

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E  
DO ADOLESCENTE

**IMPACTO DA VARIAÇÃO DE FATORES DE  
ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO ENTRE OS  
PROTOCOLOS DE TRATAMENTO DE  
LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS DA INFÂNCIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KLERIZE ANECELY DE SOUZA SILVA

Porto Alegre, Brasil

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E  
DO ADOLESCENTE

**IMPACTO DA VARIAÇÃO DE FATORES DE  
ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO ENTRE OS  
PROTOCOLOS DE TRATAMENTO DE  
LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS DA INFÂNCIA**

KLERIZE ANECELY DE SOUZA SILVA

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Liane Esteves Daudt**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mariana Bohns Michalowski**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil  
2018

#### CIP - Catalogação na Publicação

de Souza Silva, Klerize Anecely  
Impacto da variação de fatores de estratificação de  
risco entre os protocolos de tratamento de leucemias  
linfoides agudas da infância / Klerize Anecely de  
Souza Silva. -- 2018.

105 f.

Orientadora: Liane Esteves Daudt.

Coorientadora: Mariana Bohns Michalowski.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,  
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. LLA pediátrica . 2. Doença Residual Mínima. 3.  
Estratificação de risco. I. Esteves Daudt, Liane,  
orient. II. Bohns Michalowski, Mariana, coorient.  
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO**

**ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

05 / 01 / 2018

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Lauro José Gregianin

Departamento de Pediatria e Puericultura/PPGSCA  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Christina Matzenbacher Bittar

Serviço de Hematologia  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dra. Cláudia Caceres Astigarraga

Serviço de Hematologia  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a todos os pacientes da oncologia e da hematologia pediátrica, não só aos que fizeram parte desse projeto, mas a todos aqueles que enfrentam ou que um dia irão enfrentar essa doença tão grave. Que eu possa continuar aprendendo com cada lágrima e com cada sorriso de vocês que são verdadeiros heróis e nos ensinam a cada dia o verdadeiro significado da palavra amor. E que esse amor continue inspirando a mim e aos apaixonados pela ciência em buscar os melhores resultados para essas crianças.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, professora Dra. Liane Daudt, e à minha coorientadora, professora Dra. Mariana Michalowski pela confiança, disponibilidade, dedicação e paciência em me auxiliarem na elaboração desse trabalho que foi realizado com muito carinho.

Aos meus pais, Maria Luiza e João Martins, cujo o apoio e os exemplos contribuíram para que eu chegasse até aqui e ao meu irmão, Klebson, pelo incentivo nas minhas decisões. Obrigada pelo apoio e amor incondicional e por compreenderem as minhas escolhas.

Ao amor da minha vida, Sílvio, por toda a força, amor, carinho e compreensão. Meu amor eterno a você que me faz cada vez mais feliz e me ajuda a me tornar uma pessoa melhor a cada dia junto dos nossos filhos caninos Bia, Lu, Bolota, Tufão e Bolinha (em memória).

A todos os pacientes da oncologia e da hematologia pediátrica e aos seus familiares que sofrem junto e que, por vezes mais do que índices de cura, esperam por um consolo e uma voz amiga.

Um agradecimento especial a equipe da oncologia pediátrica do HCPA por todos os ensinamentos médicos e de vida que eu sempre carregarei comigo. Minha eterna gratidão por terem contribuição essencial na minha formação profissional.

A toda equipe da citometria de fluxo do laboratório de diagnóstico personalizado do HCPA pelo carinho e disponibilidade. Minha admiração e respeito por essa equipe maravilhosa que sempre está disposta a compartilhar seu conhecimento e sanar nossas dúvidas.

À estatística, Aline Castello Branco Mancuso, pela incansável ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente pelos ensinamentos e atenção.

Aos colegas de trabalho do Hospital da Criança Conceição por compreenderem os momentos em que precisei me dedicar ao mestrado.

Por fim, obrigada a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu concluísse esse trabalho da melhor maneira possível.

