



MÔNICA APARECIDA GANAZZA

**“ESTUDO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM LEUCEMIA
LINFÓIDE AGUDA DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE”**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MÔNICA APARECIDA GANAZZA

**“ESTUDO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM LEUCEMIA
LINFÓIDE AGUDA DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE”**

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). José Andrés Yunes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA MÔNICA APARECIDA GANAZZA E
ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ ANDRÉS YUNES**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

G15e Ganazza, Mônica Aparecida, 1982-
Estudo de doença residual mínima em leucemia linfóide aguda da criança e do adolescente / Mônica Aparecida Ganazza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: José Andrés Yunes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia linfóide aguda. 2. Neoplasia residual. 3. Reação em cadeia da polimerase. I. Yunes, José Andrés. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Minimal residual disease study in child and adolescent acute lymphoblastic leukemia

Palavras-chave em inglês:

Acute lymphoblastic leukemia

Neoplasm, residual

Polymerase chain reaction

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

José Andrés Yunes [Orientador]

Luiz Fernando Lopes

Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá

Leticia Frohlic Archângelo

Carmen Silvia Bertuzzo

Data de defesa: 31-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

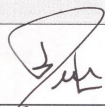
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MÔNICA APARECIDA GANAZZA

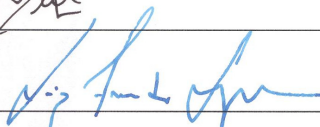
Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOSÉ ANDRÉS YUNES

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). JOSÉ ANDRÉS YUNES



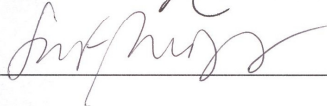
2. PROF(A). DR(A). LUIZ FERNANDO LOPES



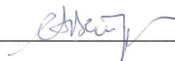
3. PROF(A). DR(A). MARIANA EMERENCIANO CAVALCANTI DE SÁ



4. PROF(A).DR(A). LETÍCIA FROHLIC ARCHÂNGELO



5. PROF(A).DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 31 de janeiro de 2014

Aos meus pais, José e Necilda, pelo apoio e compreensão e a todas as crianças com leucemia que permitiram a realização deste trabalho e que possam se beneficiar dos resultados por ele gerado.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido o conhecimento, a perseverança e ter me sustentado na fé para que eu não desistisse nos momentos difíceis, por ter me abençoado durante esses anos com saúde a fim de conduzir minha pesquisa e produzir resultados que possam trazer benefícios para os pacientes com leucemia.

Aos meus pais que em todos os momentos me apoiaram, em todas as minhas voltas para casa, nos momentos de desilusões, ansiedade e desespero, que sempre acreditaram em mim e que por mim tudo sempre fizeram, fazem e farão.

Ao meu noivo André que muitas vezes aguentou minhas crises de choro, nervosismo, a distancia de viagens a congressos, treinamentos e trabalhos durante os finais de semana.

Ao meu orientador José Andrés Yunes que me aceitou como aluna de doutorado e que sem seus ensinamentos não seria possível a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos de Limeira que mesmo a distancia, pela internet ou telefone me mandaram energias, pensamentos e recados positivos, que entenderam minha ausência muitas vezes em reuniões da turma ou atividades rotineiras por estar me dedicando à minha tese.

Aos meus queridos amigos dos laboratórios multidisciplinares do Centro Infantil Boldrini, que além do suporte técnico e científico me proporcionaram momentos inesquecíveis juntos. Almoços, festinhas, reuniões fora do laboratório, passeios e acima de tudo muito mas muito apoio nos momentos em que mesmo sem falar percebiam que eu não estava totalmente 100%, amigos podem ter certeza que já sinto e sentirei muita falta de vocês.

Não posso deixar de agradecer algumas pessoas em especial: Aline, Ana Mosca, Aninha, André, Amanda, Bruna, Bruno, Cintia, Dani, Isabel, Paty, Rafael, Sabrina, Seleny. Amigos, não tenho palavras para agradecer o que fizeram por mim, o suporte técnico, a companhia em viagens, os conselhos, os puxões de orelhas, os telefonemas, as mensagens, as palavras carinhosas nos momentos difíceis, as palhaçadas, os abraços e muitas vezes simplesmente um “vc está bem?”. Saibam que eu sempre disse que filhos únicos possuem sim irmãos e estes são aqueles que o coração escolhe, tenham certeza que vocês são os irmãos que meu coração escolheu e sempre levarei vocês num lugar muito especial no peito, mesmo que a distância nos separe e o tempo dificulte nossos encontros.

Agradeço à Doutora Sílvia Regina Brandalise e a toda equipe médica do Centro Infantil Boldrini por permitir a realização do estudo e propiciar todo o suporte para a realização do mesmo.

Aos pacientes com leucemia linfóide aguda e seus familiares que mesmo sem me conhecer confiaram no meu trabalho ao permitirem que eu utilizasse suas amostras em minha pesquisa.

À Fapesp que me concedeu a bolsa de estudos e ao Instituto Ronald Mc Donald pelo apoio financeiro fundamentais para a realização do presente trabalho.

*"Ninguém comete erro maior do que não fazer nada
só porque só pode fazer um pouco." [Edmund Burke]*

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é o câncer mais comum da infância. Os atuais protocolos de tratamento da LLA levam à cura em até 80% dos casos e parte do sucesso se deve à aplicação de diferentes tratamentos para os pacientes estratificados em diferentes grupos de risco. Contudo, pacientes considerados em remissão podem apresentar conteúdo substancial de células neoplásicas, a chamada doença residual mínima (DRM), cuja proliferação está associada com a recaída da doença e que podem estar em níveis indetectáveis pelas técnicas convencionais de análise morfológica. O atual protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI-LLA-2009) utiliza as análises da DRM para estratificar os pacientes em grupos de risco e assim determinar seu tratamento. Desta maneira o presente estudo objetivou (1) estudar a DRM por método qualitativo e quantitativo (RQ-PCR) em amostras D35 de 120 pacientes prospectivos admitidos para tratamento com o protocolo GBTLI-LLA-2009 no Centro Boldrini entre dezembro de 2009 e julho de 2013 (2) determinar a frequência e sensibilidade dos rearranjos gênicos de imunoglobulinas e receptores de células T (3) analisar a realocação dos pacientes em grupos de risco em três pontos do tratamento (D8, D15 e D35) (4) buscar associações entre resultados de DRM no D35 e variáveis clínico-biológicas dos pacientes (5) analisar a sobrevida global nos pacientes (6) analisar o grau de concordância entre os resultados obtidos por PCR qualitativo e RQ-PCR no D35. Para a DRM no D15 as análises foram realizadas por citometria de fluxo pela equipe multidisciplinar do Centro Boldrini, já para DRM no D35 as análises foram feitas por PCR qualitativo e RQ-PCR com o uso de primers para a região VDJ das imunoglobulinas e receptores de células T. Observou-se que pelo menos 1 rearranjo gênico foi detectado ao diagnóstico para 98% dos casos estudados através de PCR qualitativo. Os rearranjos mais frequentes ao diagnóstico foram IGH, IGK, TCRG e TCRD para os casos de LLA-B derivada e TCRG, TCRD e Sil-Tal e IGH para os casos de LLA-T. Os primers paciente específicos para RQ-PCR mais sensíveis (sensibilidade 1×10^{-4}) foram aqueles envolvendo rearranjos IGH, TCRD, TCRG e IGK. Associação entre presença de DRM no D35 detectada por RQ-PCR e idade dos pacientes (grupo <1 e ≥ 9 anos) foi observada. Presença de DRM $\geq 10^{-3}$ no D35 se mostrou relacionada com sobrevida global em pacientes com LLA-B derivada classificados como

BR após análises de DRM no D15. Casos de LLA-B derivada classificados como BR após o D15 em sua maioria não apresentaram DRM nos pontos analisados (D15 e D35) sugerindo que a análise da DRM nesses casos seja dispensável. Já para os casos LLA-B derivada classificados como AR após o D15, 7 pacientes considerados bons respondedores no D15 mostraram-se respondedores lentos no D35 ressaltando a importância da análise da DRM nesse ponto do tratamento. Para casos com LLA-T o número reduzido de pacientes impediu qualquer conclusão a respeito. As duas metodologias aplicadas para as análises da DRM no D35 obtiveram concordância de 80% e 100% para LLA-B derivada e LLA-T, respectivamente.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer. The recent ALL treatment protocols can achieve the complete remission in 80% of cases and this success is due to different treatments for patients stratified into different risk groups. Therefore, patients considered in remission may have substantial contents of neoplastic cells, the minimal residual disease (MRD). The proliferation of such neoplastic cells is associated with disease relapse and they can be undetected by conventional methods. The current protocol of the Brazilian Childhood Leukemia Treatment (GBTLI-LLA-2009) uses the analysis of MRD to stratify patients into risk groups and thus determine their treatment. Thus this study aimed to (1) study the MRD for qualitative and quantitative method (RQ-PCR) at D35 from 120 prospective patients admitted for treatment with protocol GBTLI-LLA-2009 at Centro Boldrini between December 2009 and July 2013 (2) determine the frequency and sensitivity of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements (3) analysis of the relocation of patients into risk groups in three points of treatment (D8, D15 and D35) (4) find associations between results of MRD at D35 and D15 and clinical-biological characteristics of patients (5) analyze the overall survival in patients (6) to analyze the degree of agreement between the results obtained by qualitative PCR and RQ-PCR in D35. MRD analyzes at D15 were performed by flow cytometry by the multidisciplinary team of the Centro Boldrini, MRD at D35 analyzes were performed by qualitative PCR and RQ-PCR using primers for the VDJ region of the immunoglobulin and T cell receptors. At least one gene rearrangement was detected at diagnosis to 98% of the cases studied by qualitative PCR. The most frequent rearrangements at diagnosis were IGH, IGK, TCRG and TCRD for cases of B-ALL derived and TCRG, TCRD and Sil-Tal and IGH in cases of T-ALL. The most sensitive RQ-PCR patient specific primers (sensitivity 1×10^{-4}) were those involving IGH, TCRD, TCRD and IGK rearrangements. Association between presence of MRD in D35 detected by RQ-PCR and age group (<1 and ≥ 9 years) was observed. Presence of MRD $\geq 10^{-3}$ in D35 showed to be related with overall survival in patients with B-ALL derived classified as BR after analysis of MRD in D15. Cases of B-ALL derived classified as low risk after the D15 mostly showed no MRD in the analyzed points (D15 and D35) suggesting that the analysis of these cases is dispensable. As for the B-ALL derived cases classified as AR after D15, 7 patients considered good responders in D15 proved to be slow responders in D35 emphasizing the importance of analyzing MRD at this point of treatment. For T-ALL cases the small number of patients did not allow any conclusion. Both methodologies for the analysis of DRM in D35 obtained 80% and 100% of agreement for B-ALL derived and T-ALL respectively.

LISTA DE ABREVIATURAS

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

AR: Alto Risco

AR-RR: Alto Risco Respondedor Rápido

AR-RL: Alto Risco Respondedor Lento

BR: Baixo Risco

BRV: Baixo Risco Verdadeiro

BRI: Baixo Risco Intermediário

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CLP: Célula Progenitora Linfóide

CF: Citometria de Fluxo

CMP: Célula Progenitora Mielóide

D8: Dia 8 da Terapia de Indução

D15: Dia 15 da Terapia de Indução

D35: Dia 35 da Terapia de Indução

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo Trisfosfatado

DRM: Doença Residual Mínima

GBTLI: Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis

Ig: Imunoglobulina

IGH: Cadeia pesada da imunoglobulina

IGK: Cadeia leve da imunoglobulina

LLA B-derivada: Leucemia Linfóide Aguda B-derivada

LLA pré-B: Leucemia Linfóide Aguda pré-B

LLA pré-pré-B: Leucemia Linfóide Aguda pré-pré-B

LLA pró-B: Leucemia Linfóide Aguda pró-B

LLA: Leucemia Linfóide Aguda

LLA-T: Leucemia Linfóide Aguda T

LMA: Leucemia Mielóide Aguda

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

MO: Medula Óssea

mRNA: Ácido Ribonucleico Mensageiro

M13: vírus bacteriófago M13

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

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

RT-PCR: Reação da Transcriptase Reversa seguida por Reação em Cadeia da Polimerase

SG: Sobrevida Global
TCR: Receptor de Célula T
TCRD: Receptor Delta de Célula T
TCRG: Receptor Gamma de Célula T
T7: vírus bacteriófago T7
WBC: Contagem de Células Brancas

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1 Esquema da hematopoiese.....	página 26
Figura 2 Esquema representativo da translocação entre os genes BCR e ABL.....	página 29
Figura 3 Esquema de uma imunoglobulina e os rearranjos VDJ.....	página 31
Figura 4 Esquema de grupos de risco e critérios para estratificação do protocolo GBTLI-LLA/2009 para pacientes com LLA-B derivada.....	página 34
Figura 5 Esquema de grupos de risco e critérios para estratificação do protocolo GBTLI-LLA/2009 para pacientes com LLA-T.....	página 35
Figura 6 Combinações de primers para LLA B-derivada e LLA-T utilizadas para análise de DRM por PCR qualitativa.....	página 41
Figura 7 Estratégia para desenho de primers paciente específicos.....	página 45
Figura 8 Esquema representativo de uma placa de RQ-PCR para teste de sensibilidade de primers.....	página 46
Figura 9 Esquema representativo de uma placa de RQ-PCR para análises de DRM por no D35.....	página 47
Figura 10 Protocolo inicialmente sugerido para PCR qualitativo.....	página 51
Figura 11 Exemplos de homo/heterodúplex para rearranjos seguindo o protocolo sugerido pelo consórcio BIOMED-2.....	página 52
Figura 12 Resultados iniciais de sequenciamento.....	página 53
Figura 13 Resultado de sequenciamento após padronização.....	página 54
Figura 14 Resultados para IGH da padronização para diminuição do volume de reagentes no teste de primers por RQ-PCR	página 55
Figura 15 Resultados para TCRG da padronização para diminuição do volume de reagentes no teste de primers por RQ-PCR.....	página 56
Figura 16 Frequências para rearranjos em amostras de LLA-B derivada.....	página 58
Figura 17 Frequências para cada rearranjo em amostras de LLA-B derivada.....	página 59
Figura 18 Frequências reais para cada rearranjo testado ao diagnóstico após sequenciamento das amostras em pacientes de LLA-B derivada.....	página 60

Figura 19	Frequências para rearranjos em amostras de LLA-T.....	página 61
Figura 20	Frequências para cada rearranjo em amostras de LLA-T.....	página 61
Figura 21	Estratificação de risco dos pacientes após D8 e D15 para pacientes LLA-B derivada.....	página 64
Figura 22	Estratificação de risco dos pacientes após D8 e D15 para pacientes LLA-T.....	página 64
Figura 23	Gráfico de correlação entre resultados de DRM no D15 e D35 em pacientes com LLA-B derivada alto risco.....	página 74
Figura 24	Gráfico de correlação entre resultados de DRM no D15 e D35 em pacientes com LLA-B derivada baixo risco.....	página 75
Figura 25	Gráfico de correlação entre resultados de DRM no D15 e D35 em pacientes com LLA-T.....	página 77
Figura 26	Curvas de Sobrevida Global em pacientes com LLA-B derivada baixo risco após estratificação no D15.....	página 81
Figura 27	Curvas de Sobrevida Global em pacientes com LLA-B derivada baixo risco após estratificação no D15.....	página 82
Figura 28	Curvas de Sobrevida Global em pacientes com LLA-T.....	página 83

QUADROS

Quadro 1 Reações e ciclos de PCR utilizados para amplificação dos rearranjos encontrados ao diagnóstico.....	página 42
Quadro 2 Reações e ciclos de PCR utilizados para reamplificação dos rearranjos encontrados ao diagnóstico.....	página 43
Quadro 3 Resultados dos testes de sensibilidade dos primers paciente-específicos por RQ-PCR para os rearranjos testados.....	página 66
Quadro 4 Resultados dos testes de sensibilidade dos primers paciente-específicos por RQ-PCR para cada segmento gênico testado	página 67
Quadro 5 Resultados de DRM no D35. Rearranjos testados por cada metodologia para pacientes com resultados de DRM $\geq 10^{-3}$ por RQ-PCR.....	página 86

TABELAS

Tabela 1 Estratégia para desenho de primers paciente específicos para DRM por RQ-PCR.....	página 44
Tabela 2 Resultado das análises da DRM por citometria de fluxo no D15.....	página 63
Tabela 3 Primers paciente específicos, sensibilidade alcançada e tamanho total da região N.....	página 69
Tabela 4 Sensibilidades alcançadas com o uso de 100ng e 500ng de DNA como amostra para 182 primers utilizados para análises da DRM.....	página 70
Tabela 5 Número total de casos analisados para diferentes dados clínicos, número e porcentagem de casos positivos e valor de p através do teste exato de Fisher para a DRM no D35.....	página 78
Tabela 6 Resultados de DRM no D35 e número de pacientes por grupo para RQ-PCR e PCR qualitativo para LLA-B derivada.....	página 84
Tabela 7 Resultados de DRM no D35 e número de pacientes por grupo para RQ-PCR e PCR qualitativo para LLA-T.....	página 85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 As Leucemias.....	25
1.2 Doença Residual Mínima.....	28
1.3 O impacto da DRM nas decisões clínicas.....	31
1.4 O protocolo brasileiro de tratamento.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAL E MÉTODO.....	39
3.1 Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos.....	39
3.2 Obtenção do DNA de células mononucleadas.....	40
3.3 Análise da DRM por PCR qualitativo.....	40
3.4 Reamplificação das amostras extraídas da análise de Homo Heteroduplex, sequenciamento e identificação da região de interesse.....	42
3.5 Desenho e teste de primers paciente específicos para quantificação de DRM por PCR em tempo real.....	44
3.6 PCR em tempo real de amostras do seguimento (D35).....	47
3.7 Citometria de Fluxo.....	48
3.8 Análise Estatística.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. Padronizações realizadas.....	51
4.1.1. Padronização do protocolo para detecção de rearranjos gênicos clonais ao diagnóstico.....	51
4.1.2. Padronização do protocolo para sequenciamento dos rearranjos clonais encontrados ao diagnóstico.....	53
4.1.3. Diminuição do volume de reação para testes de primers por RQ-PCR.....	55
4.2. Detecção de rearranjos gênicos Ig e TCR ao diagnóstico.....	57
4.2.1. Frequências de rearranjos gênicos encontrados ao diagnóstico.....	57
4.3. Análise dos pacientes para Doença Residual Mínima através de Citometria de Fluxo (CF).....	62

4.4. Sequenciamento dos rearranjos clonais encontrados ao diagnóstico, desenho e teste de primers paciente específicos para quantificação de DRM por RQ-PCR.....	65
4.5. Análise da Doença Residual Mínima no dia 35 da terapia de indução.....	71
4.5.1. Relação entre DRM no D15 e DRM no D35.....	72
4.5.2. Relação entre DRM no D35 e fatores clínicos e biológicos.....	77
4.5.3. Análise de Sobrevida Global.....	80
4.6. Comparação entre DRM por RQ-PCR e por PCR qualitativo.....	83
5. CONCLUSÕES.....	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1 As Leucemias

A leucemia consiste em uma doença heterogênea, caracterizada por uma disfunção das células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea, levando a uma proliferação clonal desordenada e sem controle de células precursoras de origem mielóide ou linfóide. Pode ser classificada como aguda ou crônica, sendo a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) o câncer mais comum na infância, correspondendo a cerca de 30% de todos os distúrbios malignos nessa faixa etária e a 80% de todas as leucemias que ocorrem até os 15 anos de idade. Seu pico de incidência ocorre em crianças entre 2 e 5 anos, e meninos são mais comumente envolvidos que meninas, principalmente no período puberal (1, 2, 3).

Atualmente, a teoria mais aceita para a fisiopatologia da LLA é aquela que relaciona o seu desenvolvimento à transformação de uma única célula progenitora hematopoiética mutante, capaz de se expandir indefinidamente por auto-renovação, levando à produção de precursores hematopoiéticos malignos e pouco diferenciados. Os eventos que levam a este processo de mutação são complexos e multifatoriais. A LLA se desenvolve como resultado de mutação que ocorreria em células progenitoras linfóides de linhagem T ou B (Figura 1).

Estudos das LLA têm confirmado que a transformação leucêmica pode ocorrer nos diversos estágios de maturação no processo de diferenciação linfóide, sendo que oitenta e cinco por cento dos casos são classificados como LLA B-derivada e 15% como LLA-T (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

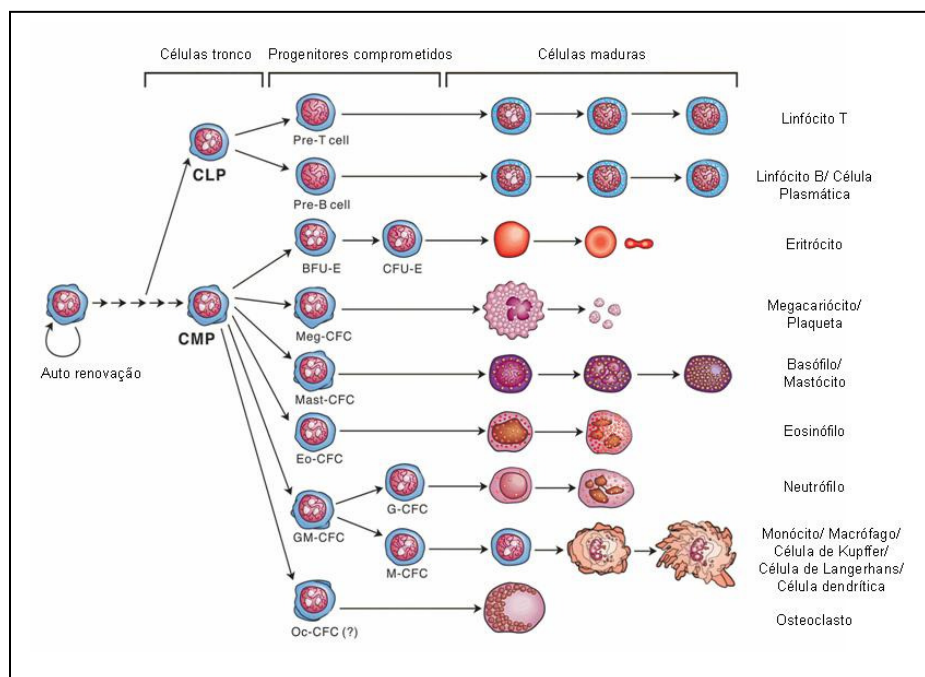


Figura 1. Esquema da hematopoiese onde é possível observar os diferentes estágios de maturação das células de linhagens linfóide e mieloide, e também as células tronco, progenitores comprometidos e células maduras da linhagem hematopoiética. CLP=célula progenitora linfóide e CMP célula progenitora mieloide¹.

As LLA B-derivadas podem ainda ser divididas em quatro subgrupos (LLA pró-B, pré-B, pré-pré-B ou comum e LLA-B madura) de acordo com as expressões de antígenos de superfície celular que refletem o estágio da diferenciação do linfócito B precursor (9).

Avanços notáveis no tratamento da LLA infantil tem sido feitos nas últimas quatro décadas (1-6 Bartram et al, 2013); nos anos 60 apenas 30% dos casos alcançavam a cura enquanto hoje em dia com os atuais protocolos de tratamento, cerca de 95% das crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) alcançam remissão, definida por microscopia óptica como menos de 5% de blastos na medula óssea. Infelizmente cerca de 20% destes pacientes ainda apresentarão recaída (10), na maioria das vezes por um clone idêntico ou relacionado àquele presente no diagnóstico (11).

Diversos fatores prognóstico pré-tratamento têm sido usados na estratificação dos pacientes em diferentes grupos de risco, como por exemplo, a contagem leucocitária ao diagnóstico, a idade do paciente, o conteúdo de DNA da célula leucêmica, anormalidades citogenéticas e imunofenotipagem (12, 13, 14). Entretanto, o significado prognóstico destas variáveis depende do tipo e intensidade do tratamento (15).

¹ <http://www.bloodlines.stemcells.com>

Nas crianças com LLA, os dados clínicos e laboratoriais convencionais, utilizados para definir a estratificação dos tratamentos nos diferentes grupos de risco, deixam de detectar 20 a 30% dos doentes, de início com bom prognóstico, e que recaem, apesar dos tratamentos já bem estabelecidos (14, 16, 17).

Além da determinação de fatores de risco pacientes específicos (como sexo e idade) e fatores de risco LLA específicos ao diagnóstico (como contagem leucocitária, imunofenótipo e aberrações cromossômicas), a confirmação *in vivo* da resposta à quimioterapia tem tido particular relevância em prever o risco de recaída em pacientes com LLA infantil (18, 19).

Avaliar a resposta à quimioterapia é a espinha dorsal do manejo clínico de pacientes com leucemia aguda. Esta tarefa tem se baseado historicamente na capacidade de identificar células leucêmicas entre células normais na medula óssea através da morfologia.

A confiabilidade do exame morfológico em sangue periférico ou na medula óssea depende da expertise do hematologista e sua sensibilidade é fundamentalmente limitada por similaridades na aparência entre células leucêmicas e progenitores normais linfohematopoéticos (20). A baixa sensibilidade permite a detecção de 1 célula leucêmica entre 100 células normais. De acordo com este critério diagnóstico 95-98% dos pacientes alcançam remissão completa após 4 semanas do início da terapia (21) porém, pacientes considerados em remissão morfológica completa podem ainda ter um grande número de células residuais leucêmicas (20). A estas células cancerosas remanescentes dá-se o nome de Doença Residual Mínima (DRM) (22).

A introdução de métodos para detectar a doença residual mínima (DRM) tem revolucionado o monitoramento da resposta ao tratamento da leucemia aguda. Esses métodos podem reconhecer as células leucêmicas através de critérios objetivos aumentando assim a confiabilidade do exame da medula óssea ou do sangue periférico. O conceito de que pacientes com leucemia em remissão morfológica poderiam apresentar níveis de DRM mensuráveis foi demonstrado pela primeira vez no início dos anos 80 (23). Desde então, muitos dados têm sido coletados comprovando este conceito tanto em LLA como em LMA (24, 25, 26, 27).

1.2 Doença Residual Mínima

Ao longo de três décadas a questão para os pesquisadores foi como aplicar os resultados dos estudos da DRM na clínica. Fundamental para solucionar esta questão foi o desenvolvimento de métodos sensíveis que possam ser utilizados para o estudo da DRM em praticamente todos os pacientes com LLA, e a demonstração do poder preditivo da DRM em avaliar a probabilidade de recaída nos pacientes independente dos fatores prognósticos comumente utilizados como idade, sexo, contagem leucocitária, imunofenótipo, etc (24).

Atualmente, basicamente três métodos são utilizados para identificar a DRM e permitem a identificação de uma célula leucêmica entre 10.000 a 100.000 células normais (10^{-4} a 10^{-5}) sendo então 100 a 1.000 vezes mais sensíveis que as técnicas citomorfológicas convencionais. Os métodos diferem em sua aplicabilidade em termos de sensibilidade, tempo para obtenção do resultado e custo (25) sendo eles: imunofenotipagem, análises de PCR de produtos de fusão de translocações cromossômicas e análises de PCR de rearranjos clone específicos de genes de imunoglobulinas (Ig) ou receptores de células T (TCR).

A detecção da DRM através da imunofenotipagem por citometria de fluxo baseia-se no fato de que células de LLA expressam marcadores celulares que discordam daqueles encontrados em precursores linfoides B ou T (23). Equipamentos modernos permitem a detecção de 6 ou mais marcadores permitindo uma descrição do fenótipo da célula leucêmica que facilita sua identificação. Virtualmente cada caso de LLA expressa diversos padrões anormais de marcadores celulares, oferecendo uma detecção de 1 célula leucêmica em 10.000 células normais (28). Por causa do processo leucemogênico resultar na expressão aberrante de marcadores celulares, imunofenótipos associados à leucemia podem ser identificados em mais de 95% dos casos de LLA-B derivada (23). No geral, a citometria de fluxo é mais amplamente disponível devido ao seu uso em muitos laboratórios de diagnóstico, porém sua principal limitação é a interpretação dos resultados, que requer grande conhecimento do operador.

Células leucêmicas podem carregar anormalidades genéticas, como as translocações cromossômicas que formam transcritos de fusão, que podem ser utilizadas para reconhecê-las entre as células saudáveis, estas translocações estão presentes em aproximadamente 40% das crianças e adultos com LLA. Os transcritos de fusão que podem ser formados e

que são os mais amplamente usados para a detecção da DRM são: *BCR-ABL1*, *MLL-AFF1*, *TCF3-PBX1*, e *ETV6-RUNX* (25, 29) (figura 2).

