofenótipo detectado ao diagnóstico - CD1a, CD34, CD99, TdT (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*); além de marcadores linfoides B e mieloides aberrantes (Campana *et al.*, 1999; Porwit-MacDonald *et al.*, 2000; Dworzak *et al.*, 2003, 2004; Delbuono *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2009; Coustan-Smith *et al.*, 2010; Mejstriková *et al.*, 2010; Béné *et al.*, 2011).

O corante nuclear *SYTO 13* foi utilizado na estratégia de separação de células viáveis para análise, com base na sua propriedade de marcar o material nuclear destas células, permitindo eliminar eventos anucleados como eritrócitos, plaquetas e debris (Gaipa *et al.*, 2005; Dworzak *et al.*, 2008, 2010; Ratei *et al.*, 2009; Luria *et al.*, 2010).

Os ensaios de imunofenotipagem foram realizados em tubos de poliestireno, onde foram adicionados 2 µL (ou volume equivalente definido após titulação do reagente) dos anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos. Para cada combinação de anticorpos

monoclonais, foram adicionadas alíquotas de medula óssea, coletadas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), em volume calculado para alcançar 10^6 eventos, respeitando o volume máximo de 300 μ L. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, foi realizada a lise dos eritrócitos, utilizando-se 2 mL de solução contendo citrato de sódio dihidratado, dietilenoglicol e formaldeído, em cada tubo. Após nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (1700 rpm por 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 2 mL de solução isotônica filtrada, empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. O sobrenadante foi novamente descartado e o centrifugado ressuspense em 300 μ L de solução isotônica filtrada para aquisição dos dados no citômetro. A marcação intracitoplasmática foi alcançada a partir da incubação da amostra com solução de lise, previamente à marcação com anticorpos, o que permitiu a permeabilização das membranas celulares.

Os parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo FACScalibur - Becton Dickinson. O programa CELLQuestTM foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise dos resultados. A aquisição foi feita em população celular de interesse, selecionada com base em aspectos morfométricos, em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC). A estratégia de análise consistiu na seleção das células precursoras linfoides B ou T por parâmetros físicos (tamanho e complexidade interna), expressão do CD45 (reduzida ou ausente) e expressão dos marcadores de linhagem - CD19 (células linfoides B) e CD3 (células linfoides T). A seguir, a expressão antigênica aberrante foi avaliada para caracterização dos linfoblastos. O clone leucêmico residual foi definido pela caracterização de aglomerado de pelo menos 10 eventos, dentre o total de eventos adquiridos em cada tubo, que expressasse o perfil fenotípico definido ao diagnóstico para cada caso, utilizando a estratégia de combinação de *gates* sequenciais. Esta estratégia consiste em somar os *gates* que englobam as células que apresentam a expressão antigênica característica do clone leucêmico em uma única região, para definição precisa dos blastos residuais - células presentes simultaneamente em todos os *gates*. Cada combinação de anticorpos avaliada foi acompanhada por um tubo que incluiu a marcação com uma imunoglobulina isotípica (IgG1 ou IgG2a), com o intuito de subtrair os eventos marcados de forma inespecífica, no cálculo final da DRM. Para alcançar o limite de sensibilidade de 10^{-4} , correspondente a 0,01%, exigiu-se a aquisição de um mínimo de 10^5 leucócitos, conforme descrito em estudos anteriores (Campana *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 2001; Malec *et al.*, 2001;

Dworzak *et al.*, 2008; Béné *et al.*, 2009; Ratei *et al.*, 2009; Luria *et al.*, 2010; Gaipa *et al.*, 2012). A proporção de células blásticas foi então determinada dentre o total de células nucleadas viáveis adquiridas, marcadas com o corante nuclear *SYTO*. A **Figura 1** ilustra, de forma simplificada, a estratégia de análise utilizada.

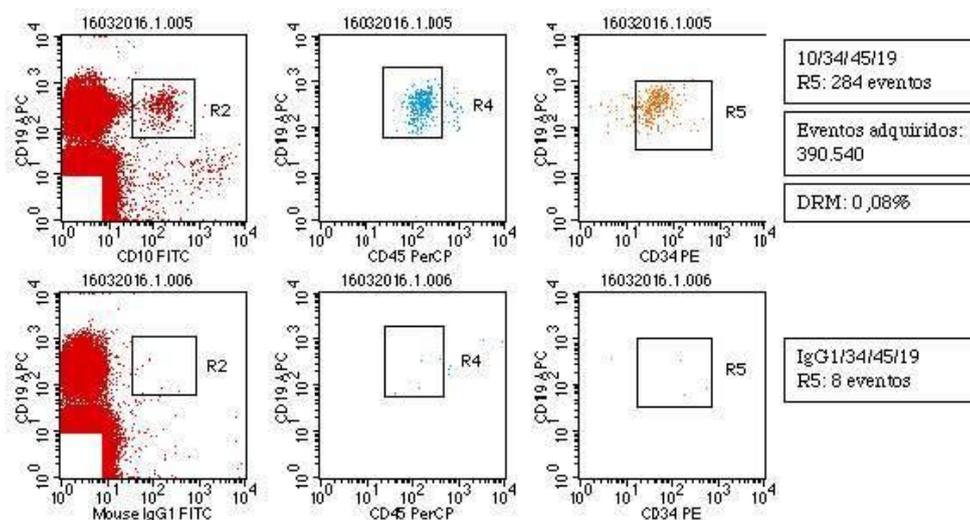


Figura 1 – Modelo de análise da DRM por citometria de fluxo, representado pela estratégia de combinação de *gates* sequenciais. O caso ilustrado é referente a um diagnóstico de LLA-B da nossa casuística (número 33), com o imunofenótipo CD45⁺ fraco, CD19⁺, CD10⁺ e CD34⁺. Na análise do D15, as células foram inicialmente selecionadas por características físicas e a seguir pelas expressões de CD19 + CD10 (R2), CD19 + CD45⁺ fraco (R4), e CD19 + CD34 (R5). A região R5 representa a combinação dos *gates* R2 + R4 + R5, o que permitiu a enumeração de 284 eventos (painel superior), dentre 390.540 eventos adquiridos. Como controle negativo, foi utilizado o tubo com marcação isotópica na primeira cor (IgG1 FITC), o que determinou a quantificação de 8 eventos inespecíficos, presentes na mesma combinação de regiões. O cálculo final, considerando o fator de correção gerado pelo percentual de células viáveis marcadas com o corante *SYTO 13* e a subtração da marcação inespecífica, gerou um resultado de 0,08% de células leucêmicas residuais.

4.3.2 Avaliação da DRM por PCR convencional

- *Separação das Células Mononucleadas e Extração de DNA:* as células mononucleadas das amostras de medula óssea foram obtidas por centrifugação em gradiente de densidade *Histopaque*[®] (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Uma alíquota de 10 x 10⁶ células foi utilizada para extração de DNA com o kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), conforme o protocolo do fabricante. O

DNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (ThermoScientific), conforme instruções do fabricante e armazenado a -20°C.

- *Detecção dos rearranjos de Ig e TCR ao diagnóstico e no monitoramento da DRM (D35 e D78)*: a detecção dos rearranjos clonais dos genes *Ig* e *TCR* nas amostras de MO, ao diagnóstico e no monitoramento da DRM, foi realizada de acordo com a metodologia padronizada pelo grupo de Biologia Molecular do GBTLI, liderado pelo Dr. José Andrés Yunes (Centro Infantil Boldrini, Campinas/SP), tendo sido adaptada a partir da metodologia desenvolvida pelo grupo BIOMED (van Dongen *et al.*, 2003). Foram executadas as etapas descritas a seguir:

- *Amplificação do DNA*: o DNA das amostras obtidas ao diagnóstico das crianças com LLA de linhagem B foi amplificado por pares de *primers* de consenso para os genes *IgH*, *IgK*, *TCRG* e *TCRD*. Para as amostras das crianças com LLA-T, foram testados os genes *IgH*, *TCRG*, *TCRD* e a microdeleção nos genes *Sil-Tal*. Os *primers* selecionados para a triagem inicial dos rearranjos clonais e monitoramento da DRM nas LLAs estão descritos na **Tabela 2** (van Dongen *et al.*, 2003). Nas amostras em que não ocorreu amplificação, a integridade do DNA foi testada através de PCR para amplificação do gene *FLT3*. 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 ampliações inespecíficas, foi utilizado um *pool* de DNAs extraídos de células mononucleadas, obtidas de sangue periférico de doadores sem doença hematológica e com participação também atestada em TCLE.

Tabela 2 – *Primers* selecionados para triagem inicial dos rearranjos clonais e para a análise da DRM por PCR convencional nas LLAs B e T derivadas^a

| <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 | “ | “ | X | |
| VH3-FR2 | GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA | “ | “ | X | |
| VH4-FR2 | TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG | “ | “ | X | |
| VH5-FR2 | GGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAAGG | “ | “ | X | |
| VH6-FR2 | TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG | “ | “ | X | |
| VH7-FR2 | TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA | “ | “ | X | |
| DH1 | GGCGGAATGTGTGCAGGC | “ | “ | | X |
| DH2 | GCACTGGGCTCAGAGTCCTCT | “ | “ | X | X |
| DH3 | GTGGCCCTGGGAATATAAAA | “ | “ | X | X |
| DH4 | AGATCCCCAGGACGCAGCA | “ | “ | | X |
| DH5 | CAGGGGGACACTGTGCATGT | “ | “ | | X |
| DH6 | TGACCCAGCAAGGGAAGG | “ | “ | | X |
| DH7 | CACAGGCCCTACCAGC | “ | “ | X | X |
| gene IgK | | | | | |
| Vk1/6 | TCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTG | Kde | CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA | X | |
| Vk2 | GGCTCCATCTCTGCAGGTCTAGTC | “ | “ | X | |
| Vk3 | CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC | “ | “ | X | |
| INTR | CGTGGCACCGCGAGCTGTAGAC | “ | “ | X | |
| gene TCRG | | | | | |
| VgIf | GGAAGGCCCCACAGCRTCTT | Jg1.3/2.3 + | GTGTTGTTCCACTGCCAAAGAG + | X | X |
| Vg9 | CGGCACTGTCAGAAAGGAATC | Jg1.1/2.1 | TTACCAGGCCAAGTTACTATGAGC | X | X |
| Vg10 | AGCATGGGTAAGACAAGCAA | “ | “ | | X |
| Vg11 | CTTCCACTTCCACTTTGAAA | “ | “ | X | X |
| gene TCRD | | | | | |
| Vd1 | ATGCAAAAAGTGGTCGCTATT | Jd1 | GTTCCACAGTCACACGGGTTC | | X |
| Vd2 | ATACCGAGAAAAGGACATCTATG | “ | “ | | X |
| Vd3 | GTACCGGATAAGGCCAGATTA | “ | “ | | X |
| Dd2 | AGCGGGTGGTGATGGCAAAGT | “ | “ | | X |
| Vd2 | ATACCGAGAAAAGGACATCTATG | Dd3 | TGGGACCCAGGGTGAGGATAT | X | X |
| Dd2 | AGCGGGTGGTGATGGCAAAGT | “ | “ | X | X |
| SIL-TAL | | | | | |
| Sil5 | AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA | Tal1 | AGAGCCTGTCGCCAAGAA | | X |

^avanDongen *et al.*, 2003.

* ‘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-derivadas.

- *Análise de homo/heteroduplex*: para caracterização da clonalidade, uma alíquota de 20 µL do produto de PCR foi acrescida de 5 µL de Tampão de Amostra 6X (azul de bromofenol 0,25%; sacarose 40% em água), desnaturada durante 10 min a 94°C, colocada imediatamente em gelo por 1 min e renaturada por 1 hora a 4°C. A seguir, foi submetida à eletroforese em gel

de acrilamida 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, USA) por 30 minutos e exposto à luz ultravioleta (UV). Um marcador de peso molecular, *DNA ladder 1Kb plus* (Invitrogen, USA) foi utilizado para servir de referência de comparação com o fragmento amplificado. A **Figura 2** ilustra, de forma esquemática, a estratégia de análise de homo/heteroduplex.

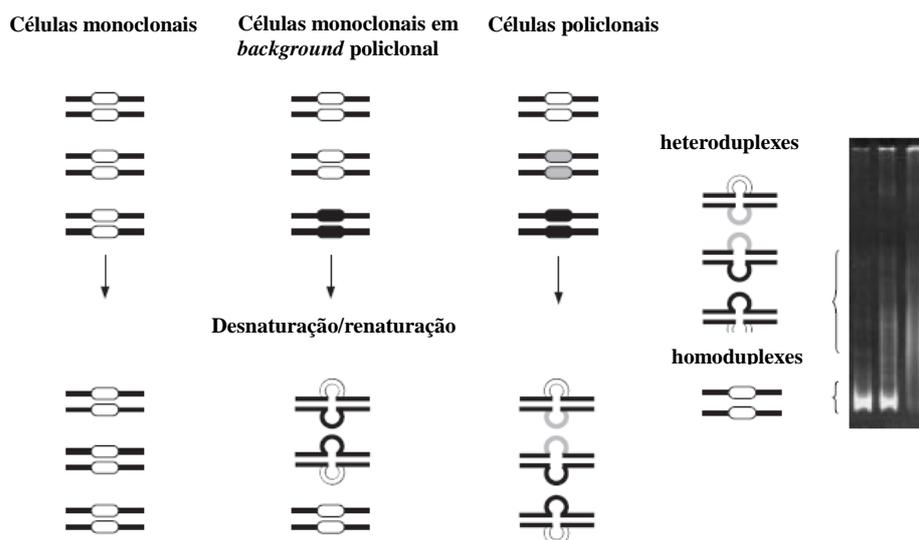


Figura 2 - Diagrama esquemático da técnica de análise de homo/heteroduplex de rearranjos dos genes *Ig* e *TCR*.

Adaptado de Langerak *et al*, 1997.

- *Análise da DRM:* para a análise de DRM, foram testados apenas os rearranjos clonais identificados ao diagnóstico. As amostras de acompanhamento foram consideradas positivas quando as bandas resultantes da análise de homo/heteroduplex apresentaram o mesmo padrão de migração e peso molecular das bandas detectadas nas amostras ao diagnóstico.

4.3.3 Avaliação da DRM por PCR quantitativa em tempo real

As amostras que apresentaram resultados discordantes entre as análises por CF e PCR, bem como número igual de amostras selecionadas aleatoriamente, foram encaminhadas para execução de RQ-PCR no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil Boldrini, Campinas/SP, que é referência para os estudos do GBTLI, mediante acordo de colaboração, sob os cuidados do Dr. José Andrés Yunes.

Após amplificação do DNA das amostras de MO pelos *primers* de consenso anteriormente descritos e detecção dos rearranjos de *Ig* e *TCR* pela análise de homo/heteroduplex, as bandas clonais foram retiradas do gel, os produtos de PCR foram dissolvidos em água e, a seguir, reamplificados com *primers* contendo caudas para os promotores virais T7 e M13. Foi realizado então o sequenciamento das regiões de rearranjo que apresentaram clonalidade e, a seguir, o desenho de *primers* específicos para cada paciente, para determinação quantitativa da DRM por RQ-PCR (van Dongen *et al.*, 2003; van der Velden *et al.*, 2007).

4.3.4 Análise estatística

O método de *Kaplan-Meier* foi utilizado para estimar as probabilidades de sobrevida global (SGLO) e de sobrevida livre de eventos (SLE). A SGLO foi definida como o tempo decorrido entre o diagnóstico e o óbito, independente da causa. A SLE foi definida como o tempo decorrido entre o diagnóstico e a ocorrência de qualquer um dos seguintes eventos: óbito ou ocorrência de recidiva da doença em qualquer sítio. O teste de *logrank* foi utilizado para comparação entre as curvas de sobrevida.

A possível associação entre variáveis categóricas e contínuas foi avaliada pelo teste exato de *Fisher* e pelos testes não paramétricos de *Mann-Whitney* ou *Kruskal Wallis*, respectivamente.

A análise de concordância entre os resultados obtidos na detecção de DRM pelos métodos de CF e PCR foi realizada pelo cálculo da taxa de concordância geral e pelo índice de *Kappa*. A seguinte classificação foi utilizada para interpretação do índice de *kappa*.

| Kappa | Avaliação |
|--------------|--------------------------|
| 0,00 a 0,20 | Concordância muito fraca |
| 0,21 a 0,40 | Concordância fraca |
| 0,41 a 0,60 | Concordância regular |
| 0,61 a 0,80 | Concordância boa |
| 0,81 a 1,00 | Concordância ótima |

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SPSS (*Statistical Program for the Social Sciences*) versão 21.0, tendo sido considerado como estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basso G, Buldini B, De Zen L, *et al.* New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica* 2001;86(7):675-692.

Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, *et al.* Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5168-5174.

Béné MC, Castoldi G, Knapp W, *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9:1783-1786.

Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukemiaNet. *Haematologica* 2009;94(8):1135-1150.

Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, *et al.* Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25:567-574.

Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999;38:139-152.

Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, *et al.* Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001;97(7):2115-2120.

Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23:347-358.

Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, *et al.* Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(1):52-58.

Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, *et al.* Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691-2696.

Coustan-Smith E, Song G, Clark C, *et al.* New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011;117(23):6267-6276.

Delbuono E, Maekawa YH, Latorre MRDO, *et al.* Simplified flow cytometric assay to detect minimal residual disease in childhood with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008;30(4):281-286.

Djokic M, Björklund E, Blennow E, *et al.* Overexpression of CD123 correlates with the hyperdiploid genotype in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2009; 94(7):1016-1019.

Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, *et al.* CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia* 2004;18:703-708.

Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, *et al.* Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible. *Cytometry Part B* 2008;74B:331-340.

Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, *et al.* Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW MRD Study Group. *Cytometry Part B* 2010;78B:147-153.

Dworzak MN, Panzer-Grümayer ER. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2003;44(9):1445-1455.

Gaipa G, Basso G, Biondi A, *et al.* Detection of minimal residual disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry Part B* 2013;84B:359-369.

Gaipa G, Basso G, Maglia O, *et al.* Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 2005;19:49-56.

Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, *et al.* Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012;97(10):1586-1593.

GBTLI (Grupo Brasileiro para o Tratamento das Leucemias da Infância). Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda da criança e do adolescente. *Soc Bras Oncol Pediatr* 2009 [versão revisada – 2011].

Irving J, Jesson J, Virgo P, *et al.* Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009;94(6):870-874.

Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, *et al.* Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997;11:2192–2199.

Lee RV, Braylan RC, Rimsza LM. CD58 expression decreases as nonmalignant B cells mature in bone marrow and is frequently overexpressed in adult and pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2005;123:119-124.

Luria D, Rosenthal E, Steinberg D, *et al.* Prospective comparison of two flow cytometry methodologies for monitoring minimal residual disease in a multicenter treatment protocol of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B* 2010;78B:365-371.

Malec M, Björklund E, Söderhäll S, *et al.* Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL. *Leukemia* 2001;15:716–727.