## RESUMO

**Introdução:** O tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (LLA) pediátrica é uma das terapias mais complexas dentre os programas terapêuticos contra o câncer. As crianças com LLA são tratadas de acordo com a estratificação em grupos de risco a fim de que crianças com características clínicas e biológicas favoráveis recebam uma terapia menos tóxica, enquanto que uma terapia mais agressiva seja reservada aos pacientes com maior risco de recaída e com menor probabilidade de sobrevida a longo prazo. **Objetivos:** Analisar a concordância entre as estratificações dos grupos de riscos em pacientes classificados pelos diferentes protocolos utilizados para tratamento da LLA da infância em uma instituição de referência no sul do Brasil e avaliar a influência da Doença Residual Mínima (DRM) por citometria de fluxo na análise dessas classificações de risco. **Metodologia:** Estudo transversal, descritivo e retrospectivo a partir da revisão de prontuários dos pacientes com idade entre 1 e 18 anos portadores de LLA B atendidos no HCPA a partir de janeiro de 2013 até abril de 2017. Todos os pacientes foram estratificados conforme as classificações de risco dos protocolos mais utilizados em instituições brasileiras, que são a do grupo *Berlim-Frankfurt-Münster* (BFM) e a do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da LLA (GBTLI). A concordância entre as classificações de risco de cada protocolo foi realizada através do coeficiente Kappa. **Resultados:** Foram analisados 75 pacientes. A concordância entre as estratificações de risco pelos protocolos GBTLI 2009 e BFM 95 ( $K= 0,22$ ;  $p= 0,003$ ), GBTLI 2009 e IC-BFM 2002 ( $K= 0,24$ ;  $p= 0,002$ ) foi baixa, moderada entre GBTLI 2009 e IC-BFM 2009 ( $K= 0,44$ ;  $p < 0,001$ ) e substancial entre IC-BFM 2009 e BFM 95 ( $K= 0,67$ ;  $p < 0,001$ ) e IC-BFM 2009 e IC-BFM 2002 ( $K= 0,68$ ;  $p < 0,001$ ). As análises sugerem que DRM do D15 por CF  $< 0,1\%$  foi um ponto de corte para pacientes que apresentaram melhores desfechos e DRM D15 por CF  $> 10\%$  com piores resultados. A classificação pelo protocolo brasileiro demonstrou um número maior de pacientes estratificados como alto risco quando comparado a do grupo BFM. As taxas de sobrevidas global e livre de eventos estimadas em 4 anos, independentes do protocolo de tratamento, foram 68,6% e 66,6% respectivamente. **Conclusões:** Este estudo nos fornece inúmeros pontos para reflexão sobre o tratamento da leucemia em nosso país. Observamos uma maior porcentagem de pacientes classificados como alto risco em nossa realidade e uma menor sobrevida em relação à literatura internacional. Compreender o papel das ferramentas para estratificação de risco disponíveis pode ajudar a melhorar este desfecho.