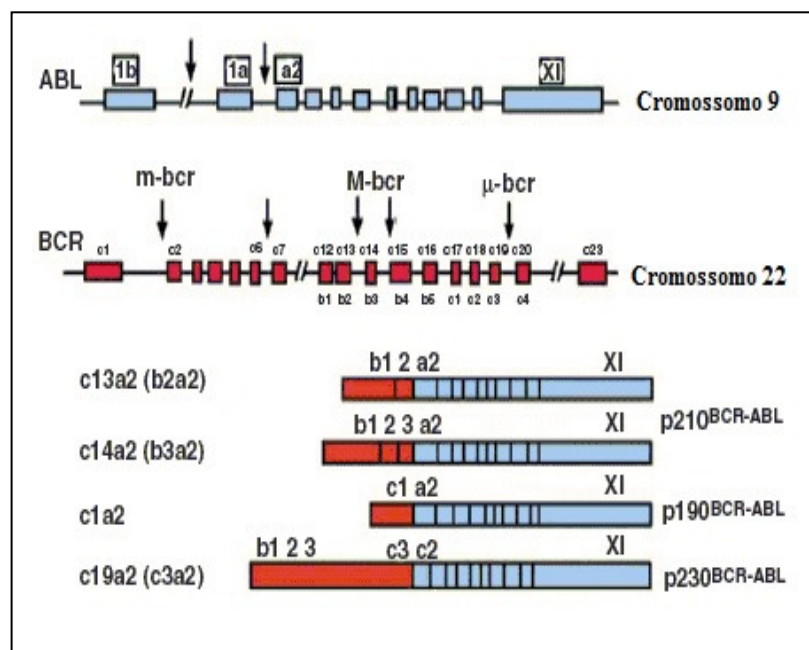


Figura 2. Esquema representativo da translocação entre os cromossomos 9 e 22, resultando na fusão dos genes BCR e ABL. Há diferentes pontos de quebra nos genes resultando em basicamente 4 mRNAs e subsequentemente 4 proteínas distintas. Esses transcritos são utilizados como marcadores moleculares para análises da DRM ².

Estudos de PCR utilizando como alvo genes de fusão são realizados através do uso de primers consenso que podem ser aplicados para todos os casos portadores do mesmo gene de fusão. Uma característica desse método é a associação estável entre o gene de fusão e o clone leucêmico o que revela seu potencial para detectar também células pré-leucêmicas. Contrariamente ao PCR de rearranjos de genes de Ig ou TCR que utilizam DNA, estudos de PCR de genes de fusão comumente utilizam mRNA. Em teoria sensibilidade de 0,001% é alcançada, mas na prática, sensibilidade de 0,01% é mais comumente observada (30).

² <http://www.lookfordiagnosis.com>

Análise da DRM através de PCR de rearranjos clone específicos de imunoglobulinas (Ig) e receptores de células T (TCR) tem se tornado o método mais difundido na Europa devido a sua excelente sensibilidade e tem sido desenvolvido desde os anos 80 com o objetivo de quantificar a DRM em pacientes com LLA (31, 32). Durante o desenvolvimento das células B segmentos V, D e J de genes de imunoglobulinas são rearranjados com deleção e inserção randômica de nucleotídeos nos sítios de junção, este processo gera uma sequência única para cada célula e sua progênie. Os genes que codificam os componentes dos receptores de células T também se submetem a um processo similar nos precursores de células B. Pelo fato das células de LLA derivarem de uma transformação oncogênica de um único precursor linfóide, elas possuem rearranjos de genes Ig e TCR clonais, os quais podem ser usados para distinguir células de LLA das células linfóides normais e células não linfóides (25).

O processo padrão para o uso desses rearranjos para o monitoramento da DRM consiste em identificar os rearranjos em cada paciente ao diagnóstico através de PCR com primers consenso para segmentos V, D e J dos genes de Ig e TCR para determinar se os rearranjos estão presentes, seguido de análises de homo/heterodúplex para estabelecer a clonalidade (33). As amostras de PCR com resultado clonal são sequenciadas e primers específicos para PCR complementares à região de junção VDJ são sintetizados. O ensaio de PCR em tempo real (RQ-PCR) com este primers paciente-específico é otimizado e então a metodologia é aplicada em amostras do seguimento (25). Aproximadamente 90% dos casos de LLA infantil possuem rearranjos adequados para o monitoramento da DRM através dessa metodologia.

A quantificação da DRM feita pelo RQ-PCR utiliza misturas de amostras de DNA de leucemia com DNA de células normais para determinar a sensibilidade do ensaio (35). Uma vez que a LLA pode apresentar subpopulações de um clone inicial leucêmico (oligoclonalidade) ao diagnóstico e pode sofrer ainda rearranjos Ig e TCR durante o curso da doença, o que pode resultar na perda das sequências de DNA utilizadas como alvos paciente específicas, é recomendado para as análises o uso de dois ou mais marcadores para evitar resultados falso negativos (21). Embora essa metodologia seja sensível e precisa (permitindo a detecção de uma célula leucêmica entre 10.000 a 100.000 células normais), o

tempo necessário para desenho e teste de primers paciente específicos impede sua aplicação durante as fases iniciais da terapia (por exemplo no dia 8 da terapia de indução).

Um recente avanço na área dos estudos da DRM em LLA é a aplicação da tecnologia do sequenciamento de nova geração para sequenciar todos os rearranjos de genes de Ig e TCR (34, 35, 36). Este método deve facilitar os estudos moleculares da DRM em LLA e poderá substituir metodologias moleculares atuais.

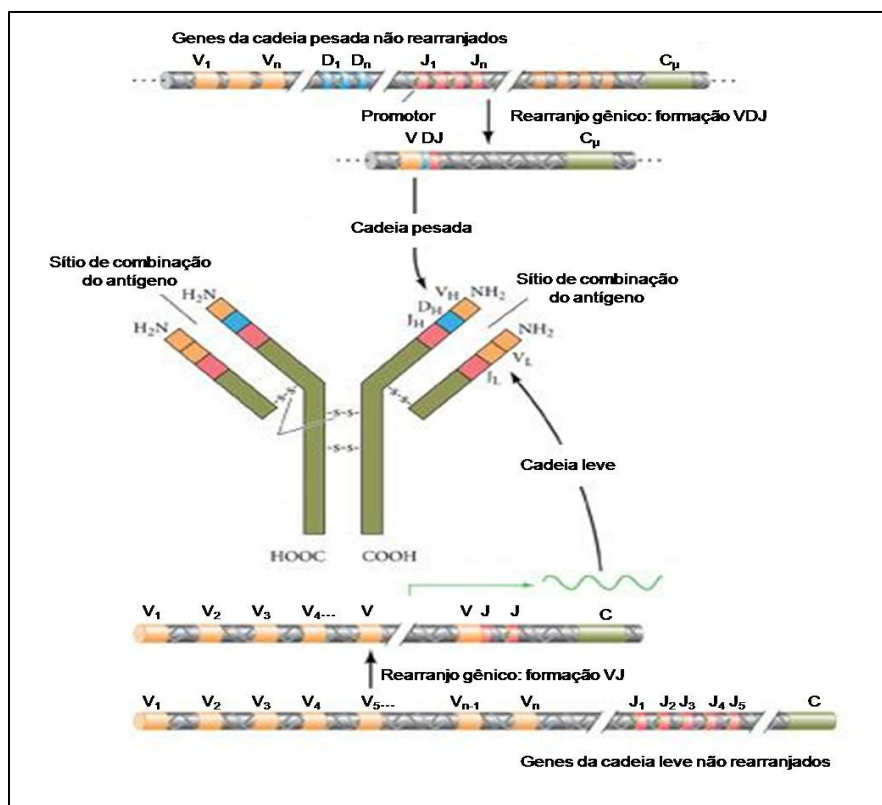


Figura 3. Esquema representativo de uma imunoglobulina e os rearranjos gênicos VDJ responsáveis pela formação das cadeias leve e pesada da Ig. Rearranjos gênicos semelhantes também ocorrem na formação dos receptores de células T².

1.3 O impacto da DRM nas decisões clínicas

A introdução do monitoramento da DRM tem transformado a forma na qual muitos pacientes com leucemia são tratados. Os níveis da DRM são agora amplamente utilizados como parâmetro para a estratificação de risco em LLA e têm tido sua aplicabilidade

² <http://8e.devbio.com/images>

aumentada também em casos de leucemia mielóide aguda (LMA). Os resultados das análises podem ser aplicados à maioria das crianças com LLA e ser entregues em tempo hábil para as mudanças de intensidade de tratamento (37, 38, 39, 40).

O significado prognóstico da DRM em LLA infantil foi demonstrado em muitos estudos envolvendo pacientes com primeiro diagnóstico de LLA, pacientes com LLA em primeira recaída e aqueles que se submeteram a transplante de medula óssea (41, 42, 43). Testes durante as fases iniciais do tratamento fornecem informação prognóstica crucial em crianças e adolescentes com LLA e a DRM frequentemente anula o impacto prognóstico dos parâmetros clínicos, biológicos e estimativas morfológicas de resposta ao tratamento.

A DRM também é um forte fator prognóstico para crianças e adolescentes com primeira recaída de LLA que alcançam a segunda remissão e para aquelas com aparente recaída isolada extramedular (44), sua detecção antes do transplante de MO é associada com um aumento do risco de recaída pós-transplante (29, 45) e o monitoramento da DRM pós-transplante informa para decisões a respeito da redução da terapia imunossupressiva, administração de infusões linfocitárias e preparação para outro transplante.

Os níveis de DRM variam entre diferentes subtipos de LLA. Em crianças com LLA-B derivada a presença de DRM ao final da indução é menor entre pacientes portadores de translocação *ETV6-RUNX1*, hiperdiploidia (47 cromossomos) e LLA *TCF3-PBX*; e maior entre aqueles portadores de translocação *BCR-ABL1* e deleções *IKZF1* (46, 47). Em pacientes com LLA-T a DRM é particularmente mais frequente naqueles classificados com LLA-T de fenótipo precoce ou “Early T phenotype” (ETP- ALL) (48).

Além do seu uso como fator prognóstico, a DRM pode também ser utilizada para detecção de recaída da leucemia antes de sua identificação morfológica, determinar a carga de leucemia antes de transplante e monitorar a eficácia de um regime de tratamento em relação ao seu antecessor.

Em pacientes com LLA, a DRM é usualmente analisada ao final da terapia de indução e em vários intervalos durante o período pós-remissão. O valor do extensivo monitoramento pós-remissão para pacientes com resultados de DRM negativos ao final da indução é questionável, uma vez que muitos destes pacientes permanecem durante longo tempo em remissão (49). Em pacientes com LLA de linhagem T, a DRM é igualmente

distribuída no sangue periférico e na MO (50, 51). Nesse pacientes a DRM pode também ser monitorada no sangue periférico.

Um estudo realizado pela AIEOP-BFM ALL 2000 tem definido padrões internacionais para a estratificação de risco em LLA pediátrica. A estimativa de prognóstico baseada na DRM tem se provado superior a todos os outros parâmetros. O valor prognóstico da DRM tem sido confirmado em inúmeros estudos, independente de qual método de DRM foi utilizado, tanto em crianças como em adultos (52, 53, 54, 55).

A implementação dos estudos de DRM nos protocolos de tratamento requerem uma forte interação entre especialistas em DRM e oncologistas clínicos. Estudos de DRM podem ser mais caros quando comparados aos testes laboratoriais clínicos de rotina, mas geralmente seu custo é similar àqueles de outros testes de alta complexidade. Quando executados e aplicados de forma correta têm potencial para reduzir os custos clínicos pela melhora na eficiência do tratamento (56).

Testes de DRM são agora incluídos na maioria dos protocolos para tratamento das LLA infantis. Há uma considerável variabilidade nos pontos selecionados para os estudos da DRM e nos níveis da DRM utilizados para definir o risco de recaída. O significado clínico e seu uso para a estratificação do tratamento estão intimamente relacionados com o protocolo a ser utilizado e, conseqüentemente a interpretação do significado clínico dos resultados da DRM necessita ser considerada no contexto de cada regime de tratamento (24).

Dadas as diferenças dos regimes terapêuticos e do método de quantificação da DRM adotados nos diferentes centros de tratamento, cada instituição deve definir o valor preditivo da DRM em suas próprias condições.

1.4 O protocolo brasileiro de tratamento

O protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil GBTLI-LLA-2009 (57), utiliza a DRM para estratificação dos pacientes em grupos de risco.

Este protocolo preconiza que os pacientes inicialmente classificados nos grupos de alto ou baixo risco por características ao diagnóstico (idade e leucometria, principalmente) sejam posteriormente estratificados de acordo com os resultados da resposta citológica no

D8, DRM por citometria de fluxo (CF) no D15 e DRM por PCR quantitativo (RQ-PCR) no D35.

Pacientes com LLA-B derivada do grupo de Baixo Risco ao diagnóstico que apresentem DRM<0,01% no D15 recebem tratamento menos intenso. Espera-se que nestes casos de excelente resposta clínica no dia 15, a diminuição da quimioterapia não cause comprometimento dos índices de cura, somado à vantajosa diminuição dos efeitos deletérios da quimioterapia. Pacientes LLA-B derivada Baixo ou Alto risco inicial, com DRM≥10% no D15 e ≥0.1% e pacientes LLA-T com DRM≥10% no D15 e ≥1% no D35 passam a receber tratamento mais intenso, com visas a melhorias na probabilidade de sobrevida. As figura 4 e 5 resumizam os critérios para estratificação e os grupos de risco para LLA-B derivada e LLA-T, após a última emenda do GBTLI LLA-2009.

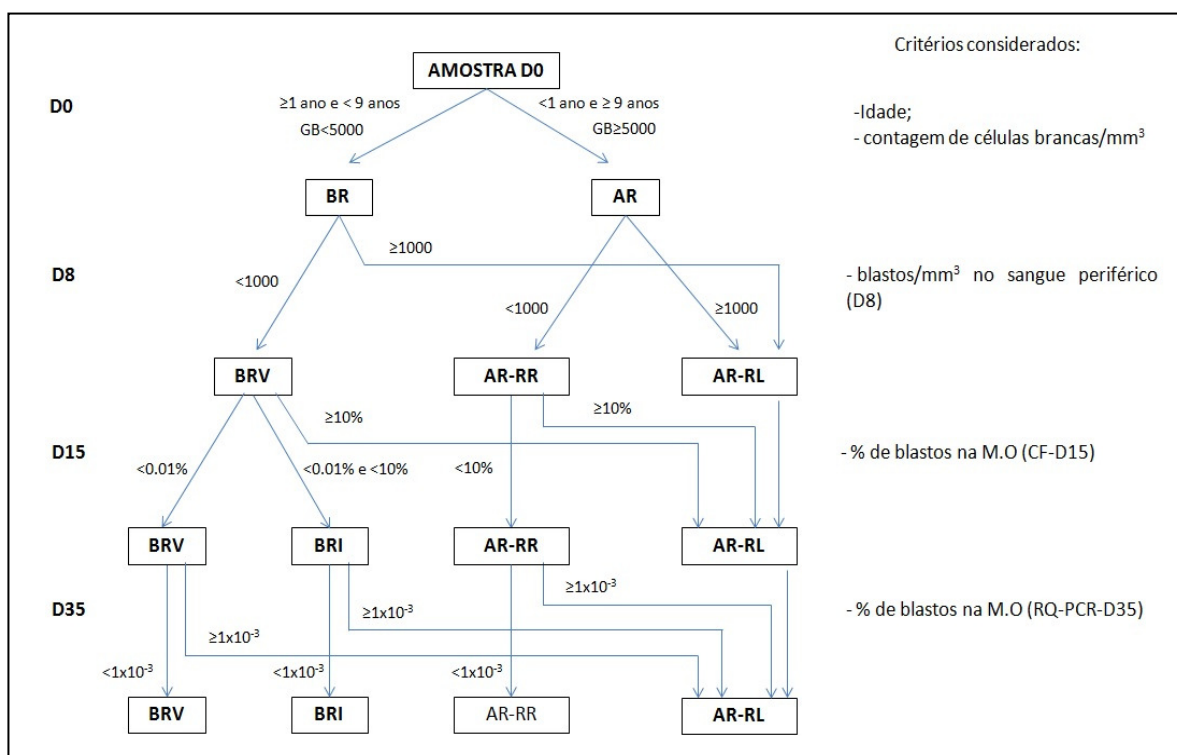


Figura 4. Grupos de risco e critérios para estratificação para pacientes com LLA-B derivada após a última emenda do protocolo GBTLI-LLA/2009 nos dias 0, 8, 15 e 35 de tratamento.

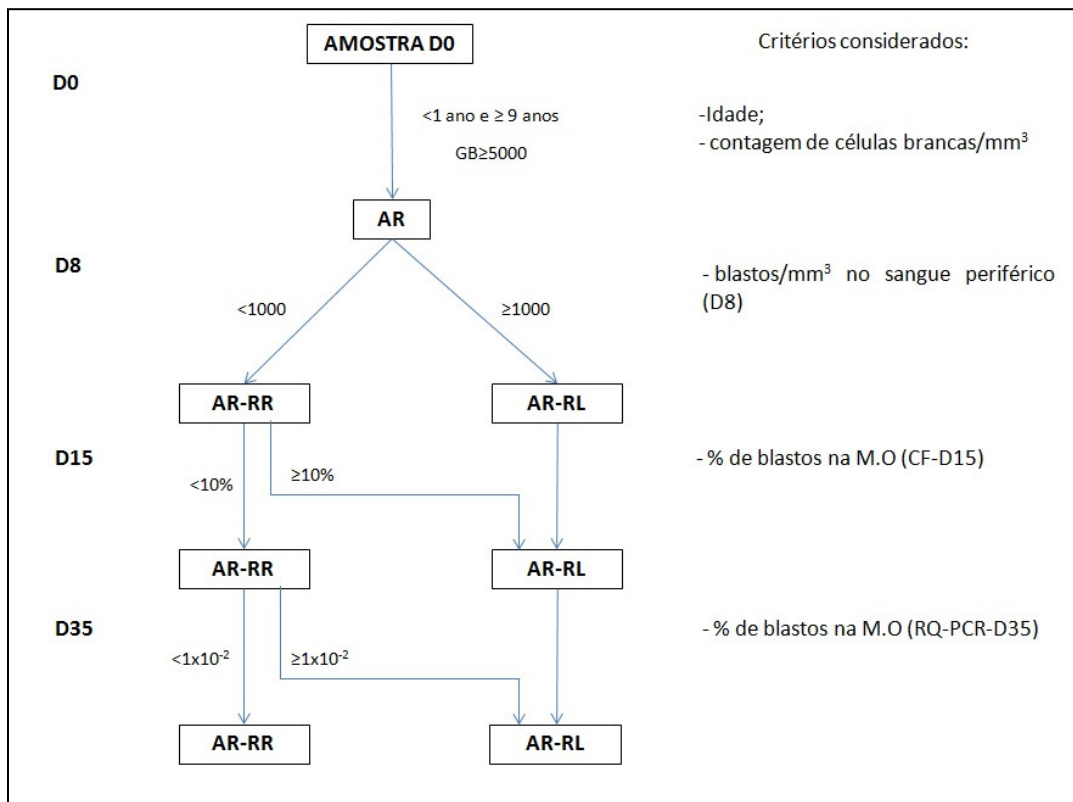


Figura 5. Grupos de risco e critrios para estratificao da LLAT aps a ltima emenda do protocolo GBTLI-LLA/2009 nos dias 0, 8, 15 e 35 de tratamento.

2. OBJETIVOS

- Analisar a Doença Residual Mínima por método qualitativo e quantitativo, em amostras de medula óssea do final da indução (D35), em todos os casos de LLA pediátrica admitidos para tratamento no Centro Infantil Boldrini e inscritos no protocolo GBTLI LLA 2009, no período entre dezembro de 2009 e julho de 2013;
- Determinar a frequência e sensibilidade do ensaio de RQ-PCR para cada um dos rearranjos gênicos *Ig* (*IgH* e *IgK*) e *TCR* (*TCRδ* e *TCRγ*);
- Analisar o número de pacientes realocados nos diferentes grupos de risco, nos diferentes tempos do tratamento: D8 (número de blastos no sangue periférico), D15 (DRM por citometria) e D35 (DRM por RQ-PCR);
- Buscar associações entre resultados de DRM no D35 e grupo de risco ao diagnóstico, presença de blastos no D8, DRM no D15, bem como demais variáveis clínico-biológicas dos pacientes;
- Analisar a sobrevida global para os pacientes envolvidos no estudo;
- Analisar o grau de concordância entre DRM pro PCR qualitativa e RQ-PCR no D35;

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Seleção de pacientes e coleta de dados clínicos

Após aprovação do Comitê de Ética Local (CEP/ Boldrini) (Anexo 1), foram incluídas no estudo amostras prospectivas de 120 casos novos consecutivos de LLA admitidos para tratamento no Centro Infantil Boldrini (Campinas-SP) no período de Dezembro/2009 a Julho/13. Todos os pacientes foram tratados com o protocolo GBTLI-LLA/2009. O mapa do tratamento recebido pelos diferentes grupos de pacientes encontra-se no Anexo 2. As características clínicas e biológicas dos pacientes envolvidos no estudo são apresentadas no Anexo 3.

As amostras de medula óssea foram colhidas ao diagnóstico e nos dias 15 e 35 da terapia de indução, não havendo nenhuma punção extra além das programadas no protocolo de tratamento, a participação foi voluntária e atestada em termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 4).

O diagnóstico da leucemia consistiu de análise morfológica, imunofenotipagem por citometria de fluxo, cariotipagem por bandamento G e análise das principais translocações cromossômicas por RT-PCR (58) sendo realizado pela equipe dos laboratórios do Centro Infantil Boldrini. Os pacientes também foram classificados, de acordo com a resposta inicial ao tratamento, em grupos de alto e baixo risco segundo os critérios adotados pelo protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis, GBTLI LLA-2009.

Dados clínicos como gênero, idade, contagem leucocitária ao diagnóstico (WBC), imunofenótipo, grupo de risco, WBC no dia 8 da terapia de indução, DRM no dia 15 da terapia de indução e presença ou ausência de CD10, foram obtidos para os pacientes do estudo através de exames realizados pela equipe multidisciplinar dos laboratórios do Centro Infantil Boldrini. Todas as informações foram mantidas num banco de dados respeitando as normas éticas de sigilo para acesso a informação de pacientes. A mediana do tempo de seguimento dos pacientes vivos foi de 22 meses (mínimo de 2 meses e máximo de 46 meses).

3.2 Obtenção do DNA de células mononucleadas

As amostras de medula óssea foram submetidas à separação através de gradiente por Ficcol Hypaque Plus (GE Healthcare), de acordo com especificações do fabricante, as células mononucleadas foram aliquotadas e o pellet foi utilizado logo em seguida para extração do DNA.

A extração do DNA foi realizada segundo o protocolo do fabricante do kit Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare). Após a extração, o DNA foi quantificado através de fluorimetria no Qubit Fluorometer com o uso do Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen - conforme especificações do fabricante) e foi armazenado a -20°C.

3.3 Análise da DRM por PCR qualitativo

Após padronização (dados apresentados na seção de resultados), o DNA de cada paciente foi submetido à amplificação por PCR com primers consenso para rearranjos de Imunoglobulinas (Ig) e Receptores de Células T (TCR). Os primers utilizados foram descritos pelo consórcio BIOMED-2 (59) e foram usados em reações singleplex para os rearranjos envolvendo IgH, IgK, TCRD e Sil-Tal, para os rearranjos envolvendo TCRG as reações foram multiplex utilizando um primer senso e dois primers anti-senso para cada reação (Figura 5). As reações e o ciclo de PCR estão descritos no quadro 1 e os primers encontram-se no anexo 5.

As reações de PCR nas amostras do diagnóstico para detecção de rearranjos clonais de Ig e TCR utilizados como marcadores para DRM foram realizadas utilizando 25ng de DNA/reação. Para as reações com amostras do D35 para detecção da DRM nesse ponto do tratamento utilizou-se 500ng de DNA/reação. A figura 6 mostra quais as combinações de primers utilizadas para detecção de rearranjos clonais em LLA-B derivada e LLA-T e os tamanhos de fragmentos esperados.

Gene	Mix	Primers	LLA-B derivada	LLA-T	Tamanho (bp)
<i>IgH</i>	VH1 (1)	VH1 5' + JHcons 3'	X		250-295
	VH2 (2)	VH2 5' + JHcons 3'	X		250-295
	VH3 (3)	VH3 5' + JHcons 3'	X		250-295
	VH4 (4)	VH4 5' + JHcons 3'	X		250-295
	VH5 (5)	VH5 5' + JHcons 3'	X		250-295
	VH6 (6)	VH6 5' + JHcons 3'	X		250-295
	VH7 (7)	VH7 5' + JHcons 3'	X		250-295
	DH1 (8)	DH1 5' + JHcons 3'		X	260-290
	DH2 (9)	DH2 5' + JHcons 3'	X	X	230-260
	DH3 (10)	DH3 5' + JHcons 3'	X	X	390-420
	DH4 (11)	DH4 5' + JHcons 3'		X	175-205
	DH5 (12)	DH5 5' + JHcons 3'		X	225-255
	DH6 (13)	DH6 5' + JHcons 3'		X	110-150
	DH7 (14)	DH7 5' + JHcons 3'	X	X	100-130
<i>IgK</i>	VKI (15)	VKI 5' + Kde 3'	X		225-245
	VKII (16)	VKII 5' + Kde 3'	X		360-390
	VKIII (17)	VKIII 5' + Kde 3'	X		270-300
	Íntron (18)	Íntron 5' + Kde 3'	X		270-300
<i>TCRG</i>	VGI (19)	Vγ1 5' + JG1.1/2.1+ JG1.3/2.3 3'	X	X	200-255
	VG9 (20)	Vγ9 5' + JG1.1/2.1+ JG1.3/2.3 3'	X	X	160-220
	VG10 (21)	Vγ10 5' + JG1.1/2.1+ JG1.3/2.3 3'		X	145-200
	VG11 (22)	Vγ11 5' + JG1.1/2.1+ JG1.3/2.3 3'	X	X	80-140
<i>TCRD</i>	VD1 (23)	Vδ1 5' + Jδ1 3'		X	170-210
	VD2 (24)	Vδ2 5' + Jδ1 3'		X	200-240
	VD3 (25)	Vδ3 5' + Jδ1 3'		X	230
	D2J1 (26)	Dδ2 5' + Jδ1 3'		X	270
	V2D3 (27)	Vδ2 5' + Dδ3 3'	X	X	Aprox. 130
	D2D3 (28)	Dδ2 5' + Dδ3 3'	X	X	Aprox. 240
<i>Sil-Tal</i>	Sil 1 (29)	Sil 5' + Tal1 3'		X	Aprox. 300
	Sil 2 (30)	Sil 5' + Tal2 3'		X	Aprox. 359

Figura 6: Combinações de primers para LLA B-derivada e LLA-T utilizadas para análise de DRM por PCR qualitativa para detecção de rearranjos clonais de Ig e TCR (baseado nos primers descritos por van Dongen et al., 2003).

Quadro 1 – Reação e ciclo de PCR para amplificação dos rearranjos encontrados em amostras do diagnóstico.

Reação (concentrações finais)	Amplificação	Ciclo de PCR
Tampão 10X c/ MgCl ₂	5,0μL	95°C - 3 minutos
dNTP (10mM)	1,0 μL	94°C – 30 segundos
Mix Oligos (10pmol/cada)	2,0 μL	60°C – 30 segundos
H ₂ O milli Q	36,0 μL	72°C – 30 segundos
Taq polimerase (1U)	1,0 μL	72°C - 10 minutos
DNA (25ng)	5,0 μL	

O produto de PCR foi submetido à reação de Homo/Heterodúplex, sendo denaturado a 95°C por 5 minutos e renaturado a 4 °C por uma hora (Anexo 6), e à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% não denaturante. O gel foi corado com brometo de etídeo (1μg/mL) por 30 minutos para verificação de bandas de DNA homoduplex predominantes, características da existência de um rearranjo clone-específico (60). Um marcador de tamanho conhecido foi usado para comparação das amostras e foi considerado resultado positivo a banda homoduplex que apresentou o tamanho esperado correspondente a cada rearranjo testado pela PCR (figura 5).

Nas análises da DRM no D35 os pacientes foram considerados positivos pelo método qualitativo quando as bandas resultantes da PCR realizada com amostras do D35 apresentaram o mesmo padrão de migração daquele observado nas amostras do diagnóstico.

3.4 Reamplificação das amostras extraídas da análise de Homo Heteroduplex, sequenciamento e identificação da região de interesse.

Após padronização prévia (dados apresentados na seção de resultados), as amostras consideradas positivas para os rearranjos clonais testados ao diagnóstico tiveram suas bandas excisadas do gel de poliacrilamida. Em seguida, essas bandas foram maceradas e eluídas em H₂O milliQ. Cerca de 5μL desse produto foi utilizado como amostra para uma

nova amplificação para o rearranjo em questão, essa reamplificação foi realizada utilizando primers com a mesma sequência da primeira reação de PCR, porém com extremidades M13 e T7 visando facilitar o posterior seqüenciamento (Anexo 7).

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose para verificar a amplificação e as condições para o PCR encontram-se no quadro 2.

Quadro 2 – Reação e ciclo de PCR para reamplificação dos rearranjos encontrados em amostras do diagnóstico.

Reação (concentrações finais)	Reamplificação	Ciclo de PCR
Tampão 10X c/ MgCl ₂	5,0µL	95°C - 3 minutos
dNTP (10mM)	1,0 µL	94°C – 30 segundos
Mix Oligos (10pmol/cada)	2,0 µL	60°C – 30 segundos
H ₂ O milli Q	36,0 µL	72°C – 30 segundos
Taq polimerase (1U)	1,0 µL	72°C - 10 minutos
DNA (20ng)	5,0 µL	

Em seguida, cerca de 1 a 2µL do produto de PCR da reamplificação foi utilizado para o seqüenciamento com primers M13 e T7. As reações de seqüenciamento foram realizadas em serviço terceirizado.

Os resultados do seqüenciamento foram analisados para identificação da região N de inserção de nucleotídeos entre os segmentos V-D-J dos rearranjos gênicos testados. A análise foi realizada através de ferramentas online como BLAST, IMGT/V-QUEST, GenBank e ClustalW, disponíveis em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/. Uma vez encontrada a região N, procedeu-se o desenho de primers paciente específicos para cada rearranjo encontrado nas amostras do diagnóstico.