Mejstriková E, Fronková E, Kalina T, *et al.* Detection of residual B precursor lymphoblastic leukemia by uniform gating flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:62-70.

Patkar N, Alex AA, Bargavi B, *et al.* Standardizing minimal residual disease by flow cytometry for precursor B lineage acute lymphoblastic leukemia in a developing country. *Cytometry Part B* 2012;82B:252-258.

Porwit-MacDonald A, Björklund E, Lucio P, *et al.* BIOMED-1 Concerted Action report: flow cytometric characterization of CD7⁺ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000;14:816-825.

Ratei R, Basso G, Dworzak M, *et al.* Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2009;23:528-534.

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

van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17(12):2257-2317.

Veltroni M, De Zen L, Sanzari MC, *et al.* Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2003;88(11):1245-1252.

Wilson K, Case M, Minto L, *et al.* Flow minimal residual disease monitoring of candidate leukemic stem cells defined by the immunophenotype, CD34⁺ CD38^{low}CD19⁺ in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010;95(4):679-683.

5. Resultados

Foram inicialmente incluídos no estudo 47 pacientes com diagnóstico de LLA, admitidos no HC-UFMG no período entre setembro de 2013 e dezembro de 2016. Cinco pacientes foram excluídos das análises – dois evoluíram para o óbito durante o tratamento de indução da remissão; um foi transferido para tratamento em outro centro; e dois, por decisão dos pesquisadores responsáveis, por se tratarem de pacientes diagnosticados com recidiva de LLA. Assim, a população de estudo foi constituída por 42 pacientes com diagnóstico recente de LLA, que preencheram os critérios de inclusão.

Os participantes do estudo foram representados por 26 meninos e 16 meninas, com idades variáveis entre 1 e 17 anos (mediana: 7 anos). Trinta e cinco pacientes (83%) foram classificados como portadores de LLA de linhagem B e 7 pacientes (17%) como portadores de LLA de linhagem T. Considerando a classificação imunológica das leucemias agudas proposta pelo grupo EGIL, os casos de LLA-B foram caracterizados como 1 LLA pró-B, 15 LLA-B comum e 19 LLA pré-B; e os casos de LLA-T foram caracterizados como 3 LLA pré-T, 3 LLA-T cortical e 1 LLA-T madura.

De acordo com a estratificação de risco para recidiva da doença proposta pelo protocolo GBTLI LLA-2009, das 35 crianças com diagnóstico de LLA-B, 14 (40%) foram inicialmente classificadas como baixo risco (BR); 20 (57%) como alto risco (AR); e 1 (3%) apresentou positividade para o gene de fusão *BCR-ABL* (LLA-B Ph⁺), tendo sido submetida a protocolo de tratamento específico (**ANEXO 4**). Os 7 pacientes diagnosticados com LLA-T foram submetidos a protocolo de tratamento específico (**ANEXO 4**), preconizado em função do maior risco de recidiva da doença, associado ao acometimento da linhagem de células T. As características clínicas e biológicas da população de estudo estão descritas na **Tabela 3**.

Os dados completos, clínicos e laboratoriais, dos 42 pacientes que compõem a população de estudo são apresentados no **ANEXO 5**.

Tabela 3 – Descrição das características clínicas e biológicas da população de estudo

| Variável | Número (%) |
|--|------------|
| Sexo (n=42) | |
| Masculino | 26 (62) |
| Feminino | 16 (38) |
| Idade (n=42) | |
| 1-9 anos | 23 (55) |
| ≥ 9 anos | 19 (45) |
| Imunofenótipo (n=42) | |
| Linhagem B | 35 (83) |
| Linhagem T | 7 (17) |
| Global de leucócitos ao diagnóstico (n=42) | |
| < 50.000 cel/ μ L | 31 (74) |
| ≥ 50.000 cel/ μ L | 11 (26) |
| Estadiamento SNC* ao diagnóstico (n=42) | |
| SNC 1 | 29 (69) |
| SNC 2 | 4 (10) |
| SNC 3 | 2 (5) |
| PLT negativa | 6 (14) |
| PLT positiva | 1 (2) |
| Transcrito de fusão BCR-ABL (n=39) | |
| Positivo | 1 (3) |
| Negativo | 38 (97) |
| Transcrito de fusão MLL-AF4 (n=33) | |
| Positivo | 0 |
| Negativo | 33 (100) |
| Estratificação do risco ao diagnóstico - GBTLI-2009 (n=42) | |
| LLA B - Baixo Risco | 14 (33) |
| LLA B - Alto Risco | 20 (48) |
| LLA B - Ph ⁺ (presença do cromossoma Ph) | 1 (2) |
| LLA T (alto risco associado à linhagem T) | 7 (17) |

*SNC: sistema nervoso central; SNC 1: punção lombar não traumática, ausência de blastos; SNC 2: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos < 5/ μ L, presença de blastos; SNC 3: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos ≥ 5/ μ L, presença de blastos; PLT negativa: punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μ L), ausência de blastos; PLT positiva: punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μ L), presença de blastos.

5.1 Análise da DRM por citometria de fluxo

As amostras de medula óssea para acompanhamento do tratamento foram analisadas por CF no 15^o dia da quimioterapia (D15) em 41 dos 42 pacientes incluídos no estudo, sendo

esta avaliação estabelecida como rotina pelo Serviço de Hematologia do HC-UFMG. Um paciente (nº13) não teve amostra de MO colhida no D15, por decisão da equipe de médicos assistentes, pois apresentava contagem elevada de blastos em sangue periférico ($> 1.000/\mu\text{L}$). Amostras sequenciais foram analisadas no dia 35 do tratamento (D35) em 41/42 pacientes – um paciente não teve amostra de MO colhida para análise da DRM neste ponto (nº13). Na semana 12 do tratamento (D78 ou período correspondente), foram analisadas amostras de 25/42 pacientes para avaliação da DRM. A **Figura 3** apresenta o fluxograma das etapas executadas para a análise de DRM por CF nas amostras dos 42 pacientes incluídos no estudo.

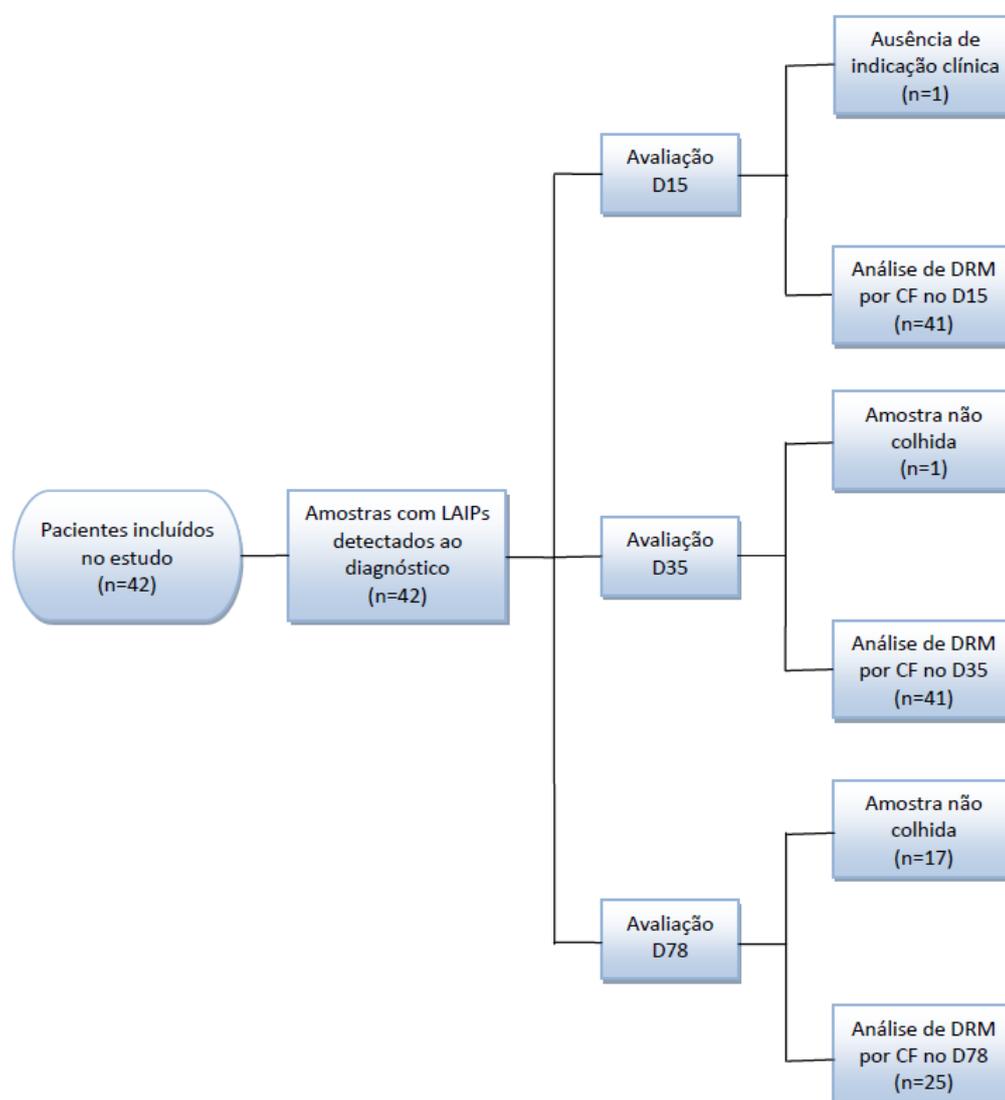


Figura 3– Fluxograma das etapas executadas para análise da DRM por citometria de fluxo nas amostras dos 42 pacientes estudados.

Para a detecção de DRM na LLA-B, os marcadores CD45, CD19, CD10 e/ou CD34 foram utilizados como estrutura fixa nas diferentes combinações de anticorpos. Dentre os marcadores aberrantes adicionais, os que mais frequentemente se mostraram úteis na distinção entre linfoblastos e células precursoras B normais foram o CD38, o CD123 e o CD58 (62,9%, 40% e 29% dos casos, respectivamente). A **Tabela 4** apresenta os marcadores aberrantes utilizados nos diversos painéis e as respectivas frequências de expressão, considerando a totalidade dos casos de LLA-B estudados (35 pacientes).

Tabela 4 – Frequência de expressão dos marcadores determinantes dos imunofenótipos associados à leucemia nos pacientes com LLA-B (n=35)

| Marcadores | Expressão antigênica aberrante | Frequência - número (%) |
|------------|--------------------------------|-------------------------|
| CD10 | superexpressão | 34 (97,1) |
| CD34 | superexpressão | 24 (68,6) |
| CD38 | expressão fraca* | 22 (62,9) |
| CD123 | superexpressão | 14 (40,0) |
| CD58 | superexpressão | 10 (29,0) |
| CD33 | expressão cruzada (mieloide) | 4 (11,4) |
| CD2 | expressão cruzada (linfoide T) | 3 (8,6) |
| CD7 | expressão cruzada (linfoide T) | 1 (2,9) |
| CD20/CD38 | expressão assincrônica | 1 (2,9) |

*Expressão fraca do CD38 nos linfoblastos em relação à forte intensidade de expressão do antígeno nas hematogônias.

Para a detecção de DRM na LLA-T, os marcadores CD45, CD3_{cy} (citoplasma), CD3_s (superfície), CD2 e/ou CD7 foram utilizados como estrutura fixa nos diferentes tubos, para definição das células linfoides T. Dentre os marcadores aberrantes adicionais, os que mais frequentemente se mostraram úteis na detecção dos linfoblastos T residuais foram o TdT (71,4% dos casos) e o CD99 (71,4% dos casos). A **Tabela 5** apresenta os marcadores aberrantes utilizados nos diversos painéis e as respectivas frequências de expressão, considerando o total de casos de LLA-T incluídos no estudo (n=7).

Tabela 5 – Frequência de expressão dos marcadores determinantes dos imunofenótipos associados à leucemia nos pacientes com LLA-T (n=7)

| Marcadores | Expressão antigênica aberrante | Frequência - número (%) |
|------------|--------------------------------|-------------------------|
| TdT | superexpressão nuclear | 5 (71,4) |
| CD99 | superexpressão | 5 (71,4) |
| CD34 | superexpressão | 2 (28,6) |
| CD1a | superexpressão | 2 (28,6) |
| CD79a | expressão cruzada (linfoide B) | 1 (14,3) |
| CD33 | expressão cruzada (mieloide) | 1 (14,3) |

A **Figura 4** ilustra exemplos de análises do presente estudo que utilizaram alguns dos marcadores aberrantes mais frequentes.

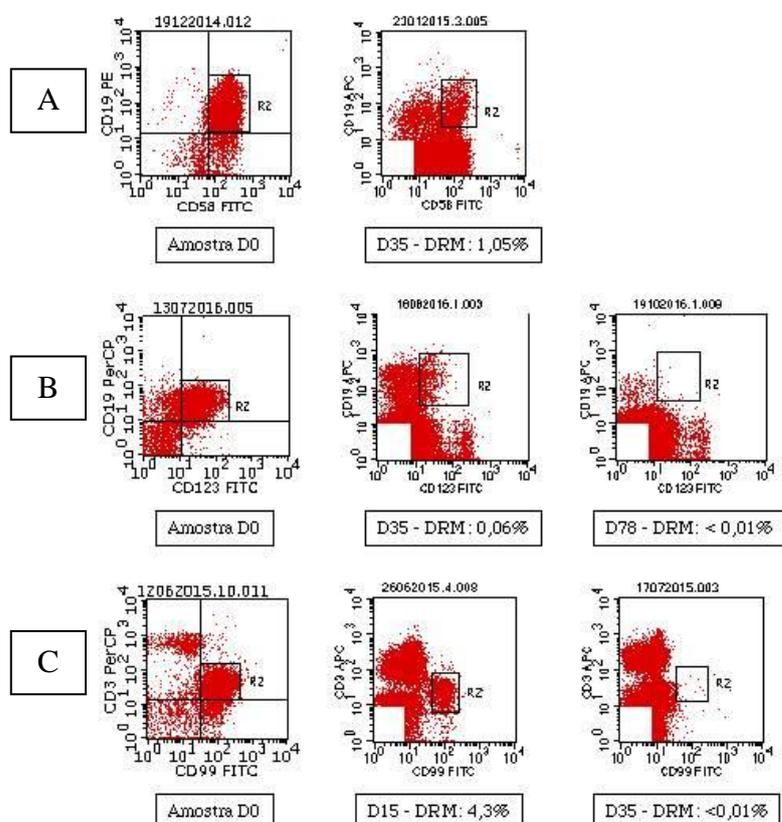


Figura 4 – Exemplos de detecção da DRM por citometria de fluxo, tendo como base o imunofenótipo aberrante detectado ao diagnóstico (amostra D0).

Painel A: análise de DRM no D35, em paciente com LLA-B (nº 20), com base na superexpressão do CD58; painel B: análise de DRM nos tempos D35 e D78, em paciente com LLA-B (nº 35), com base na superexpressão do CD123; painel C: análise de DRM nos tempos D15 e D35, em paciente com LLA-T (nº 25), com base na superexpressão do CD99. Os cálculos finais da DRM são apresentados acompanhando os respectivos gráficos; os resultados expressos como < 0,01% foram considerados negativos.

Cabe ressaltar que a combinação 10/34/45/19 entrou como constituinte do painel em 31/35 pacientes com LLA-B (88,6% dos casos). Dentre eles, oito apresentaram linfoblastos negativos para o CD34 ao diagnóstico, o que se mostrou útil na detecção de DRM nos pontos D35 e D78, por auxiliar na diferenciação entre blastos linfoides B e precursores B normais. Entretanto, dentre os casos que expressavam o CD34 ao diagnóstico, o tubo 10/34/45/19 não permitiu a distinção acurada entre linfoblastos B e hematogônias em 6/36 amostras (16,7%; 2 amostras do D35 e 4 amostras do D78), gerando resultados falso-positivos na análise de DRM. Nestes casos, a conclusão do resultado foi feita a partir de outras combinações de marcadores utilizadas. A **Figura 5** ilustra um resultado falso-positivo de DRM pela combinação 10/34/45/19, em uma amostra do D78 (paciente nº 29).

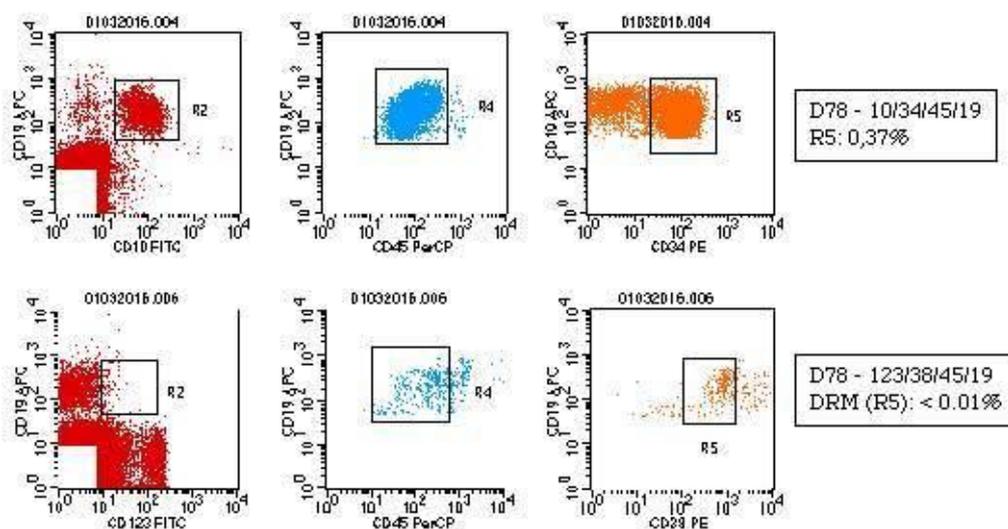


Figura 5 – Análise de DRM em amostra do D78 de paciente com LLA-B (nº 29), com o imunofenótipo inicial: CD45⁺ fraco, CD19⁺, CD10⁺, CD34⁺, CD123⁺, CD38⁺ fraco.

A combinação 10/34/45/19 (painel superior) identificou 0,37% de eventos com imunofenótipo aberrante semelhante ao LAIP; a combinação 123/38/45/19 (painel inferior) não confirmou este achado, quantificando os eventos aberrantes em níveis inferiores a 0,01% (resultado negativo da DRM). O resultado fornecido pela combinação 10/34/45/19 (0,37%) foi considerado falso-positivo, em decorrência da presença de precursores B normais (hematogônias) na amostra de MO em regeneração.

Na avaliação das amostras dos pontos D35 e D78, pelo menos duas combinações de anticorpos foram utilizadas em 58/66 (87,9%) análises e 3 ou 4 combinações foram utilizadas em 20/66 (30,3%) análises.

A análise da DRM foi considerada positiva quando um *cluster* de pelo menos 10 células com fenótipo aberrante foi encontrado, dentre o mínimo de 100.000 eventos adquiridos

em cada tubo, o que definiu a sensibilidade analítica de 10^{-4} . O número de eventos adquiridos situou-se entre 113.510 e 1.135.905 (média: 461.870) nas amostras do D15; entre 173.910 e 1.043.160 (média: 651.404) nas amostras do D35; e entre 119.925 e 1.011.645 (média: 729.466) nas amostras do D78.