**Palavras-chave:** LLA pediátrica. Doença residual mínima. Estratificação de risco.

## ABSTRACT

**Introduction:** The treatment of childhood acute lymphoid leukemia (ALL) is one of the most complex therapies among cancer treatment programs. Children with ALL are treated according to stratification into risk groups so that children with favorable clinical and biological characteristics receive less toxic therapy, whereas more aggressive therapy is reserved for patients with higher risk of relapse and with lower probability of long-term survival. **Objectives:** First, to analyze the agreement between the risk stratification in patients classified by the different protocols already used to treat childhood ALL in a reference institution in southern Brazil and, second to evaluate the influence of minimal residual disease (MRD) by FC in the analysis of these risk. **Methods:** A cross-sectional, descriptive and retrospective study was carried out based on the review of medical records of patients aged 1 to 18 years with B-ALL attended at the HCPA from January 2013 to April 2017. All patients were stratified according to the risk classifications of the protocols most used in Brazilian institutions, which are those of the Berlin-Frankfurt-Münster group (BFM) and the Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da LLA (GBTLI). The agreement between the risk classifications of each protocol was performed using the Kappa coefficient. **Results:** A total of 75 patients were analyzed. There was a low agreement between the risk stratification by protocols GBTLI 2009 and BFM 95 ( $K = 0.22$ ,  $p = 0.003$ ), GBTLI 2009 and IC-BFM 2002 ( $K = 0.24$ ,  $p = 0.002$ ), moderate between GBTLI 2009 and IC-BFM 2009 ( $K = 0.44$ ,  $p < 0.001$ ) and substantial between IC-BFM 2009 and BFM-95 ( $K = 0.67$ ,  $p < 0.001$ ) and IC-BFM 2009 and IC-BFM 2002 ( $K = 0.68$ ,  $p < 0.001$ ). The analyzes suggest that day 15 FC MRD  $< 0.1\%$  was a cutoff for patients who presented better outcomes and day 15 FC MRD  $> 10\%$  with worse results. Classification by the Brazilian protocol showed a greater number of patients stratified as high risk when compared to the BFM group. The global and event-free survival rates estimated at 4 years, independent of the treatment protocol, were 68.6% and 66.6%, respectively. **Conclusions:** This study provides us with numerous points for reflection on the treatment of leukemia in our country. We observed a higher percentage of patients classified as high risk in our reality and a lower survival rate than the international literature. Understanding the role of risk classifications tools available may help us to improve treatment outcomes.

Keywords: Childhood ALL. Minimal residual disease. Risk stratification.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de risco conforme regimes de tratamento BFM e GBTLI .....	44
Tabela 2. Interpretação dos valores Kappa .....	53

### LISTA DE TABELAS – ARTIGO 1

Tabela 1. Classificação de risco conforme NCI e regimes de tratamento BFM e GBTLI.. .....	68
Tabela 2. Características clínicas, laboratoriais e distribuição dos grupos de risco.....	70
Tabela 3. Análise de concordância entre as estratificações de risco pelos protocolos GBTLI 2009 e BFM 95; GBTLI 2009 e IC-BFM 2002; GBTLI 2009 e IC-BFM 2009...72	

### LISTA DE TABELAS - ARTIGO 2

Tabela 1. Análise de concordância entre as estratificações de risco pelos protocolos IC- BFM 2009 e BFM 95 e entre IC-BFM 2009 e IC-BFM 2002.....	85
Tabela 2. Distribuição dos eventos conforme DRM do final da indução por CF.....	86
Tabela 3. Distribuição dos eventos conforme DRM do D15 por CF.....	87
Tabela 4. Distribuição das variáveis conforme morfologia no D15, D8 e NCI .....	90

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

### **LISTA DE ILUSTRAÇÕES – ARTIGO 1**

Figura 1. (A) Estimativa de Sobrevida Global e (B) estimativa de Sobrevida livre de eventos dos 75 pacientes independente do protocolo.....74

### **LISTA DE ILUSTRAÇÕES - ARTIGO 2**

Figura 1. (A) Estimativa de SG conforme DRM D15 por citometria de fluxo e (B) HR cumulativo do risco de óbito conforme DRM D15.....88

Figura 2. (A) Estimativa de SLE conforme DRM D15 por citometria fluxo e (B) HR cumulativo do risco de recidiva conforme a DRM do D15.....89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LLA B	Leucemia Linfoide Aguda de células precursoras linfoides B
LLA T	Leucemia Linfoide Aguda de células precursoras linfoides T
DRM	Doença Residual Mínima
FAB	<i>French-American-British</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
BFM	Grupo <i>Berlim-Frankfurt-Münster</i>
IC	Intercontinental
GBTLI	Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfoide Aguda na Infância
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
6-MP	6-Mercaptopurina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
CF	Citometria de fluxo
MPO	Mieloperoxidase
IGH	<i>Locus</i> da cadeia pesada de imunoglobulina
LDH	Desidrogenase láctica
OMS	Organização Mundial de Saúde
Ph+	Cromossomo Filadélfia positivo
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
BR	Baixo Risco