3.5 Desenho e teste de primers paciente específicos para quantificação de DRM por PCR em tempo real.

Foram desenhados dois a três primers diferentes para anelamento na região N de cada um dos rearranjos clonais encontrados ao diagnóstico e sequenciados. Para o desenho dos primers utilizou-se o programa Primer Premier (Premier Biosoft), e os primers foram desenhados no sentido sense ou anti-sense de acordo com a estratégia para cada rearranjo encontrado. A tabela 1 resume o protocolo seguido para desenho de primers paciente específicos de acordo com o segmento gênico rearranjado identificado.

Tabela 1: Estratégia para desenho de primers paciente específicos para DRM por RQ-PCR, de acordo com os segmentos gênicos rearranjados.

Rearranjo gênico	Segmento rearranjado	Sentido do primer e sonda consenso a usar	Sentido do primer a ser desenhado
IgH	Qualquer segmento JH	Anti-sense	Sense
IgK	KDE	Anti-sense	Sense
TCRG	JG1.3/2,3	Anti-sense	Sense
	JG1.1/2,1	Sense	Anti-sense
	VG2, VG3, VG4, VG5,	Sense	Anti-Sense
	VG9, VG10, VG11		
TCRD	VD2, VD3, DD2	Sense	Anti-sense
	DD3/JD1	Anti-sense	Sense

A estratégia para o desenho dos primers paciente específicos seguiu os critérios esquematizados na figura 7.

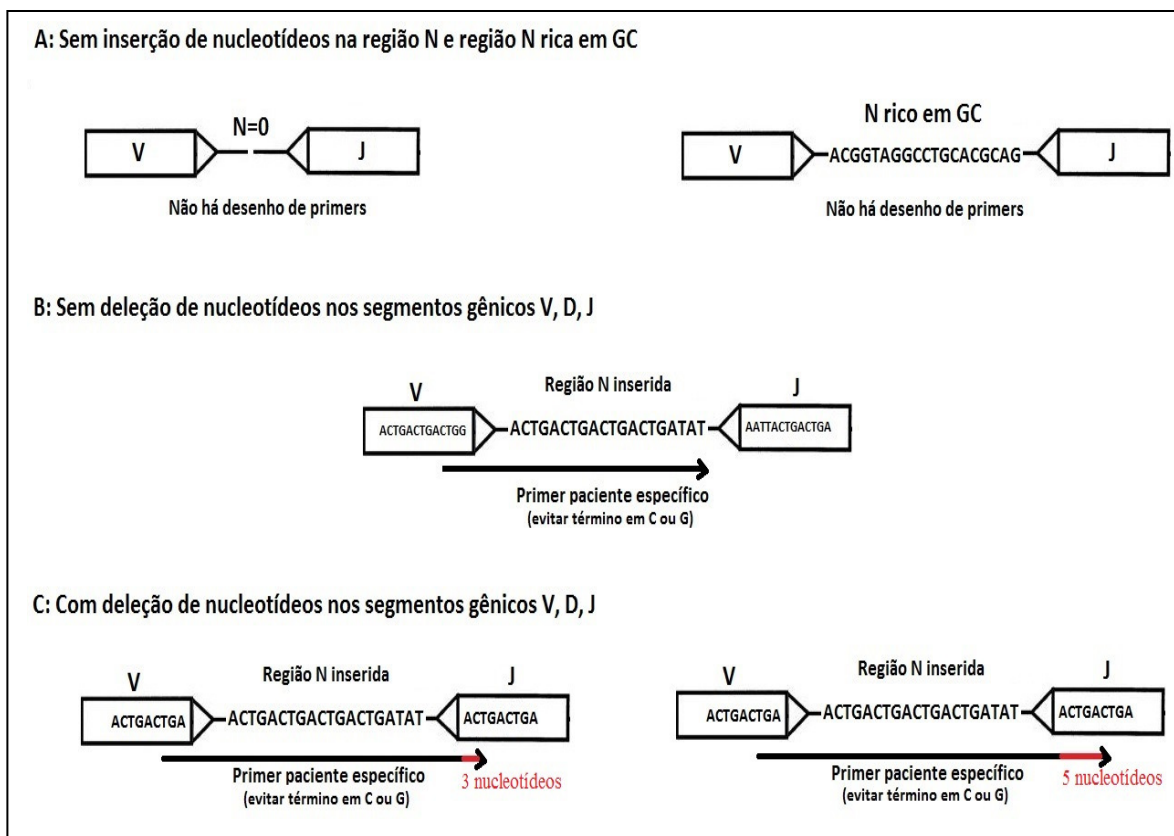


Figura 7. Estratégia geral de desenho de primers paciente específicos. A: Não há desenho de primers para rearranjos sem inserção de nucleotídeos na região N ou com inserção de região N rica em conteúdo CG quando houver outro marcador onde o desenho de primer paciente específico seja possível. B: Quando não há deleção de nucleotídeos nos segmentos V, D ou J durante a recombinação gênica, o término da região 3' do primer paciente específico deve coincidir com o término na região N, evitando-se terminar em C ou G. C: Quando há deleção de nucleotídeos nos segmentos V, D ou J durante a recombinação gênica, o término da região 3' do primer paciente específico deve conter 3 ou 5 nucleotídeos do segmento gênico rearranjado, evitando-se também terminar em C ou G.

Todos os primers paciente específicos desenhados foram testados quanto à sensibilidade através de reação por PCR em tempo real. As reações foram feitas com primers paciente específicos combinados com primers e sondas consenso apropriados para os rearranjos gênicos. Os primers e sondas consenso foram os descritos em Verhagen et.al., 2000 (61) para IgH, van der Velden et al., 2002a (62) para IgK, van der Velden et. al., 2002b (63) para TCRG, Szczepanski et. al., 2004 (64) para TCRD e Chen et al., 2001 (65) para Sil-Tal (Anexo 8).

Para cada reação utilizou-se TaqMan Master Mix Universal 1X (Applied Biosystems), 300 nmol de cada primer, 200pmol de sonda e 100ng de DNA (diluições seriadas de 10^{-3} e 10^{-4} de DNA das amostras de diagnóstico em pool de DNA de doadores

normais). Para cada rearranjo testado um pool de DNA de doadores normais (PBL - 100ng/reacção) foi utilizado como controle negativo. As amostras foram testadas em duplicata e a figura 8 esquematiza um modelo de placa utilizada para as análises.

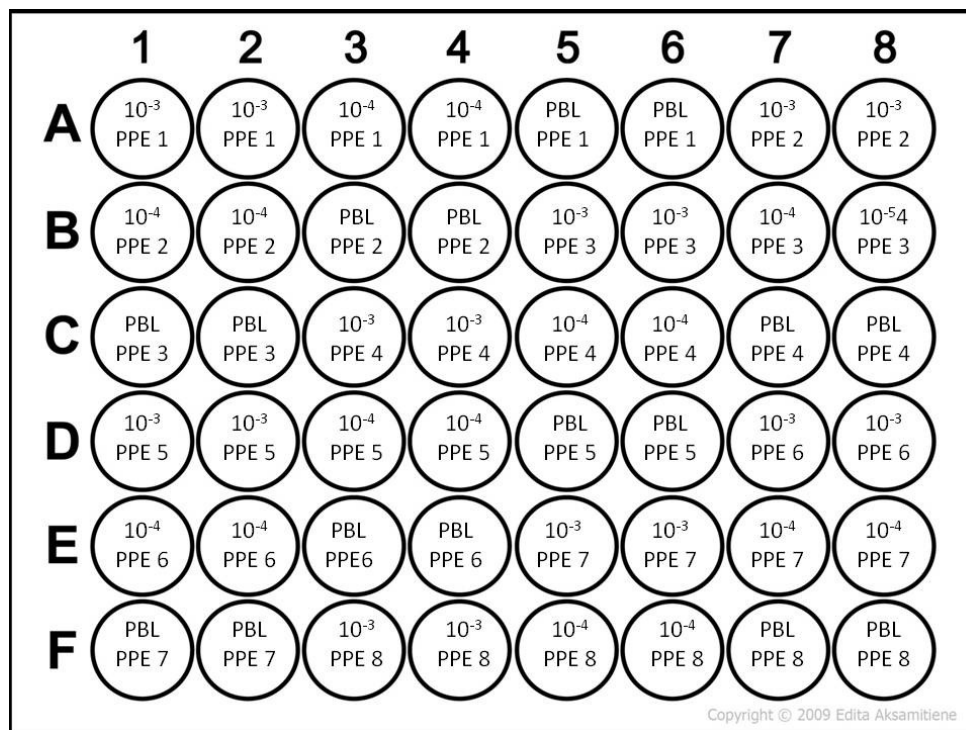


Figura 8. Esquema de placa de RQ-PCR para teste de sensibilidade de primers paciente específico em amostras do diagnóstico (D), curvas de diluição e controle para teste de oito primers paciente específicos. Onde: PPE1 – primer paciente específico 1, PPE2: primer paciente específico 2, PPE3: primer paciente específico 3, PPE4: primer paciente específico 4, PPE5: primer paciente específico 5, PPE6: primer paciente específico 6, PPE7: primer paciente específico 7, PPE8: primer paciente específico 8. PBL: controle.

Os aparelhos utilizados foram o Step One e 7500 fast (Applied Biosystems) e as condições de ciclagem foram: 95°C durante 10 minutos e 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

As análises dos resultados foram realizadas no software dos próprios aparelhos. A maior das diluições onde o sinal de amplificação ocorreu a 1 Ct de diferença em relação ao controle negativo PBL (quando houver amplificação deste), ou a maior das diluições que amplificou quando não houve amplificação de controle negativo, representou a sensibilidade alcançada. Para uso na DRM o primer deve alcançar sensibilidade de pelo menos 10⁻³, visto ser este o ponto de corte estipulado no GBTLI LLA-2009. Os primers (1

ou 2) que alcançaram maior sensibilidade e diferença de sinal em relação ao controle negativo foram usados na análise de DRM no seguimento dos pacientes (D35).

3.6 PCR em tempo real de amostras do seguimento (D35)

Após a seleção dos primers mais sensíveis, reações de RQ-PCR foram realizadas com as amostras de pacientes do D35. Cada teste continha uma nova curva de diluição como a utilizada nos testes dos primers (concentrações de 10^{-2} a 10^{-5}), as amostras do D35 e o gene controle endógeno *N-RAS*.

As amostras do seguimento, os pontos 10^{-4} , 10^{-5} da curva de diluição e o controle PBL foram testados em triplicata, os pontos 10^{-2} e 10^{-3} da curva de diluição foram testados em duplicata, e a H_2O foi testada em monocata. O teste para o gene *N-RAS* foi realizado em monocata para todas as amostras testadas. A figura 9 representa um esquema de uma placa típica com o teste de dois primers paciente específicos.

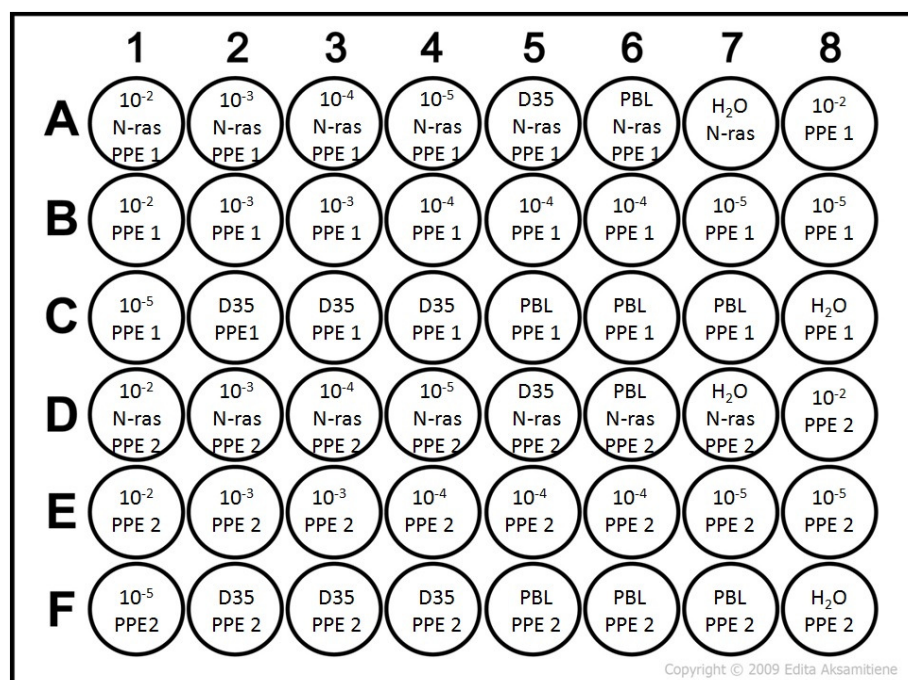


Figura 9. Esquema de placa de RQ-PCR para amostras do seguimento (D35), curvas de diluição e controles para dois primers paciente específicos e o gene controle *N-ras*. Onde: PPE1 – primer paciente específico 1, PPE2: primer paciente específico 2. PBL: controle.

O protocolo para as reações e as condições de ciclagem seguiu o padrão utilizado no teste de sensibilidade dos primers, com a diferença de que nesta etapa foi utilizado 500 ng de DNA por reação.

Todas as reações foram realizadas concomitantemente na mesma placa de RQ-PCR e os valores de quantificação do rearranjo clone-específico foram normalizados em função do valor de amplificação do gene controle *N-RAS*.

Pacientes com resultados acima de 1×10^{-3} para LLA B-derivada e 1×10^{-2} para LLA-T foram considerados positivos para a DRM nesse ponto do tratamento (critério estabelecido pelo protocolo GBTLI-LLA/2009). A diferença entre os valores de ponto de corte entre LLA-B derivada e LLA-T apoia-se no fato de o que o padrão de diminuição das células leucêmicas em resposta à quimioterapia é bem diferente nas LLA-T quando comparado às LLA-B derivadas. Pacientes com LLA-T apresentam diminuição mais lenta das células leucêmicas (66), desta forma se o ponto de corte adotado fosse igual àquele utilizado para LLA-B derivada, os resultados de DRM para casos com LLA-T não seriam tão informativos com relação à resposta ao tratamento uma vez que estes ainda podem apresentar uma grande carga leucêmica no D35, fazendo-se necessário um ponto de corte mais elevado para melhor avaliação da resposta.

3.7 Citometria de Fluxo

A análise da DRM por citometria de fluxo no D15 da terapia de indução foi realizada pela equipe multidisciplinar dos laboratórios do Centro Infantil Boldrini como prescrito pelo protocolo de tratamento das Leucemias Infantis GBTLI LLA-2009. A amostra de medula óssea ao diagnóstico foi analisada com os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos:

- ✓ Marcadores específicos de LLA-B derivada: - 79 α citoplasmático, CD19, CD20, CD22, CD24, sIgM, cIgM, kappa e lambda,
- ✓ Marcadores específicos de LLA-T: CD1a, CD2, CD3 superfície, CD3 citoplasmático, CD4, CD5, CD7, CD8

✓ Marcadores inespecíficos: HLA-DR, CD10, CD34, CD45, TDT citoplasmático.

Para acompanhar a DRM no D15 seguiu-se o protocolo de DRM-CF estabelecido por Coustan-Smith et al. (2006). Para amostras CD45 negativas usou-se o seguinte painel de anticorpos: CD45(FITC)/CD10(PE)/CD34(PERCP)/CD19(APC), já para CD45 positivas usou-se: κλ(FITC)/CD10(PE)/CD34(PERCP)/CD19(APC). Para as LLA-T usou-se o seguinte painel: TDT (FITC)+CD3(PE)+CD45(PERCP)/TDT(FITC)+CD5(PE)+CD45(PERCP)/CD99(FITC)+CD7(PE)+CD3(PERCP). A análise dos resultados de citometria foi feita no software Cell-Quest e Paint-a-Gate (ambos com resultados concordantes para cada amostra).

As leituras foram realizadas em Citômetro de fluxo FACSCALIBUR (Becton Dickinson). Foram considerados DRM negativos os pacientes que na medula óssea do D15 apresentaram blastos leucêmicos em nível $\leq 10^{-4}$ (ou seja, 0.01% - critério estabelecido pelo GBTLI LLA-2009).

3.8 Análise Estatística

O teste exato de Fisher foi aplicado para analisar possível correlação entre o resultado da DRM por RQ-PCR no dia 35 da terapia de indução e variáveis clínicas e biológicas como: gênero, idade, contagem leucocitária (WBC) ao diagnóstico, imunofenótipo, presença ou ausência de CD10 e WBC no dia 8. Foram realizadas análises de correlação para resultados de DRM por citometria de fluxo no D15 e RQ-PCR no D35.

Foram realizadas análises estatísticas para sobrevida global (SG) (definida como o tempo entre o diagnóstico e a ocorrência de óbito de qualquer causa). As análises foram feitas através de curvas de Kaplan-Meier e foram comparadas de acordo com o teste de log-rank.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o uso do software Graph Pad Prism 4 com um nível de significância $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Padronizações realizadas

4.1.1. Padronização do protocolo para detecção de rearranjos gênicos clonais ao diagnóstico.

Inicialmente, o protocolo adotado para detecção de rearranjos clonais de imunoglobulinas (IgH e IgK) e receptores de células T (TCRG e TCRD) nas amostras ao diagnóstico, correspondia àquele descrito em Assumpção et. al., 2010 (67). Tal protocolo estabelecia 8 reações de PCR, sendo que diferentes marcadores deveriam ser utilizados para LLA-B derivada e LLA-T (Figura 10).

Gene	Mix	Primers	LLA- B derivada							
<i>IgH</i>	A	Fr3A 5' + LJH 3'								
<i>IgK</i>	B	VκKI 5' + Intron 3', Kde 3'	A	B	C	D	E	F	I	L
	C	VκII, VκIII 3' + Kde 3'								
<i>TCRG</i>	D	Vγ2, Vγ8 5' + JGT12, JGT3, JGT4 3'								
	E	Vγ9 5' + JGT12, JGT3, JGT4 3'								
	F	Vγ3, Vγ5 5' + JGT12, JGT3, JGT4 3'								
	G	Vγ11 5' + JGT12, JGT3, JGT4 3'								
<i>TCRD</i>	H	Vγ10 5' + JGT12, JGT3, JGT4 3'								
	I	Vδ2 5' + Dδnew 3'								
	J	Vδ2 5' + Jδ1 3'								
	K	Vδ3 5' + Jδ1 3'								
	L	Dδ2 new 5' + Dδnew 3'								
			LLA-T							
			D	E	F	G	H	I	J	K

Figura 10. Protocolo para detecção ao diagnóstico de rearranjos de imunoglobulinas e receptores de células T em pacientes com LLA. À esquerda genes testados e mixes de primers utilizados em cada reação, à direita mixes utilizados para cada subtipo de LLA (adaptado de Assumpção et. al., 2010).

Ao longo dos experimentos iniciais constatou-se que o uso do protocolo inicialmente proposto para detecção dos rearranjos presentes nas amostras ao diagnóstico implicava em dificuldade no seqüenciamento dos fragmentos obtidos, fundamental para desenho de primers paciente-específicos para o PCR quantitativo (RQ-PCR). Sendo assim,

houve necessidade de padronização da metodologia aplicada nesta etapa para uniformizar as condições de PCR e otimizar o processo de sequenciamento.

Todos os primers foram trocados por primers baseados nos publicados pelo consórcio BIOMED-2 descritos em van Dongen et al., 2003 (68), incluindo também primers para outros rearranjos de IgH (rearranjo DH-JH), TCR (V δ 1-J δ 1 e D δ 2-J δ 1) e rearranjos SIL-TAL. O número de reações de PCR por paciente passou de 8 (LLA-T) ou 15 (LLA B-derivada) para 19 reações em ambas, mas com a vantagem de melhoras na uniformidade das condições de PCR e melhoria do seqüenciamento (dados apresentados a seguir).

A figura 11 mostra os resultados de análise homo/heteroduplex para identificação de rearranjos clonais de Ig/TCR e SIL-TAL ao diagnóstico, para dois pacientes, um com LLA-B derivada e outro com LLA-T. O caso de LLA-B derivada apresentou rearranjos clonais para IgH (VH3, VH6, VH7) e IgK (VKI, VKIII e Intron), já o caso de LLA-T rearranjos para TCRG (VGI). Constatou-se também que para o rearranjo DH7 normalmente é encontrada uma banda *germline* (indicada na figura por um *). Pode-se verificar que a nova metodologia resultou em bandas bem definidas e na maioria dos casos sem bandas inespecíficas (com bandas *germline* conhecidas).

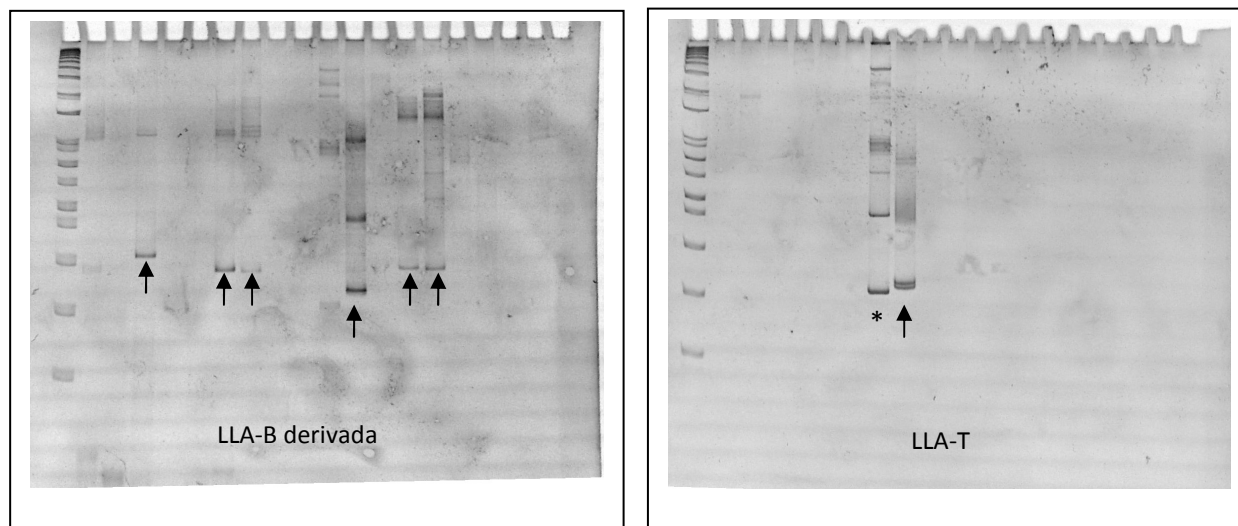


Figura 11. Resultados de formação de bandas homo/heteroduplex em gel de poliacrilamida, para identificação de rearranjos clonais ao diagnóstico, utilizando a metodologia baseada em primers do BIOMED-2. As setas indicam os rearranjos clonais considerados positivos para cada paciente e o * a banda *germline* para o rearranjo DH7.

Desta forma, esta nova metodologia aqui designada como BIOMED-2, foi adotada tanto para a detecção de rearranjos clonais ao diagnóstico quanto para as análises da DRM através de PCR qualitativo em amostras do D35.

4.1.2. Padronização do protocolo para sequenciamento dos rearranjos clonais encontrados ao diagnóstico.

Apenas a troca do protocolo para detecção de rearranjos clonais não foi suficiente para sanar todos os problemas com relação sequenciamento, embora a qualidade tenha melhorado, o sequenciamento direto dos produtos de PCR com os mesmos primers utilizados para amplificação não permitia a análise das sequencias até a região N de interesse em uma boa parte dos casos.



Figura 12. Resultados do sequenciamento para rearranjos de IgH, IgK, TCRG com primers sense e TCRD com primer anti-sense (A, B, C, D, respectivamente). Nota-se que em alguns casos os resultados permitiram o reconhecimento da região N de interesse (C e D) porém, em outros (A e B) os resultados ainda não foram satisfatórios.

Com o intuito de melhorar a qualidade dos sequenciamentos algumas modificações foram realizadas:

Para melhorar o resultado do sequenciamento, decidiu-se por re-amplificar o amplicon recuperado da análise Homo-heteroduplex em gel de acrilamida. Os produtos de PCR foram recuperados pela excisão das bandas amplificadas do gel de poliacrilamida e maceração em água milliQ. Esse DNA foi usado como molde em um novo PCR (chamado de PCR reamplificado) e o produto dessa reamplificação foi então sequenciado pelo método BigDye. Numa primeira tentativa, utilizamos os mesmos primers em todas as 3 etapas: PCR diagnóstico, reamplificação e sequenciamento. Os resultados obtidos não foram suficientemente bons, sendo que em muitos casos não foi possível ler a região N. Além disso, nessa metodologia, a montagem das reações de sequenciamento foi muito trabalhosa, pois foi preciso usar primers específicos para cada rearranjo. Para solucionar esse problema, decidiu-se desenhar novos primers para a reamplificação, que possibilitassem posterior sequenciamento com o uso de um único par de primers universais M13 e T7.

Na nova metodologia a banda foi recortada do gel de acrilamida e o DNA eluído foi reamplificado com primers iguais aos do diagnóstico, mas acrescidos de ‘orelhas’ (extremidades 5’) correspondentes à sequência dos primers M13 ou T7. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em agarose 1% para verificação da reamplificação e sua qualidade. Em seguida o produto da reamplificação foi utilizado como amostra para o sequenciamento com primers universais M13 e T7, independentemente de qual seja o rearranjo gênico. Com esta nova metodologia obteve-se sucesso em todos os sequenciamentos, como pode ser visto no exemplo da figura 13.

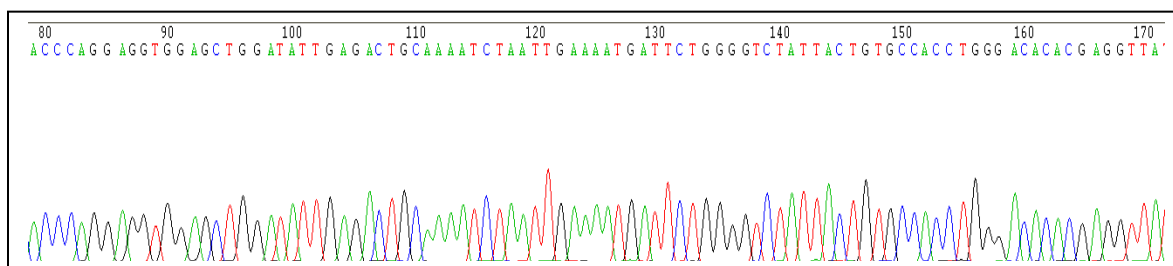


Figura 13. Cromatograma resultante do sequenciamento de uma amostra com rearranjo clonal para TCRG com a aplicação da nova metodologia proposta. O resultado permitiu identificar a região N de interesse. Resultado satisfatório semelhante foi também observado nos outros rearranjos testados (dados não apresentados).

4.1.3. Diminuição do volume de reação para testes de primers por RQ-PCR

Com o objetivo de reduzir o volume de reação, visando economia de reagentes durante o teste de primers paciente-específicos (inicialmente 25 μ L), fizemos testes com volumes finais de reação de PCR em 25, 20 e 15 μ L. As figuras 14 e 15 mostram os resultados dos testes para rearranjos de IgH e TCRG.

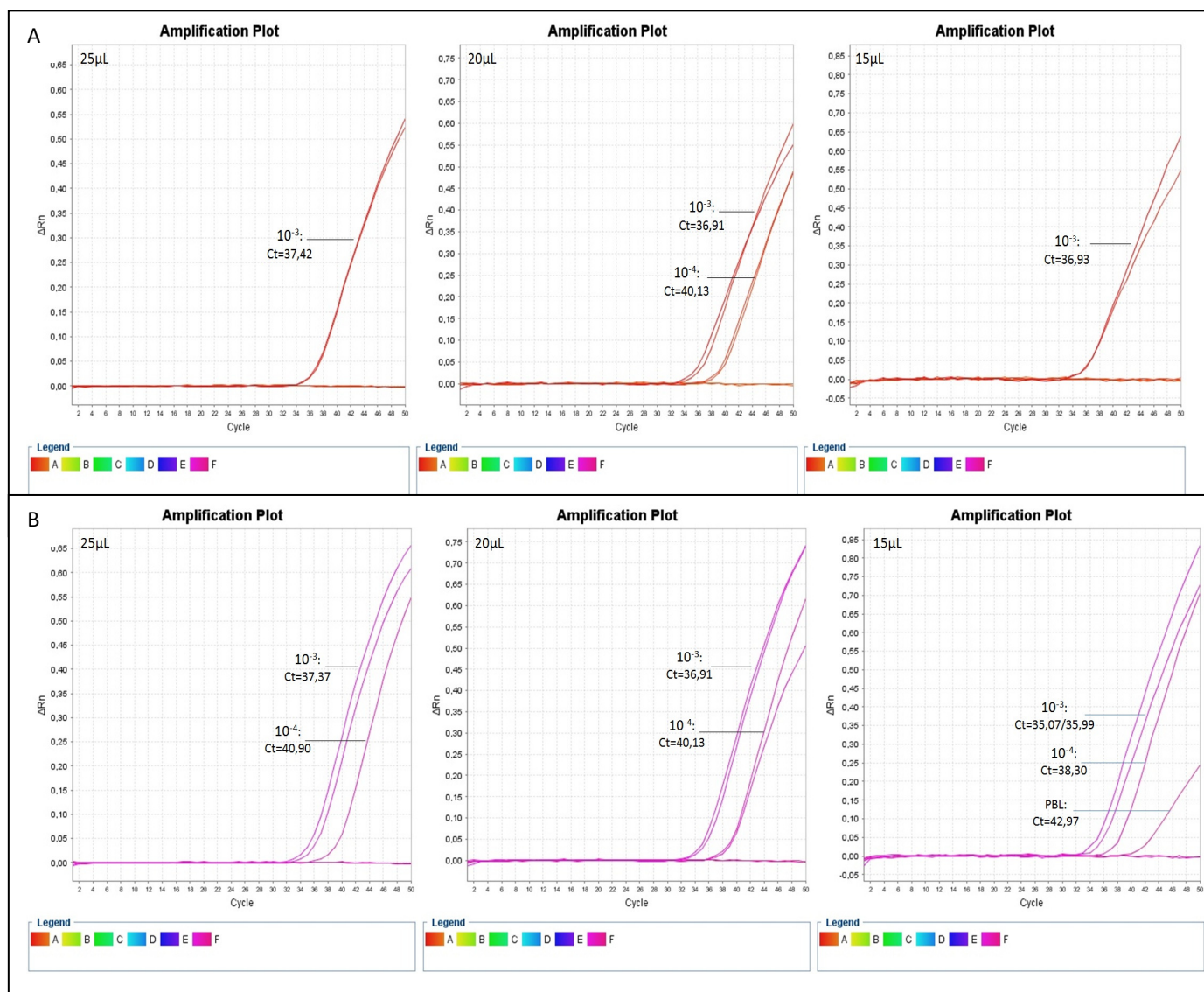


Figura 14. Resultados do teste para diminuição do volume de reação para testes de primers paciente-específicos para rearranjos de IgH. Foram testados 2 primers diferentes (A e B) em volumes 25, 20 e 15 μ L. Os Cts obtidos foram: (A) 25 μ L: 10^{-3} – 37,42; 20 μ L: 10^{-3} – 36,91 e 10^{-4} – 40,13; 15 μ L: 10^{-3} – 36,93 (B) 25 μ L: 10^{-3} – 37,37 e 10^{-4} – 40,90; 20 μ L: 10^{-3} – 36,91 e 10^{-4} – 40,13; 15 μ L: 10^{-3} – 35,07/35,99, 10^{-4} – 38,30 e PBL – 42,97.