Considerando o ponto de corte de 0,01% para definição de positividade, a DRM foi detectada em 36/41 amostras (87,8%) no D15, sendo 21 amostras positivas com resultados $\geq 0,01\%$ e $< 1\%$; 8 amostras positivas com resultados $\geq 1\%$ e $< 10\%$; e 7 amostras com DRM detectável em níveis $\geq 10\%$. Das amostras colhidas no D35, apenas 7/41 (17,1%) apresentaram DRM detectável, sendo 5 amostras positivas com resultados $\geq 0,01\%$ e $< 1\%$; 1 amostra com resultado $\geq 1\%$ e $< 10\%$; e 1 amostra com DRM detectável em níveis $\geq 10\%$. No D78, 7/25 (28%) amostras foram positivas, todas com resultados iguais ou inferiores a 0,1%.

De acordo com os critérios de reclassificação da estratificação de risco propostos pelo GBTLI-2009, dos 14 pacientes inicialmente classificados como LLA-B - BR, 12 (85,7%) permaneceram como tal, sendo na totalidade estratificados como baixo risco intermediário (BRI). Cabe ressaltar que este grupo incluiu um paciente que apresentou DRM negativa no D15, entretanto seguiu o protocolo preconizado para o subgrupo BRI, em função da evidência de infiltração testicular. Os outros 2 (14,3%) pacientes inicialmente classificados como LLA-B - BR foram reclassificados como alto risco – respondedor lento (AR-RL). Dos 20 pacientes inicialmente classificados como LLA-B - AR, 14 (70%) foram estratificados como alto risco – respondedor rápido (AR-RR) e 6 (30%) foram estratificados como AR-RL. O paciente portador do gene de fusão *BCR-ABL* foi estratificado no subgrupo respondedor lento (RL).

Dentre os 7 pacientes portadores de LLA-T, 4 (57,1%) foram estratificados no subgrupo respondedor rápido (RR) e 3 (42,9%) foram estratificados no subgrupo RL.

5.2 Avaliação da concordância entre as técnicas de CF e microscopia

Análise comparativa entre a avaliação morfológica da remissão medular por microscopia e a pesquisa da DRM por CF, no D15 do tratamento, revelou que dos 22 pacientes classificados como MO M1, 19 (86,4%) apresentaram DRM detectável no intervalo entre 0,01% e 10,01% (média: 0,99%). Todos os pacientes classificados como MO M2 (3 pacientes) e MO M3 (7 pacientes) apresentaram DRM positiva em proporções entre 1,5% e 19% (média: 7,8%) e 0,69% a 65% (média: 19%), respectivamente. Nove pacientes apresentaram resultados inconclusivos na avaliação morfológica, sendo que 7 (77,8%) deles apresentaram DRM detectável (0,01% a 21,8%; média 3,21%).

Na avaliação do D35 do tratamento, 40/42 pacientes tiveram resultados conclusivos da avaliação morfológica e pareados com as análises por CF. Destes, 39 pacientes foram classificados como MO M1, sendo que 5 (12,8%) deles apresentaram DRM positiva (0,01% a 1,14%; média: 0,41%); apenas 1 paciente foi classificado como MO M2, tendo apresentado DRM positiva, quantificada em 11,37%. As **Tabelas 6 e 7** mostram os resultados comparativos entre os métodos de CF e microscopia.

Tabela 6 – Comparação entre a avaliação morfológica do esfregaço de medula óssea e a DRM por citometria de fluxo das amostras colhidas no D15, nas 42 crianças estudadas

| ID | D15 - microscopia | D15 - CF qualitativa | D15 – CF quantitativa (%) Faixa (média) |
|--|-------------------------------------|----------------------|--|
| 3,5,7,9,10,11,12,15,16, 17,18,22,24,30,32,33, 38,41,42 | MO M1 | Positivo* | 0,01 a 10,01 (0,99) |
| 26,34,37 | MO M1 | Negativo** | < 0,01 |
| 8,20,21 | MO M2 | Positivo | 1,5 a 19 (7,8) |
| 4,6,14,23,25,31,40 | MO M3 | Positivo | 0,69 a 65 (19) |
| 1,2,19,28,29,35,39 | Inconclusivo/amostra hipocelular | Positivo | 0,01 a 21,8 (3,21) |
| 27,36 | Inconclusivo/amostra hipocelular | Negativo | < 0,01 |
| 13 | Não realizado | Não realizado | |

ID: identificação do paciente no banco de dados; D15: 15º dia da quimioterapia; CF: citometria de fluxo; MO M1: esfregaço de medula óssea com < 5% de linfoblastos; MO M2: esfregaço de medula óssea com 5 a 25% de linfoblastos; MO M3: esfregaço de medula óssea com > 25% de linfoblastos

*Citometria de fluxo positivo: $\geq 0,01\%$; **Citometria de fluxo negativo: $< 0,01\%$

Tabela 7 – Comparação entre a avaliação morfológica do esfregaço de medula óssea e a DRM por citometria de fluxo das amostras colhidas no D35, nas 42 crianças estudadas.

| ID | D35 - microscopia | D35 - CF qualitativa | D35 – CF quantitativa (%) Faixa (média) |
|---|-------------------------------------|----------------------|--|
| 7,19,20,35,40 | MO M1 | Positivo* | 0,01 a 1,14 (0,41) |
| 1,2,3,4,5,6,8,9,10,11, 14,15,16,17,18,21,22, 23,24,25,26,27,28,29, 30,32,33,34,36,37,38, 39,41,42 | MO M1 | Negativo** | |
| 13 | MO M1 | Não realizado | |
| 31 | MO M2 | Positivo | 11,37 |
| 12 | Inconclusivo/amostra hipocelular | Positivo | 0,01 |

ID: identificação do paciente no banco de dados; D35: 35º dia da quimioterapia; CF: citometria de fluxo; MO M1: esfregaço de medula óssea com < 5% de linfoblastos; MO M2: esfregaço de medula óssea com 5 a 25% de linfoblastos; MO M3: esfregaço de medula óssea com > 25% de linfoblastos

*Citometria de fluxo positivo: $\geq 0,01\%$; **Citometria de fluxo negativo: $< 0,01\%$

5.3 Análise da DRM por PCR

Foi possível fazer a análise de DRM por PCR em 40/42 pacientes – um paciente não teve amostra de MO colhida para triagem dos rearranjos clonais de *Ig* e/ou *TCR* ao diagnóstico e o outro não apresentou rearranjos clonais detectados na triagem, o que inviabilizou as análises das amostras do seguimento. A análise de DRM por PCR no D35 foi realizada em 38/40 pacientes – dois pacientes não tiveram amostra de MO colhida para o teste molecular ao final da indução. Na semana 12 do tratamento, foram analisados 25/40 pacientes – 15 pacientes não tiveram amostra de MO colhida neste tempo de avaliação. A **Figura 6** apresenta o fluxograma das etapas executadas para a análise de DRM por PCR nas amostras dos 42 pacientes incluídos no estudo.

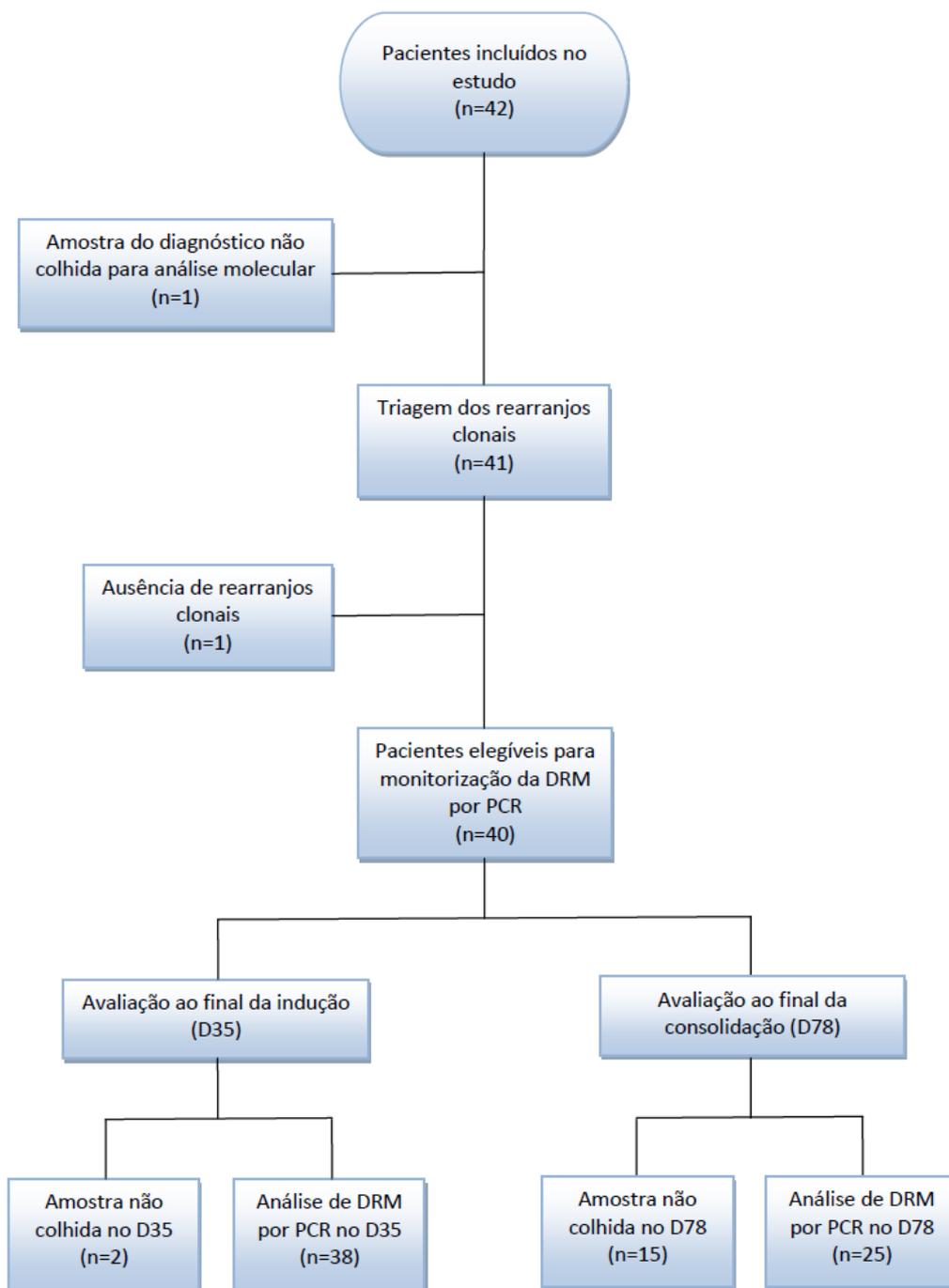


Figura 6– Fluxograma das etapas executadas para análise da DRM por PCR convencional nas amostras dos 42 pacientes estudados.

Dentre os 35 pacientes com LLA-B, um não teve amostra de MO colhida para o teste molecular ao diagnóstico. Dentre os 34 pacientes avaliados, pelo menos um rearranjo clonal de *Ig/TCR* foi identificado em 33 (97,1%); 20 pacientes (58,8%) apresentaram de 2 a 4 rearranjos clonais; e 7 pacientes (20,6%) apresentaram de 5 a 7 rearranjos clonais. O rearranjo mais frequentemente detectado na LLA-B foi de *IgH* (79,4% dos casos), seguido por *TCRD* (47,1%),

TCRG (41,2%) e *IgK* (35,3%). Dentre os rearranjos de *IgH*, os mais frequentes foram VH3, VH1 e VH7 (44,1%, 26,5% e 26,5% dos casos, respectivamente); dentre os rearranjos de *TCRD*, Vd2Dd3 foi o mais frequente, encontrado em 38,2% dos casos; e VgIf foi o principal representante de *TCRG*, presente em 26,5% dos casos. Os rearranjos de *IgK* (Vk1, Vk2, Vk3 e Intron) foram encontrados em frequências semelhantes (8,8 a 14,7% dos casos). A **Tabela 8** descreve as frequências dos rearranjos clonais detectados na LLA-B.

Tabela 8 - Frequência de rearranjos de *Ig/TCR* em 34 crianças com LLA-B

| Rearranjo clonal <i>Ig/TCR</i> | Frequência |
|--------------------------------|---------------|
| <i>IgH</i> | |
| VH1-FR2 | 9/34 (26,5%) |
| VH2-FR2 | 4/34 (11,8%) |
| VH3-FR2 | 15/34 (44,1%) |
| VH4-FR2 | 4/34 (11,8%) |
| VH5-FR2 | 4/34 (11,8%) |
| VH6-FR2 | 4/34 (11,8%) |
| VH7-FR2 | 9/34 (26,5%) |
| DH2 | 5/34 (14,7%) |
| DH3 | 3/34 (8,8%) |
| DH7 | 3/34 (8,8%) |
| <i>IgK</i> | |
| Vk1/6 | 4/34 (11,8%) |
| Vk2 | 4/34 (11,8%) |
| Vk3 | 3/34 (8,8%) |
| INTR | 5/34 (14,7%) |
| <i>TCRG</i> | |
| VgIf | 9/34 (26,5%) |
| Vg9 | 4/34 (11,8%) |
| Vg11 | 4/34 (11,8%) |
| <i>TCRD</i> | |
| Vd2Dd3 | 13/34 (38,2%) |
| Dd2Dd3 | 4/34 (11,8%) |

Ig: imunoglobulina; TCR: receptor de células T; LLA: leucemia linfóide aguda; IgH: imunoglobulina de cadeia pesada; IgK: imunoglobulina de cadeia leve *Kappa*; TCRG: receptor de células T *gamma*; TCRD: receptor de células T *delta*

Os 7 pacientes (100%) portadores de LLA-T apresentaram rearranjos clonais de *Ig/TCR* identificados ao diagnóstico – 3 pacientes apresentaram apenas 1 rearranjo e 4 pacientes apresentaram de 2 a 4 rearranjos clonais. O rearranjo mais frequente foi de *TCRG* (85,7% dos casos), seguido por *IgH* e *TCRD* em proporções iguais (42,9% dos casos) e, em seguida, *Sil-Tal*

(14,3% dos casos). VgIf foi o principal representante de *TCRG* e o único rearranjo que, isoladamente, sobressaiu em frequência na LLA-T, tendo sido detectado em 5/7 pacientes (71,4%). A **Tabela 9** descreve as frequências dos rearranjos clonais detectados na LLA-T.

Tabela 9 - Frequência de rearranjos de *Ig/TCR* em 7 crianças com LLA-T

| Rearranjo clonal <i>Ig/TCR</i> | Frequência |
|--------------------------------|-------------|
| <i>IgH</i> | |
| DH1 | 1/7 (14,3%) |
| DH4 | 1/7 (14,3%) |
| DH6 | 2/7 (28,6%) |
| <i>TCRG</i> | |
| VgIf | 5/7 (71,4%) |
| Vg10 | 2/7 (28,6%) |
| <i>TCRD</i> | |
| Vd1 | 2/7 (28,6%) |
| Vd2Dd3 | 1/7 (14,3%) |
| <i>SIL-TAL</i> | 1/7 (14,3%) |

Ig: imunoglobulina; TCR: receptor de células T; LLA: leucemia linfóide aguda; IgH: imunoglobulina de cadeia pesada; TCRG: receptor de células T *gamma*; TCRD: receptor de células T *delta*

Na monitorização da DRM por PCR, foram avaliados 38/42 (90,5%) pacientes no D35 e 25/42 (59,5%) pacientes no D78. A análise foi realizada com pelo menos 2 marcadores clonais em 28/38 (73,7%) amostras do D35 e em 21/25 (84%) amostras do D78. O resultado foi considerado positivo em 5/38 (13,2%) pacientes no D35, sendo 2/31 (6,5%) com LLA-B e 3/7 (42,9%) com LLA-T. Na análise do D78, a DRM se mostrou positiva em 3/25 (12%) pacientes, sendo 1/22 (4,5%) com LLA-B e 2/3 (66,7%) com LLA-T. A **Figura 7** ilustra a análise de DRM por PCR em dois pacientes monitorados nos pontos D35 e D78 (pacientes nº 6 e nº 13).

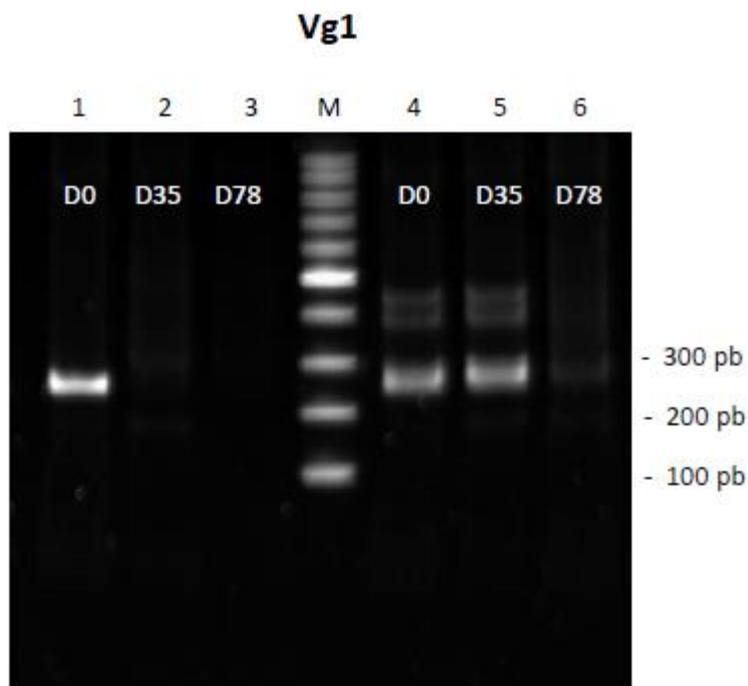


Figura 7 - Exemplo de avaliação da DRM através da detecção do rearranjo de *TCRG* (VgIf) por PCR convencional (análise homo/heteroduplex), com peso molecular esperado entre 200 e 255 pb.

Linhas 1, 2 e 3: paciente nº 6 (LLA-B) - amostra do diagnóstico (D0) e resultado negativo da pesquisa de DRM nos tempos D35 e D78, respectivamente. Linhas 4, 5 e 6: paciente nº 13 (LLA-T) - amostra do diagnóstico (D0) e resultado positivo da pesquisa de DRM nos tempos D35 e D78, respectivamente. Poliacrilamida 12%. M = marcador de peso molecular.