RI	Risco Intermediário
AR	Alto Risco
RC	Remissão completa
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
MO	Medula óssea
QT	Quimioterapia
TMO	Transplante de Medula Óssea
INCA	Instituto Nacional de Câncer

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA .....	19
2.1.1 Aspectos históricos .....	19
2.1.2 Epidemiologia .....	21
2.1.3 Etiologia .....	22
2.1.4 Apresentação clínica .....	24
2.1.5 Diagnóstico .....	26
2.1.6 Fatores prognósticos .....	31
2.1.6.1 Fatores clínicos e laboratoriais .....	31
2.1.6.2 Características imunofenotípicas .....	34
2.1.6.3 Citogenética e genética molecular .....	36
2.1.6.4 Resposta ao tratamento .....	40
2.1.7 Estratificação de risco .....	43
2.1.8 Aspectos gerais do tratamento .....	46
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	49
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	50
4.1 OBJETIVO GERAL .....	50
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	51
5.2 COLETA DE DADOS .....	51
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	51
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	52
5.5 ESTRUTURAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
<b>6 ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	54
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>8 ARTIGO ORIGINAL 1</b> .....	64
<b>9 ARTIGO ORIGINAL 2</b> .....	80
<b>10 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	101
<b>APÊNDICE A - FICHA DE COLETA DE DADOS</b> .....	102

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer na infância e adolescência é considerado uma doença rara quando comparado aos cânceres em adultos, embora os registros têm mostrado que a incidência global de câncer infantil tem aumentado desde 1975 (SMITH *et al.*, 2014). No Brasil, os registros de base populacional revelam uma incidência de câncer pediátrico de 154,3 casos/milhão, dos quais as leucemias correspondem de 18 a 41% (DE CAMARGO *et al.*, 2010). Elas constituem, portanto, o tipo de neoplasia mais comum na infância e formam um grupo de doença que é classificado em aguda e crônica, conforme o grau de maturação da população celular envolvida, sendo as leucemias agudas as mais frequentes (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Dentro desta população, a leucemia linfoblástica aguda ou leucemia linfóide aguda (LLA) ocorre aproximadamente cinco vezes mais do que leucemia mieloide aguda (LMA) e representa aproximadamente 75% de todos os diagnósticos de leucemia infantil (BELSON *et al.*, 2007).

Do ponto de vista etiológico, elas representam doenças clonais originárias da transformação maligna de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea, que adquirem alterações genéticas que lhes conferem uma vantagem proliferativa e de sobrevivência ou um prejuízo na diferenciação e apoptose. O clone neoplásico prolifera-se até substituir o parênquima medular normal (PUI *et al.*, 2011). A transformação neoplásica pode ocorrer nas células precursoras totipotentes ou nas precursoras já comissionadas para a linhagem mieloide ou linfóide. No caso da LLA, estas alterações ocorrem na linhagem linfóide, nos linfoblastos B ou T na medula óssea.

A LLA é uma doença muito heterogênea, pois possui uma variedade de características morfológicas, bioquímicas e imunofenotípicas. Além disso, diferentes tipos de leucemias podem surgir a partir das células progenitoras linfóides em diversas

fases de diferenciação e maturação celular e as leucemias podem também apresentar marcadores associados a mais de um estágio de desenvolvimento normal (PIZZO; POPLACK, 2015). O subtipo de LLA pediátrica mais comum é o que se origina nos precursores de células linfoides B, representando cerca de 80% dos casos e se subdivide conforme o estágio de maturação do linfoblasto B. Já a LLA de célula T se origina nos precursores de células linfoides T e representa aproximadamente 15% dos pacientes pediátricos e também se subdivide conforme o estágio de maturação do linfoblasto T (SWERDLOW *et al.*, 2008).