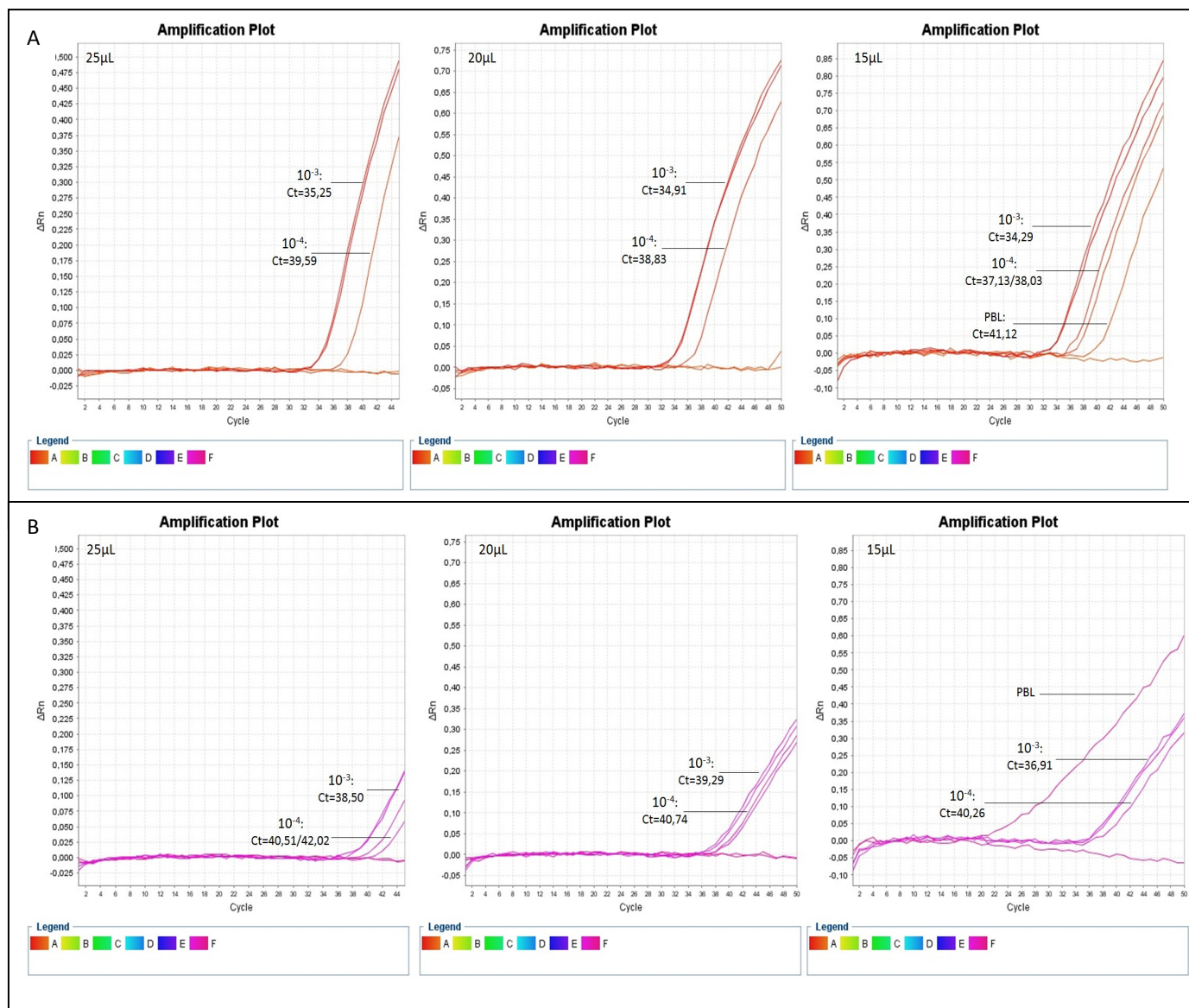


Figura 15. Resultados do teste para diminuição do volume de reação para testes de primers paciente-específicos para rearranjos de TCRG. Foram testados 2 primers diferentes (A e B) em volumes 25, 20 e 15µL. Os Cts obtidos foram: (A) 25µL: 10^{-3} - 35,25 e 10^{-4} - 39,59; 20µL: 10^{-3} - 34,91 e 10^{-4} - 38,83; 15µL: 10^{-3} - 34,29, 10^{-4} - 37,13/38,03 e PBL - 41,12 (B) 25µL: 10^{-3} - 38,50 e 10^{-4} - 40,51/42,02; 20µL: 10^{-3} - 39,29 e 10^{-4} - 40,74; 15µL: 10^{-3} - 36,91 e 10^{-4} - 40,26.

Pode-se observar que em ambos os testes os resultados com volume final de 20 µL não apresentaram diferença em relação ao volume inicialmente utilizado, sendo assim, decidiu-se adotar 20 µL como novo volume final para os testes de sensibilidade de primers paciente-específicos por RQ-PCR. O volume de 15 µL apresentou, em alguns casos, amplificação do controle de DNAs de doadores normais, o que não foi observado até o volume de 20 µL. Para as análises por RQ-PCR em amostras do D35 o volume de 25 µL foi mantido pois neste caso usa-se 500ng de DNA.

4.2. Detecção de rearranjos gênicos Ig e TCR ao diagnóstico

De Dezembro de 2009 a Julho de 2013, 120 pacientes foram admitidos para tratamento de acordo com o protocolo GBTLI-LLA/2009, no Centro Infantil Boldrini (Campinas-SP).

4.2.1. Frequências de rearranjos gênicos encontrados ao diagnóstico

Todos os 120 casos admitidos para tratamento no período entre Dezembro/2009 a Janeiro/2013, foram analisados através de PCR para detecção de rearranjos clonais dos genes IgH, IgK, TCRG e TCRD, além de SIL-TAL1 para as LLA-T exclusivamente (descritos previamente na figura 6). Do total, 91% (109) foram classificados como LLA-B derivada e 9% (11) como LLA-T. Pelo menos 1 rearranjo clonal foi identificado em 98,3% das amostras (99,1% para as LLA de linhagem B e 90,1% para as LLA-T) e dois ou mais rearranjos foram encontrados em 89,1% dos pacientes (90,8% em LLA-B derivada e 70% para LLA-T). O número máximo de rearranjos identificados por paciente foi 8, sendo que a maioria dos pacientes apresentaram 3 rearranjos (26,7%), resultados semelhantes foram encontrados por Dawidowska et al, 2008 (69). As frequências de rearranjos encontrados para cada paciente são apresentadas no anexo 9. Os resultados demonstram que a técnica empregada pode ser utilizada no estudo da DRM na grande maioria das crianças com LLA.

Apenas 2 pacientes não apresentaram rearranjos ao diagnóstico, esses provavelmente derivaram de linhagem celular muito imatura onde os rearranjos VDJ ainda não tinham ocorrido, ambos os pacientes apresentaram marcadores mielóides detectados por citometria de fluxo, um deles teve a DRM acompanhada por estes marcadores e o outro foi a óbito logo após do início do tratamento (antes do D8).

Para os casos de LLA-B derivada os rearranjos mais frequentemente encontrados foram IgH (89%), IgK (51%), TCRG (49%) e TCRD (46%) (figura 16). Os resultados concordam com aqueles anteriormente relatados na literatura por Thorn et al., 2010 (70), Dawidowska et al., 2008 (69), Scrideli et al., 2003 (71) e Assumpção et al., 2010 (67).

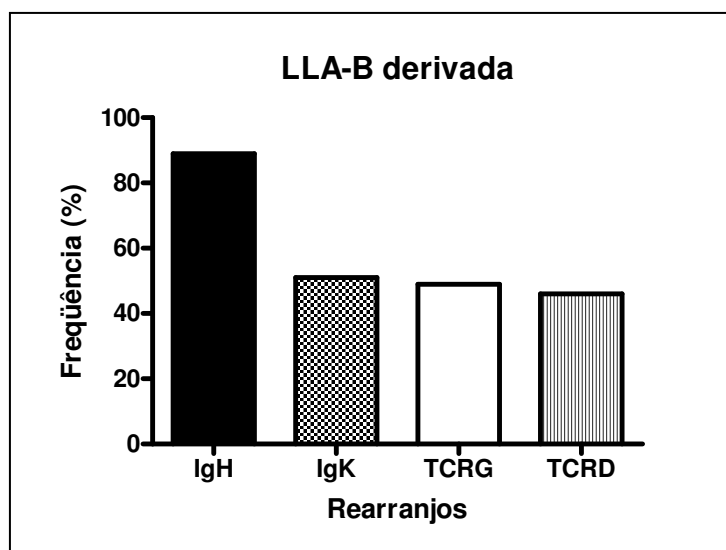


Figura 16. Frequências para os rearranjos IgH, IgK, TCRG e TCRD encontrados ao diagnóstico em pacientes de LLA-B derivada (n=109).

Ainda para os casos de LLA B-derivada a análise realizada para cada rearranjo testado revelou que o rearranjo mais freqüente foi aquele envolvendo VH3-JH (55%), seguido por V δ 2D δ 3 (40%), VGI- JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (36%), VKI-Kde (30%), VKII-Kde (27,5%), VH1-JH (26%), VH2-JH (23%), VG9-JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (22%), VH7-JH (21%), Intron-Kde (15%), D δ 2D δ 3 (14%), VKIII-Kde (13%), VH6-JH e DH27-JH (11%), DH3-JH (5,5%), VH5-JH (4,6%), DH7-JH (2,85) e VH4-JH e VG11- JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (0,9%) (figura 17). Van Dongen et al., 2003 (68) encontrou as mesmas frequências para a maioria dos rearranjos testados demonstrando concordância entre os dados do presente estudo e aqueles previamente relatados na literatura.

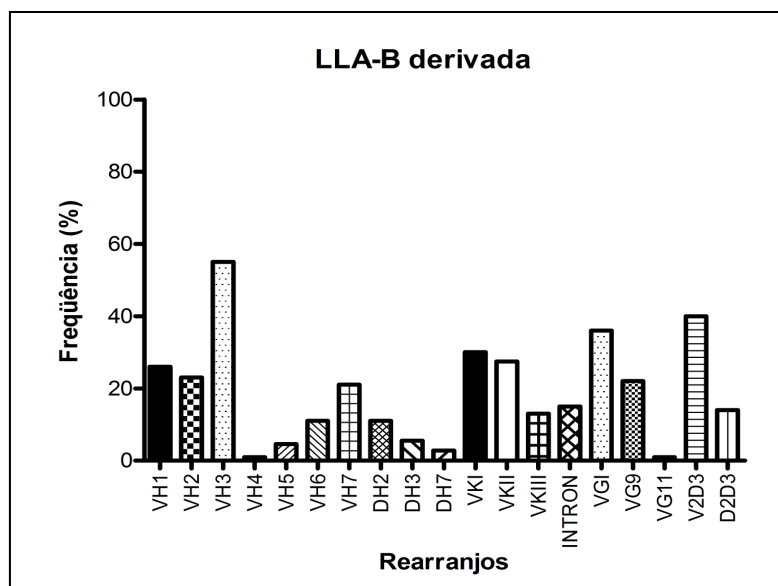


Figura 17. Frequências para cada rearranjo testado ao diagnóstico em pacientes de LLA-B derivada (n=109).

Com base apenas nesses resultados pode-se inferir que as reações para detecção dos rearranjos DH7-JH, VH4-JH, e VG11- JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 poderiam ser excluídas da triagem de rearranjos para este grupo de pacientes uma vez que as frequências foram baixas (<3%) quando comparadas àquelas encontradas na literatura para estes mesmos rearranjos (19%, 17% e 5%, respectivamente) (68). Porém, pode-se observar através das análises do sequenciamento das amostras, que ocorreu amplificação cruzada para alguns rearranjos como: VH1-JH e VH7-JH em 15 pacientes, VH2-JH e VH4-JH em 12 pacientes, VH2-JH e VH3-JH em 2 pacientes e VKI-Kde e VKII-Kde em 1 paciente. Desta forma as reais frequências para cada rearranjo e os rearranjos mais frequentes são: VH3-JH (55%), seguido por Vδ2Dδ3 (40%), VGI- JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (36%), VKI-Kde (29%), VKII-Kde (28%), VH1-JH (23%), VG9-JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (22%), VH7-JH (15%) e Intron-Kde (15%), Dδ2Dδ3 (14%), VKIII-Kde (13%), VH4-JH (12%), VH6-JH e DH2-JH (11%), VH2-JH (10%), DH3-JH (5,5%), VH5-JH (4,6%), DH7-JH (2,85), e VG11- JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (0,9%) (figura 18).

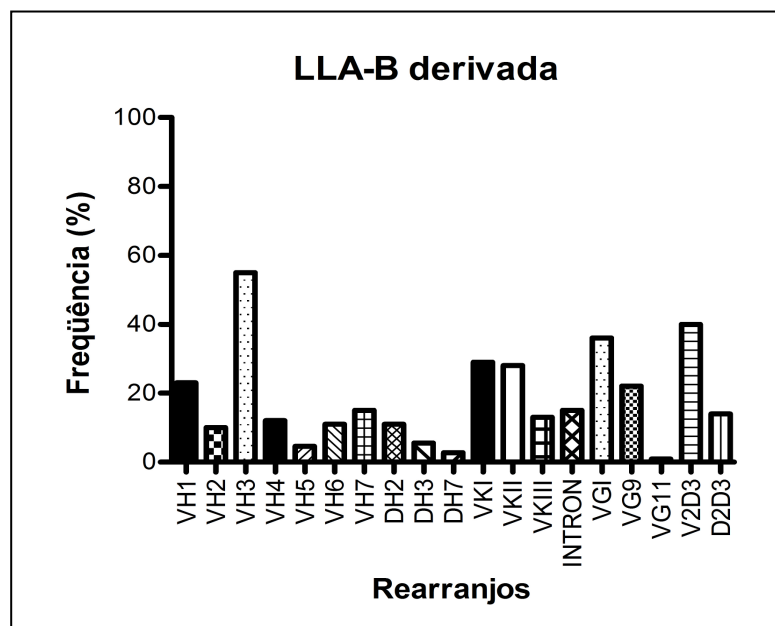


Figura 18. Frequências reais para cada rearranjo testado ao diagnóstico após sequenciamento das amostras em pacientes de LLA-B derivada (n=109).

Após estas análises sugere-se que as reações para detecção dos rearranjos DH7-JH, VH4-JH, e VG11- JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 podem ser excluídas da triagem de rearranjos para análises de DRM para este grupo de pacientes. No caso do rearranjo VH4-JH, embora ocorram em frequência de 12% (Fig. 18), estes são frequentemente (12 de 13 casos) detectados através de amplificação cruzada com os primers para VH2-JH e não através da reação com seus próprios primers (1 em 13 casos, ver Fig 17) . Os demais rearranjos não sofreram mudança de frequência após a confirmação dos rearranjos por sequenciamento.

Já para as LLA-T, 100% dos pacientes apresentaram rearranjos para TCRG, 40% para TCRD e SIL-TAL e 10% para IgH (figura 19). Frequências semelhantes foram encontradas por Thorn et al., 2010 (70) Assumpção et al., 2010 (67), Ganazza et al., 2009 (72) e Scrideli et al., 2003 e 2009 (71, 73).

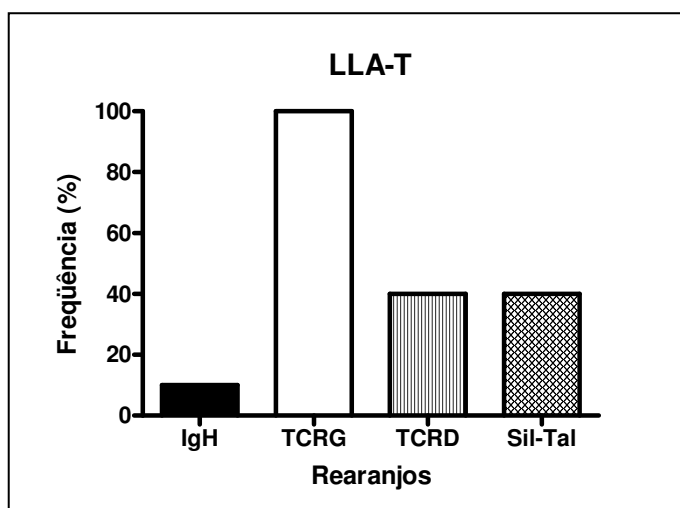


Figura 19. Frequências para os rearranjos IgH, IgK, TCRG e TCRD encontrados ao diagnóstico em pacientes de LLA-T (n=11).

As análises para cada rearranjo testado revelaram que o mais frequente foi aquele envolvendo VGI- JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (82%), seguido por Sil-Tal1 (36%), VG10-JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (27%), V δ 1-J δ 1 e D δ 2-J δ 1 (18%) e DH7-JH, VG9-JG1.1/2.1+JG1.3/2.3, V δ 2-J δ 1, V δ 3-J δ 1 e V δ 2D δ 3 (9%) (figura 20). As frequências aqui encontradas mostraram-se superiores aquelas relatadas à literatura para rearranjos VGI-JG1.1/2.1+JG1.3/2.3, Sil-Tal1 e VG10-JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (55%, 15% e raro, respectivamente) (68) e inferiores para V δ 1-J δ 1 e D δ 2-J δ 1 (21%), e DH7-JH, VG9-JG1.1/2.1+JG1.3/2.3 (16%), V δ 2-J δ 1 (35%), V δ 3-J δ 1 e V δ 2D δ 3 (45%) (69).

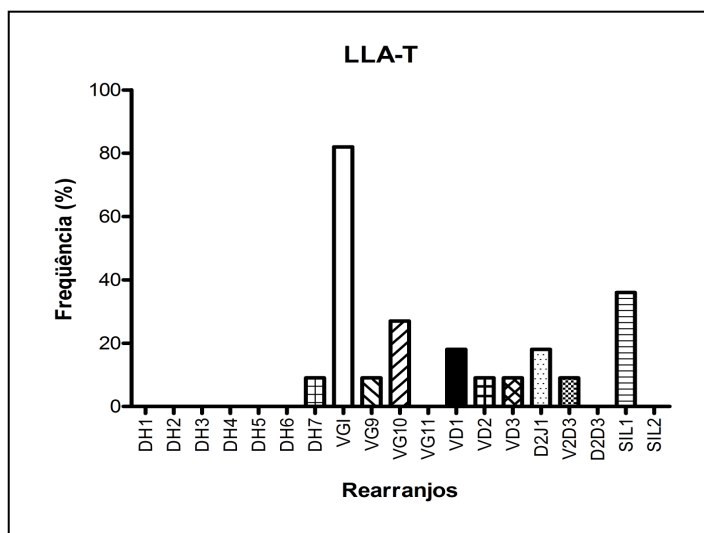


Figura 20. Frequências para cada rearranjo testado ao diagnóstico em pacientes de LLA-T (n=11).

Nenhuma alteração nas frequências e amplificação cruzada foi observada após as análises por sequenciamento. Para pacientes com LLA-T poderia-se sugerir a exclusão da triagem ao diagnóstico dos rearranjos DH1-JH, DH2-JH, DH3-JH, DH4-JH, DH5-JH, DH6-JH, VG11- JG1.1/2.1+JG1.3/2.3, D δ 2D δ 3 e Sil-Tal2, uma vez que nenhum desses rearranjos foi encontrado neste grupo de pacientes. Entretanto, dado o pequeno número de casos analisados, é melhor continuar analisando todos os 19 rearranjos inicialmente propostos.

4.3. Análise dos pacientes para Doença Residual Mínima através de Citometria de Fluxo (CF).

Após análise de citoredução no D8 apenas 4 pacientes LLA-B derivada foram realocados em um novo grupo de risco (baixo risco para alto risco RL, figura 21).

Do total de amostras ao diagnóstico (n=120), 102 foram analisados quanto a DRM no D15 por citometria de fluxo (DRM-CF). Dezoito casos não puderam ser estudados, sendo que 13 deles iniciaram tratamento antes da CF-DRM ter sido padronizada para o protocolo e outros 5 não possuíam material ou este estava inadequado para as análises. O fato de cinco dos 120 pacientes não terem amostra de medula própria para análise no D15 pode ser considerado uma das desvantagens da CF-DRM neste ponto do seguimento. A análise foi feita pela equipe do laboratório de hematologia do Centro Infantil Boldrini, sob coordenação de Rosemary Otubo.

Dos 102 pacientes estudados, 94 eram LLA-B derivada e 8 LLA-T. Para os casos de LLA-B, 50 foram classificados ao diagnóstico como grupo de Baixo Risco (BR) e 44 como alto risco (AR), para os casos de LLA-T todos eram do grupo AR. A maioria dos casos (40%) classificados como BRV no D15 apresentou DRM por CF entre 0,01-1%, já os grupos AR-RR e AR-RL apresentaram maior número de casos (33 e 31%, respectivamente) com níveis de DRM entre 1-10%. A tabela 2 resume os resultados encontrados para DRM por citometria de fluxo no D15.

Tabela 2: Resultado de análises da DRM por citometria de fluxo no D15 (pacientes LLA-B derivada e LLA-T)

DRM no D15	Número de casos BRV	Número de casos AR-RR	Número de casos AR-RL	Número de casos Total
<0.01%	2 (4%)	11 (21%)	0	13 (11%)
0.01%-1%	<u>22 (40%)</u>	12 (23%)	1(8%)	35 (29%)
1%-10%	14 (25%)	<u>17 (33%)</u>	<u>4 (31%)</u>	35 (29%)
≥10%	11 (20%)	5 (10%)	3 (23%)	19 (16%)
n.d.	6 (11%)	7 (13%)	5 (38%)	18 (15%)
Total	55	52	13	120

n.d.: não determinado. Do total de 18 casos que não tiveram resultados de CF , 13 são pacientes que iniciaram tratamento antes da CF-DRM ter sido padronizada para o protocolo e os outros 5 não possuíram material ou este estava inadequado para as análises.

Dentre os pacientes com LLA-B derivada, após a análise da DRM-CF no D15, 10 pacientes do grupo BR (BRV) foram realocados no grupo AR (RL), 37 no grupo BR(BRI) e 2 no grupo BRV. No caso dos pacientes AR, 34 foram realocados no grupo AR (RR) e 8 foram realocados no grupo AR(RL) (figura 21). Esses dados já refletem a resposta dos pacientes aos primeiros quinze dias da terapia de indução, sendo que aqueles que não responderam bem foram realocados em outros grupos de risco para receber intensificação (AR-RL) do tratamento, ou em casos excepcionais de pacientes com excelente resposta, a diminuição da quimioterapia pela retirada do antracíclico e ciclofosfamida. Apenas um dos pacientes BRV com resultados de CF>10% que deveria ser alocado no grupo AR-RL permaneceu alocado no grupo BR (BR-BRI).

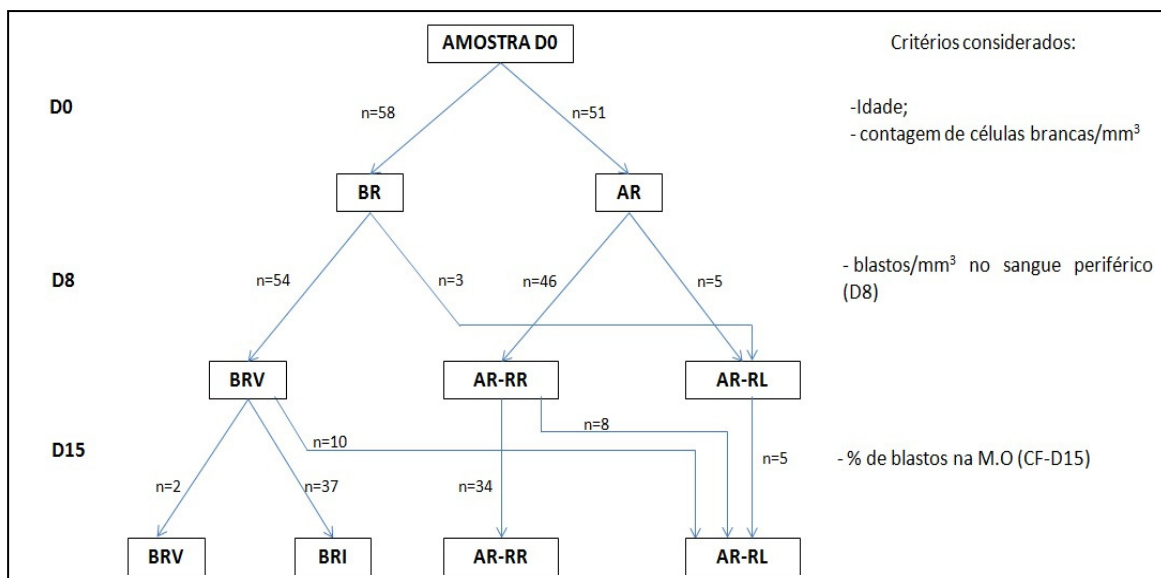


Figura 21. Alocação dos pacientes com LLA-B derivada nos grupos de risco após análises de citoredução no D8 e DRM por citometria de fluxo no D15.

Para os pacientes com LLA-T, não houve mudança na estratificação de grupo em nenhum caso após as análises por CF no D15 (figura 22).

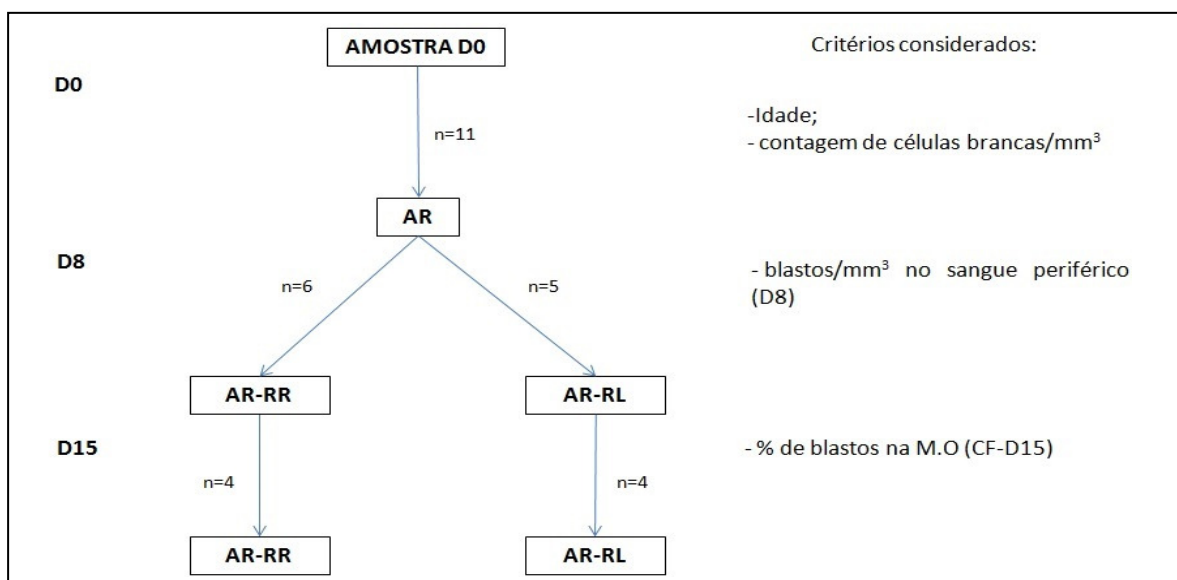


Figura 22. Alocação dos pacientes com LLA-T nos grupos de risco após análises de citoredução no D8 e DRM por citometria de fluxo no D15.

4.4. Sequenciamento dos rearranjos clonais encontrados ao diagnóstico, desenho e teste de primers paciente específicos para quantificação de DRM por RQ-PCR.

Para 108 dos 120 pacientes analisados ao diagnóstico, rearranjos clonais VDJ de genes Ig e TCR identificados em amostras do D0 por PCR qualitativo, foram sequenciados com o objetivo de identificar a região de inserção aleatória de nucleotídeos (região N) entre os segmentos gênicos rearranjados.