5.4 Avaliação da concordância entre as técnicas de CF e PCR

Avaliações pareadas de DRM por CF e PCR foram realizadas em 61/68 (89,7%) amostras de MO colhidas nos pontos D35 e D78. A taxa de concordância geral entre as duas metodologias foi de 88,5% (54/61 amostras). Foram observados 7 resultados discordantes, ocorridos em 3/37 amostras do D35 (taxa de concordância de 91,9%) e em 4/24 amostras do D78 (taxa de concordância de 83,3%). Os perfis de resultados das 68 amostras analisadas por CF e/ou PCR estão descritos nas **Tabelas 10 e 11**. Dos 7 resultados discordantes, 6 apresentaram resultados positivos por CF em níveis inferiores a 0,1% e negativos por PCR. Uma amostra do ponto D35 apresentou resultado positivo por PCR e negativo por CF. O índice de *Kappa*, utilizado para avaliar a intensidade de concordância entre os dois métodos, revelou boa concordância (índice de *Kappa* = 0,62; IC 95%, 0,23 – 1,01; $p < 0,001$) nas análises do D35 e regular (índice de *Kappa* = 0,52; IC 95%, 0,09 – 0,94; $p = 0,004$) nas análises do D78. Os dados da avaliação de concordância entre os métodos de CF e PCR estão descritos na **Tabela 12**.

Tabela 10 – Comparação entre a avaliação da DRM por citometria de fluxo e por PCR convencional das amostras colhidas no D35, nas 42 crianças estudadas

| ID | D35 CF | D35 PCR |
|---|---------------|---------------|
| 1,2,3,4,5,6,9,10,14,16,17,18,21,22,23,24,25,26,27,28,29, 30,32,33,34,36,37,38,39,41,42 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 7,31,40 | POSITIVO | POSITIVO |
| 8 | NEGATIVO | POSITIVO |
| 12,35 | POSITIVO | NEGATIVO |
| 19,20 | POSITIVO | NÃO REALIZADO |
| 11,15 | NEGATIVO | NÃO REALIZADO |
| 13 | NÃO REALIZADO | POSITIVO |

ID: identificação do paciente no banco de dados; D35: 35º dia de quimioterapia; CF: citometria de fluxo; PCR: reação em cadeia da polimerase

Tabela 11 – Comparação entre a avaliação da DRM por citometria de fluxo e por PCR convencional das amostras colhidas no D78 ou período equivalente, nas 26 crianças estudadas

| ID | D78 CF | D78 PCR |
|--|---------------|---------------|
| 12,14,15,16,17,18,24,26,29,30,35,36,37,38,39,41,42 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 13,32,40 | POSITIVO | POSITIVO |
| 5,6,21,27 | POSITIVO | NEGATIVO |
| 11 | NEGATIVO | NÃO REALIZADO |
| 20 | NÃO REALIZADO | NEGATIVO |

ID: identificação do paciente no banco de dados; D78: 78º dia de quimioterapia; CF: citometria de fluxo; PCR: reação em cadeia da polimerase

Tabela 12 – Avaliação de concordância entre os resultados da análise de DRM pelos métodos de CF e PCR, nos pontos D35 e D78

| | DRM – D35 | | | DRM – D78 | | |
|--------------------|--------------------------------|----------|-------|--------------------------------|----------|-------|
| | Negativo | Positivo | Total | Negativo | Positivo | Total |
| CF | | | | | | |
| Negativo | 31 | 1 | 32 | 17 | 0 | 17 |
| Positivo | 2 | 3 | 5 | 4 | 3 | 7 |
| Total | 33 | 4 | 37 | 21 | 3 | 24 |
| Kappa/p | 0,62 | | | 0,52 | | |
| | (IC 95%, 0,23-1,01; p < 0,001) | | | (IC 95%, 0,09-0,94; p = 0,004) | | |
| Concordância | 34/37 = 91,9% | | | 20/24 = 83,3% | | |
| Concordância geral | 54/61 = 88,5% | | | | | |

DRM: doença residual mínima; D35: 35º dia de quimioterapia; D78: 78º dia de quimioterapia; CF: citometria de fluxo; PCR: reação em cadeia da polimerase

Para esclarecimento dos resultados discordantes, foi viabilizada a realização de RQ-PCR dessas amostras e de outras 5 amostras com resultados concordantes, que serviram como “controle” do processo. As amostras “controle” apresentaram resultados da análise de DRM por RQ-PCR concordantes com os resultados obtidos por CF e PCR. Dentre as 7 amostras discordantes, a RQ-PCR confirmou os resultados da PCR convencional em 5 (4 amostras negativas e 1 positiva) e os resultados da CF em 2 amostras positivas. Os resultados das amostras analisadas pelas três metodologias estão expressos na **Tabela 13**.

Tabela 13 – Comparação entre as análises de DRM por citometria de fluxo, PCR convencional e RQ-PCR das 7 amostras com resultados discordantes, analisadas pelo Laboratório de Biologia Molecular do Centro Infantil Boldrini, Campinas/SP

| ID | Linhagem | Amostra | DRM por CF | DRM por PCR | DRM por RQ-PCR |
|----|----------|---------|---------------|-------------|----------------|
| 5 | LLA-B | D78 | POS (0,02%) | NEG | NEG (< 0,01%) |
| 6 | LLA-B | D78 | POS (0,10%) | NEG | POS (0,00118%) |
| 8 | LLA-B | D35 | NEG (< 0,01%) | POS | POS (0,00248%) |
| 12 | LLA-B | D35 | POS (0,01%) | NEG | NEG (< 0,01%) |
| 21 | LLA-B | D78 | POS (0,03%) | NEG | NEG (< 0,01%) |
| 27 | LLA-B | D78 | POS (0,02%) | NEG | NEG (< 0,001%) |
| 35 | LLA-B | D35 | POS (0,06%) | NEG | POS (0,209%) |

ID: identificação do paciente no banco de dados; LLA-B: leucemia linfóide aguda de linhagem B; D35: 35º dia da quimioterapia; D78: 78º dia de quimioterapia ou período equivalente; CF: citometria de fluxo; PCR: reação em cadeia da polimerase; RQ-PCR: PCR quantitativa em tempo real; POS: positivo; NEG: negativo

Cabe ressaltar que uma das amostras do D78 enviada como “controle” se refere a um paciente posteriormente excluído das análises, por se tratar de um diagnóstico de recidiva de LLA. Outras duas amostras (D35 e D78), com resultados positivos concordantes entre CF e PCR convencional, também enviadas como “controles”, não tiveram as análises de RQ-PCR realizadas - uma por inadequação da amostra enviada e outra por baixa sensibilidade dos *primers* testados (< 10⁻³).

5.5 Avaliação da associação entre os resultados de DRM e outros fatores prognósticos em LLA infantil

A análise de associação entre os resultados de DRM por CF e PCR, nos pontos D35 e D78, e diferentes fatores clínicos e biológicos determinantes do prognóstico em LLA infantil revelou associação significativa apenas entre linhagem celular acometida e DRM por PCR, nos

dois pontos de avaliação (D35: $p = 0,037$; D78: $p = 0,032$). Para as análises envolvendo o fator “linhagem celular”, optou-se por excluir o paciente portador do gene de fusão *BCR-ABL*. Foi verificado que, no D35, apenas 6,7% dos pacientes com LLA-B apresentaram resultado positivo da DRM por PCR, enquanto, no grupo com LLA-T, 42,9% apresentaram DRM positiva. Na avaliação do D78, o resultado da DRM por PCR foi negativo na maioria dos pacientes com LLA-B (95,2%) e positivo na maioria dos pacientes com LLA-T (66,7%). Não foram verificadas associações significativas entre os resultados de DRM e os demais fatores prognósticos avaliados - idade, contagem de leucócitos ao diagnóstico (2 e 3 categorias) e envolvimento do SNC. As análises de associação entre os resultados da DRM e os fatores prognósticos estão descritas nas **Tabelas 14** (D35) e **15** (D78).

Tabela 14 – Análise de associação entre a avaliação de DRM no ponto D35, por CF e PCR, e fatores clínicos e biológicos determinantes do prognóstico em LLA infantil

| Variáveis | DRM D35 - CF | | | DRM D35 - PCR | | |
|--|--------------|-----------|-------|---------------|-----------|-------|
| | Negativo | Positivo | Total | Negativo | Positivo | Total |
| Idade | | | | | | |
| < 9 anos | 19 (82,6%) | 4 (17,4%) | 23 | 19 (90,5%) | 2 (9,5%) | 21 |
| ≥ 9 anos | 15 (83,3%) | 3 (16,7%) | 18 | 14 (82,4%) | 3 (17,6%) | 17 |
| Total | 34 (82,9%) | 7 (17,1%) | 41 | 33 (86,8%) | 5 (13,2%) | 38 |
| p | | 1,000 | | | 0,640 | |
| Linhagem celular acometida* | | | | | | |
| Linhagem B | 29 (85,3%) | 5 (14,7%) | 34 | 28 (93,3%) | 2 (6,7%) | 30 |
| Linhagem T | 4 (66,7%) | 2 (33,3%) | 6 | 4 (57,1%) | 3 (42,9%) | 7 |
| Total | 33 (82,5%) | 7 (17,5%) | 40 | 32 (86,5%) | 5 (13,5%) | 37 |
| p | | 0,279 | | | 0,037 | |
| Contagem de leucócitos ao diagnóstico (cel/μL) – 2 categorias | | | | | | |
| < 50.000 | 25 (80,6%) | 6 (19,4%) | 31 | 24 (88,9%) | 3 (11,1%) | 27 |
| ≥ 50.000 | 9 (90%) | 1 (10%) | 10 | 9 (81,8%) | 2 (18,2%) | 11 |
| Total | 34 (82,9%) | 7 (17,1%) | 41 | 33 (86,8%) | 5 (13,2%) | 38 |
| p | | 0,660 | | | 0,615 | |
| Contagem de leucócitos ao diagnóstico (cel/μL) – 3 categorias | | | | | | |
| < 50.000 | 25 (80,6%) | 6 (19,4%) | 31 | 24 (88,9%) | 3 (11,1%) | 27 |
| 50.000 —100.000 | 4 (100%) | 0 (0%) | 4 | 4 (100%) | 0 (0,0%) | 4 |
| ≥ 100.000 | 5 (83,3%) | 1 (16,7%) | 6 | 5 (71,4%) | 2 (28,6%) | 7 |
| Total | 34 (82,9%) | 7 (17,1%) | 41 | 33 (86,8%) | 5 (13,2%) | 38 |
| p | | 1,000 | | | 0,291 | |
| Envolvimento do sistema nervoso central | | | | | | |
| Negativo | 32 (84,2%) | 6 (15,8%) | 38 | 31 (88,6%) | 4 (11,4%) | 35 |
| Positivo | 2 (66,7%) | 1 (33,3%) | 3 | 2 (66,7%) | 1 (33,3%) | 3 |
| Total | 34 (82,9%) | 7 (17,1%) | 41 | 33 (86,8%) | 5 (13,2%) | 38 |
| p | | 0,439 | | | 0,353 | |

DRM: doença residual mínima; D35: 35º dia da quimioterapia; CF: citometria de fluxo; PCR: reação em cadeia da polimerase

* A análise de associação com o fator linhagem celular acometida foi feita após exclusão do paciente portador do gene de fusão *BCR-ABL*

Nota: a probabilidade de significância (p) refere-se ao teste exato de Fisher

Tabela 15 – Análise de associação entre a avaliação de DRM no ponto D78, por CF e PCR, e fatores clínicos e biológicos determinantes de prognóstico em LLA infantil

| Variáveis | DRM D78 - CF | | | DRM D78 - PCR | | |
|--|--------------|-----------|-------|---------------|-----------|-------|
| | Negativo | Positivo | Total | Negativo | Positivo | Total |
| Idade | | | | | | |
| < 9 anos | 10 (71,4%) | 4 (28,6%) | 14 | 13 (92,9%) | 1 (7,1%) | 14 |
| ≥ 9 anos | 8 (72,7%) | 3 (27,3%) | 11 | 9 (81,8%) | 2 (18,2%) | 11 |
| Total | 18 (72%) | 7 (28%) | 25 | 22 (88%) | 3 (12%) | 25 |
| p | | 1,000 | | | 0,565 | |
| Linhagem celular acometida * | | | | | | |
| Linhagem B | 16 (76,2%) | 5 (23,8%) | 21 | 20(95,2%) | 1 (4,8%) | 21 |
| Linhagem T | 1 (33,3%) | 2 (66,7%) | 3 | 1 (33,3%) | 2 (66,7%) | 3 |
| Total | 17 (70,8%) | 7 (29,2%) | 24 | 21 (87,5%) | 3 (12,5%) | 24 |
| p | | 0,194 | | | 0,032 | |
| Contagem de leucócitos ao diagnóstico (cel/μL) – 2 categorias | | | | | | |
| < 50.000 | 15 (78,9%) | 4 (21,1%) | 19 | 17 (89,5%) | 2 (10,5%) | 19 |
| ≥ 50.000 | 3 (50%) | 3 (50%) | 6 | 5 (83,3%) | 1 (16,7%) | 6 |
| Total | 18 (72%) | 7 (28%) | 25 | 22 (88%) | 3 (12%) | 25 |
| p | | 0,298 | | | 1,000 | |
| Contagem de leucócitos ao diagnóstico (cel/μL) – 3 categorias | | | | | | |
| < 50.000 | 15 (78,9%) | 4 (21,1%) | 19 | 17 (89,5%) | 2 (10,5%) | 19 |
| 50.000 —100.000 | 2 (66,7%) | 1 (33,3%) | 3 | 3 (100%) | 0 (0,0%) | 3 |
| ≥ 100.000 | 1 (33,3%) | 2 (66,7%) | 3 | 2 (66,7%) | 1 (33,3%) | 3 |
| Total | 18 (72%) | 7 (28%) | 25 | 22 (88%) | 3 (12%) | 25 |
| p | | 0,339 | | | 0,579 | |
| Envolvimento do sistema nervoso central | | | | | | |
| Negativo | 16 (69,6%) | 7 (30,4%) | 23 | 20 (87%) | 3 (13%) | 23 |
| Positivo | 2 (100%) | 0 (0,0%) | 2 | 2 (100%) | 0 (0%) | 2 |
| Total | 18 (72%) | 7 (28%) | 25 | 22 (88%) | 3 (12%) | 25 |
| p | | 1,000 | | | 1,000 | |

DRM: doença residual mínima; D78: 78º dia da quimioterapia; CF: citometria de fluxo; PCR: reação em cadeia da polimerase

* A análise de associação com o fator linhagem celular acometida foi feita após exclusão do paciente portador do gene de fusão *BCR-ABL*

Nota: a probabilidade de significância (p) refere-se ao teste exato de Fisher

5.6 Avaliação da influência da detecção de DRM e de outros fatores prognósticos nas probabilidades de sobrevida global e livre de eventos

Do total de pacientes incluídos no estudo, 7/42 (16,7%) apresentaram recidiva da doença – 3 com diagnóstico de LLA-T (2 RR e 1 RL) e 4 com LLA-B – um estratificado como BRI, dois estratificados como AR (1 AR-RR e 1 AR-RL) e um portador do gene de fusão *BCR-ABL*. Quatro pacientes apresentaram recidiva isolada de MO e 3 apresentaram recidiva combinada de MO e SNC. A DRM foi avaliada no D15 em 6 destes pacientes, sendo positiva em todos eles. Na análise do D35 por CF, a DRM foi negativa nos 6 pacientes avaliados. Os 7 pacientes foram avaliados por PCR no D35, sendo que 6 apresentaram resultados negativos, concordantes com a CF, e apenas um apresentou DRM detectável, entretanto, sem análise pareada por CF. A DRM foi avaliada no D78 por CF em 4 destes pacientes, tendo apresentado resultado positivo em 2 deles. A análise por PCR foi concordante em apenas um destes resultados positivos. A amostra que apresentou discordância de resultados foi avaliada por RQ-PCR, que confirmou a positividade da análise por CF. Dos 7 pacientes que apresentaram recaída, 5 evoluíram para o óbito, no intervalo entre 1 e 6 meses após o diagnóstico da recidiva. Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes que evoluíram com recidiva da LLA estão descritos na **Tabela 16**. Cabe relatar ainda que um paciente com LLA-T não entrou em remissão medular e evoluiu para o óbito, oito meses após o diagnóstico inicial.

Tabela 16 – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes que evoluíram com recidiva da LLA

| ID | Classif | Risco | Recidiva | Óbito | DRM | | | | | |
|----|---------|--------|----------|-------|-------|--------|-----|--------|-----|-------------------|
| | | | | | D15 | | D35 | | D78 | |
| | | | | | CF* | CF* | PCR | CF* | PCR | RQ-PCR |
| 2 | LLA-B | BRI | MO/SNC | Não | 0,08% | <0,01% | NEG | NR | NR | NR |
| 3 | LLA-T | RR | MO/SNC | Sim | 0,02% | <0,01% | NEG | NR | NR | NR |
| 6 | LLA-B | AR-RL | MO | Sim | 65% | <0,01% | NEG | 0,10% | NEG | POS (0,00118%) |
| 13 | LLA-T | RL | MO | Sim | NR | NR | POS | 0,04% | POS | NR |
| 14 | LLA-B | Ph+ RL | MO | Sim | 5,54% | <0,01% | NEG | <0,01% | NEG | NR |
| 18 | LLA-B | AR-RR | MO | Sim | 0,53% | <0,01% | NEG | <0,01% | NEG | NR |
| 25 | LLA-T | RR | MO/SNC | Não | 1,30% | <0,01% | NEG | NR | NR | NR |

LLA: leucemia linfóide aguda; ID: identificação do paciente no banco de dados; Classif: classificação da doença quanto à linhagem celular; D15: 15º dia de quimioterapia; D35: 35º dia de quimioterapia; D78: 78º dia de quimioterapia ou período equivalente; CF: citometria de fluxo; PCR: reação em cadeia da polimerase; RQ-PCR: PCR quantitativa em tempo real; BRI: baixo risco intermediário; RR: respondedor rápido; AR-RL: alto risco - respondedor lento; RL: respondedor lento; Ph+ RL: cromossomo Philadelphia positivo - respondedor lento; AR-RR: alto risco – respondedor rápido; SNC: sistema nervoso central; MO: medula óssea; POS: positivo; NEG: negativo; NR: não realizado

*DRM < 0,01% corresponde a resultado negativo da CF

O tempo de seguimento clínico dos pacientes variou de 6 a 46 meses (mediana: 27 meses). A probabilidade estimada de sobrevida global (SGLO) aos 3,8 anos, para os 42 pacientes incluídos no estudo, foi de 75,1% (\pm 9,9%). A probabilidade estimada de sobrevida livre de eventos (SLE), aos 3,8 anos, foi de 50,5% (\pm 21,4%). As **Figuras 8 e 9** mostram o comportamento dos pacientes em relação à SGLO e SLE, respectivamente.

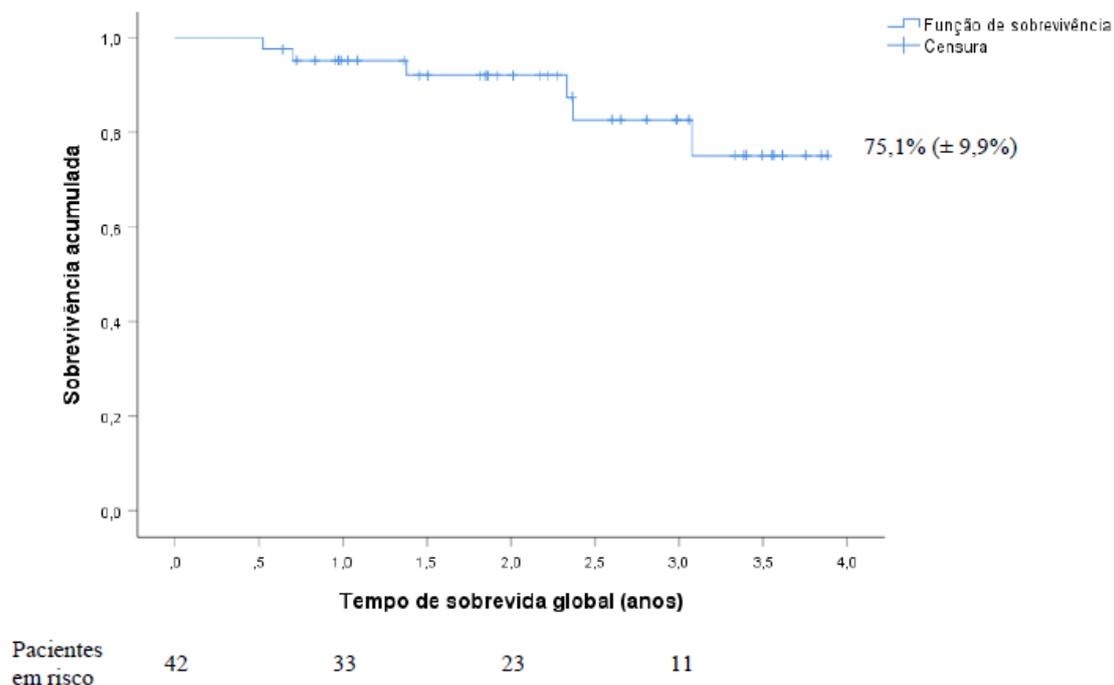


Figura 8 - Probabilidade de sobrevida global para 42 pacientes com diagnóstico de LLA

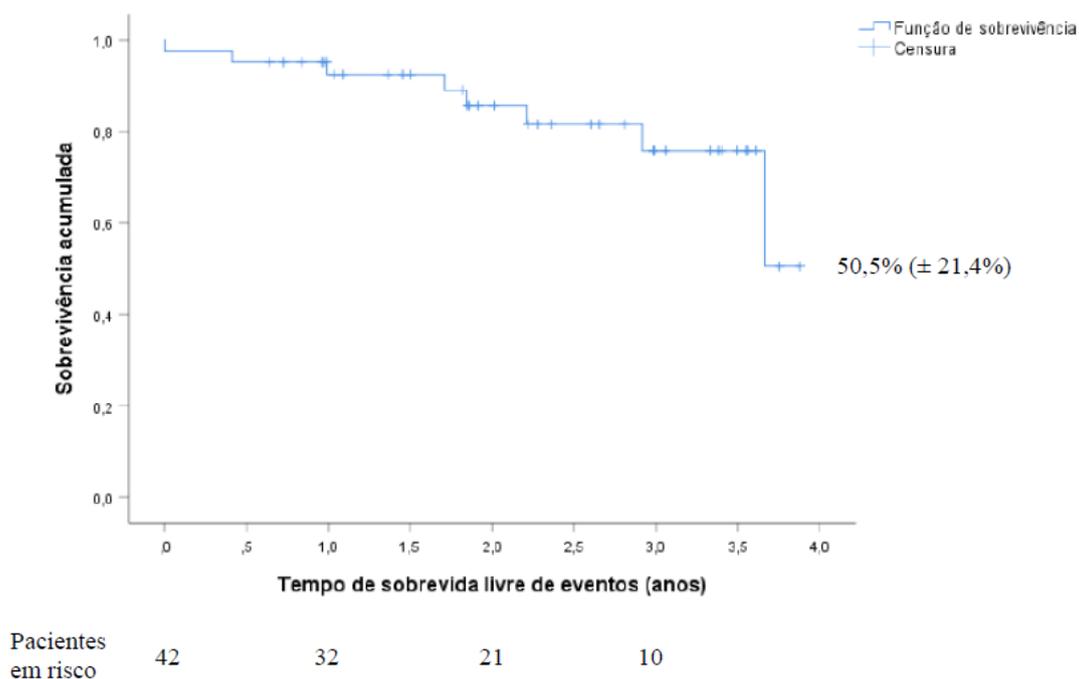


Figura 9 - Probabilidade de sobrevida livre de eventos para 42 pacientes com diagnóstico de LLA

Para a análise de sobrevida considerando o fator linhagem celular, optou-se por excluir o paciente portador do gene de fusão *BCR-ABL*. O grupo de pacientes com LLA-T apresentou probabilidade de sobrevida global de 53,6% (\pm 20,1%), significativamente menor à

probabilidade estimada dos pacientes com LLA-B ($88,5 \pm 7,6\%$; $p = 0,001$), conforme demonstrado na **Figura 10**. Uma menor SGLO foi também identificada no grupo com contagem de leucócitos ao diagnóstico igual ou superior a $50.000 \text{ cel}/\mu\text{L}$ ($35,8 \pm 2,63\%$), quando comparado aos pacientes com menos de $50.000 \text{ cel}/\mu\text{L}$ ($85,9 \pm 9,5\%$; $p = 0,0001$), conforme ilustrado pela **Figura 11**. Os demais fatores prognósticos avaliados (idade, $p = 0,160$; estratificação inicial do risco, $p = 0,131$; e detecção de DRM nos tempos D15 por CF, $p = 0,705$; D35 por CF, $p = 0,334$; D35 por PCR, $p = 0,683$; e D78 por CF, $p = 0,328$) não influenciaram de forma significativa a SGLO dos pacientes estudados, até o momento da análise. As análises da probabilidade de SGLO em relação à detecção de DRM no D78 por PCR e ao envolvimento do SNC não foram realizadas, em função do pequeno número de casos nos grupos com PCR positivo e acometimento do SNC, ambos com menos de cinco casos, o que torna inadequada a realização de curvas de sobrevida.

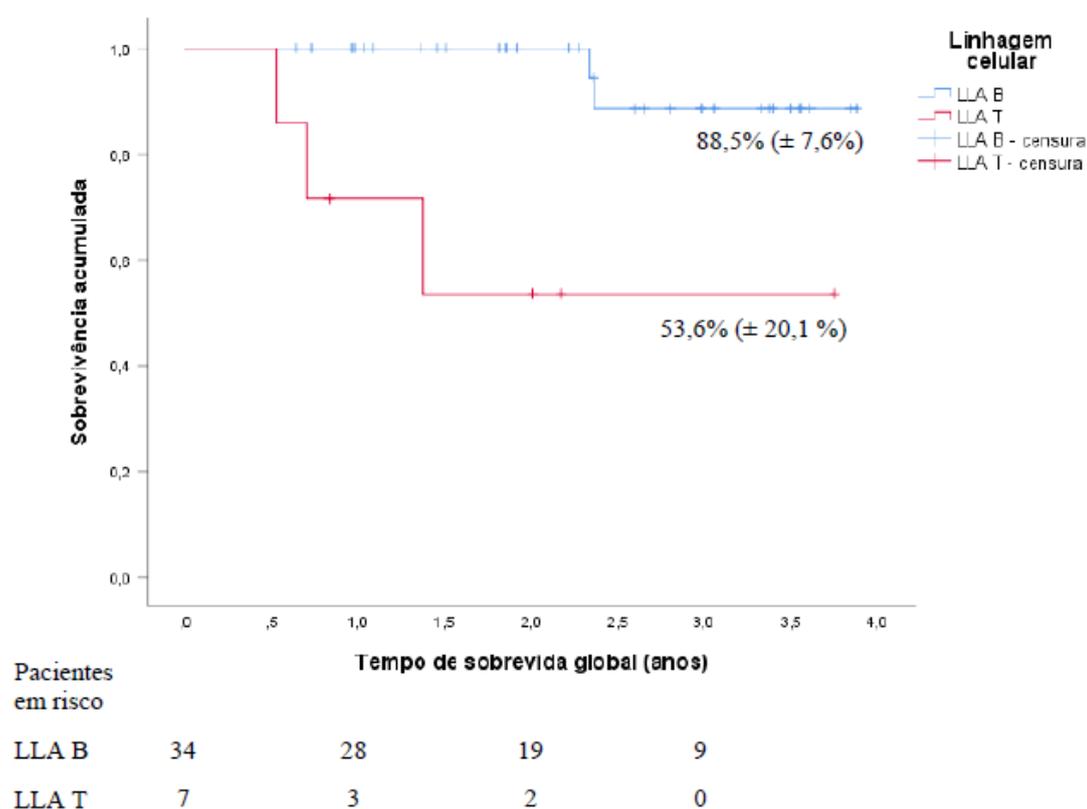


Figura 10 - Probabilidade de sobrevida global (SGLO) para 41 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com a linhagem celular acometida ($p = 0,001$).

Nota: o paciente classificado como LLA-B - Ph^+ (presença do cromossoma Ph) foi excluído da análise.

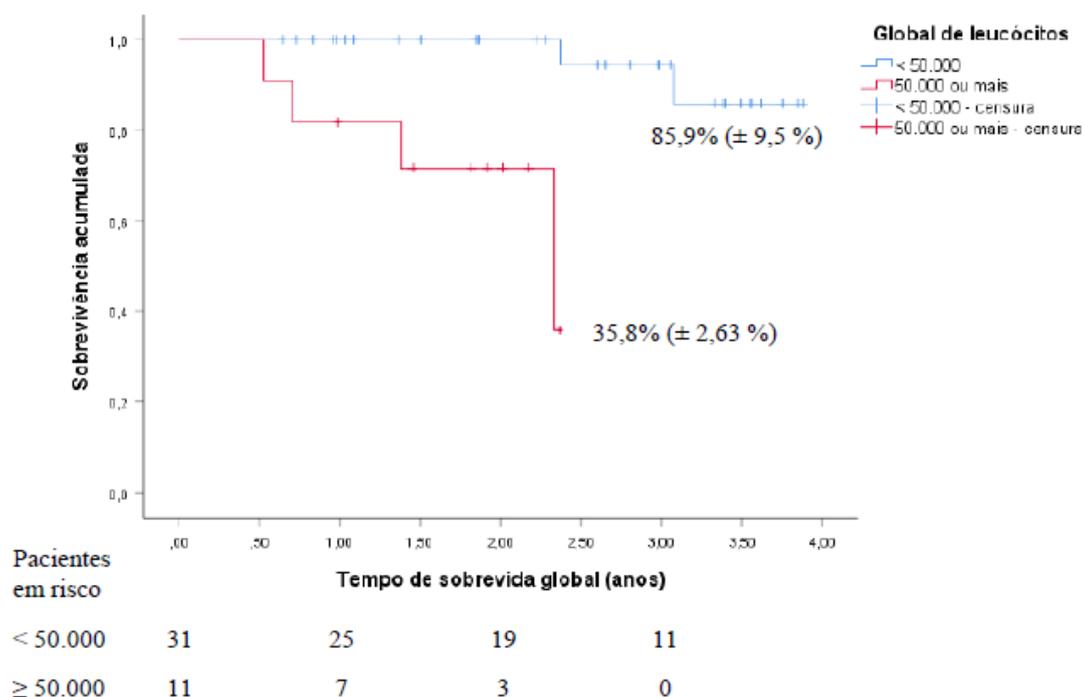


Figura 11 - Probabilidade de sobrevida global (SGLO) para 42 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com a contagem global de leucócitos ao diagnóstico ($p = 0,0001$)

Os pacientes com LLA de linhagem B apresentaram SLE significativamente superior àqueles com LLA-T ($p = 0,001$), conforme pode ser visto na **Figura 12**. Maior probabilidade de SLE foi também observada no grupo de pacientes com contagem de leucócitos ao diagnóstico inferior a 50.000 cel/ μ L, em relação ao grupo com leucometria igual ou superior a 50.000 cel/ μ L ($p = 0,00009$), conforme demonstrado na **Figura 13**. A probabilidade de SLE não foi avaliada em relação à detecção de DRM no D78 por PCR e ao envolvimento do SNC, pelo mesmo motivo relatado na análise da SGLO. Os demais fatores prognósticos avaliados (idade, $p = 0,231$; estratificação inicial do risco, $p = 0,671$; e detecção de DRM nos tempos D15 por CF, $p = 0,582$; D35 por CF, $p = 0,336$; D35 por PCR, $p = 0,664$; e D78 por CF, $p = 0,271$) não influenciaram de forma significativa a SLE dos pacientes estudados, até o momento da análise.

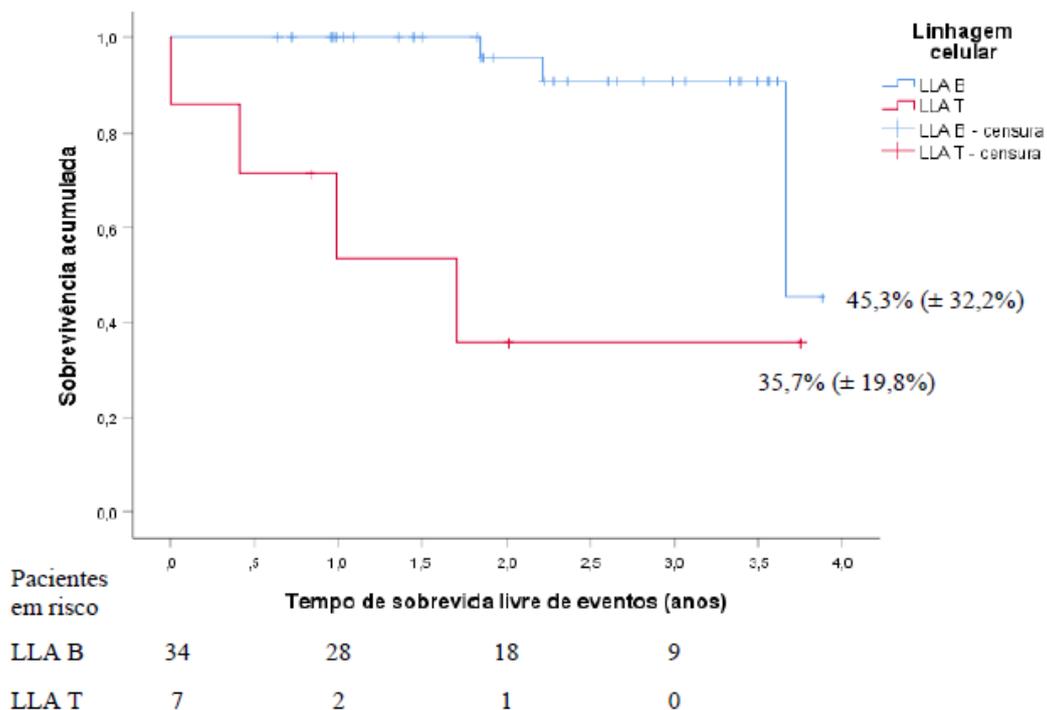


Figura 12 - Probabilidade de sobrevida livre de eventos (SLE) para 41 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com a linhagem celular acometida ($p = 0,001$).

Nota: o paciente classificado como LLA-B - Ph^+ (presença do cromossoma Ph) foi excluído da análise.

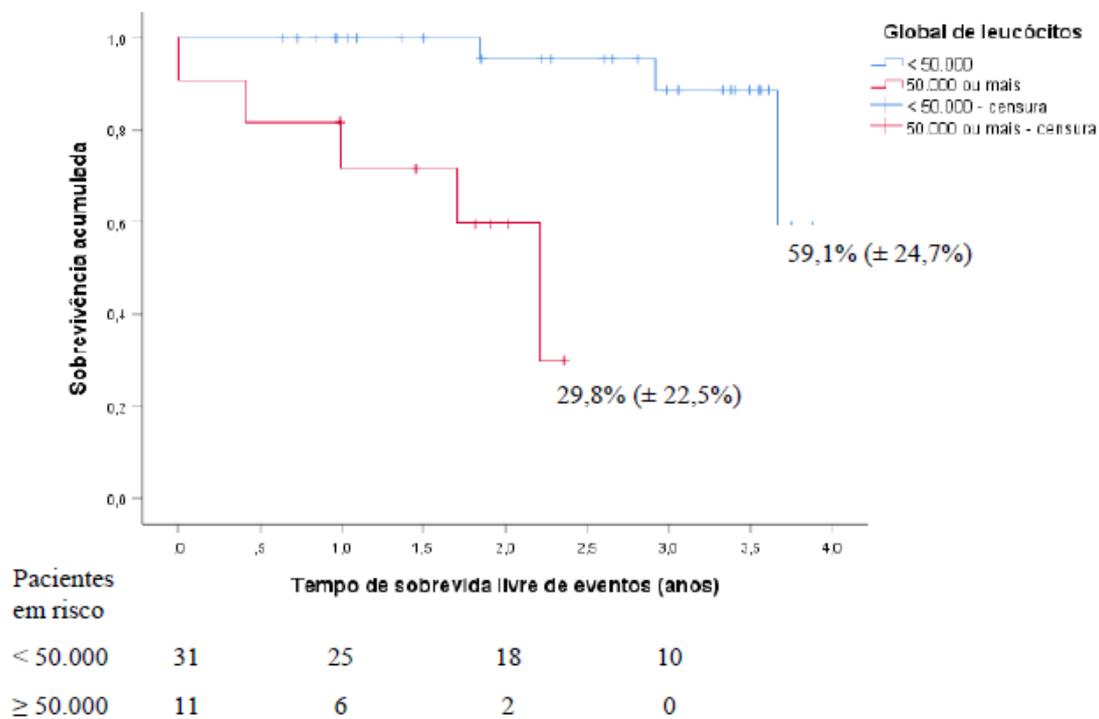


Figura 13 - Probabilidade de sobrevida livre de eventos (SLE) para 42 pacientes diagnosticados com LLA, de acordo com a contagem global de leucócitos ao diagnóstico ($p = 0,00009$).