Para cada rearranjo encontrado foram desenhados dois a três primers paciente-específicos, complementares à região N. Uma exceção ocorreu para rearranjo Sil-Tal onde os primers utilizados eram consenso ao invés de paciente específicos. Em seguida, todos os primers foram testados e um ou dois, que alcançassem sensibilidade entre 10^{-3} e 10^{-4} , foram escolhidos para serem utilizados na análise de DRM no seguimento dos pacientes (dia 35 de tratamento).

Para os 108 pacientes um total de 704 primers foram testados por PCR quantitativo quanto à sensibilidade, sendo 701 primers paciente-específicos e 3 primers consenso (Sil-Tal). A maior parte dos primers foi para rearranjos de IgH (359), seguido por TCRG (125), TCRD (118), IgK (99) e Sil-Tal (3). Pode-se observar que primers para rearranjos de IgH foram os mais sensíveis (cerca de 63% deles atingiram sensibilidade 1×10^{-4}), em seguida primers para rearranjos TCRD e TCRG (42% e 41% alcançando 1×10^{-4} , respectivamente) e IgK (33%). Primers para IgK foram os que mais alcançaram sensibilidade 10^{-3} (36%) e inespecificidade (21%) e primers para TCRG foram os que apresentaram maior índice de não amplificação (21%). Para Sil-Tal os três primers testados alcançaram sensibilidade 1×10^{-4} . Os resultados são mostrados no quadro 3.

Quadro 3. Resultados dos testes de sensibilidade de primers por PCR quantitativo para 108 pacientes. Dados de primers que foram testados e foram inespecíficos ou não amplificaram também são mostrados.

Rearranjo	Total de primers testados	Teste de Sensibilidade			
		Não amplificou	Inespecífico	10 ⁻³	10 ⁻⁴
IgH	359	30 (8%)	19 (12%)	85 (24%)	<u>225 (63%)</u>
TCRG	125	26 (21%)	16 (13%)	31 (25%)	<u>52 (41%)</u>
TCRD	118	24 (20%)	7 (6%)	38 (32%)	<u>49 (42%)</u>
IgK	99	10(10%)	21 (21%)	<u>36 (36%)</u>	34 (33%)
Sil-Tal consenso	3		-----	-----	<u>3 (100%)</u>

Para cada segmento gênico dos rearranjos testados a sensibilidade dos primers se distribuiu conforme mostra o quadro 4. Os segmentos com maior número de primers testados foram VH3 (145 primers) cuja sensibilidade 10⁻⁴ foi alcançada em 65% dos primers, VGI (66 primers) onde 44% dos primers testados alcançaram sensibilidade 10⁻⁴ e VH1 (64 primers) com sensibilidade 10⁻⁴ em 55% dos primers. Os primers que alcançaram maior sensibilidade (1x10⁻⁴) foram aqueles desenhados para os segmentos gênicos VD3 e VG10 (100%), VH7 (86%), DH2 (80%), VH4 (79%), VH2 (78%), DH7 (67%), VH3 (65,5%), VD1 (60%), DH3 (56%) e VH1 (55%). Já os primers que apresentaram os maiores índices de não amplificação ou inespecificidade compreenderam os segmentos gênicos VG11 (100%), JG1.3/2.3 (42%), JG 1.1/2.1 (39%), DD2 (35%) e intron (33%), provavelmente esses resultados se devem ao fato desses primers conterem uma grande quantidade de nucleotídeos G e C em sua composição.

Quadro 4. Resultados dos testes de sensibilidade de primers por PCR quantitativo para segmentos gênicos de rearranjos VDJ de Ig e TCR. Dados de primers que foram testados e foram inespecíficos ou não amplificaram também são mostrados. Em cinza primers que obtiveram melhores sensibilidades nos testes, em rosa primers que apresentaram maiores índices de não amplificação ou inespecificidade.

Segmento gênico testado	Total de primers testados	Teste de Sensibilidade			
		Não amplificou	Inespecífico	10 ⁻³	10 ⁻⁴
VH1	64	12 (19%)	2 (3%)	15 (24%)	35 (55%)
VH2	31	1 (3%)	-----	6 (19%)	24 (78%)
VH3	145	8 (5,5%)	13 (9%)	29 (20%)	95 (65.5%)
VH4	28	-----	-----	6 (21%)	22 (79%)
VH5	18	7 (39%)	1 (5%)	4 (22%)	6 (34%)
VH6	38	-----	3 (8%)	17 (45%)	18 (47%)
VH7	7	-----	-----	1 (14%)	6 (86%)
DH2	15	-----	1 (7%)	2 (13%)	12 (80%)
DH3	9	2 (22%)	-----	2 (22%)	5 (56%)
DH7	6	-----	-----	2 (33%)	4 (67%)
VKI	28	2 (7%)	3 (11%)	11 (39%)	12 (43%)
VKII	39	6 (15%)	8 (20%)	13 (34%)	12 (31%)
VKIII	18	1 (5%)	7 (39%)	7 (39%)	3 (17%)
Intron	15	-----	5 (33%)	3 (20%)	7 (47%)
VGI	66	11 (17%)	8 (12%)	18 (27%)	29 (44%)
VG9	29	4 (14%)	6 (21%)	11 (38%)	8 (27%)
VG10	4	-----	-----	-----	4 (100%)

Segmento gênico testado	Total de primers testados	Teste de Sensibilidade			
		Não amplificou	Inespecífico	10 ⁻³	10 ⁻⁴
VG11	1	-----	1 (100%)	-----	-----
JG1.1/2.1	13	5 (39%)	-----	2 (15%)	6 (46%)
JG1.3/2.3	12	5 (42%)	1 (8%)	1 (8%)	5 (42%)
VD1	5	-----	-----	2 (40%)	3 (60%)
VD2	52	10 (19%)	2 (4%)	19 (37%)	21 (40%)
VD3	1	-----	-----	-----	1 (100%)
DD2	29	10 (35%)	3 (10%)	7 (24%)	9 (31%)
DD3	31	4 (13%)	2 (7%)	10 (32%)	15 (48%)
Sil-Tal 1	3	-----	-----	-----	3 (100%)

Van der Velden et al. (63) observou que para rearranjos TCRG o tamanho das deleções e inserções da região N influencia a sensibilidade alcançada pelos primers paciente específicos para RQ-PCR, especialmente naqueles com sensibilidade $\leq 1 \times 10^{-4}$. Embora nossos testes de sensibilidade dos primers não utilizem um ponto da curva capaz de identificar níveis de DRM $\leq 1 \times 10^{-4}$ foi possível avaliar para nosso grupo de amostras a influência do tamanho das deleções e inserções de nucleotídeos na região N na sensibilidade alcançada pelos primers em níveis até 1×10^{-4} .

De modo geral, as deleções na região 3' de junção tiveram como média 4,72 nucleotídeos e como mediana 3 nucleotídeos, já inserções na região N tiveram média de 7,9 nucleotídeos e mediana de 6 nucleotídeos, para a região 5' de junção a média de nucleotídeos deletados foi 11,6 e a mediana foi de 5 nucleotídeos. Os primers foram classificados de acordo com o tipo de rearranjo (IgH, IgK, TCRD e TCRG) e a sensibilidade alcançada foi comparada a mediana do tamanho total da região N (soma das

deleções e inserções). Os primers que obtiveram amplificação inespecífica ou que não amplificaram também estão representados na tabela (tabela 3). Para 15 primers não foi possível a análise do tamanho da região N total. Rearranjo Sil-Tal não possui região N sendo assim, também não entrou nas análises.

Tabela 3. Primers paciente específicos classificados de acordo com o tipo de rearranjo (IgH, IgK, TCRD e TCRG), sensibilidade alcançada e tamanho total da região N (mediana da soma das deleções e inserções).

Rearranjo (região N)	Teste de Sensibilidade			
	10^{-3} n/total (%)	10^{-4} n/total (%)	Inespecífico n/total (%)	Não amplificou n/total (%)
IgH				
<18	41/167 (24%)	109/167 (65%)	6/167 (4%)	11/167 (7%)
≥18	41/183 (22%)	114/183 (62%)	9/183 (5%)	19/183 (11%)
IgK				
<14	19/48 (40%)	11/48 (23%)	12/48 (25%)	6/48 (12%)
≥14	16/51 (31%)	<u>23/51 (45%)</u>	8/51 (16%)	4/51 (8%)
TCRD				
<13	23/52 (44%)	22/52 (42%)	3/52 (6%)	4/52 (8%)
≥13	15/66 (23%)	27/66 (41%)	4/66 (6%)	<u>20/66 (30%)</u>
TCRG				
<16	13/54 (24%)	21/54 (39%)	<u>9/54 (17%)</u>	11/54 (20%)
≥16	18/65 (28%)	<u>30/65 (46%)</u>	2/65 (3%)	15/65 (23%)

Realizando um teste exato de Fisher tendo como base os resultados para as sensibilidades 10^{-3} e 10^{-4} e o tamanho da região N para todos os rearranjos, pudemos observar que não houve nenhum resultado estatisticamente significativo no que diz respeito à associação entre o tamanho da região N e a sensibilidade dos primers ($p=0,8976$, $p=0,0902$, $p=0,1951$ e $p=1,00$, para IgH, IgK, TCRD e TCRG, respectivamente) o que contraria os achados de Van der Velden et al. (63). Embora não haja significância estatística, pudemos observar que aparentemente há uma relação diretamente proporcional

entre o tamanho da região N e o alcance de maior sensibilidade (1×10^{-4}) para primers para IgK e TCRG. Também para primers para TCRG observamos que provavelmente há uma relação inversamente proporcional entre o tamanho da região N e a inespecificidade dos primers. Para primers para TCRD o tamanho da região N parece estar relacionada com a não amplificação dos primers, sendo que aqueles que possuíam $N \geq 13$ possuíam maiores índices de não amplificação (30% x 8% $N < 13$). Para primers para IgH o tamanho da região N não se mostrou estar relacionada a qualquer resultado obtido no teste dos primers. Como os resultados não foram estatisticamente significativos a região N dos primers aqui estudados não se apresentou como um parâmetro discriminativo em relação à sensibilidade e todos os rearranjos independente do tamanho da região N encontrada devem ter primers paciente específicos desenhados e testados para se obter os melhores resultados nas análises da DRM.

As análises da DRM no D35 da terapia de indução utilizam 500ng ao invés de 100ng de DNA de amostra (como utilizado para o teste de sensibilidade de primers). Sendo assim, pudemos observar também se houve diferença na sensibilidade alcançada pelos primers que foram selecionados para serem utilizados nas análises das amostras do D35. A tabela 4 resume os resultados encontrados para o total de 182 primers utilizados.

Tabela 4. Sensibilidades alcançadas com o uso de 100ng e 500ng de DNA como amostra para 182 primers utilizados para análises da DRM.

	100ng DNA amostra	500ng DNA amostra	Pacientes/Total (%)
Sensibilidade(n)	10^{-3}	10^{-3}	2/21 (9,5%)
		10^{-4}	<u>17/21 (81%)</u>
		10^{-5}	2/21 (9,5%)
Sensibilidade(n)	10^{-4}	10^{-3}	8/161 (5%)
		10^{-4}	103/161 (64%)
		10^{-5}	<u>50/161 (31%)</u>

Com base nas análises dos testes de sensibilidade dos primers (o qual usa 100ng de DNA como amostra), 21 primers alcançaram sensibilidade de 1×10^{-3} e 161 sensibilidade de

1×10^{-4} . Quando analisamos os resultados utilizando 500ng de amostra no D35, pudemos observar que para os primers inicialmente com sensibilidade 1×10^{-3} , a maioria teve a sensibilidade aumentada com o aumento da quantidade de DNA para 500ng (17 primers alcançaram sensibilidade 1×10^{-4} - 81% e 2 sensibilidade de 1×10^{-5} - 9,5%) e apenas 2 continuaram com a mesma sensibilidade (9,5%). Já para os primers com sensibilidade inicial de 1×10^{-4} , o aumento da quantidade de DNA não alterou a sensibilidade para a maioria dos casos (64%) e provocou diminuição da sensibilidade para 1×10^{-3} em 8 primers (5%) e aumento da sensibilidade para 1×10^{-5} para 50 primers (31%). Após as análises pode-se inferir que o uso de 500ng de DNA na reação resulta em aumento de sensibilidade para 81% e 31% dos casos que alcançam sensibilidade 10^{-3} e 10^{-4} , respectivamente, quando na análise feita com 100 ng de DNA na reação de RQ-PCR.

4.5. Análise da Doença Residual Mínima no dia 35 da terapia de indução.

Dos 120 casos admitidos para tratamento, 105 foram analisados para DRM por PCR qualitativo (BIOMED-2) e quantitativo (RQ-PCR) no dia 35 da terapia de indução (D35). Dos 15 casos não analisados, 2 não tiveram rearranjos clonais de Ig/TCR, 3 não tiveram primers paciente-específicos funcionais para realização do RQ-PCR, 9 não tiveram amostra de DNA do D35, e 1 foi a óbito antes do D35. Destes 105 casos, 78 foram avaliados em paralelo, prospectivamente, por RQ-PCR e PCR qualitativo. Os demais 27 foram analisados prospectivamente por PCR qualitativo, mas não por RQ-PCR, uma vez que o método ainda não estava estabelecido na ocasião. Para estes 27, a análise de DRM por RQ-PCR foi feita retrospectivamente.

No caso da DRM por PCR qualitativo, todos os rearranjos clonais de Ig/TCR encontrados ao diagnóstico foram também testados nas amostras de D35. No caso da DRM por RQ-PCR, para maioria dos pacientes (n=81) foi possível analisar 2 rearranjos, os demais 24 casos foram avaliados por um único rearranjo. No total foram testados 110 rearranjos para IgH, 27 para TCRD, 26 para IgK, 24 para TCRG e 3 para Sil-Tal.

4.5.1. Relação entre DRM no D15 e DRM no D35.

Análises de relação entre resultado da DRM-CF do D15 e DRM-RQ-PCR foram realizadas para 91 casos de LLA-B e também para os casos de LLA-T, embora para este grupo o número de pacientes seja reduzido ($n=6$). Os demais casos envolvidos no estudo não puderam fazer parte das análises por não apresentarem resultados de DRM no D15 e/ou D35.

Vale salientar que os resultados aqui apresentados dizem respeito à avaliação da resposta dos pacientes ao tratamento até o dia 15 e dia 35, e não uma comparação entre os métodos aplicados. A comparação entre a CF e o RQ-PCR como metodologias para análise de DRM já foi feita por outros autores, em amostras pareadas do mesmo ponto do tratamento e mostrou apresentarem sensibilidades similares (74).

Os resultados da análise de relação da DRM-CF D15 versus DRM-RQPCR D35 são apresentados na figura 23.

Para os pacientes com LLA-B derivada AR, a CF no D15 foi capaz de identificar 7 casos que posteriormente no D35 apresentaram níveis de $\text{DRM} \geq 10^{-3}$, destes, 4 tiveram seu grupo de risco alterado de BR para AR após a análise no D15 (pontos em vermelho no gráfico), 2 tiveram seu grupo de risco alterado de AR-RR para AR-RL (pontos pretos no gráfico) e 1 permaneceu no grupo AR-RR (ponto azul no gráfico). No D15 as análises por CF também identificaram 8 pacientes com $\text{DRM} \geq 10\%$ que posteriormente no D35 apresentaram $\text{DRM} < 10^{-3}$, entre eles 5 casos do grupo BR no D8 que foram para AR no D15 (pontos em vermelho vazado no gráfico). A CF no D15 não identificou 7 pacientes que apresentaram $\text{DRM} \geq 10^{-3}$ no D35. Destes pacientes, dois não foram realocados para o grupo de respondedores lentos após o D35, um deles por não apresentar o resultado do RQ-PCR no momento de realocação (análise feita retrospectivamente) e outro por decisão da equipe clínica (pontos em formato de x no gráfico). Os dois pacientes classificados como AR-RL desde o D8 da terapia apresentaram $\text{DRM} < 10\%$ no D15 e $\text{DRM} < 10^{-3}$ no D35.

De modo geral, pode-se observar que a maioria dos pacientes que foram bons respondedores no D15 continuaram como bons respondedores no D35 e praticamente metade dos casos (7 de 15) com resposta lenta no D15 ($\text{Blastos} \geq 10\%$) se mantiveram como maus respondedores ($\text{DRM} \geq 10^{-3}$) também no D35. Pode-se observar também que em

alguns casos, a DRM alta no D15 não está associada a pior qualidade de remissão molecular no D35, uma vez que alguns pacientes (8 de 15) que apresentaram $DRM \geq 10\%$ por CF no D15 apresentaram boa resposta ao tratamento no D35 ($DRM < 10^{-3}$) e vice-versa (7 de 36).

Alguns protocolos de tratamento adotados pelo BFM (Berlin-Frankfurt-Münster Consórcio), CCG (Children's Cancer Group) e St Jude Children's Research Hospital, utilizam a DRM no 35 com um ponto de corte $\geq 10^{-4}$, caso o nosso protocolo adotasse esse ponto de corte 5 pacientes seriam realocados para um novo grupo de risco e todos passariam do grupo AR-RR para o grupo AR-RL. Embora o grupo de risco desses pacientes não tenha sido alterado, todos se encontram vivos e sem ocorrência de qualquer evento.

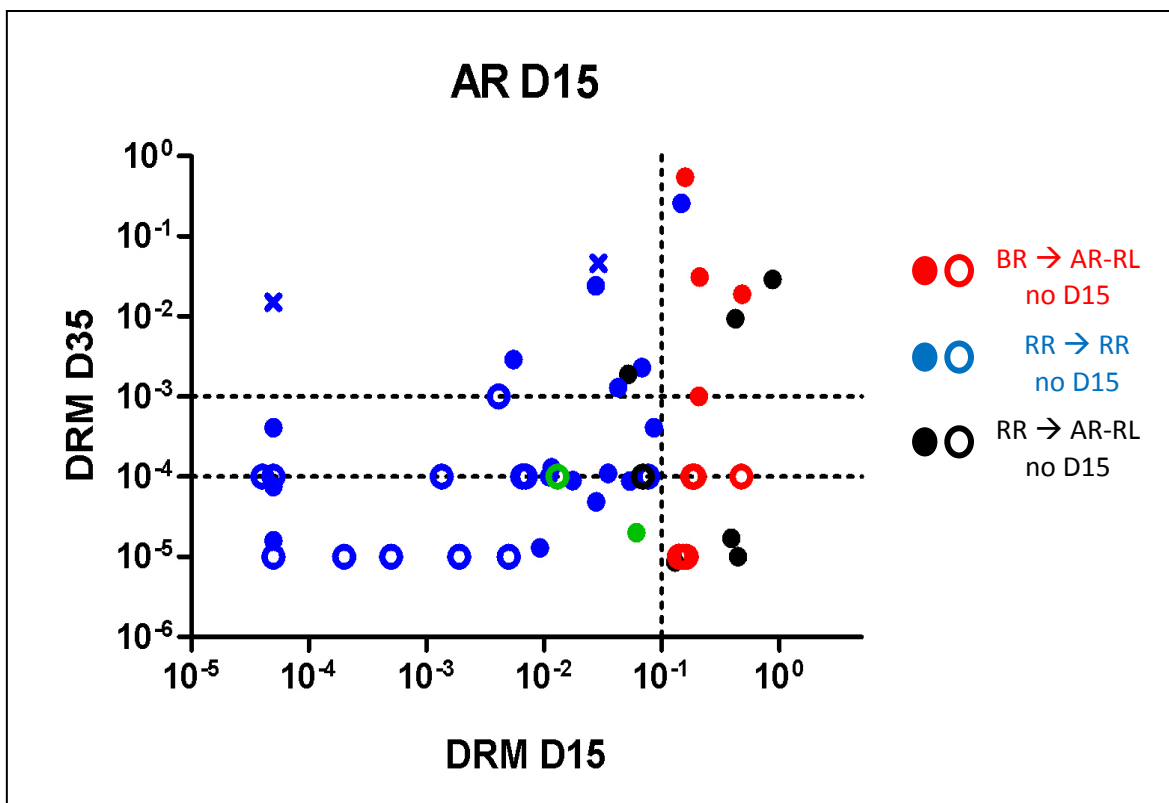


Figura 23. Gráfico de relação entre os resultados de DRM nos dias 15 e 35 para pacientes do grupo de Alto Risco (AR-RR e AR-RL), após alocação feita no D15. No gráfico os pontos azuis representam pacientes que foram alocados no grupo RR no D8 e permaneceram neste grupo no D15. Pontos pretos representam pacientes alocados no grupo RR no D8 e que foram realocados para o grupo RL no D15. Pontos verdes: pacientes alocados no grupo RL no D8 e que permaneceram neste grupo no D15. Pontos vermelhos: pacientes alocados no grupo baixo risco no D8 e que foram realocados para alto risco RL no D15. Pontos em forma de x: pacientes que deveriam ter seu grupo e risco alterado mas que não houve alteração. Os pontos vazados representam pacientes com DRM no D35 negativa por RQ-PCR, estes pontos foram plotados no gráfico com base na sensibilidade alcançada no ensaio.

Para os casos alocados no grupo BR após a análise do D15, observou-se que todos, exceto um caso, apresentaram níveis de DRM inferiores a 10^{-3} (figura 24). Dois casos apresentaram resultados interessantes, em um deles a DRM por citometria de fluxo encontrava-se $>10\%$ no D15 e segundo os critérios do protocolo GBTLI-LLA/2009, este paciente deveria ser realocado no grupo AR no momento da análise (D15), porém este paciente permaneceu no grupo BR e obteve boa resposta ao tratamento como pode ser observado pelas análises da DRM por RQ-PCR no D35 (paciente DRM negativo – ponto em formato quadrado no gráfico). O outro caso foi o único que apresentou níveis de DRM

superiores a 10^{-3} nas análises do D35 por RQ-PCR, este paciente apresentou recaída após 22 meses do diagnóstico (ponto em x no gráfico). Caso o ponto de corte adotado no D35 fosse $\text{DRM} \geq 10^{-4}$, 9 pacientes seriam realocados em novo grupo de risco (BR→AR-RL) sendo que nenhum deles teria sido identificado pelas análises por CF no D15, todos eles também se encontram vivos e sem nenhuma ocorrência de eventos até o presente momento.

Com o atual ponto de corte adotado pelo protocolo de tratamento para a DRM por RQ-PCR no D35 ($\text{DRM} \geq 10^{-3}$), pacientes classificados como LLA-B derivada BR em sua maioria não apresentaram DRM nos pontos analisados (D15 e D35) sugerindo que a análise da DRM nesses casos seja dispensável.

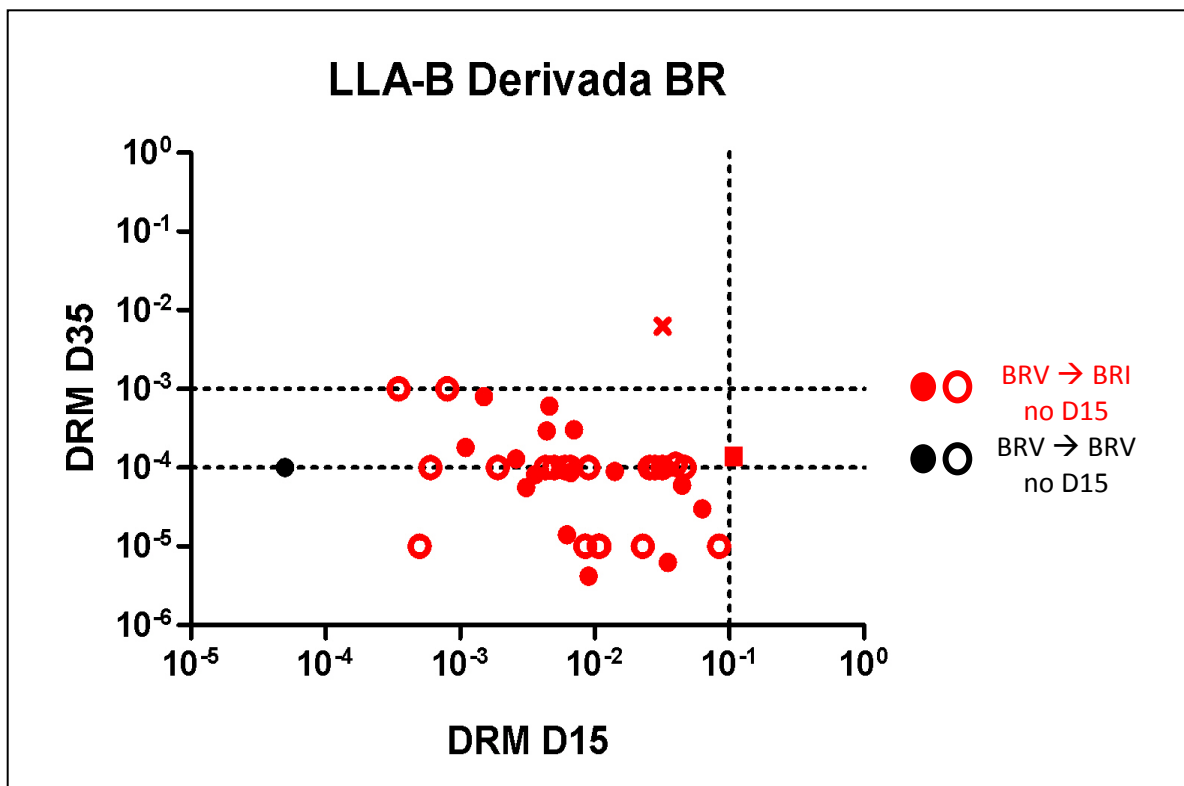


Figura 24. Gráfico de correlação entre os resultados de DRM nos dias 15 e 35 para pacientes LLA-B derivada Baixo Risco (BRV e BRI) após alocação do D15. Pontos vermelhos: pacientes alocados no grupo de risco BRV no D8 e que foram realocados no grupo BRI no D15. Ponto preto: único paciente alocado como BRV no D8 que permaneceu neste grupo no D15. Ponto em formato quadrado: paciente que deveria ter seu grupo de risco alterado após o D15 mas cuja alteração não foi realizada. Ponto em forma de x: paciente que deveria ter seu grupo de risco alterado após o D35 mas a alteração não foi realizada. Os pontos vazados representam pacientes com DRM no D35 negativa por RQ-PCR, estes pontos foram plotados no gráfico com base na sensibilidade alcançada no ensaio.

Para os pacientes com LLA-T observou-se que a maioria dos casos (4/6) eram bons respondedores já no D15 e permaneceram como bons respondedores no D35. Um paciente com DRM <10% por CF no D15 apresentou níveis de DRM $\geq 10^{-2}$ no D35 (ponto em formato de triângulo no gráfico) este resultado sugere que este paciente não apresentou boa resposta ao tratamento após o D15, provavelmente pela evolução de um clone resistente à quimioterapia empregada ou que a CF no D15 não tenha sido capaz de identificá-lo como mau respondedor no momento das análises. O único caso com DRM >10% no D15 tornou-se negativo no D35 sugerindo boa resposta a terapia após o D15 (ponto em formato de * no gráfico). O ponto de corte dos níveis da DRM para os pacientes com LLA-T difere daquele adotado para pacientes com LLA-B derivada (DRM $\geq 10^{-2}$ e DRM $\geq 10^{-3}$, respectivamente), o que pudemos observar é que se o ponto de corte fosse o mesmo utilizado para LLA-B derivada, metade dos pacientes analisados teriam níveis de DRM acima do ponto de corte no D35 (pacientes com níveis de DRM $\geq 10^{-3}$), esse fato aqui não influenciaria a mudança de grupo de risco pelos pacientes uma vez que todos foram alocados no grupo de risco RL (2 casos desde o D0 e 1 caso após o D35). Os resultados são mostrados na figura 25.

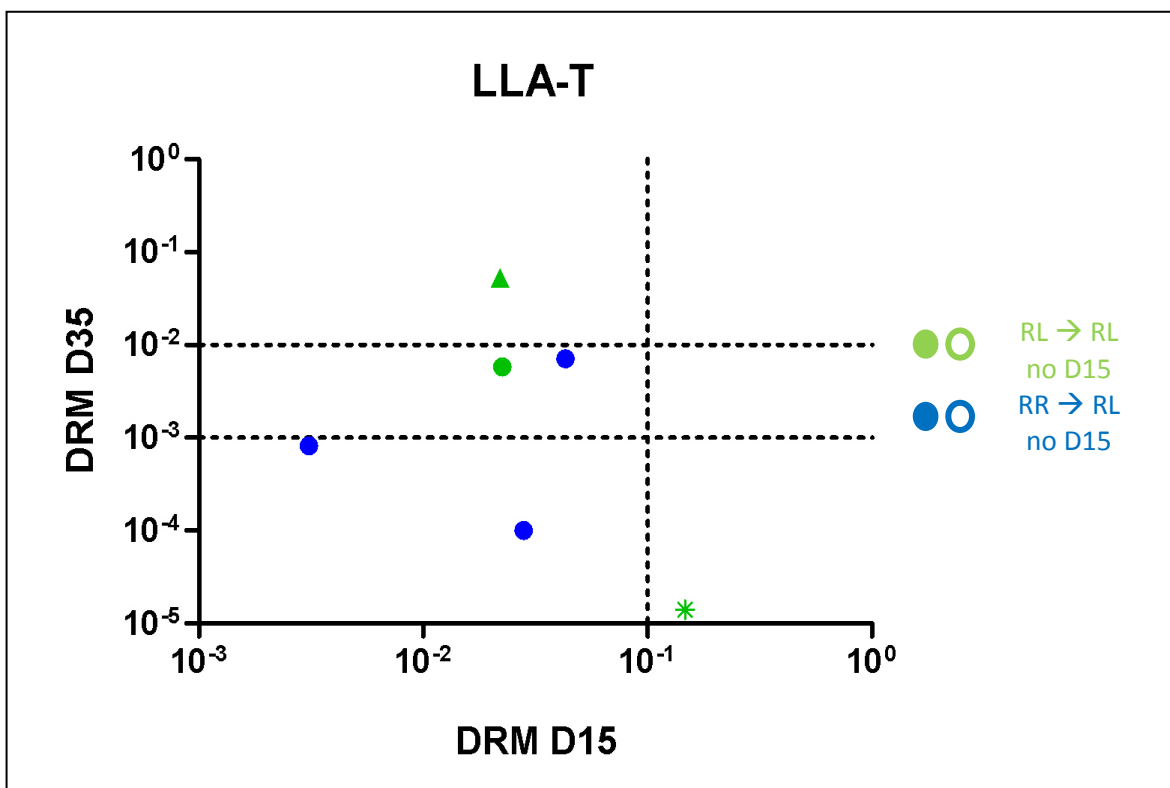


Figura 25. Gráfico de correlação entre os resultados de DRM nos dias 15 e 35 para pacientes LLA-T. Pontos verdes: pacientes alocados como RL no D8 e que permaneceram neste grupo no D15. Pontos azuis: pacientes alocados como RR no D8 e que foram realocados como RL no D15. Ponto em forma de triângulo: único paciente com níveis de DRM acima do ponto de corte estipulado pelo protocolo de tratamento. Ponto em formato de *: único paciente com níveis de DRM acima de 10% no D15.

4.5.2. Relação entre DRM no D35 e fatores clínicos e biológicos.

Para 97 casos foi possível analisar a relação da presença da DRM no D35 determinada por RQ-PCR e fatores clínicos e biológicos como: idade, sexo, contagem leucocitária ao diagnóstico (WBC), risco ao diagnóstico, contagem leucocitária no D8, quantidade de blastos no D8, imunofenótipo, presença ou ausência de CD10 e DRM no D15 através do teste exato de Fisher. A tabela 5 resume os dados encontrados nas análises.

Tabela 5. Número total de casos analisados para diferentes dados clínicos, número e porcentagem de casos positivos e valor de *p* através do teste exato de Fisher para a DRM no D35.

de casos positivos e valor de <i>p</i> através do teste exato de Fisher para a DRM no D35.					
		DRM D35 ≥10-3 (LLA B) ≥ 10-2 (LLA-T) +/total	<i>p</i> -valor (Fisher)	DRM D35 ≥10-4 (LLA B) ≥ 10-3 (LLA-T) +/total	<i>p</i> -valor (Fisher)
Gênero (n=97)					
Masculino	47	7/47 (14,9%)	0,7871	14/47 (29,8%)	0,8299
Feminino	50	9/50 (18,0%)		16/50 (32,0%)	
Idade (n=97)					
≥1 ano e <9 anos	63	6/63 (9,5%)	0,00199*	13/63 (25,4%)	0,0052*
<1 ano e ≥9 anos	34	10/34 (29,4%)		17/34 (50%)	
WBC ao diagnóstico (n=97)					
<50.000/mm ³	78	14/78 (17,9%)	0,7306	24/78 (30,8%)	0,5739
≥50.000/mm ³	19	2/19 (10,5%)		4/19 (21,0%)	
Imunofenótipo (n=97)					
LLA B-derivada	91	15/91 (16,5%)	1,00	27/91 (29,7%)	0,3694
LLA-T	6	1/6 (16,5%)		3/6 (50%)	
CD10 (n=97)					
Positivo	90	14/90 (15,5%)	0,3251	27/90 (30%)	0,6730
Negativo	7	2/7 (28,6%)		3/7 (42,8%)	
Risco ao diagnóstico (n=97)					
BR	47	4/47 (8,5%)	0,0923	12/47 (25,5%)	0,2730
AR	50	11/50 (22%)		18/50 (36%)	
WBC dia 8 (n=97)					
<5.000/mm ³	82	12/82 (14,6%)	0,2644	24/82 (29,3%)	0,5440
>5.000/mm ³	15	4/15 (26,7%)		6/15 (40,0%)	
Blastos dia 8 (n=97)					
<1000/ mm ³	93	15/93 (16,1%)	1.00	28/93 (30,1%)	0,5852
>1000/ mm ³	4	0/4 (0%)		2/4 (50%)	
DRM D15 (n=97)					
< 10%	79	8/79 (10%)	0,0063*	23/79 (29,1%)	0,4130
≥ 10%	18	7/18 (39%)		7/18 (38,9%)	
DRM D15 (n=97)					
< 5%	71	7/71 (9,9%)	0,0227*	19/71 (26,8%)	0,2141
≥ 5%	26	8/26 (30,8%)		11/26 (42,3%)	
DRM D15 (n=97)					
< 1%	46	2/46 (4,3%)	0,0045*	9/46 (19,6%)	0,0466*
≥ 1%	52	13/52 (25%)		21/46 (45,6%)	

Nossos resultados apresentaram associação entre idade <1 e ≥ 9 anos e DRM+ no dia 35 da terapia de indução ($p= 0,00199$) confirmando a noção de que esse grupo de pacientes apresenta maiores chances de recaída. Scrideli et al. (79) e Coustan-Smith et al. (49) encontraram também associação entre essa faixa etária e a presença de DRM no final da terapia de indução estando portanto nossos dados de acordo com a literatura.

DRM $\geq 1\%$, $\geq 5\%$ e $\geq 10\%$ avaliada por citometria de fluxo no D15, mostrou-se associada com DRM+ no D35 ($p=0,0045$, $0,0227$ e $0,0063$, respectivamente), desta forma pacientes que não responderam bem à terapia já no D15 têm pior resposta ao tratamento comparados aqueles com DRM $<1\%$, 5% e 10% no D15, a mesma relação foi encontrada também por Cheng et al., 2013 (80).

O GBTLI-LLA/2009 utiliza a contagem leucocitária ao diagnóstico (WBC) para estratificar os pacientes em diferentes grupos de risco, são considerados pacientes alto risco aqueles que apresentam $WBC >50.000/mm^3$, o que observamos foi que não houve associação significativa entre WBC no D0 e DRM+ no D35 ($p= 0,7306$), sugerindo que tanto pacientes com baixa contagem leucocitária no D0 quanto pacientes com alta contagem leucocitária no D0 obtiveram sucesso na resposta a terapia.

O sexo masculino tem sido associado a uma resposta levemente inferior em comparação ao sexo feminino (81). A fim de reduzir a diferença na resposta ao tratamento entre o sexo masculino e o feminino, a duração do tratamento tem sido aumentada para meninos, mas não para meninas em alguns protocolos de tratamento (82). O atual protocolo brasileiro GBTLI-LLA/2009 não diferencia o tempo de tratamento entre meninas e meninos e o que pudemos observar é que não houve associação significativa entre o gênero e a presença de DRM no 35 ($p= 0,7871$). Também não foi encontrada associação entre o grupo de risco ao diagnóstico e a presença de DRM no D35 ($p=0,0923$).

A presença de CD10 geralmente é tida como um indicativo de melhor prognóstico para os pacientes, porém nossos resultados não encontraram nenhuma associação entre pacientes negativos para CD10 e presença de DRM no D35 ($p= 0,3251$). Em nosso protocolo de tratamento, os pacientes são avaliados no D8 da indução quanto à WBC e quantidade de blastos e os resultados encontrados também não foram

estatisticamente significativos em relação à associação entre WBC e quantidade de blastos no D8 e presença de DRM no D35 ($p=0,2644$ e $1,00$, respectivamente).

Caso o ponto de corte utilizado para protocolo fosse 1×10^{-4} para LLA-B derivada e 1×10^{-3} para LLA-T ocorreria associação significativa entre a DRM+ no final da indução e a idade dos pacientes e também com a DRM $\geq 1\%$ avaliada por citometria de fluxo no D15 (Tabela 5).

4.5.3. Análise de Sobrevida Global

Segundo dados da literatura é sabido que ocorre associação entre DRM e tempo de sobrevida dos pacientes com LLA (75, 76, 77, 78). Pacientes com DRM negativa no final da terapia de indução apresentam menor probabilidade de sofrer recaída e maior sobrevida global, já aqueles com DRM positiva apresentam maiores chances de recaída e menor sobrevida global. Análises de sobrevida livre de eventos (recaída ou óbito por leucemia) foram realizadas para 81 casos admitidos para tratamento até Dezembro de 2012, sendo 76 casos LLA-B derivada (33 classificados como baixo risco e 43 como alto risco) e 5 casos LLA-T. A mediana do tempo de seguimento para os pacientes sem evento foi de 25 meses (com mínimo de 12 e máximo de 41 meses). Para pacientes baixo risco (após alocação do D15), a presença da DRM D35 em níveis $\geq 10^{-3}$ mostrou-se associada a menor sobrevida livre de eventos (SLE) ($p=0,0006$). Caso o ponto de corte adotado pelo protocolo de tratamento fosse DRM $\geq 10^{-4}$ não haveria associação estatisticamente significativa entre a presença da DRM no D35 e a sobrevida dos pacientes, embora pareça haver tendência a menor sobrevida nos casos DRM positivo (figura 26). Aumento do tempo de seguimento e maior número de pacientes são necessários para tirar conclusões a respeito deste assunto.

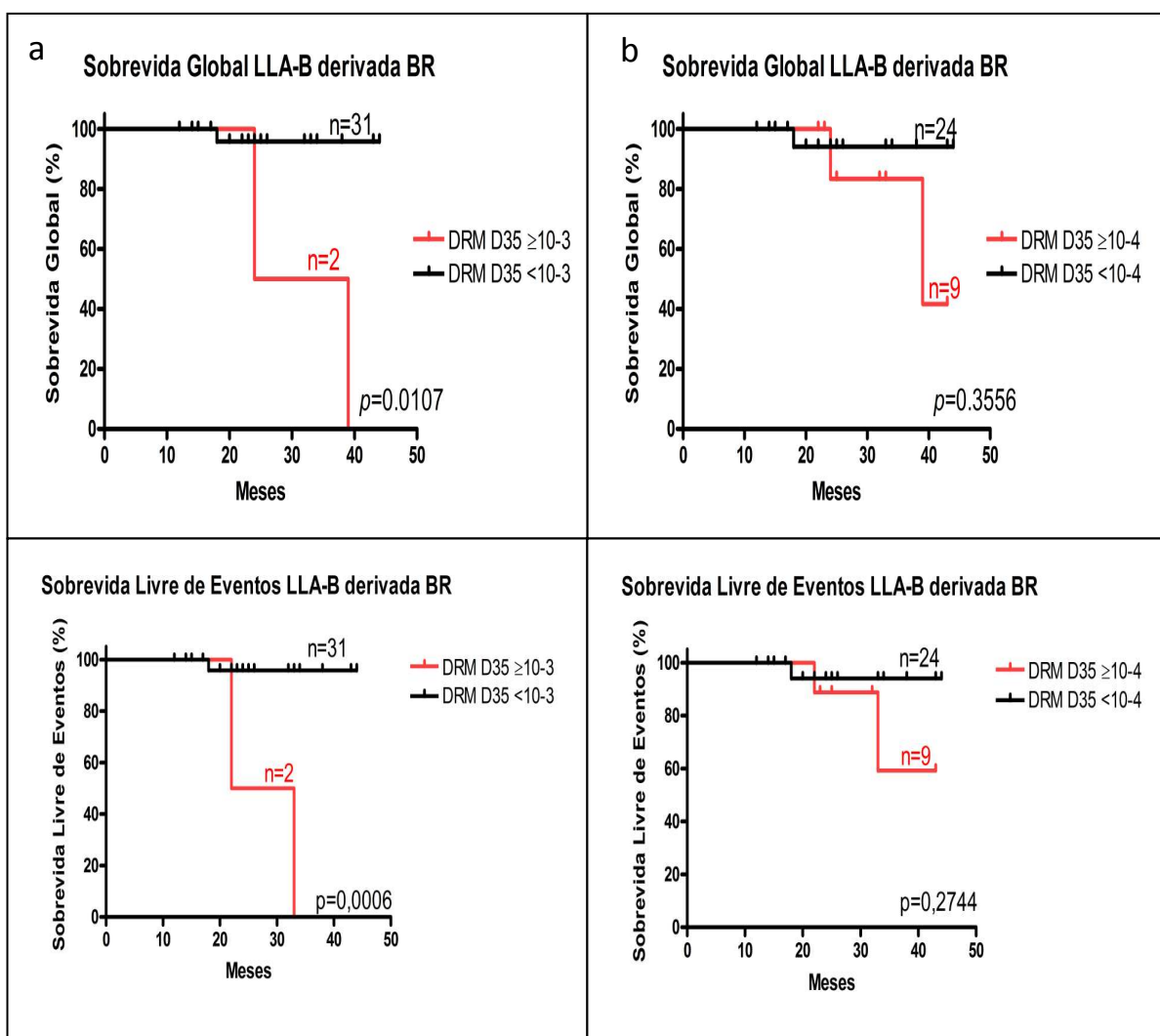


Figura 26. Curva de SG e SLE para pacientes LLA-B derivada classificados como baixo risco (BR) após análises de DRM por CF no D15 e dados de DRM por RQ-PCR no dia 35 da terapia de indução. (a) análises considerando grupos com nível de DRM $\geq 10^{-3}$ e $< 10^{-3}$. (b) análises considerando grupos com DRM $\geq 10^{-4}$ e $< 10^{-4}$.

Para os casos alocados no grupo AR e para as LLA-T não houve diferença significativa entre a presença da DRM $\geq 10^{-3}$ e DRM $\geq 10^{-2}$, respectivamente, no D35 e as sobrevidas global e livre de eventos. A mudança de ponto de corte para DRM $\geq 10^{-4}$ para os casos de LLA-B derivada AR e para DRM $\geq 10^{-3}$ para as LLA-T também não influencia a relação entre presença de DRM e sobrevida (figuras 27 e 28). Novamente, o curto tempo de acompanhamento e o pequeno tamanho da amostra não permite qualquer conclusão no que diz respeito ao valor preditivo da DRM para estes grupos de pacientes.

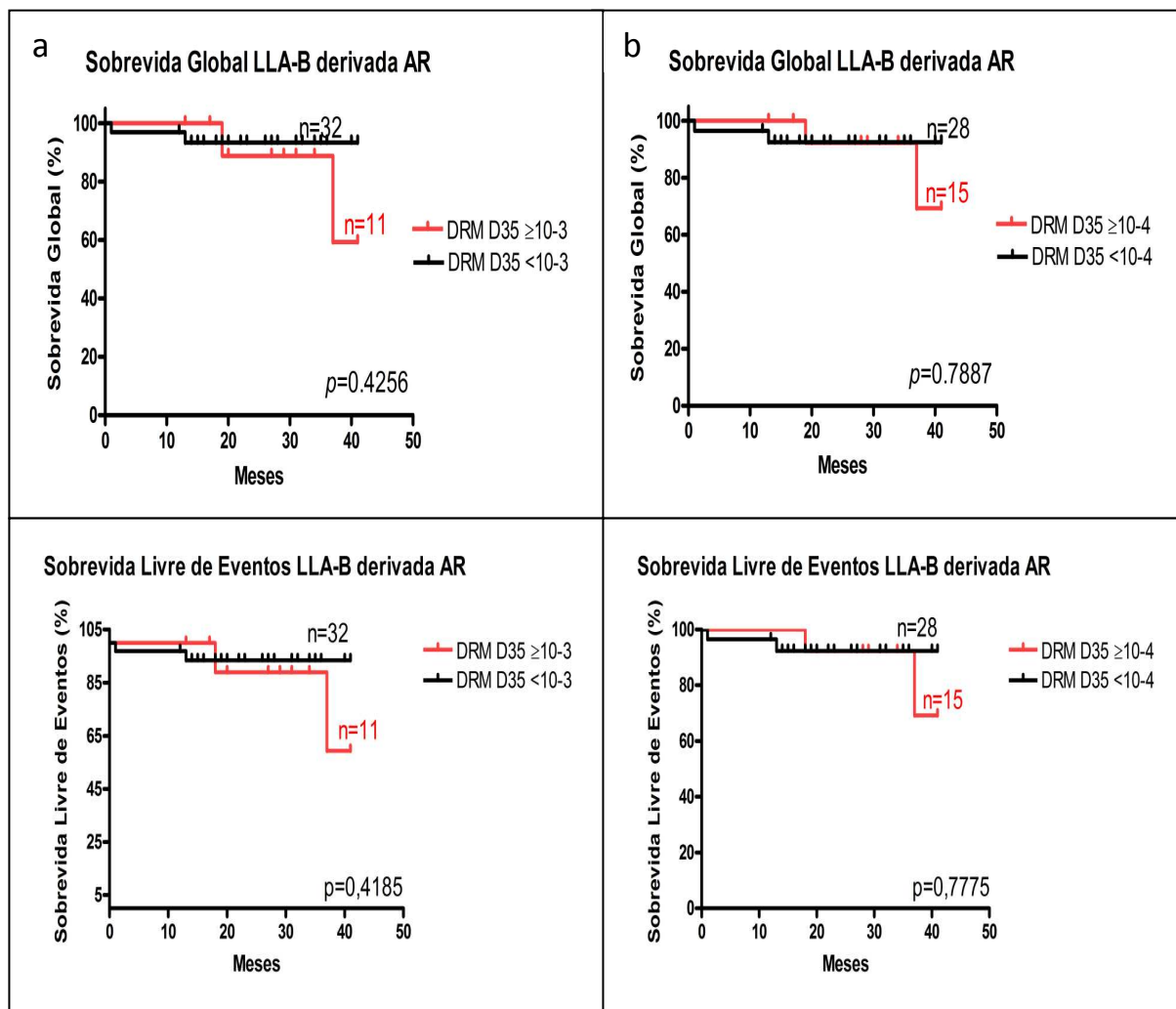


Figura 27. Curvas de SG e SLE para pacientes LLA-B derivada classificados como alto risco (AR) após análises de DRM por CF no D15 e dados de DRM por RQ-PCR no dia 35 da terapia de indução. (a) análises considerando grupos com nível de $\text{DRM} \geq 10^{-3}$ e $< 10^{-3}$. (b) análises considerando grupos com $\text{DRM} \geq 10^{-4}$ e $< 10^{-4}$.

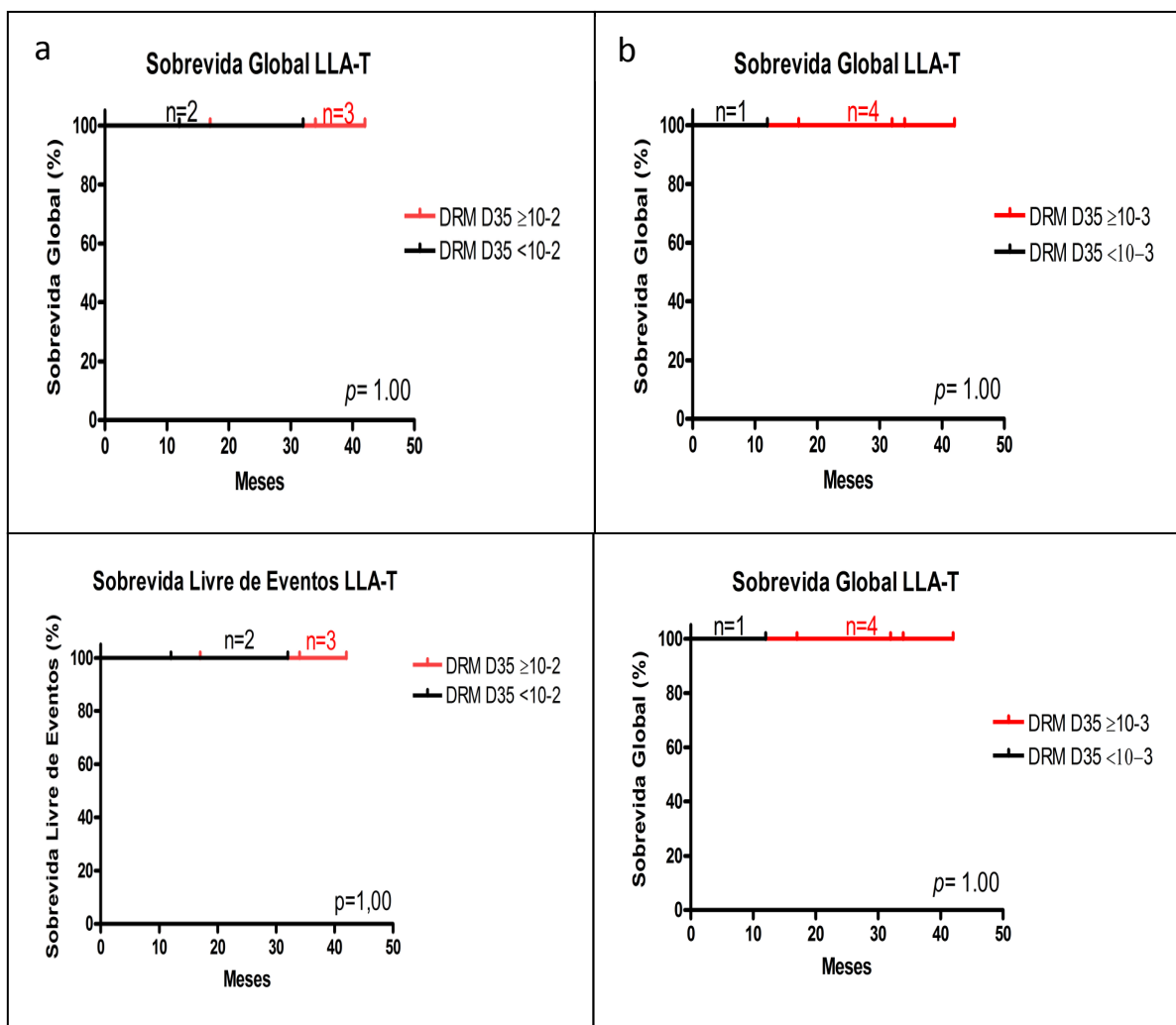


Figura 28. Curvas de SG e SLE para pacientes LLA-T e dados de DRM por RQ-PCR no dia 35 da terapia de indução. (a) análises considerando grupos com nível de DRM $\geq 10^{-2}$ e $< 10^{-2}$. (b) análises considerando grupos com DRM $\geq 10^{-3}$ e $< 10^{-3}$.

4.6. Comparação entre DRM por RQ-PCR e por PCR qualitativo

Após as análises do D35 com ambas as metodologias (PCR qualitativo e quantitativo) pode-se inferir a concordância entre os dois métodos. Para LLA-B derivada, de um total de 95 casos estudados, 8 pacientes se apresentaram com níveis de DRM $\geq 10^{-2}$ por RQ-PCR, destes 7 também se encontraram positivos por PCR qualitativo (Biomed-2), demonstrando concordância de 88% entre os métodos. Já para níveis de DRM $< 10^{-2}$ e $\geq 10^{-3}$ a concordância entre os métodos foi de 71% (dos 7 pacientes detectados por RQ-PCR, 5 também foram detectados por PCR qualitativo). Apenas 2 casos (14%) com DRM $< 10^{-3}$ e $\geq 10^{-4}$ e 1 caso (6%) com DRM $< 10^{-4}$ foram encontrados positivos no PCR qualitativo (tabela 5). Para o atual protocolo de tratamento (GBTLI/2009) o ponto de corte para a

DRM no D35 para este grupo de pacientes é de 10^{-3} sendo assim, 12 dos 15 pacientes DRM+ (80%) poderiam ter sido alocados corretamente nos grupos de risco apenas pelo resultado de DRM qualitativa. Porém, se o nível de corte fosse 10^{-4} , como utilizado em vários protocolos internacionais, apenas 14 de 29 (48%) dos casos com DRM+ teriam sido corretamente alocados nos grupos de risco após o D35 pelo método de DRM qualitativa, isto deve-se ao fato da metodologia empregada para PCR qualitativo atingir sensibilidade máxima de 1×10^{-2} a 1×10^{-3} na maioria dos ensaios.

De um total de 48 pacientes negativos por PCR quantitativo, apenas 2 foram encontrados positivos por PCR qualitativo (tabela 6). Em um dos casos a diferença pode ser devida ao fato de que o único rearranjo encontrado positivo no PCR qualitativo não pode ser testado por RQ-PCR (primers paciente específicos desenhados não funcionaram), os demais rearranjos testados com as duas metodologias apresentaram-se concordantes (negativos em ambas). No outro caso, os resultados observados nas análises por RQ-PCR apontam no sentido de que a discrepância encontrada seja devido a um resultado falso positivo nas análises por PCR qualitativo, embora as análises do PCR qualitativo tenham sido realizadas mais de uma vez para confirmação dos resultados. O sequenciamento das amostras do D35 e sua comparação com os resultados do sequenciamento das amostras do D0 poderá ajudar a esclarecer esta questão.

Tabela 6. Resultados de DRM no D35 e número de pacientes por grupo para RQ-PCR e PCR qualitativo para LLA-B derivada.

	DRM por RQ-PCR (n)	DRM por PCR qualitativo (n)		Concordância (%)
		positivo	negativo	
$\geq 10^{-2}$	8	7	1	88
$< 10^{-2}$ a $\geq 10^{-3}$	7	5	2	71
$< 10^{-3}$ a $\geq 10^{-4}$	14	2	12	14
$< 10^{-4}$	18	1	17	6
negativo	48	2	46	96

Para os 9 casos de LLA-T, 3 se apresentaram com níveis de DRM $\geq 10^{-2}$ por RQ-PCR e todos foram positivos por PCR qualitativo (100% de concordância entre os

métodos). Já para níveis de DRM $<10^{-2}$ e $\geq 10^{-3}$ a concordância entre os métodos foi de 50% (dos 2 pacientes detectados por RQ-PCR, apenas 1 foi detectado por PCR qualitativo). Nenhum caso com DRM $<10^{-3}$ e $\geq 10^{-4}$ e DRM $<10^{-4}$ foi positivo por PCR qualitativo (tabela 7). Para o atual protocolo de tratamento (GBTLI/2009) o ponto de corte para a DRM no D35 para este grupo de pacientes é de 10^{-2} sendo assim, todos os casos poderiam ter sido alocados corretamente nos grupos de risco apenas pelo resultado de DRM qualitativa após o D35. Porém, se o nível de corte fosse 10^{-3} , como utilizado nos pacientes com LLA-B derivada, 4 de 5 pacientes, ou seja, 80% dos casos com DRM+ teriam sido corretamente alocados nos grupos de risco pelo método de DRM qualitativa. Nenhum caso para os pacientes com LLA-T teve DRM negativa seja por RQ-PCR ou PCR qualitativo.

Sob o ponto de vista da difusão nacional da análise da DRM no D35, -para os atuais pontos de corte do protocolo GBTLI LLA-2009 e considerando as dificuldades para aplicação do PCR em tempo real (cuja sensibilidade é maior), a análise da DRM por PCR qualitativo é uma alternativa viável e recomendada, pois cerca de 80% dos casos seriam alocados no grupo de risco adequado.

Tabela 7. Resultados de DRM no D35 e número de pacientes por grupo para RQ-PCR e PCR qualitativo para LLA-T.

	DRM por RQ-PCR (n)	DRM por PCR qualitativo (n)		Concordância (%)
		positivo	negativo	
$\geq 10^{-2}$	3	3	0	100
$< 10^{-2}$ e $\geq 10^{-3}$	2	1	1	50
$< 10^{-3}$ e $\geq 10^{-4}$	2	0	2	0
$< 10^{-4}$	2	0	2	0
negativo	0	0	0	0

Do total de 104 casos analisados por ambas metodologias, 37 tiveram a DRM detectada apenas por RQ-PCR em qualquer nível provavelmente devido a maior sensibilidade do RQ-PCR em relação ao PCR qualitativo.

Analizamos também quais rearranjos foram testados por cada metodologia e quais são mais concordantes entre elas para 20 pacientes com resultados de DRM $\geq 10^{-3}$ por RQ-

PCR. A concordância foi analisada apenas para os casos em que ambas as metodologias foram utilizadas para os mesmos rearranjos. O quadro 5 resume os dados, onde são apresentados os resultados de todos os rearranjos testados bem como a concordância para cada rearranjo e a concordância por grupo de rearranjo (IgH, IgK, TCRG e TCRD). O anexo 10 apresenta os dados dos rearranjos testados por ambas metodologias para os pacientes com $DRM \geq 10^{-4}$.

Quadro 5. Resultados de DRM no D35. Rearranjos testados por cada metodologia para pacientes com resultados de $DRM \geq 10^{-3}$ por RQ-PCR. Em verde resultados concordantes entre as duas metodologias e em vermelho resultados discordantes. (+) rearranjo positivo (-) rearranjo negativo (nt) não testado.