6. Discussão

Este estudo teve como objetivo principal a comparação de resultados obtidos pelas metodologias de CF e PCR convencional, na análise de DRM, em amostras de MO colhidas em dois pontos de monitorização do tratamento quimioterápico da LLA infantil, previstos pelo protocolo GBTLI LLA-2009 (D35 e D78). Em um primeiro momento, cabe considerar que os dois métodos apresentam limites de sensibilidade analítica distintos, sendo a CF mais sensível do que a PCR (10^{-4} e 10^{-2} a 10^{-3} , respectivamente). Quanto à sensibilidade dos ensaios de CF para a detecção de DRM, a literatura relata que este é um parâmetro que depende essencialmente do número total de células adquiridas e analisadas, mas também de fatores como o grau de aberrância da célula neoplásica detectada ao diagnóstico e a presença de *background* de precursores B normais nas amostras de acompanhamento (Coustan-Smith *et al.*, 2010; Borowitz *et al.*, 2015; Wood, 2016). Neste estudo, a aquisição do número mínimo de 100.000 células em cada amostra processada (médias de 651.404 e 729.466 células nos tempos D35 e D78, respectivamente) permitiu alcançar o limite de sensibilidade analítica de 10^{-4} , considerando a estratégia de análise previamente descrita por vários autores (Malec *et al.*, 2001; Béné *et al.*, 2009; Luria *et al.*, 2010; Thörn *et al.*, 2011; Gaipa *et al.*, 2012). Adicionalmente, a pesquisa ampliada de marcadores aberrantes ao diagnóstico propiciou a construção de painéis informativos para a detecção de DRM, o que possibilitou a distinção entre linfoblastos leucêmicos e hematogônias, na grande maioria das amostras analisadas.

No presente estudo, foi verificado maior poder de detecção de blastos residuais pela CF, em comparação com a análise por microscopia, o que reforça a essência da pesquisa de DRM, que se propõe a detectar blastos residuais não identificados pela análise morfológica. Nesta casuística, a avaliação de DRM por CF forneceu vários resultados positivos em amostras de MO consideradas em remissão pela morfologia e permitiu, ainda, a análise robusta de amostras consideradas inconclusivas pela microscopia, demonstrando o seu melhor desempenho na monitorização do tratamento da LLA.

Por outro lado, as análises de correlação entre os resultados de DRM obtidos pelos métodos de CF e PCR convencional revelaram alta concordância geral entre os dois métodos, nos dois pontos de coleta avaliados. Este resultado foi corroborado pelos índices de *Kappa*, que classificaram as intensidades de concordância como boa e regular, nas análises dos tempos D35 e D78, respectivamente. Os resultados discordantes, verificados em 7/61 amostras, foram esclarecidos pelo método de RQ-PCR, considerado padrão ouro para a detecção de DRM. Assim, foram identificados dois resultados falso-negativos da DRM por PCR convencional e cinco resultados falsos da DRM por CF (um resultado falso-negativo e quatro resultados falso-

positivos). Os resultados falso-negativos foram atribuídos ao limite de sensibilidade analítica dos métodos. Cabe ressaltar que as amostras que apresentaram resultados falso-negativos por PCR (pacientes nº 6 e 35) foram avaliadas com o uso de, pelo menos, três marcadores moleculares que, por sua vez, apresentaram interpretações concordantes, descartando possíveis falhas de análise. Quanto aos resultados falso-positivos da CF (pacientes nº 5, 12, 21 e 27), merece destaque o fato de que demonstraram a presença de blastos residuais em proporções muito baixas (0,01 a 0,03%), próximas ao ponto de corte. Revisão retrospectiva destas análises revelou os seguintes erros analíticos como prováveis determinantes dos resultados falsos: 1 - baixa viabilidade celular, definida pela marcação com o corante *SYTO 13* (< 60%), o que gerou um fator de correção elevado no cálculo da DRM, superestimando o resultado em duas amostras; 2 - caracterização errônea de células com o imunofenótipo CD19⁺, CD10⁺, CD45⁺ fraco e CD34⁻ como blastos residuais, quando poderiam representar hematogônias em processo de maturação, em duas amostras; 3 - dificuldade de distinção do CD38 fraco a moderado, característico dos blastos, daquele de forte intensidade, característico das hematogônias, em duas amostras. Em estudo recente publicado por Theunissen e colaboradores (2017), que compararam a análise de DRM por CF de alta sensibilidade e RQ-PCR, de 17 resultados discordantes dentre 227 amostras analisadas, 6 (35%) foram associados a falhas de interpretação dos dados de CF. Os autores consideraram que a interpretação dos dados de CF depende da experiência técnica dos profissionais envolvidos e também das características da população celular suspeita - tamanho, homogeneidade e grau de aberrância das células neoplásicas.

Considerando as questões metodológicas envolvidas na detecção de DRM por CF, foi verificada, neste estudo, falso-positividade do tubo 10/34/45/19 em 6/36 (16,7%) amostras colhidas nos tempos D35 e D78, em decorrência da dificuldade de distinção entre linfoblastos B e hematogônias. Esta ocorrência é esperada e amplamente descrita na literatura, que define que a análise de DRM por CF em amostras colhidas em fases de regeneração medular (final da indução da remissão e final da consolidação da remissão) requer o uso de painel amplo de anticorpos, para distinção acurada entre linfoblastos residuais e precursores B normais. Desta forma, este achado reforça a necessidade de utilização de outros marcadores, que permitam melhor caracterização do imunofenótipo aberrante da célula neoplásica, garantindo resultados confiáveis (Lúcio *et al.*, 1999; Béné *et al.*, 2009; Brüggemann *et al.*, 2010; Coustan-Smith *et al.*, 2010; Gaipa *et al.*, 2013). Nestes casos, os resultados foram concluídos como negativos a partir da avaliação dos marcadores CD123 (4 amostras), CD38 (4 amostras) e antígenos linfoides T aberrantes (2 amostras). Quatro destas amostras apresentaram resultados negativos também pela

PCR convencional, reforçando os resultados da CF, e duas não foram analisadas pelo método molecular.

Os marcadores aberrantes utilizados neste trabalho foram selecionados dentre aqueles avaliados em estudos prévios, que demonstraram bom desempenho na análise de DRM por CF, em pacientes com LLA (Irving *et al.*, 2009; Mejstriková *et al.*, 2010; Coustan-Smith *et al.*, 2011; Patkar *et al.*, 2012; Denys *et al.*, 2013; Gaipa *et al.*, 2013; Garand *et al.*, 2013). A frequência dos marcadores aberrantes detectados ao diagnóstico e que se mostraram úteis na avaliação da DRM foi semelhante às descrições de outros estudos (Coustan-Smith *et al.*, 2002; Irving *et al.*, 2009; Coustan-Smith *et al.*, 2010; Fossat *et al.*, 2015). Entretanto, a utilização de marcadores adicionais poderia ter determinado maior acurácia na detecção dos blastos residuais, já que a caracterização de um maior número de expressões antigênicas aberrantes facilita a distinção entre o clone neoplásico e os precursores linfóides normais (Coustan-Smith *et al.*, 2011; Denys *et al.*, 2013; Fossat *et al.*, 2015; Theunissen *et al.*, 2017). Restrições financeiras do estudo inviabilizaram a construção de um painel ainda mais amplo de anticorpos monoclonais.

Por outro lado, apesar dos estudos internacionais utilizarem citômetros de 6 a 8 cores para a pesquisa de DRM, foi possível demonstrar que a análise realizada em citômetro de 4 cores, utilizando um número maior de combinações de anticorpos, apresenta performance satisfatória, quando comparada ao método molecular. O uso de citômetro de 4 cores é, inclusive, previsto em publicação nacional recente que propôs a padronização dos ensaios de CF para a detecção de DRM, considerando a realidade de grande parte dos laboratórios brasileiros (Ikoma *et al.*, 2015).

A frequência dos rearranjos de *Ig/TCR* detectados ao diagnóstico e que se mostraram úteis na monitorização de DRM por PCR foi, em geral, semelhante àquela encontrada em estudos brasileiros prévios que usaram metodologia similar, especialmente na LLA-B (Ganazza *et al.*, 2009; Scrideli *et al.*, 2009; Assumpção *et al.*, 2010; Assumpção *et al.*, 2013; Paula *et al.*, 2015). No grupo de pacientes com LLA-T, foi verificada menor frequência de rearranjos de TCRG (86%) e maior frequência de rearranjos de TCRD (43%), em comparação com alguns destes estudos - 97 a 100% para TCRG e 8,1 a 24% para TCRD (Scrideli *et al.*, 2009; Assumpção *et al.*, 2010). Entretanto, os achados estão de acordo com aqueles descritos em revisão publicada por Kraszewska e colaboradores (2011) e também com os resultados de Flohr e colaboradores (2008), que estudaram população constituída por 442 pacientes com LLA-T. Há que se considerar que as conclusões do presente estudo são limitadas pelo pequeno número de pacientes com LLA-T avaliados.

Com relação à avaliação do significado prognóstico dos resultados de DRM obtidos, o estudo apresenta duas limitações importantes - o pequeno número de pacientes incluídos e, conseqüentemente, o pequeno número de eventos (recidivas e/ou óbitos) ocorridos; e o período curto de seguimento dos pacientes (mediana: 27 meses), em decorrência da necessidade de interrupção das observações em tempo hábil para finalização das análises do doutorado. Assim, as análises de associação entre os resultados de DRM e os demais fatores prognósticos avaliados revelaram significância estatística apenas entre linhagem celular acometida e DRM por PCR, nos tempos D35 e D78. Já as análises de sobrevida não revelaram associação significativa entre os resultados de DRM e SGLO ou SLE. Apenas a DRM detectada por PCR no D78 demonstrou uma tendência à associação com piores probabilidades de SGLO e SLE, entretanto o pequeno número de resultados positivos neste tempo de avaliação não permitiu análises estatísticas válidas. Estes resultados são contrários aos dados da literatura, que descrevem, de maneira ampla, a associação entre DRM detectável em diferentes fases do tratamento quimioterápico e maior risco de recidiva da doença e/ou óbito (Coustan-Smith *et al.*, 2000; Dworzak *et al.*, 2002; Borowitz *et al.*, 2008; Flohr *et al.*, 2008; Scrideli *et al.*, 2009; Conter *et al.*, 2010; Stow *et al.*, 2010; Bowman *et al.*, 2011; Schrappe *et al.*, 2011; Borowitz *et al.*, 2015). Torna-se importante ressaltar que alguns destes estudos foram conduzidos em formato multicêntrico e acompanharam grandes populações de pacientes com LLA, por longos períodos de tempo (Borowitz *et al.*, 2008; Flohr *et al.*, 2008; Conter *et al.*, 2010; Borowitz *et al.*, 2015). É plausível ainda supor que, além da pequena população estudada e do curto período de seguimento clínico, os resultados falsos, especialmente os falso-positivos da CF em níveis muito próximos ao ponto de corte, tenham contribuído para a ausência de associação prognóstica. E, em relação aos seis resultados negativos de DRM no D35, dentre os sete pacientes que evoluíram com recidiva, há que se considerar a possibilidade de resultados falsos pelos dois métodos, em função dos respectivos limites de sensibilidade analítica. No entanto, a literatura define que, apesar da recidiva ser mais frequente em pacientes com DRM detectável, grande parte das recidivas ocorre em pacientes com DRM negativa. É o que demonstra Borowitz e colaboradores (2015) em análise de 355 recidivas de LLA, dentre 2.473 pacientes acompanhados – 162/355 (45,6%) não apresentaram DRM detectável ao final da indução.

Em contrapartida, ao avaliar os dados dos sete pacientes que apresentaram DRM positiva por CF no D35, verificou-se que seis deles persistem em remissão da doença e apenas um evoluiu para o óbito, na ausência de remissão. Apesar da ausência de correlação clínica, três dos resultados positivos da CF foram concordantes aos obtidos pela PCR convencional e um foi confirmado pela RQ-PCR (PCR convencional falso-negativa). Dos outros três resultados

positivos da CF, dois não tiveram análise pareada por PCR e um foi definido como falso-positivo (PCR convencional e RQ-PCR negativas). Do ponto de vista evolutivo, todos haviam apresentado DRM detectável em avaliação prévia (D15) e, na avaliação sequencial do D78, um persistiu positivo por CF e PCR, três negativaram a DRM e três não foram avaliados. Assim, é plausível supor que o pequeno tempo de seguimento clínico destes pacientes (média: 2,2 anos) tenha contribuído para a falta de correlação clínico-laboratorial observada nos casos com DRM verdadeiramente positiva, detectada por duas metodologias. Esta seria também uma justificativa para o paciente que apresentou DRM positiva nos três tempos de avaliação e, ainda assim, encontra-se em remissão da doença há nove meses – este período de acompanhamento não permite excluir a possibilidade de eventos futuros.

Quanto ao seguimento dos sete pacientes que apresentaram DRM positiva por CF no D78, dois evoluíram com recidiva da doença seguida de óbito e cinco persistem em remissão. Três destes resultados foram concordantes com aqueles obtidos pela PCR convencional, um foi confirmado pela RQ-PCR (PCR convencional falso-negativa) e os outros três foram definidos como falso-positivos pela RQ-PCR. De forma semelhante ao D35, os dois pacientes com DRM verdadeiramente positiva, que persistem em remissão, tiveram pequeno tempo de seguimento clínico (0,8 e 1,5 anos), o que pode ter contribuído para a ausência de correlação clínico-laboratorial. É válido considerar que a maior ocorrência de resultados falso-positivos da CF neste tempo de avaliação pode ser justificada pela maior regeneração medular esperada nesta fase, dificultando a distinção entre linfoblastos residuais e hematogônias.

Finalizando, pode-se afirmar que as limitações apresentadas por este estudo podem ter contribuído para a ausência de associação entre a detecção de DRM e a evolução clínica desfavorável. Para alcançar resultados mais robustos, seria necessário aumentar o número de pacientes acompanhados e o tempo de seguimento desta população, o que seria alcançável, mais provavelmente, em um estudo multicêntrico. No entanto, foi possível verificar o bom desempenho das duas metodologias avaliadas na pesquisa de DRM, através dos resultados satisfatórios obtidos nas análises de concordância entre métodos. Cabe considerar ainda que, apesar da menor sensibilidade analítica apresentada pelas duas metodologias avaliadas neste estudo, em comparação com a RQ-PCR, o uso combinado da CF e da PCR convencional permitiu a avaliação de DRM nos dois pontos de coleta, em todos os pacientes incluídos. Ambos os métodos requerem infraestrutura e capacitação técnica encontradas, prioritariamente, em centros especializados, mas apresentam custo acessível a regiões com recursos financeiros restritos. Assim, um serviço que já conta com a metodologia de CF disponível para o diagnóstico e classificação imunofenotípica das leucemias agudas dependerá, essencialmente, da

aquisição de anticorpos monoclonais adicionais para realizar os ensaios de detecção de DRM. O custo da PCR convencional também não se mostra inviável, já que a técnica é baseada no uso de *primers* de consenso e não demanda sequenciamento dos rearranjos gênicos, confecção de *primers* específicos para cada paciente ou automação para detecção do produto amplificado. É conhecido que a PCR convencional apresenta baixo limite de sensibilidade analítica (10^{-2} a 10^{-3}), o que limita o seu uso para o reconhecimento dos pacientes com risco muito baixo de recidiva, classificados como BRV pelo protocolo GBTLI-2009. Entretanto, é importante ressaltar que, dentre as 61 amostras avaliadas simultaneamente pelos dois métodos, apenas 2 (3,3%) apresentaram resultados falso-negativos pela PCR convencional, definidos pela RQ-PCR. Por outro lado, a PCR convencional se mostra adequada para identificar pacientes de alto risco, para os quais pode estar indicada a intensificação do tratamento, conforme demonstrado em estudos prévios (Scrideli *et al.*, 2009; Stanulla *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2015; Scrideli *et al.*, 2015).

Desta forma, a partir dos resultados deste estudo, assim como já demonstrado em estudos anteriores, pode-se inferir que o uso combinado da CF e da PCR convencional na análise de DRM, em diferentes pontos do tratamento quimioterápico da LLA infantil, pode ser considerado uma estratégia válida e acessível a regiões menos favorecidas, permitindo a monitorização do tratamento em um maior número de crianças acometidas pela doença. Assim, considerando a realidade dos diferentes centros brasileiros de referência para tratamento da LLA infantil, seria possível propor, como alternativa para os locais menos estruturados, o uso da CF e/ou da PCR convencional em substituição à RQ-PCR, na detecção de DRM nos pontos D35 e D78, previstos pelo protocolo GBTLI-2009. Esta estratégia, aparentemente tida como um retrocesso em termos tecnológicos, possivelmente permitiria a monitorização do tratamento quimioterápico da LLA infantil de forma mais ampla, completa e acessível aos diferentes serviços e a um maior número de pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Assumpção JG, Ganazza MA, Araujo M, *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;55:1278-1286.

Assumpção JG, Paula FDF, Xavier SG, *et al.* Gene rearrangement study for minimal residual disease monitoring in children with acute lymphocytic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013;35(5):337-342.

Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukemiaNet. *Haematologica* 2009;94(8):1135-1150.

Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, *et al.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477-5485.

Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, *et al.* Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood* 2015;126(8):964-971.

Bowman WP, Larsen EL, Devidas M, *et al.* Augmented therapy improves outcome for pediatric high risk acute lymphocytic leukemia: results of Children's Oncology Group Trial P9906. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:569-577.

Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, *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;24:521-535.

Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, *et al.* 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(16):3206-3214.

Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, *et al.* Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691-2696.

Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, *et al.* Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(1):52-58.

Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: a comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23:347-358.

Coustan-Smith E, Song G, Clark C, *et al.* New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011;117(23):6267-6276.

Denys B, van der Sluijs-Gelling AJ, Homburg C, *et al.* Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013;27:635-641.

Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, *et al.* Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952-1958.

Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, *et al.* Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22:771-782.

Fossat C, Roussel M, Arnoux I, *et al.* Methodological aspects of minimal residual disease assessment by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter study. *Cytometry Part B* 2015;88B:21-29.

Gaipa G, Basso G, Biondi A, *et al.* Detection of minimal residual disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry Part B* 2013;84B:359-369.

Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, *et al.* Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012;97(10):1586-1593.

Ganazza MA, Assumpção JG, Araujo M, *et al.* *TCRG* gene rearrangement patterns in brazilian children with ALL: an update. *Leukemia Research* 2009;33:e228-e229.

Garand R, Beldjord K, Cavé H, *et al.* Flow cytometry and Ig/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia* 2013;27:370-376.

Ikoma MRV, Beltrame MP, Ferreira SIACP, *et al.* Proposal for the standardization of flow cytometry protocols to detect minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37(6):406-413.

Irving J, Jesson J, Virgo P, *et al.* Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica* 2009;94(6):870-874.

Kraszewska M, Dawidowska M, Szczepanski T, *et al.* T-cell acute lymphoblastic leukaemia: recent molecular biology findings. *British Journal of Haematology* 2011;156:303-315.

Lúcio P, Parreira A, van den Beemd MWM, *et al.* Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999;13:419-427.

Luria D, Rosenthal E, Steinberg D, *et al.* Prospective comparison of two flow cytometry methodologies for monitoring minimal residual disease in a multicenter treatment protocol of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B* 2010;78B:365-371.

Malec M, Björklund E, Söderhäll S, *et al.* Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL. *Leukemia* 2001;15:716-727.

Mejstriková E, Fronková E, Kalina T, *et al.* Detection of residual B precursor lymphoblastic leukemia by uniform gating flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:62-70.

Patkar N, Alex AA, Bargavi B, *et al.* Standardizing minimal residual disease by flow cytometry for precursor B lineage acute lymphoblastic leukemia in a developing country. *Cytometry Part B* 2012;82B:252-258.

Paula FDF, Santos SME, Xavier SG, *et al.* Comparison between qualitative and real-time polymerase chain reaction to evaluate minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37(6):373-380.

Schrappé M, Valsecchi MG, Bartram CR, *et al.* Late MRD response determine relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 2011;118(8):2077-2084.

Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza MA, *et al.* A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica* 2009;94(6):781-789.

Scrideli CA, Tone LG. Qualitative polymerase chain reaction versus quantitative polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37(6):366-368.

Stanulla M, Schrauder A. Bridging the gap between the north and south of the world: the case of treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2009;94(6):748-752.

Stow P, Key L, Chen X, *et al.* Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115(23):4657-4663.

Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, *et al.* Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2017;129(3):347-357.

Thörn I, Forestier E, Botling J, *et al.* Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolor flow cytometry. *British Journal of Haematology* 2011;152:743-753.

Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry Part B* 2016;90B:47-53.

7. Conclusões

“Imunofenótipos associados à leucemia” (LAIPs) foram identificados por CF nas amostras do diagnóstico dos 42 pacientes incluídos no estudo. Os marcadores aberrantes que mais frequentemente se mostraram úteis na avaliação de DRM nos pontos D35 e D78 foram o CD38, o CD123 e o CD58.

Rearranjos clonais dos genes de *Ig/TCR* foram identificados por PCR convencional em 40 das 41 amostras analisadas ao diagnóstico. Pelo menos dois rearranjos gênicos de *Ig/TCR* foram detectados em 31 destes pacientes. Rearranjos de *IgH* foram os mais frequentes na LLA-B (79,4% dos casos), enquanto rearranjos de *TCRG* foram os mais frequentes na LLA-T (85,7% dos casos). Estes achados estão de acordo com relatos prévios de outros estudos.

As técnicas de imunofenotipagem por CF e PCR convencional, usadas para a monitorização de DRM em crianças e adolescentes tratados de acordo com o GBTLI LLA-2009, forneceram resultados concordantes em 54 (88,5%) das 61 amostras colhidas nos tempos D35 e D78 do tratamento quimioterápico.

O índice de *Kappa* revelou boa concordância (*Kappa* = 0,62; $p < 0,001$) nas análises do D35 e concordância regular (*Kappa* = 0,52; $p = 0,004$) nas análises do D78, entre as técnicas de CF e PCR convencional.

A análise complementar por RQ-PCR, das sete amostras com resultados discordantes entre CF e PCR convencional, identificou quatro resultados falso-positivos da CF, um falso-negativo da CF e dois falso-negativos da PCR convencional.

Foi verificada associação significativa entre linhagem celular acometida e DRM por PCR convencional nos tempos D35 e D78, tendo sido maior a proporção de resultados positivos de DRM dentre os pacientes com LLA-T.

Os grupos de pacientes com LLA-T e leucometria ao diagnóstico igual ou superior a 50.000 células/ μ L apresentaram probabilidades de SGLO e SLE inferiores aos grupos de pacientes com LLA-B e leucometria ao diagnóstico abaixo de 50.000 cel/ μ L, respectivamente.

As análises de sobrevida não revelaram associação significativa entre os resultados da pesquisa de DRM e as probabilidades de SGLO ou SLE dos pacientes estudados. Entretanto, o pequeno número de casos e o período relativamente curto de seguimento clínico destes pacientes podem ter contribuído para a ausência de significância estatística dos resultados.

Apesar das limitações mencionadas, os resultados do presente estudo sugerem que a estratégia de uso combinado da CF e da PCR convencional na análise de DRM, nos pontos D35 e D78 do tratamento quimioterápico da LLA infantil, pode ser válida e acessível a centros com restrições de recursos financeiros e tecnológicos, permitindo a monitorização do tratamento em maior número de crianças acometidas pela doença.

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (COEP) - UFMG



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

Projeto: CAAE – 20800713.9.0000.5149

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de janeiro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima, pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO 2 – PARECER DA DIRETORIA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (DEPE)



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão

Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2014.

PROCESSO: Nº 166/13 "ESTUDO COMPARATIVO DA DETECÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA, PELAS TÉCNICAS DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO E PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL, EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA"

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 13/01/2014, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE *relatório* parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

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

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

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TCLE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO INFORMAÇÕES DOS PESQUISADORES AOS REPRESENTANTES LEGAIS

Título da pesquisa: Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima, pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda.

Seu filho ou o paciente pelo qual você é responsável está sendo convidado a participar dessa pesquisa porque ele tem o diagnóstico de leucemia linfóide aguda (LLA) e está sendo tratado de acordo com o protocolo de tratamento denominado GBTLI-2009. As pesquisadoras responsáveis pelo estudo são as Professoras Benigna Maria de Oliveira e Juliana Maria Camargos Rocha.

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

O tratamento dos pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda (LLA) é feito com o uso de quimioterapia. No Hospital das Clínicas da UFMG o tratamento quimioterápico é feito de acordo com um protocolo chamado GBTLI 2009, o qual é adotado em vários hospitais do Brasil. Nesse protocolo, a resposta do paciente ao tratamento é avaliada após 15, 35 e 78 dias do início do tratamento com a utilização do mesmo exame que foi realizado na ocasião do diagnóstico – mielograma. Nesse exame é coletada amostra de sangue da medula óssea para avaliação do número de células leucêmicas (blastos) ainda presentes na medula óssea. A resposta precoce ao tratamento, com rápida redução das células leucêmicas, é considerada importante fator indicador de boa evolução e de baixo risco de recaída da doença.

No entanto, diversos estudos mostraram que apenas a contagem das células leucêmicas pode não ser suficiente para uma boa avaliação dessa resposta ao tratamento e foram desenvolvidas outras técnicas para avaliação das células leucêmicas residuais. Essas técnicas/exames (imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real - RQ-PCR) permitem a detecção de células leucêmicas em proporções menores que aquelas alcançadas pela avaliação tradicional (morfológica), sendo a presença destas células denominada Doença Residual Mínima (DRM). Acredita-se que os estudos relacionados à DRM poderão auxiliar na definição de tratamento mais adequado para os pacientes com LLA.

O objetivo desse estudo é comparar as técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e de RQ-PCR, como métodos de avaliação da Doença Residual Mínima, em crianças e adolescentes em tratamento para LLA. As pesquisadoras querem avaliar se uma das técnicas é melhor do que a outra ou se as duas devem ser utilizadas conjuntamente.

A realização desses exames já está prevista no protocolo de tratamento utilizado por seu filho. O mielograma deverá ser colhido nos dias 15, 35 e 78 do tratamento para avaliação tradicional, a qual será complementada por essas novas técnicas. Não será realizado nenhum exame com finalidade exclusiva da pesquisa.

Os riscos mais frequentemente relacionados à coleta do mielograma são dor e sangramento local. Para minimizar esses efeitos a coleta será feita por médico treinado, com uso de anestesia local ou sob sedação (com anestesia no bloco cirúrgico), de acordo com a indicação do seu médico.

Caso concorde com a participação de seu filho na pesquisa você estará dando o seu consentimento para que os prontuários médicos do paciente sejam consultados pelos pesquisadores para obtenção de dados clínicos (diagnóstico, tipo de tratamento, resposta ao tratamento) e laboratoriais (resultados de exames).

O tratamento do paciente não será alterado em função da pesquisa. Os resultados dos exames (citometria de fluxo e RQ-PCR) serão comunicados ao médico responsável pelo tratamento de seu filho para que ele tome decisões de acordo com o previsto no protocolo de tratamento.

O paciente continuará a ser atendido no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, sem prejuízo ao seu cuidado, mesmo que não concorde com a sua inclusão no estudo ou, ainda, que desista de participar em qualquer momento. Você e seu filho não receberão remuneração por participar do estudo.

A sua participação é muito importante. Esperamos que os resultados dessa pesquisa ajudem a melhorar o tratamento e as chances de cura dos pacientes com leucemia. Os dados coletados neste trabalho serão confidenciais. Apenas os responsáveis pela pesquisa terão acesso aos dados coletados.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia para contato com as pesquisadoras são os seguintes: 34099397 e 34099207. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Telefone 34094592).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa "**Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima, pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda**", consinto em participar na qualidade de responsável pelo paciente-----, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 200__

Assinatura do responsável: _____

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

Assinatura do pesquisador: _____

TCLE 2

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

Título da pesquisa: Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima, pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda.

Antes de você aceitar participar desta pesquisa é necessário que você compreenda as explicações a seguir.

Esta declaração esclarece o objetivo, exames, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante a pesquisa. Também estabelece o seu direito de desistir de sua participação a qualquer momento

Durante o seu tratamento você fará um exame chamado mielograma. O mesmo exame feito antes de você iniciar o tratamento. O exame será feito mais três vezes (15, 35 e 78 dias após o início do tratamento). Durante esse exame será colhido sangue para verificar se você está tendo uma boa resposta ao tratamento. O sangue coletado será avaliado por três técnicas (tipo de exame) diferentes. Objetivo da pesquisa é comparar duas dessas técnicas (imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real - RQ-PCR) para verificar se uma delas é melhor ou se as duas devem ser utilizadas.

Caso você e seus pais, ou responsáveis, concordem com a participação na pesquisa, o seu prontuário médico (ficha médica) será consultado pelos pesquisadores para que eles

obtenham informações sobre os resultados de seus exames e do seu tratamento. O seu tratamento não será modificado.

Você terá que fazer os mielogramas mesmo que não esteja participando desta pesquisa, pois eles fazem parte da avaliação do seu tratamento. Durante a realização do exame pode você poderá sentir dor. Para evitar que isso aconteça você receberá medicamentos chamados anestésicos. O tipo de medicamento será indicado pelo seu médico.

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

Nós responderemos a qualquer dúvida que você tiver sobre a pesquisa. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia são os seguintes: 34099397 e 34099207. Os nomes dos pesquisadores responsáveis são: Profa^a Juliana Maria Camargos Rocha e Prof^a Benigna Maria de Oliveira. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2^o andar, sala 2005. Telefone 34094592).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que entendi as informações sobre a pesquisa "**Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima, pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda**", consinto em participar na qualidade de paciente, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 200__

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do paciente (crianças de 13 a 17 anos): _____

Assinatura do pesquisador: _____

TCLE 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO INFORMAÇÕES DOS PESQUISADORES AOS PACIENTES com idade ≥ 18 anos

Título da pesquisa: Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima, pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa porque tem o diagnóstico de leucemia linfóide aguda (LLA) e está sendo tratado de acordo com o protocolo de tratamento denominado GBTLI-2009. As pesquisadoras responsáveis pelo estudo são as Professoras Benigna Maria de Oliveira e Juliana Maria Camargos Rocha.

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

O tratamento dos pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide aguda (LLA) é feito com o uso de quimioterapia. No Hospital das Clínicas da UFMG o tratamento quimioterápico é feito de acordo com um protocolo chamado GBTLI 2009, o qual é adotado em vários hospitais do Brasil. Nesse protocolo, a resposta do paciente ao tratamento é avaliada após 15, 35 e 78 dias do início do tratamento com a utilização do mesmo exame que foi realizado na ocasião do diagnóstico – mielograma. Nesse exame é coletada amostra de sangue da medula óssea para avaliação do número de células leucêmicas (blastos) ainda presentes na medula óssea. A resposta precoce ao tratamento, com rápida redução das células leucêmicas, é considerada importante fator indicador de boa evolução e de baixo risco de recaída da doença.

No entanto, diversos estudos mostraram que apenas a contagem das células leucêmicas pode não ser suficiente para uma boa avaliação dessa resposta ao tratamento e foram desenvolvidas outras técnicas para avaliação das células leucêmicas residuais. Essas técnicas/exames (imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real - RQ-PCR) permitem a detecção de células leucêmicas em proporções menores que aquelas alcançadas pela avaliação tradicional (morfológica), sendo a presença destas células denominada Doença Residual Mínima (DRM). Acredita-se que os estudos relacionados à DRM poderão auxiliar na definição de tratamento mais adequado para os pacientes com LLA.

O objetivo desse estudo é comparar as técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e de RQ-PCR, como métodos de avaliação da Doença Residual Mínima, em crianças e adolescentes em tratamento para LLA. As pesquisadoras querem avaliar se uma das técnicas é melhor do que a outra ou se as duas devem ser utilizadas conjuntamente.

A realização desses exames já está prevista no protocolo de tratamento utilizado por seu filho. O mielograma deverá ser colhido nos dias 15, 35 e 78 do tratamento para avaliação tradicional, a qual será complementada por essas novas técnicas. Não será realizado nenhum exame com finalidade exclusiva da pesquisa.

Os riscos mais frequentemente relacionados à coleta do mielograma são dor e sangramento local. Para minimizar esses efeitos a coleta será feita por médico treinado, com uso de anestesia local ou sob sedação (com anestesia em bloco cirúrgico), de acordo com a indicação do seu médico.

Caso concorde com sua participação na pesquisa você estará dando o seu consentimento para que os prontuários médicos do paciente sejam consultados pelos pesquisadores para obtenção de dados clínicos (diagnóstico, tipo de tratamento, resposta ao tratamento) e laboratoriais (resultados de exames).

O seu tratamento não será alterado em função da pesquisa. Os resultados dos exames (citometria de fluxo e RQ-PCR) serão comunicados ao médico responsável pelo seu tratamento para que ele tome decisões de acordo com o previsto no protocolo de tratamento.

Você continuará a ser atendido no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG, sem prejuízo ao seu cuidado, mesmo que não concorde com a sua inclusão no estudo ou, ainda, que desista de participar em qualquer momento. Você não receberá remuneração por participar do estudo.

A sua participação é muito importante. Esperamos que os resultados dessa pesquisa ajudem a melhorar o tratamento e as chances de cura dos pacientes com leucemia. Os dados coletados neste trabalho serão confidenciais. Apenas os responsáveis pela pesquisa terão acesso aos dados coletados.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones de contato do Serviço de Hematologia para contato com as pesquisadoras são os seguintes: 34099397 e 34099207. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005. Telefone 34094592).

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa **“Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima, pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e PCR quantitativa em tempo real, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda”**, consinto em participar na qualidade de responsável pelo paciente-----, até que eu decida em contrário.

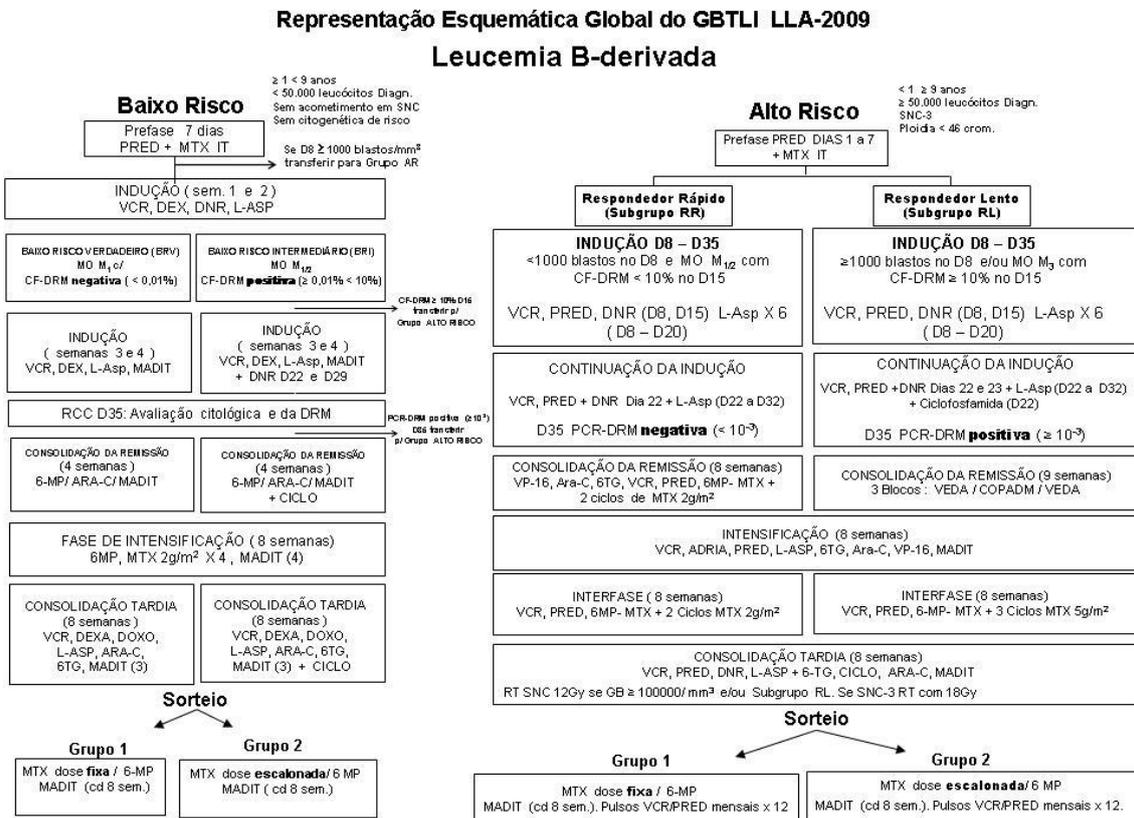
Belo Horizonte, ____ de _____ de 200__

Assinatura do paciente (idade ≥18 anos): _____

Assinatura do pesquisador: _____

ANEXO 4 – PLANEJAMENTO GLOBAL GBTLI LLA-2009

a) LLA B-DERIVADA



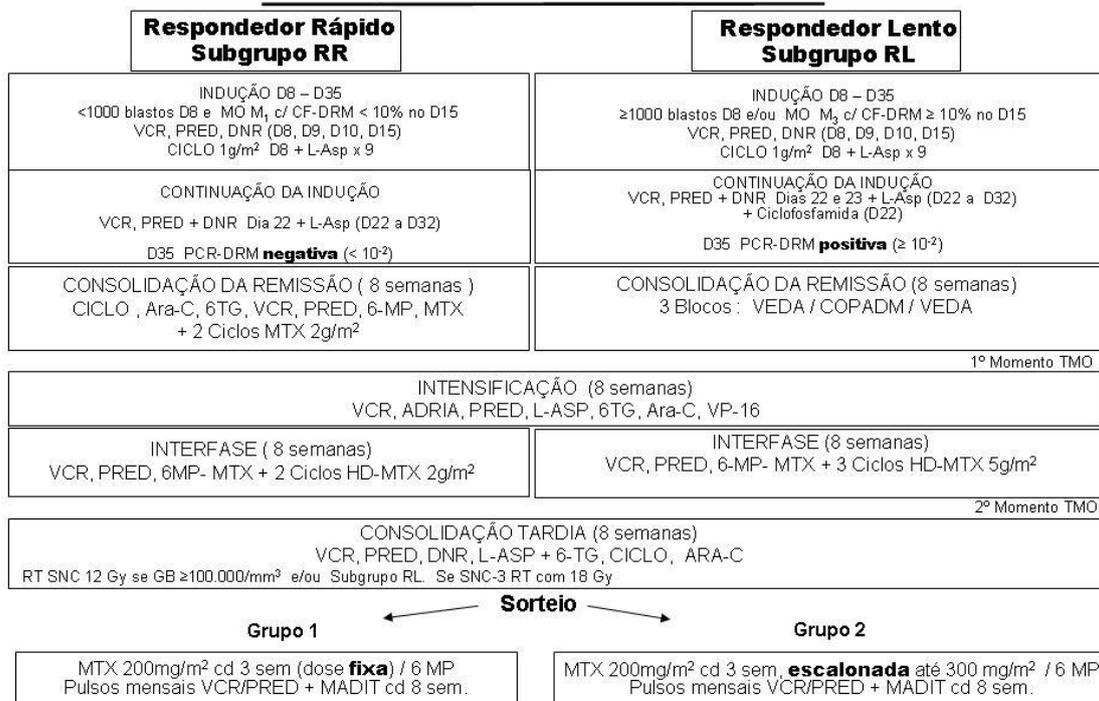
Referência: GBTLI, 2009

b) LLA T-DERIVADA

Planejamento Global GBTLI LLA-2009

LLA T-DERIVADA

Prefase PRED dia 1 a 7 + MTX IT



Referência: GBTLI, 2009

c) LLA Ph⁺ (presença do cromossoma Ph⁺)