DRM RQ-PCR D35		Paciente	Rearranjos																							
			VH1	VH2	VH3	VH5	VH7	DH2	DH3	VKI	VKII	VKIII	Intron	VG2	VG3	VG4	VG5	VG8	VG9	VG10	VD1-JD1	VD2-JD1	VD2-DD3	VD3-JD1	DD2-JD1	Sil-T al 1
≥ 10 ⁻²	1	RQ				+													nt							
	Quali				+														-							
	2	RQ	nt				nt						+													
	Quali	-				-						-														
	3	RQ			+						+			nt												
	Quali			+							-			-												
	4	RQ						+																		
	Quali						+																			
	5	RQ	+				nt							+												
	Quali	+				+								-												
≥ 10 ⁻²	6	RQ																	+							
	Quali					+													+							
	7	RQ			+				nt	nt	+			nt												
	Quali			+					-	-	+			-												
	8	RQ											nt							nt		nt		+	+	
	Quali												+							-		+		+	-	
	9	RQ											+													nt
	Quali												-													+
	10	RQ														nt				+		nt	nt			+
	Quali															-				-		-				+
≥ 10 ⁻²	11	RQ	+		+					nt									nt							+
	Quali	nt		-					+										+							+
	12	RQ		nt	+												nt						+			
	Quali			+													-					+				
	13	RQ		+	+																					
	Quali		+	+																						
	14	RQ									+															
	Quali										+															
	15	RQ						+												+						
	Quali							-												+						
≥ 10 ⁻²	16	RQ	+				nt			nt		nt						nt	nt							
	Quali	-				-			-			+						-	-							
	17	RQ		+	nt													nt				nt				
	Quali		-	-																		-				
	18	RQ	+						nt	nt	nt							+								
	Quali	+						-	+	+							-									
	19	RQ											+					+								
	Quali												-													
	20	RQ													+											
	Quali														-											
Testado RQ e Quali		3	2	6	1	-	1	1	-	2	1	1	2	1	1	1	-	2	1	-	-	1	1	1	1	1
Concordância (%)		2 (67%)	0 (0%)	1 (17%)	1 (100%)	-	1 (100%)	0 (0%)	-	1 (50%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-	2 (100%)	0 (0%)	-	-	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	
Testado RQ e Quali		14				4				8				3				1				1				
Concordância (%)		5 (36%)				2 (50%)				2 (25%)				2 (67%)				1 (100%)								

Analisando os resultados por grupo de rearranjos os que apresentaram maior concordância foram TCRD (67%), seguido por IgK (50%), IgH (36%) e TCRG (25%). Quando as análises foram feitas tomando por base cada rearranjo testado pudemos observar que houve concordância de 100% para rearranjos VH5, DH2, VKIII, VG9, VD2DD3, VD3JD1 e Sil-Tal1; 67% para rearranjos VH1; 50% para VKII, 17% para VH3 e não houve concordância entre os resultados de ambas as técnicas testadas para rearranjos VH2, DH3, Intron, VG2, VG3, VG4, VG5, VG10 e VD2JD1. Esses resultados nos levam a crer que aparentemente a concordância entre as metodologias aqui aplicadas não está relacionada com nenhum rearranjo específico, sendo assim é importante realizar o estudo da DRM no D35 em todos os marcadores encontrados ao diagnóstico a fim de se evitar resultados equivocados.

Mesmo com a elevada concordância geral entre os métodos estudados (qualitativo Biomed-2 x RQ-PCR) para pacientes com LLA-B derivada (ponto de corte 10^{-3} – 80%) e LLA-T (ponto de corte 10^{-2} – 100%), é importante ressaltar que a análise por PCR qualitativo é ainda sujeita à subjetividade no caso de visualização de bandas muito fracas, sendo assim, há a possibilidade de um paciente ser alocado em grupo de risco inadequado para tratamento e ter sua resposta ao tratamento comprometida.

Desta forma, mesmo com o alto custo para a realização do PCR por tempo real e com base nos resultados observados no presente trabalho, sugere-se então que o RQ-PCR seja a metodologia padrão aplicada para análise da DRM no D35 da indução para os pacientes tratados com o protocolo GBTLI-LLA/2009. Sabe-se, porém que em muitos centros de tratamento brasileiros não há ainda infraestrutura, mão de obra especializada ou verba suficiente para realizar os exames de DRM por RQ-PCR, desta forma, sugere-se que nestes centros a DRM seja avaliada através da metodologia por PCR qualitativo. Esta medida poderá aumentar as chances de estratificação dos pacientes nos grupos de risco corretos e obter maior sucesso de resposta à terapia, visando aumentar a sobrevida global e livre de eventos nesses pacientes.

Nenhum outro trabalho tem sido feito nos pacientes tratados com o protocolo brasileiro GBTLI-LLA/2009 com o objetivo de comparar as duas metodologias aqui aplicadas, desta forma, os resultados apresentados se tornam de grande valia para aprimorar

o tratamento dos pacientes brasileiros com LLA pediátrica e podem ser então aplicados não apenas na instituição sede do estudo (Centro Infantil Boldrini), mas também em todos os centros que adotam o mesmo protocolo de tratamento.

5. CONCLUSÕES

- Pelo menos 1 rearranjo gênico foi detectado ao diagnóstico para 98% dos casos estudados através de PCR qualitativo. Os rearranjos mais frequentes ao diagnóstico foram IgH (89%), IgK (51%), TCRG (49%) e TCRD (46%) para os casos de LLA-B derivada e TCRG (100%), TCRD e Sil-Tal (40%) e IgH (10%) para os casos de LLA-T.
- Após o teste de sensibilidade dos primers paciente específicos por RQ-PCR pode-se observar que os mais sensíveis (que alcançaram sensibilidade de 1×10^{-4}) foram aqueles envolvendo rearranjos de IgH (63%), TCRD (42%), TCRG (41%) e IgK (33%). Nas análises para cada rearranjo os que alcançaram maior sensibilidade foram para os segmentos gênicos VD3 e VG10 (100%), VH7 (86%), DH2 (80%), VH4 (79%), VH2 (78%), DH7 (67%), VH3 (65,5%), VD1 (60%), DH3 (56%) e VH1 (55%).
- Não houve associação estatisticamente significativa entre o tamanho da região N e a sensibilidade dos primers paciente específicos. Observou-se que aparentemente há uma relação diretamente proporcional entre o tamanho da região N e maior sensibilidade para primers para IgK e TCRG, bem como inversamente proporcional entre o tamanho da região N e inespecificidade dos primers para TCRG. Para primers para TCRD o tamanho da região N parece estar diretamente relacionado com a não amplificação dos mesmos.
- Houve associação entre presença de DRM no D35 detectada por RQ-PCR e idade dos pacientes (grupo <1 e ≥ 9 anos). Não houve associação entre DRM no D35 por RQ-PCR e fatores clínicos como sexo, contagem leucocitária ao diagnóstico, contagem leucocitária no D8, imunofenótipo e presença ou ausência de CD10.
- Com os atuais pontos de corte adotados pelo protocolo de tratamento para a DRM por RQ-PCR no D35 ($DRM \geq 10^{-3}$ e $DRM \geq 10^{-2}$, LLA-B derivada e LLA-T, respectivamente), pacientes classificados como LLA-B derivada BR em sua maioria não apresentaram DRM nos pontos analisados (D15 e D35) sugerindo que a análise da DRM nesses casos seja dispensável. Para casos com LLA-T o número reduzido de pacientes impediu qualquer conclusão a respeito.
- Para pacientes LLA-B derivada AR 7 casos considerados bons respondedores no D15 ($DRM-CF < 10\%$) mostraram-se respondedores lentos no D35 ($DRM \geq 10^{-3}$) ressaltando a importância da análise da DRM nesse ponto do tratamento. Bem como, outros 7 pacientes

considerados maus respondedores no D15 (DRM-CF $\geq$ 10%) mostraram-se como bons respondedores no D35 (DRM $<10^{-3}$).

- Análises de sobrevida global demonstraram em pacientes com LLA-B derivada, classificados como BR após análises de DRM por citometria de fluxo no D15, que a presença de DRM em níveis $\geq 10^{-3}$ no D35 está associada com menor sobrevida. Para pacientes LLA-B derivada classificados como AR e pacientes LLA-T o pouco tempo de seguimento não permitiu concluir sobre o valor preditivo da DRM.
- Concordâncias de 80% e 100% foram encontradas entre as duas metodologias aplicadas para as análises da DRM no D35 para LLA-B derivada e LLA-T respectivamente.
- Análises das concordâncias entre os tipos de rearranjos testados por ambas metodologias aplicadas demonstraram que a concordância entre os métodos não parece estar associada a nenhum rearranjo específico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Sinnet D, Labuda D, Krajnovic M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers – the childhood leukemia experience. *Familial Cancer*. 2006; 5: 35-47.
- (2) Smith MT, McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Wiencke JK, Zheng S et al. Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 206: 237-245.
- (3) Margolin JF, Poplack DG. Acute lymphoblastic leukemia. In: Pizzo AP, Poplack DG. *Principles and practices of pediatric oncology*. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1997. p. 409-462.
- (4) Fonn KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphomas. *Blood* 1986; 68(1): 1-31.
- (5) Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biological relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1993; 82(2): 343-362.
- (6) Rowan RM, Brain BJ, England JM, Hyde K, Matutes E, Reilly JT et al. Immunophenotyping in the diagnosis of acute leukaemias. *J Clin Pathol*. 1994; 47: 777-781.
- (7) Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med*. 1995; 332(24): 1618-1630.
- (8) Stassi R. Contribution of immunophenotypic and genotypic analysis to the diagnosis of acute leukemia. *Ann Hematol*. 1995; 71:13-27.
- (9) van Dongen JJ, Szczepanski T, Adriaansen H. Immunobiology of acute lymphoblastic leukemia. In: Szczepanski T. *Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia*. Rotterdam: Ridderprint, Ridderkerk; 2002. p.85-129.
- (10) Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004; 118-145.
- (11) Scrideli CA, Kashima S, Cipolloti R, Defavary R, Bernardes JE, Tone LG. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoid leukemia: comparison of three detection methods by PCR. *Leuk Res*. 2002; 26(5): 431-8.
- (12) Greaves, M.F. (1997). Aetiology of acute leukemia. *Lancet*. 349: 344-349.

- (13) Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. 278: 1959-1064.
- (14) Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998; 1998; 339: 605-15.
- (15) Schrappe M, Arico M, Harbott J, Biondi A, Zimmermann M, Conter V et al. Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood*. 1998; 15; 92(8):2730-41
- (16) Brandalise S, Odone V, Pereira W, Andrea M, Zanichelli M, Aranega V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. ALL Brazilian Group. *Leukemia*. 1993; 7 Suppl 2:S142-5
- (17) Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G, et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood*. 1994;84(9):3122-33.
- (18) Gaynon PS, Desai AA, Bostrom BC, Hutchinson RJ, Lange BJ, Nachman JB, et al. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. *Cancer* 1997; 80:1717–26.
- (19) Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, Götz N, Viehmann S, et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1209–17.
- (20) Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85:1416-34.
- (21) Bartram CR, Schrauder A, Köhler R, Schrappe M. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Dtsch Arztl Int*. 2012; 109(40): 652-8.
- (22) Katz F, Ball L, Gibbons B, Chessells J. The use of DNA probes to monitor minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1989; 73:173-180.
- (23) Bradstock KF, Janossy G, Tidman N, Papageorgiou ES, Prentice HG, Willoughby, et al. Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 1981;5:301-9.

- (24) Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010:7-12.
- (25) Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottman OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 2010;24:521-35.
- (26) Shook D, Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Campana D. Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9(Suppl 3):S281-5.
- (27) Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-coco F, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012;119:332-41.
- (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;23:347-58.
- (29) Campana D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23:1083–1098.
- (30) Gabert J, Beillard E, van der Velden V, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003;17:2318 –2357.
- (31) Hansen-Hagge TE, Yokota S, Bartram CR. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor delta chain sequences. *Blood* 1989; 74: 1762–7.
- (32) Yamada M, Hudson S, Tournay O, Bittenbender S, Shane SS, Lange B, et al. Detection of minimal disease in hematopoietic malignancies of the B-cell lineage by using third-complementarity-determining region (CDR-III)-specific probes. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 1989; 86: 5123–7.

- (33) van der Velden V, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21:604–611.
- (34) Boyd SD, Marshall EL, Merker JD, Maniar JM, Zhang LN, Sahaf B, et al. Measurement and clinical monitoring of human lymphocyte clonality by massively parallel VDJ pyrosequencing. *Sci Transl Med* 2009;1:12ra23.
- (35) Wu D, Sherwood A, Fromm JR, Winter SS, Dunsmore KP, Loh ML, et al. High-throughput sequencing detects minimal residual disease in acute T lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2012;4:134ra63.
- (36) Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VE, Stow P, Coustan-Smith E, et al. Deep sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; 120(26):5173-80.
- (37) Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, et al. Minimal residual diseasedirected therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol* 2010;11:543-52.
- (38) Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol* 2011;29:2709-16.
- (39) Loken MR, Alonzo TA, Pardo L, Gerbing RB, Raimondi SC, Hirsch BA, et al. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group. *Blood* 2012;120:1581-8.
- (40) Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, van der Velden V, Fischer S, 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 AIEOPBFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22:771-82.

- (41) Brisco MJ, Condon J, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, Seshadri R, et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 1994; 343:196-200.
- (42) Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Pötschger U, Mühlegger N, Fritsch G, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:1952-8.
- (43) Zhao XS, Liu YR, Zhu HH, Xu LP, Liu DH, Liu KY, et al. Monitoring MRD with flow cytometry: an effective method to predict relapse for ALL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2012;91:183-92.
- (44) Hagedorn N, Acquaviva C, Fronkova E, Von Stackelberg A, Barth A, zur Stadt U, et al. Submicroscopic bone marrow involvement in isolated extramedullary relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: a more precise definition of “isolated” and its possible clinical implications, a collaborative study of the Resistant Disease Committee of the International BFM study group. *Blood*. 2007;110:4022– 4029.
- (45) Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, Eckert C, Reising M, Willasch A, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stemcell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27:377–384.
- (46) Campana D. Molecular determinants of treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;366 –373.
- (47) Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360:470–480.
- (48) Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2009;10:147–156.
- (49) Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96:2691-6.

- (50) Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk Bi, Ribeiro RC, Rivera GK, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100: 2399-402.
- (51) van der Velden VH, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ, Comans-Bitter WM, Willemse MJ, Hähnen K, et al. 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;16:1432-6.
- (52) Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, 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;111:5477-85.
- (53) Stow P, Key L, Chen X, Pan Q, Neale GA, Coustan-Smith E, 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: 4657–63.
- (54) Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. 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: 4153–62.
- (55) Gökbüget N, Kneba M, Raff T, Trautmann H, Bartram CR, Arnold R, et al. Adults with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor diagnosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood* 2012; 120(9):1868-76.
- (56) Campana D, Coustan-Smith E. Measurements of treatment response in childhood acute leukemia. *The Korean Journal of Hematology* 2012; 47(4):245-54.
- (57) GBTLI. Grupo Brasileiro para o Tratamento de Leucemia Infantil. Protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, 2009
- (58) van Dongen JJM, Langerak AW. Immunoglobulin and T-cell receptor rearrangements. In: Pui CH. *Childhood leukemias*. Cambridge: Cambridge University Press; 1999. p. 145-167.

- (59) van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombination in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17:2257-2317.
- (60) Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia*. 1997;11(12):2192-9.
- (61) Verhagen OJHM, Willemse MJ, Breunis WB, Wijkhuijs AJM, Jacobs DCH, Joosten SA, et al. Application of germline IgH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000; 14:1426-1434.
- (62) van der Velden VHJ, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJM. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2002 (a); 16:928-936.
- (63) van der Velden VHJ, Wijkhuijs JM, Jacobs DCH, van Wering ER, van Dongen JJM. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia* 2002 (b); 16:1372-1380.
- (64) Szczepanski T, van der Velden VHJ, Hoogeveen PG, de Brie M, Jacobs DCH van Wering ER, et al. V delta 2-J alpha rearrangements are frequent in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia but are rare in normal lymphoid cells. *Blood* 2004; 103:3788-3804.
- (65) Chen X, Pan Q, Stow P, Behm FG, Goorha R, Pui CH, Neale GAM. Quantification of minimal residual disease in T-lineage acute lymphoblastic leukemia with the TAL-1 deletion using a standardized real time PCR assay. *Leukemia* 2001; 15:166-170.
- (66) Willemse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello, Hop WC, Panzer-Grümayer ER, et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002; 99(12): 4386-4393.

- (67) Assumpção JG, Ganazza MA, de Araújo M, Silva AS, Scrideli CA, Brandalise SR, Yunes JA. Detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia using a low-cost PCR strategy. *Pediatric Blood and Cancer* 2010; 55 (7): 1278-1286.
- (68) van Dongen JJM, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavenders FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-2317.
- (69) Dawidowska M, Jolkowska 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.
- (70) Thorn I, Forestier E, Thuresson B, Wasslavič C, Malec M, Li A, et al. Applicability of Ig/TCR gene rearrangements as targets for minimal residual disease assessment in a population-based cohort of Swedish childhood acute lymphoblastic leukaemia diagnosed 2002-2006. *European Journal of Haematology* 2010; 84: 117-127.
- (71) Scrideli CA, Queiroz RGP, Bernardes JE, Valera ET, Tone LG. 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.
- (72) Ganazza MA, Assumpção JG, de Araújo M, Scrideli CA, Tone LG, Brandalise SR, Yunes JA. TCRG gene rearrangement patterns in Brazilian children with ALL: an update. *Leuk. Res* 2009; 33(12):e228-229.
- (73) Scrideli CA, Assumpção JG, Ganazza MA, Araújo M, Toledo SR, Lee ML, 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.
- (74) Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, Panzer-Grümayer R, Buldini B, Silvestri D, 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. *Haematologia* 2012; 97 (10): 1586-1593.

(75) Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 1998; 339: 591-598.

(76) van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998; 352: 1731-1738.

(77) Eckert C, Scrideli CA, Taube T, Songia S, Wellmann S, Manenti M et al. Comparison between TaqMan and LightCycler technologies for quantification of minimal residual disease by using immunoglobulin and T-cell receptor genes consensus probes. *Leukemia*. 2003; 17(12): 2517-24.

(78) Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Linda S 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. *Blood*. 2008; 111(12):5477-5485.

(79) Scrideli CA, Queiróz RP, Bernardes JE, Defavery R, Valera ET, Tone LG. Use of simplified strategies to evaluate early treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*. 2006; 30: 1049-1052.

(80) Cheng SH, Lau KM, Li CK, Chan NPH, Ip RKL, Cheng CK, et al. Minimal residual disease-based risk stratification in Chinese childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry and plasma DNA quantitative polymerase chain reaction. *PLOS One* 2013; 8(7): 1-10.

(81) Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia: current status and future prospective. *Lancet Oncol*. 2001; 2: 507-607.

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

ANEXO 1 – Comprovante de Aprovação do Comitê de Ética Local



Centro Infantil
Boldrini

Campinas, 29 de Agosto de 2008.

Ilmo. Sr.
JOSÉ ANDRES YUNES

Prezado Senhor,

Informamos que seu projeto intitulado "**ESTUDO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**" foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini) em 29/08/2008.

Informamos que a cada 6 meses, deverá ser apresentado um relatório parcial sobre o andamento da pesquisa em questão (formulário: acompanhamento das pesquisas; disponível no site: www.boldrini.org.br ou no L: público/ CEC/ CEP Formulários) ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini).

Solicitamos que, após a conclusão do estudo, o mesmo seja encaminhado à Secretaria do CEP /Boldrini e apresentado aos profissionais do Centro Infantil Boldrini.

Colocamo-nos à disposição para maiores esclarecimentos.

Cordialmente,

Prof. Dr. Sérgio Santos Muhlen
Coordenador do CEP/Boldrini

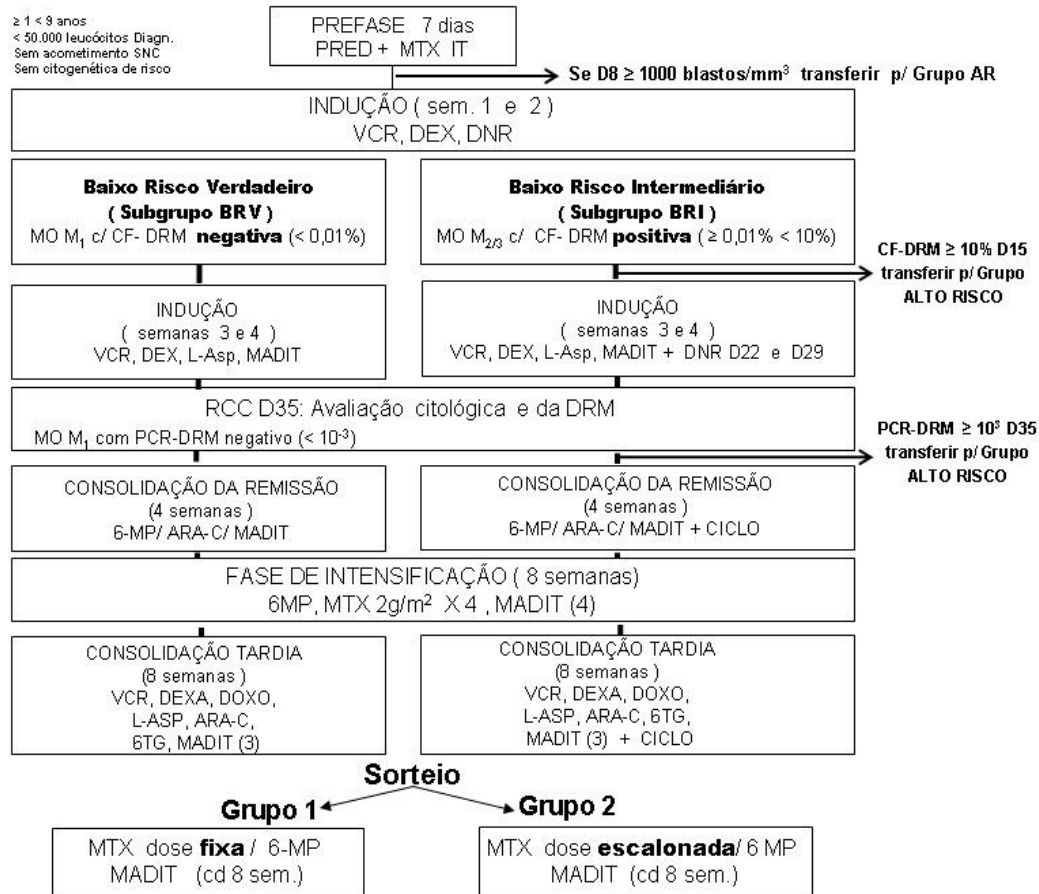
P.S.: Pedimos a gentileza de acusar o recebimento desta.

Uol. Públ. Municipal Lei nº 496
Uol. Públ. Estadual Dec. nº 22.018
Uol. Públ. Federal Dec. nº 88.747

CENTRO INFANTIL DR. DOMINGOS A. BOLDRINI
Dr. Gabriel Porto, 1270
Cid. Universitária - Campinas SP

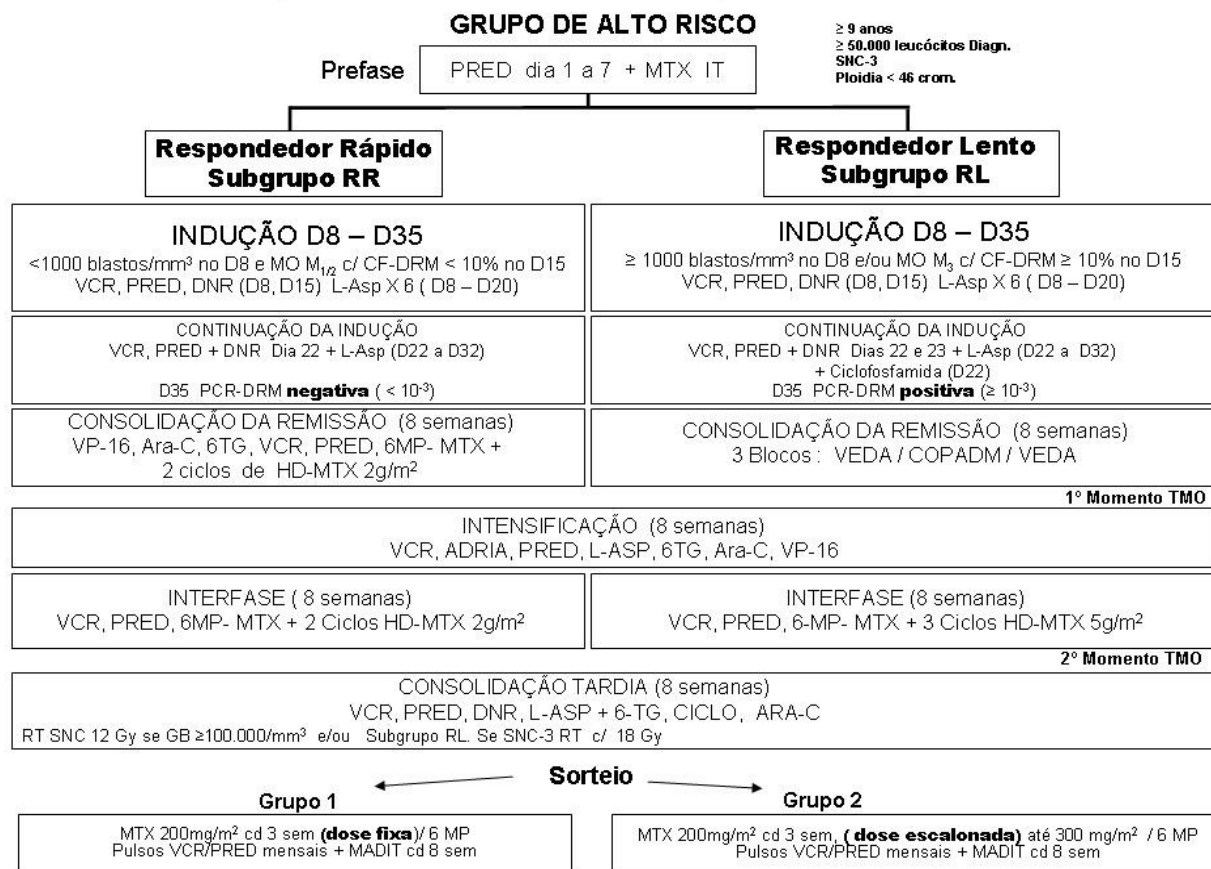
ANEXO 2 – Representações esquemáticas do tratamento dos pacientes do GBTLI LLA 2009

Representação esquemática Global GBTLI LLA 2009 Leucemia B-derivada do Grupo de Baixo Risco



Representação esquemática do Protocolo GBTLI LLA-2009 da terapia para a LLA B-derivada do Grupo de *Baixo Risco* de recidiva (BR)

Planejamento Global GBTLI LLA-2009 para LLA B-derivada

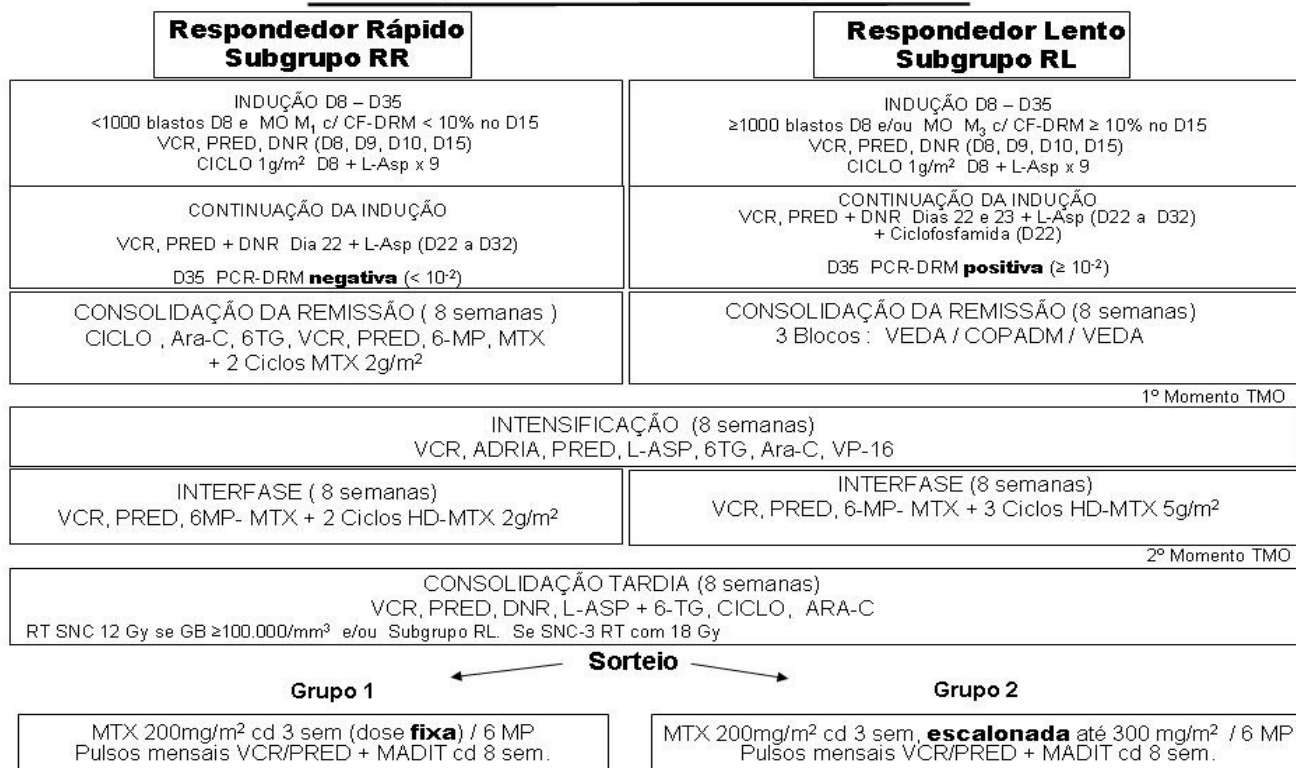


Representação esquemática do Planejamento Global do Estudo GBTLI LLA-2009 para a LLA B-derivada do Grupo de *Alto Risco* de recidiva (AR)

Planejamento Global GBTLI LLA-2009

LLA T-DERIVADA

Prefase PRED dia 1 a 7 + MTX IT



Representação esquemática do planejamento global do Protocolo GBTLI LLA-2009 para a LLA T-derivada.

Protocolo GBTLI LLA- 2009 LLA Ph⁺

Prefase PRED dias 1 a 7 + MTX IT

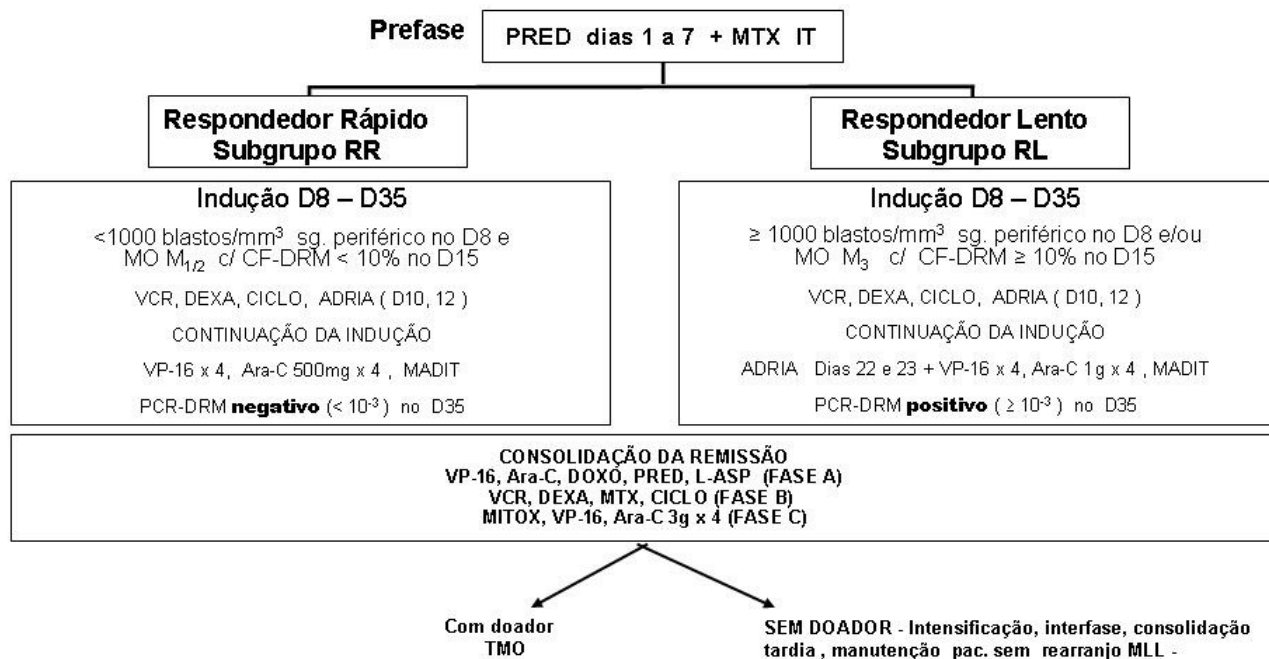
Respondedor Rápido Subgrupo RR

Respondedor Lento Subgrupo RL

INDUÇÃO D8 – D35 Blast. <1000/mm³ no D8 e MO M_{1/2} c/ CF-DRM < 10% no D15 VCR, PRED, DNR (D9, D10) L-Asp X 6 (D16 – 28)	INDUÇÃO D8 – D35 Blast. ≥ 1000/mm³ no D8 e/ou MO M₃ c/ CF-DRM ≥ 10% no D15 VCR, PRED, DNR (D9, D10) L-Asp X 6 (D16 – 28)
Continuação da indução VCR, PRED + DNR D22 + L-Asp x 9 (D16 a 33) D35 PCR-DRM negativo (< 10⁻³)	Continuação da indução VCR, PRED + DNR D22, 23, 24 + L-Asp x 3 (D22 a 26) + Imatinibe (D16-33) + Ciclofosfamida D22 D35 PCR-DRM positivo (≥ 10⁻³)
CONSOLIDAÇÃO DA REMISSÃO (3 semanas) VP-16, Ara-C, 6TG + Imatinibe D1- 21	BLOCO 1 IFO, VP-16 + Imatinibe D1 - 14
BLOCO 2 MTX 2g/m², 6TG, CICLO, Ara-C	BLOCO 2 MTX 5g/m², 6TG, CICLO, Ara-C
BLOCO 3 MTX 2g/m², 6MP, Ara-C, L-ASP	BLOCO 3 MTX 5g/m², 6MP, Ara-C, L-Asp
1º Momento TMO	
Intensificação (8 semanas) VCR, PRED, ADRIA, L-ASP, Ara-C, 6TG + Imatinibe (dias 1- 22 e 30 – 51)	
BLOCO 2 MTX 2g/m², 6TG, CICLO, Ara-C	BLOCO 3 MTX 5g/m², 6MP, Ara-C, L-Asp
BLOCO 3 MTX 2g/m², 6MP, 6TG, Ara-C, L-Asp	BLOCO 2 MTX 5g/m², 6TG, CICLO, Ara-C
	BLOCO 1 IFO, VP-16 + Imatinibe D1- 14
2º Momento TMO	
CONSOLIDAÇÃO TARDIA (8 semanas) VCR, PRED, DNR, L-ASP, CICLO, 6-TG, VP-16, ARA-C + Imatinibe (dias 1 - 14 e 29 – 50) RT SNC 12Gy se ≥ 100.000/mm³ e/ou Subgrupo RL. Se SNC-3 RT com 18Gy	
MANUTENÇÃO (18 meses) 6MP + MTX Intermitente dose fixa 200 mg/m². Pulsos a cd 6 semanas c/ VCR/DEXA, Imatinibe (PULSO A) alternando c/ CICLO/Ara-C/ Imatinibe (PULSO B). MADIT a cd 8 sem. durante toda a Terapia de Manutenção (exceto p/ os pacientes irradiados).	

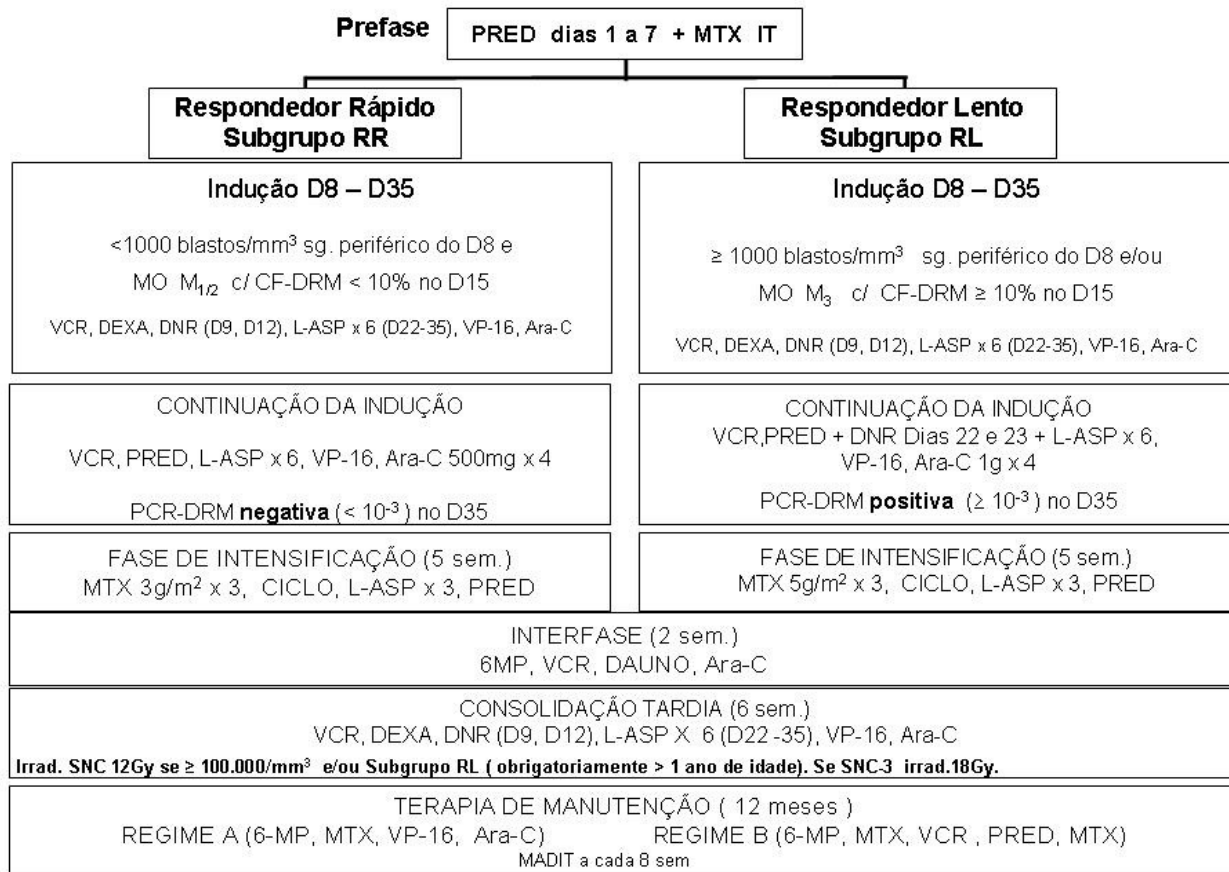
Representação esquemática geral do Protocolo GBTLI LLA-2009 para a LLA Ph⁺

Planejamento Global GBTLI LLA-2009
GRUPO LACTENTE (< 12 meses) COM REARRANJO (MLL⁺)



Representação esquemática geral do Protocolo GBTLI LLA-2009 de tratamento da LLA de lactentes(<12 meses), com rearranjo MLL positivo

Planejamento Global GBTLI LLA-2009
Grupo Lactente (< 12 meses) sem rearranjo MLL -



Representação esquemática geral do Protocolo GBTLI LLA-2009 de tratamento da LLA de lactentes
 (<12 meses), sem rearranjo MLL (MLL -).

ANEXO 3 – Características clínico-biológicas dos pacientes envolvidos no estudo.

	Nº casos (%)
Gênero (n=120)	
Masculino	54 (45%)
Feminino	66 (55%)
Idade (n=120)	
≥1 ano e <9 anos	78 (65%)
<1 ano e ≥9 anos	42 (35%)
WBC ao diagnóstico (n=120)	
<50.000/mm ³	93 (77,5%)
≥50.000/mm ³	27 (22,5%)
Imunofenótipo (n=120)	
LLA B-derivada	109 (91%)
LLA-T	11 (9%)
Risco ao diagnóstico (n=120)	
BR	56 (47%)
AR	64 (53%)
WBC dia 8 (n=119)	
<5.000/mm ³	100 (83%)
>5.000/mm ³	19 (17%)
Translocação (n=120)	
Ph+	2 (1,5%)
MLL+	3 (2,5%)
Outras tranlocações	17 (14%)
Sem translocação	98 (82%)

ANEXO 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes

Estudo prospectivo da Doença Residual Mínima em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda tratados segundo protocolo do GBTLI.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico sobre o câncer e doenças hematológicas, os pesquisadores e corpo clínico deste hospital desenvolvem pesquisa científica, através de projetos analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Através desta pesquisa, que pretende detectar a presença de células leucêmicas na medula óssea do paciente no 15º e 35º dias do tratamento (chamada de Doença Residual Mínima), será possível identificar os pacientes que respondem ou não satisfatoriamente na fase de indução e, portanto, oferecer a possibilidade de realocá-los no protocolo terapêutico em vigência.

Seu filho(a) foi submetido a tratamento para leucemia linfóide aguda neste hospital. O tratamento inclui coletas de sangue e medula óssea para o diagnóstico e acompanhamento da doença. Parte da amostra colhida, não usada nos diagnósticos, representa material muito útil para pesquisa científica.

Por isso, você está sendo convidado a colaborar com a pesquisa científica, autorizando a utilização de parte das amostras de sangue/medula óssea já coletadas nos procedimentos rotineiros de diagnóstico. Apenas o restante do material colhido, não usado para diagnóstico, será aproveitado na pesquisa. Assim sendo, não será feita nenhuma coleta adicional de sangue/medula óssea àquela que já foi feita para o diagnóstico, portanto, a sua colaboração na pesquisa não acarreta risco nem desconforto adicional algum.

Solicitamos também sua autorização para a consulta do prontuário clínico, a fim de estudar a ocorrência de eventuais associações entre os dados laboratoriais encontrados e a evolução clínica da doença. Os dados individuais, resultados de exames e testes, bem como do prontuário, somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, etc).

Além disso, solicitamos autorização para armazenar a parte da amostra não utilizada para a consecução deste projeto de pesquisa. Na eventualidade de novo projeto de pesquisa, o material só será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo CEP e, se for o caso, pela CONEP.

Todo o material utilizado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, a privacidade e identidade do seu filho(a) serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso deste material, conforme descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em permitir o uso deste material para pesquisa, ou se futuramente, em qualquer fase da pesquisa, vier a retirar seu consentimento, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no tratamento de seu filho(a), nem incorrerá em discriminação ou penalização alguma.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado no prontuário do paciente.

Caso você tenha questões a fazer sobre este termo de consentimento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, bem como se desejar a qualquer momento retirar seu consentimento, por gentileza, entre em contato com o pesquisador responsável pelo projeto, Dr. José Andrés Yunes: andres@boldrini.org.br ou pelo endereço: R. Gabriel Porto, 1270, CEP 13083 210. Campinas, SP.

☐ Autorizo que o material coletado seja armazenado para uso em outras pesquisas após sua aprovação como novo projeto, mediante nova avaliação pelo CEP

Assinatura do doador(a) ou Representante Legal: _____

Nome do doador(a) : _____

RG do Prontuário Médico: _____

Médico Responsável: _____

Presidente do Centro Infantil Boldrini: _____

ANEXO 5 – Primers utilizados para PCR qualitativo

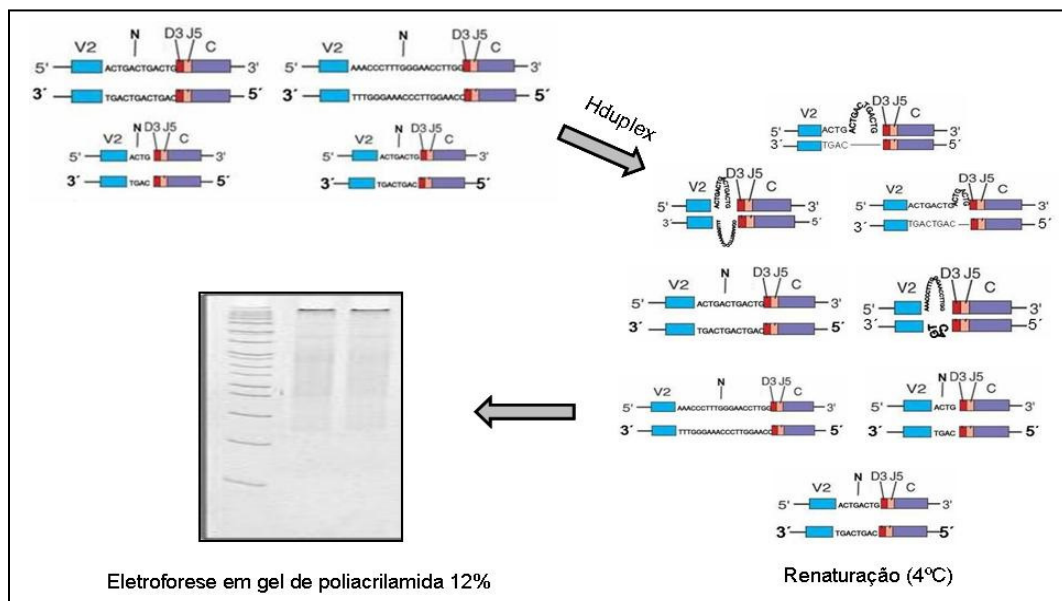
Primers selecionados para análise da DRM por PCR qualitativo

Primer Forward	(Sequencia 5'→ 3')	Primer Reverso	(Sequencia 5'→ 3')	LLA* B T	
gene IgH					
VH1-FR2	CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA	JHcon	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC	x	
VH2-FR2	TGGATCCGTACAGCCCCAGGGAAGG	"	"	x	
VH3-FR2	GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA	"	"	x	
VH4-FR2	TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG	"	"	x	
VH5-FR2	GGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGG	"	"	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	TCAAGGTTACGCGCAGTGGATCTG	kde	CCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA	x	
Vk2	GGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTC	"	"	x	
Vk3	CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC	"	"	x	
INTR	CGTGGCACCGCGAGCTGTAGAC	"	"	x	
gene TCRG					
VgIf	GGAAGGCCCCACAGCRTCTT	Jg1.3/2.3	GTGTTGTTCCACTGCCAAAGAG		
		+	+	x	x
Vg9	CGGCACTGTCAGAAAGGAATC	Jg1.1/2.1	TTACCAGGCGAAGTTACTATGAGC		
		"	"	x	x
Vg10	AGCATGGGTAAGACAAGCAA	"	"		x
Vg11	CTTCCACTTCCACTTTGAAA	"	"	x	x
gene TCRD					
Vd1	ATGCAAAAAGTGGTCGCTATT	Jd1	GTTCCACAGTCACACGGGTTC		x
Vd2	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG	"	"		x
Vd3	GTACCGGATAAGGCCAGATTA	"	"		x
Dd2	AGCGGGTGGTGATGGCAAAGT	"	"	x	x
Vd2	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG	Dd3	TGGGACCCAGGGTGAGGATAT	x	x
Dd2	AGCGGGTGGTGATGGCAAAGT	"	"		
SIL-TAL					
Si15	AAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA	Tal1	AGAGCCTGTCGCCAAGAA		x
"	"	Tal2	TTGTAAAATGGGGAGATAATGTGCAC		x

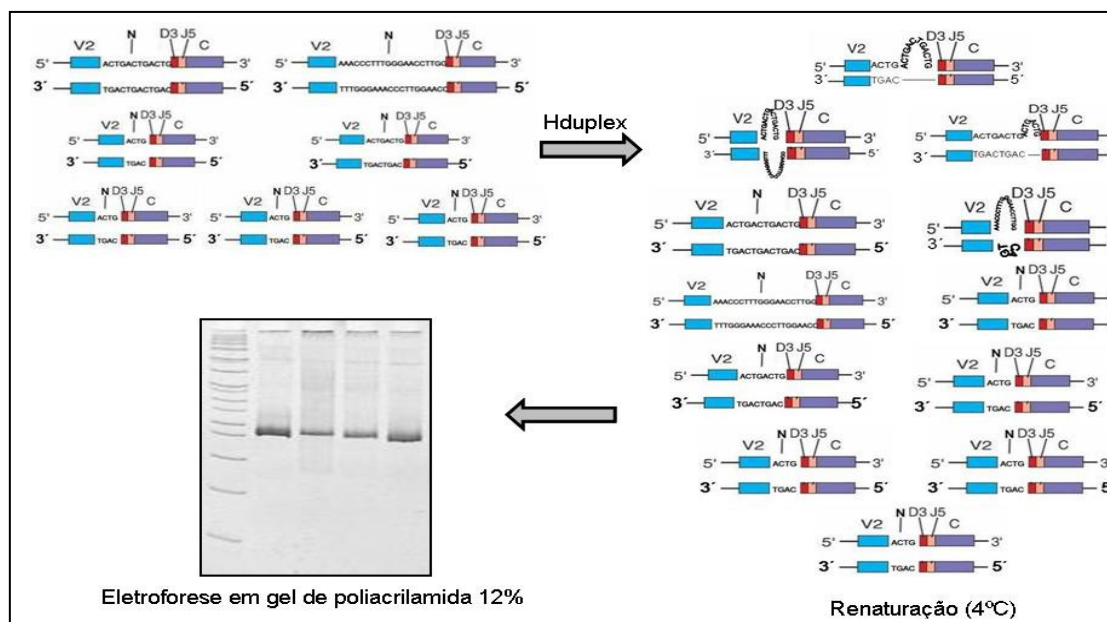
Referencias: van Dongen et al., 2003 e Pongers-Willems et al., 1999 .

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

ANEXO 6 – PCR associado à formação de Homo/Heterodúplex



PCR associado à formação de Homo/Heterodúplex em uma população de linfócitos normais. Observa-se que após a desnaturação e renaturação do produto de PCR, não são visíveis bandas distintas no gel de poliacrilamida.



PCR associado à formação de Homo/Heterodúplex em uma população leucêmica. Observa-se que após a desnaturação e renaturação do produto de PCR, é possível a identificação de bandas distintas no gel de poliacrilamida devido à presença de uma população de células leucêmicas com o mesmo padrão de rearranjos gênicos.

ANEXO 7 – Primers utilizados para reamplificação por PCR qualitativo

Primers para reamplificação de rearranjos clonais IG/TCR/SIL-TAL e seqüenciamento com M13 e T7.

Primer	Sequencia 5'→3'
<i>Primers para reamplificação</i>	
VH1-FR2-M13	gtaaaacgacggccagtCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
VH2- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG
VH3- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
VH4- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
VH5- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtGGGTGCGCCAGATGCCCCGGAAAGG
VH6- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAG
VH7- FR2-M13	gtaaaacgacggccagtTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
DH1-M13	gtaaaacgacggccagtGGCGGAATGTGTGCAGGC
DH2-M13	gtaaaacgacggccagtGCACTGGGCTCAGAGTCCTCT
DH3-M13	gtaaaacgacggccagtGTGGCCCTGGGAATATAAAA
DH4-M13	gtaaaacgacggccagtAGATCCCCAGGACGCAGCA
DH5-M13	gtaaaacgacggccagtCAGGGGGACACTGTGCATGT
DH6-M13	gtaaaacgacggccagtTGACCCAGCAAGGGAAGG
DH7-M13	gtaaaacgacggccagtCACAGGCCCTACCAGC
JHcon-T7	taatacgactcactatagggCTTACCTGAGGAGACGGTGACC
Vk1/6-M13	gtaaaacgacggccagtTCAAGGTTCAAGGCGAGTGGATCTG
Vk2-M13	gtaaaacgacggccagtGGCCTCCATCTCTGCAGGTCTAGTC
Vk3-M13	gtaaaacgacggccagtCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
INTR-M13	gtaaaacgacggccagtCGTGCCACCGCGAGCTGTAGAC
kde-T7	taatacgactcactatagggCCTCAGAGGTCAGAGCAGGTTGTCCTA
Vglf-M13	gtaaaacgacggccagtGGAAGGCCCCACAGCRTCTT
Vg9-M13	gtaaaacgacggccagtCGGCACTGTCAGAAAGGAATC
Vg10-M13	gtaaaacgacggccagtAGCATGGGTAAAGACAAGCAA
Vg11-M13	gtaaaacgacggccagtCTTCCACTTCCACTTTGAAA
Jg1.3/2.3-T7	taatacgactcactatagggGTGTTGTTCCACTGCCAAAGAG
Jg1.1/2.1-T7	taatacgactcactatagggTTACCAGGCGAAGTTACTATGAGC
Vd1-M13	gtaaaacgacggccagtATGCAAAAAGTGGTCGCTATT
Vd2-M13	gtaaaacgacggccagtATACCGAGAAAAGGACATCTATG
Vd3-M13	gtaaaacgacggccagtGTACCGGATAAGGCCAGATTA
Jd1-T7	taatacgactcactatagggGTTCACAGTCACACGGGTTC
Dd2-M13	gtaaaacgacggccagtAGCGGGTGGTGATGGCAAAGT
Dd3-T7	taatacgactcactatagggTGGACCCAGGGTGAGGATAT
Sil5-M13	gtaaaacgacggccagtAAGGGGAGCTAGTGGGAGAAA
Tal1-T7	taatacgactcactatagggAGAGCCTGTCGCCAAGAA
Tal2-T7	taatacgactcactatagggTTGTAAAATGGGGAGATAATGTGAC
<i>Primers para sequenciamento</i>	
M13 (universal)	gtaaaacgacggccagt
T7	taatacgactcactataggg

Obs : em letras minusculas, sequencia correspondente aos *primers* M13 e T7. Em letras maiusculas, sequencia correspondentes aos *primers* da tabela anterior.

ANEXO 8 – Primers utilizados para RQ-PCR

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

Rearranjos IgH (VH-JH ou DH-JH)

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

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

Rearranjos IgK (Vk-Kde ou INTRON-Kde)

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

	Probe TaqMan	Primer Reverso
Kde	AGCTGCATTTTTGCCATATCCACTATTTGGAGT	TACAGACAGGTCCTCAGAGGTCAG
Kde*	AGCCCAGGGCGACTCCTCATGAGT	ATATGGCAAAAATGCAGCTGC
Kde2*	GGACAACCTGCTCTGACCTCTGAGGA	GACCTTCAGGCACATGCTT

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

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

	Probe TaqMan	Primer Reverso
JG1.3/2.3	TGTCACAGGTAAGTATCGGAAGAATACAACATTTCC	TTCCTGC(T/C)TTCCTCTATTACCT
JG1.1/2.1	CTGAAGGGACTAAGCTCATAGTAACCTCACCTGGT	TATACTGAGGCCAGGAATGTGACATA

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

	Probe TaqMan	Primer Forward
VG2	TTGAGATTGATACTGCGAAATCTAATTGAAAATGACTC	CTTACGCAAGCACAAGGAACAA
VG3	ACTCATAACCCAGGAGGTGGAGCTGGATATT	CTCCACCGCAAGGGATGT
VG4	CTTGAGAATGATACTGCGAAATCTTATTGAAAATGA	GATACTTACGGAAGCACAAGGAAGA
VG5*	ATCAATATCCAGCTCCACCTCCTGGGT	GGACTCAGTCCAGGAAAGTATTATACTCAT
VG9	TAGGATACCTGAAACGTCTACATCCACTCTCACC	GGCATTCCGTCAGGCAAA
VG10*	CAATCCTTACCATCAAGTCCGTAGAGAAAGAAGACAT (R)	CAAAGTGGAGGCAAGAAAGAATTCT
VG11*	TCAAGTTTCTTAGTCTTCCACCTGAGCAATCT (R)	CATGTCTTCTTGACAATCTCTGCTC

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

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

	Probe TaqMan	Primer Reverso
JD1*	CCCGTGTGACTGTGGAACCAAGTAAGTAACTC	TTAGATGGAGGATGCCTTAACCTT
DD3*	CGCACAGTGCTACAAAACCTACAGAGACCTG	TTTGCCCCTGCAGTTTTTGT
DD3-2*	ATATCCTCACCTGGGTCCCATGCC3'	CTGCTTGCTGTGTTTGTCTCCT

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

	Probe TaqMan	Primer Forward
VD2	AGACCCTTCATCTCTCTGATGGTGCAAGTA	TGCAAAGAACCTGGCTGTACTTAA

Gene N-RAS: Controle interno (normalizador) ⁵

Primer Forward	AACCTGTTTGTGGACATACTGGATA
Primer Reverso	CGCCTGTCCTCATGTATTGGT
Probe TaqMan N-ras	TCTCATGGCACTGTACTCTTCTTGGTCCAGCT

Sequências estão na orientação 5'→3'. Probes com (R) significa que são da fita reversa. Ref : 1, Verhagen et al, 2000, 2, van der Velden et al, 2002b, 3, van der Velden et al, 2002a, 4, Szczepanski et al, 2004, 5, Neale et al., 2004. * Comunicação pessoal Gianni Cazanig, primers com nomes 'repetidos' são alternativas mais apropriados em caso de deleções maiores, por exemplo no caso do Kde-2 e Dd3-2.

ANEXO 9 – Frequência do numero de rearranjos por paciente por PCR qualitativo ao diagnóstico (n=120)

Número de rearranjos encontrados	Nº pacientes (%)
0	2 (1,7%)
1	14 (11,7%)
2	23 (19,2%)
3	32 (26,7%)
4	18 (15%)
5	15 (12,5%)
6	8 (6,7%)
7	4 (3,3%)
8	4 (3,3%)

ANEXO 10 – Resultados de DRM no D35

Rearranjos testados por cada metodologia para pacientes com resultados de DRM $\geq 10^{-3}$ por RQ-PCR. Em verde resultados concordantes entre as duas metodologias e em vermelho resultados discordantes. (+) rearranjo positivo (-) rearranjo negativo (nt) não testado.

DRM RQ-PCR D35	Paciente	Rearranjos																											
		VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	VH7	DH2	DH3	DH7	VKI	VKII	VKIII	Intron	VG2	VG3	VG4	VG5	VG8	VG9	VG10	VD1-ID1	VD2-ID1	VD2-DD3	VD3-ID1	DD2-ID1	DD2-DD3	Sl-Tad 1
		RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali	RQ	Quali
$\geq 10^{-2}$	1					+															nt								
	2		nt						nt						+														
	3				+								+			nt													
	4									+																			
	5		+						nt							+													
	6								+													+							
	7											nt	nt	+			nt												
	8															nt							nt		+	+	+		
	9																+												nt
	10																	nt					+	nt	nt				+
	11		+			+						nt										nt							+
$< 10^{-2}$ a $\geq 10^{-3}$	12		nt									+								nt		+				+			
	13																												
	14													+															
	15									+												+							
	16		+						nt				nt			nt					nt	nt							
	17				+	nt														nt						nt			
	18		+									nt	nt	nt						+									
	19		+										+	+							+								
	20																+				nt								
	21				+								nt							nt									
	22		+						nt			nt	+			nt													
23				nt																								nt	
24		+	nt				nt	nt			nt		nt												nt				
25																													
26													+		nt														
27				+																									
28		+												+	nt														
29											nt	nt	nt	+					nt		nt				+				
30		+		+				nt																					
31				+																									
32												nt	nt	nt	nt										+		nt		
33															+														
34												+							nt										
35																				+		nt							
36				+								nt									nt								