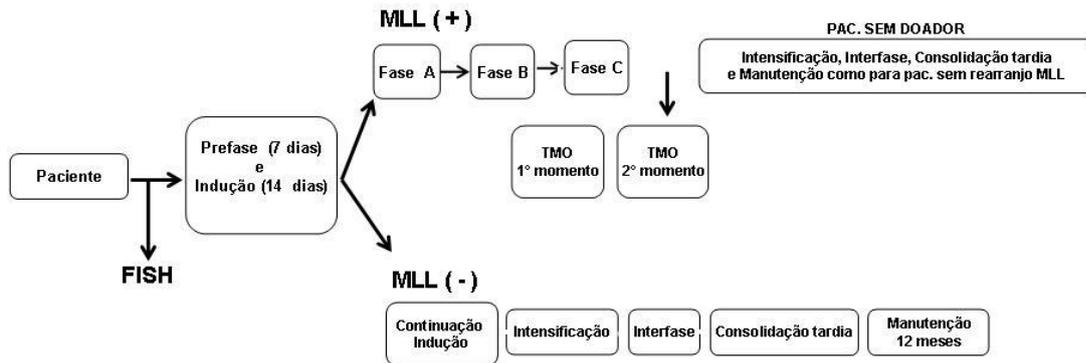


Referência: GBTLI, 2009

d) LLA DO LACTENTE (< 12 meses)

Planejamento Global GBTLI LLA-2009

Grupo Lactente (< 12 meses)



Referência: GBTLI, 2009

ANEXO 5 – DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

| PACIENTE | IDADE | DIAG | GENERO | LEUCÓCITOS (cel/ μ L) | LINHAGEM | SNC |
|----------|-------|------|--------|---------------------------|----------|---------|
| 1 | 9,8 | | F | 2.490 | LLA-B | SNC 1 |
| 2 | 2,2 | | M | 1.700 | LLA-B | SNC 1 |
| 3 | 10 | | M | 387.000 | LLA-T | SNC 1 |
| 4 | 4,6 | | F | 34.750 | LLA-T | SNC 1 |
| 5 | 7,8 | | F | 1.510 | LLA-B | SNC 1 |
| 6 | 15 | | M | 55.150 | LLA-B | PLT NEG |
| 7 | 9,8 | | F | 660 | LLA-B | PLT NEG |
| 8 | 6,7 | | M | 5.360 | LLA-B | SNC 1 |
| 9 | 16,4 | | F | 3.430 | LLA-B | SNC 1 |
| 10 | 3 | | F | 9.240 | LLA-B | SNC 1 |
| 11 | 7,7 | | M | 3.690 | LLA-B | SNC 1 |
| 12 | 5,3 | | M | 4.020 | LLA-B | SNC 1 |
| 13 | 18 | | M | 173.400 | LLA-T | PLT NEG |
| 14 | 5,6 | | M | 12.540 | LLA-B | SNC 1 |
| 15 | 11,9 | | M | 11.250 | LLA-B | PLT NEG |
| 16 | 7,7 | | F | 10.890 | LLA-B | SNC 1 |
| 17 | 3,5 | | F | 10.080 | LLA-B | SNC 1 |
| 18 | 15,3 | | F | 4.870 | LLA-B | SNC 1 |
| 19 | 13 | | M | 1.770 | LLA-B | SNC 1 |
| 20 | 6,2 | | F | 2.890 | LLA-B | SNC 1 |
| 21 | 2,7 | | M | 4.620 | LLA-B | SNC 1 |
| 22 | 1,7 | | M | 123.700 | LLA-B | SNC 1 |
| 23 | 16 | | M | 2.440 | LLA-B | PLT NEG |
| 24 | 12,1 | | M | 3.610 | LLA-B | SNC 1 |
| 25 | 13,4 | | M | 284.000 | LLA-T | SNC 1 |
| 26 | 15 | | M | 90.910 | LLA-T | SNC 1 |
| 27 | 3,6 | | F | 239.900 | LLA-B | SNC 1 |
| 28 | 10,2 | | M | 2.010 | LLA-B | SNC 1 |
| 29 | 16,6 | | M | 3.130 | LLA-B | SNC 1 |
| 30 | 11,6 | | M | 75.720 | LLA-B | SNC 2 |
| 31 | 5,8 | | M | 572.000 | LLA-T | SNC 3 |
| 32 | 2,8 | | F | 1.590 | LLA-B | PLT NEG |
| 33 | 4,1 | | F | 59.320 | LLA-B | SNC 2 |
| 34 | 4,1 | | M | 38.970 | LLA-B | SNC 1 |
| 35 | 4,7 | | M | 5.630 | LLA-B | SNC 1 |
| 36 | 12,5 | | F | 47.210 | LLA-B | PLT POS |
| 37 | 8,8 | | M | 144.250 | LLA-B | SNC 1 |
| 38 | 2,7 | | F | 9.800 | LLA-B | SNC 2 |
| 39 | 14,7 | | M | 2.170 | LLA-B | SNC 1 |
| 40 | 12 | | M | 3.140 | LLA-T | SNC 2 |
| 41 | 2,6 | | F | 28.080 | LLA-B | SNC 3 |
| 42 | 4,8 | | M | 13.070 | LLA-B | SNC 1 |

Idade diag: idade ao diagnóstico; F: feminino; M: masculino; SNC: sistema nervoso central; SNC 1: punção lombar não traumática, ausência de blastos; SNC 2: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos $< 5/\mu$ L, presença de blastos; SNC 3: punção lombar não traumática, contagem de leucócitos $\geq 5/\mu$ L, presença de blastos; PLT neg: punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μ L), ausência de blastos; PLT pos: punção lombar traumática (≥ 10 hemácias/ μ L), presença de blastos.

| PACIENTE | BCR-ABL | ETV6-RUNX1 | TCF3-PBX1 | MLL-AF4 | D15 MORF | D15 CF* |
|----------|---------|------------|-----------|---------|----------|---------|
| 1 | NEG | NEG | NEG | NEG | INCONC | 0,02 |
| 2 | NEG | POS | NR | NR | INCONC | 0,08 |
| 3 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 0,02 |
| 4 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M3 | 0,69 |
| 5 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 0,43 |
| 6 | NEG | NR | NEG | NEG | MO M3 | 65,00 |
| 7 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 0,66 |
| 8 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M2 | 19,00 |
| 9 | NEG | NR | NEG | NEG | MO M1 | 0,01 |
| 10 | NEG | NEG | POS | NEG | MO M1 | 1,01 |
| 11 | NR | NR | NR | NR | MO M1 | 0,09 |
| 12 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 0,01 |
| 13 | NEG | NEG | NEG | NEG | NR | NR |
| 14 | POS | NR | NR | NR | MO M3 | 5,54 |
| 15 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 10,01 |
| 16 | NEG | NEG | NR | NEG | MO M1 | 1,99 |
| 17 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 0,03 |
| 18 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 0,53 |
| 19 | NR | NR | NR | NR | INCONC | 0,01 |
| 20 | NEG | NR | NR | NEG | MO M2 | 1,50 |
| 21 | NEG | NR | NR | NEG | MO M2 | 2,96 |
| 22 | NR | NR | NR | NR | MO M1 | 0,03 |
| 23 | NEG | NR | NEG | NEG | MO M3 | 15,30 |
| 24 | NEG | NR | NR | NR | MO M1 | 0,22 |
| 25 | NEG | NR | NR | NR | MO M3 | 1,30 |
| 26 | NEG | NR | NEG | NEG | MO M1 | <0,01 |
| 27 | NEG | NEG | POS | NEG | INCONC | <0,01 |
| 28 | NEG | POS | NEG | NEG | INCONC | 0,37 |
| 29 | NEG | NEG | NEG | NEG | INCONC | 0,06 |
| 30 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 0,04 |
| 31 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M3 | 20,01 |
| 32 | NEG | POS | NR | NR | MO M1 | 0,64 |
| 33 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 0,07 |
| 34 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | <0,01 |
| 35 | NEG | NEG | NEG | NEG | INCONC | 21,80 |
| 36 | NEG | NEG | POS | NEG | INCONC | <0,01 |
| 37 | NEG | POS | NEG | NEG | MO M1 | <0,01 |
| 38 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 2,20 |
| 39 | NEG | NR | NEG | NEG | INCONC | 0,15 |
| 40 | NEG | NR | NR | NR | MO M3 | 25,40 |
| 41 | NEG | NEG | NEG | NEG | MO M1 | 0,87 |
| 42 | NEG | NEG | POS | NEG | MO M1 | 0,02 |

Neg: negativo; Pos: positivo; NR: não realizado; D15 morf: morfologia de medula óssea no 15º dia de tratamento; Inconc: resultado inconclusivo; MO M1: esfregaço de medula óssea com < 5% de linfoblastos; MO M2: esfregaço de medula óssea com 5 a 25% de linfoblastos; MO M3: esfregaço de medula óssea com > 25% de linfoblastos; D15 CF: análise de DRM por citometria de fluxo no 15º dia de tratamento.

* DRM por citometria de fluxo considerada positiva quando $\geq 0,01\%$.

| PACIENTE | D35 MORF | D35 CF | D35 PCR | D78 CF | D78 PCR | RISCO INICIAL |
|----------|----------|--------|---------|--------|---------|---------------|
| 1 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA B - AR |
| 2 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA B - BR |
| 3 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA T |
| 4 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA T |
| 5 | MO M1 | < 0,01 | NEG | 0,02 | NEG | LLA B - BR |
| 6 | MO M1 | < 0,01 | NEG | 0,10 | NEG | LLA B - AR |
| 7 | MO M1 | 0,02 | POS | NR | NR | LLA B - AR |
| 8 | MO M1 | < 0,01 | POS | NR | NR | LLA B - BR |
| 9 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA B - AR |
| 10 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA B - BR |
| 11 | MO M1 | < 0,01 | NR | < 0,01 | NR | LLA B - BR |
| 12 | INCONC | 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 13 | MO M1 | NR | POS | 0,04 | POS | LLA T |
| 14 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B-Ph+ |
| 15 | MO M1 | < 0,01 | NR | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 16 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - BR |
| 17 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - BR |
| 18 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 19 | MO M1 | 0,01 | NR | NR | NR | LLA B - AR |
| 20 | MO M1 | 1,14 | NR | NR | NEG | LLA B - BR |
| 21 | MO M1 | < 0,01 | NEG | 0,03 | NEG | LLA B - BR |
| 22 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA B - AR |
| 23 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA B - AR |
| 24 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 25 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA T |
| 26 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA T |
| 27 | MO M1 | < 0,01 | NEG | 0,02 | NEG | LLA B - AR |
| 28 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA B - AR |
| 29 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 30 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 31 | MO M2 | 11,37 | POS | NR | NR | LLA T |
| 32 | MO M1 | < 0,01 | NEG | 0,03 | POS | LLA B - BR |
| 33 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA B - AR |
| 34 | MO M1 | < 0,01 | NEG | NR | NR | LLA B - BR |
| 35 | MO M1 | 0,06 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - BR |
| 36 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 37 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 38 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - BR |
| 39 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 40 | MO M1 | 0,81 | POS | 0,06 | POS | LLA T |
| 41 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - AR |
| 42 | MO M1 | < 0,01 | NEG | < 0,01 | NEG | LLA B - BR |

Neg: negativo; Pos: positivo; NR: não realizado; D35 morf: morfologia de medula óssea no 35º dia de tratamento; Inconc: resultado inconclusivo; MO M1: esfregaço de medula óssea com < 5% de linfoblastos; MO M2: esfregaço de medula óssea com 5 a 25% de linfoblastos; D35: 35º dia de tratamento; D78: 78º dia de tratamento; CF: citometria de fluxo; PCR: reação em cadeia da polimerase; BR: baixo risco; AR: alto risco; Ph+: cromossomo Philadelphia positivo.

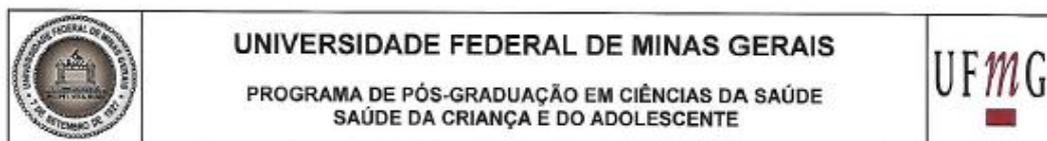
* DRM por citometria de fluxo considerada positiva quando $\geq 0,01\%$.

| PACIENTE | RECLASSIF | RISCO | CENS | EVENTOS | CENS GLOBAL | SGLO | SLE |
|----------|-----------|-------|------|----------------------|-------------|-------|-------|
| 1 | LLA | B-AR | RR | | | 3,88 | 3,88 |
| 2 | LLA | B-BRI | | RECIDIVA | | 3,847 | 3,661 |
| 3 | LLA | T-RR | | RECIDIVA | ÓBITO | 0,526 | 0,411 |
| 4 | LLA | T-RR | | | | 3,754 | 3,754 |
| 5 | LLA | B-BRI | | | | 3,614 | 3,614 |
| 6 | LLA | B-AR | RL | RECIDIVA | ÓBITO | 2,335 | 2,209 |
| 7 | LLA | B-AR | RR | | | 3,562 | 3,562 |
| 8 | LLA | B-AR | RL | | | 3,554 | 3,554 |
| 9 | LLA | B-AR | RR | | | 3,496 | 3,496 |
| 10 | LLA | B-BRI | | | | 3,4 | 3,4 |
| 11 | LLA | B-BRI | | | | 3,329 | 3,329 |
| 12 | LLA | B-AR | RR | | | 3,381 | 3,381 |
| 13 | LLA | T-RL | | RECIDIVA | ÓBITO | 1,38 | 0,991 |
| 14 | LLA | B-Ph+ | RL | RECIDIVA | ÓBITO | 3,075 | 2,916 |
| 15 | LLA | B-AR | RL | | | 3,058 | 3,058 |
| 16 | LLA | B-BRI | | | | 2,99 | 2,99 |
| 17 | LLA | B-BRI | | | | 2,984 | 2,984 |
| 18 | LLA | B-AR | RR | RECIDIVA | ÓBITO | 2,366 | 1,845 |
| 19 | LLA | B-AR | RR | | | 2,806 | 2,806 |
| 20 | LLA | B-BRI | | | | 2,653 | 2,653 |
| 21 | LLA | B-BRI | | | | 2,601 | 2,601 |
| 22 | LLA | B-AR | RR | | | 2,363 | 2,363 |
| 23 | LLA | B-AR | RL | | | 2,275 | 2,275 |
| 24 | LLA | B-AR | RR | | | 2,218 | 2,218 |
| 25 | LLA | T-RR | | RECIDIVA | | 2,174 | 1,711 |
| 26 | LLA | T-RR | | | | 2,01 | 2,01 |
| 27 | LLA | B-AR | RL | | | 1,914 | 1,914 |
| 28 | LLA | B-AR | RR | | | 1,859 | 1,859 |
| 29 | LLA | B-AR | RR | | | 1,848 | 1,848 |
| 30 | LLA | B-AR | RR | | | 1,818 | 1,818 |
| 31 | LLA | T-RL | | AUSÊNCIA DE REMISSÃO | ÓBITO | 0,704 | 0,003 |
| 32 | LLA | B-BRI | | | | 1,503 | 1,503 |
| 33 | LLA | B-AR | RR | | | 1,454 | 1,454 |
| 34 | LLA | B-BRI | * | | | 1,361 | 1,361 |
| 35 | LLA | B-AR | RL | | | 1,087 | 1,087 |
| 36 | LLA | B-AR | RL | | | 1,032 | 1,032 |
| 37 | LLA | B-AR | RL | | | 0,988 | 0,988 |
| 38 | LLA | B-BRI | | | | 0,975 | 0,975 |
| 39 | LLA | B-AR | RR | | | 0,958 | 0,958 |
| 40 | LLA | T-RL | | | | 0,835 | 0,835 |
| 41 | LLA | B-AR | RR | | | 0,726 | 0,726 |
| 42 | LLA | B-BRI | | | | 0,641 | 0,641 |

Reclassif risco: reclassificação do risco; BRI: baixo risco intermediário; AR-RR: alto risco-responder rápido; AR-RL: alto risco-responder lento; RR: responder rápido; RL: responder lento; Ph+ RL: cromossomo Philadelphia positivo - responder lento; Cens: censura; SGLO: sobrevida global (anos); SLE: sobrevida livre de eventos (anos).

*Paciente nº34 alocado para o protocolo de tratamento preconizado para o subgrupo LLA B-BRI em função da evidência de infiltração testicular.

ANEXO 6 – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE TESE



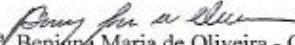
FOLHA DE APROVAÇÃO

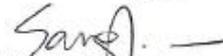
ESTUDO COMPARATIVO DA DETECÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA PELAS TÉCNICAS DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

JULIANA MARIA CAMARGOS ROCHA

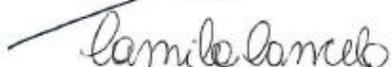
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Ciências da Saúde.

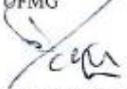
Aprovada em 29 de novembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

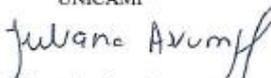

 Prof.^a Benigna Maria de Oliveira - Orientadora
 UFMG


 Prof.^a Sandra Guerra Xavier - Coorientadora
 UFMG


 Prof. Marcos Borato Viana
 UFMG


 Prof.^a Camila Silva Peres Cancellato
 UFMG


 Prof. José Andrés Yunes
 UNICAMP


 Prof.^a Juliana Godoy Assumpção
 GENETICENTER

Belo Horizonte, 29 de novembro de 2017.