Alguns estudos já identificaram possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da leucemia. Em geral, os estudos investigam fatores ambientais, genéticos e infecciosos. Na maioria dos casos, a doença é esporádica, mas algumas doenças genéticas como anemia de Fanconi, síndrome de Down, síndrome de Bloom, Shwachman, Blackfan-Diamond, síndrome de Li-Fraumeni e Ataxia Telangiectasia têm sido associadas. A exposição à irradiação pré-natal e durante a vida intrauterina tem potencial carcinogênico, assim como exposição intrauterina ou pós-natal a benzeno, pesticidas, álcool, tabagismo e drogas ilícitas (LIGHTFOOT, 2005).

A LLA pediátrica é uma doença potencialmente curável na maioria dos casos atualmente. Os avanços nos estudos e o aperfeiçoamento dos recursos terapêuticos permitiram que as taxas globais de cura para essa doença que eram de praticamente zero em 1950 atingissem sobrevida livre de eventos (SLE) de mais de 80% na atualidade (PUI *et al.*, 2008). Essa melhora significativa na sobrevida é atribuível ao desenvolvimento de agentes quimioterápicos ativos, a otimização da dosagem individual, as combinações de multiagentes e aos avanços em cuidados de suporte (PIZZO; POPLACK, 2015).

O tratamento da LLA é uma das terapias mais complexas dentre os programas terapêuticos contra o câncer. As crianças com LLA são tratadas de acordo com a

estratificação em grupos de risco afim de que crianças com características clínicas e biológicas favoráveis recebam uma terapia menos intensa e menos tóxica, enquanto que uma terapia mais agressiva seja reservada aos pacientes com maior risco de recaída e com menor probabilidade de sobrevida a longo prazo (SCHULTZ *et al.*, 2007). Essa estratificação é possível a partir da determinação de fatores prognósticos. Para LLA pediátrica, há vários fatores prognósticos já bem estabelecidos (VROOMAN; SILVERMAN, 2009).

Os avanços nos estudos com relação ao tratamento da LLA são frequentemente citados como paradigma de sucesso dos ensaios clínicos modernos e da medicina baseada em pesquisa translacional (HUNGER *et al.*, 2012). Por décadas, os grupos de ensaios clínicos que estudam LLA na infância têm utilizado sistemas de classificação de risco para alocar os pacientes nos esquemas terapêuticos com base em seu risco estimado de falha no tratamento. Inicialmente, os sistemas de classificação de risco utilizavam apenas fatores clínicos, como idade e contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico. Posteriormente, a resposta à terapia foi adicionada. Atualmente, a classificação de risco continua utilizando fatores clínicos tais como idade e contagem de leucócitos ao diagnóstico, mas também incorporou características moleculares das células leucêmicas no momento do diagnóstico e de resposta ao tratamento. Uma das tecnologias atualmente usada é a de detecção de Doença Residual Mínima (DRM).

Sendo assim, atualmente, os fatores que afetam o prognóstico da LLA pediátrica são agrupados em características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico, características das células leucêmicas e velocidade de resposta ao tratamento inicial (NCI, 2016). A identificação desses fatores ao diagnóstico tornou-se essencial na concepção e análise dos ensaios terapêuticos modernos. Entre as características clínicas e laboratoriais estão idade, número de leucócitos, envolvimento extramedular, gênero, estado nutricional, raça

e etnia (PIZZO; POPLACK, 2015). Por exemplo, pacientes menores de 1 ano e idade igual ou maior do que 10 anos tem um prognóstico pior do que crianças no grupo entre 1 e menores de 10 anos de idade (MORICKE *et al.*, 2005). A leucometria acima de  $50.000/\text{mm}^3$  observada em aproximadamente 20% das LLAs é fator de mau prognóstico (SMITH *et al.*, 1996). O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) pelos blastos linfoides também é fator de prognóstico desfavorável (PUI; HOWARD, 2008).

Com relação as características das células leucêmicas, é importante avaliar a morfologia, a imunofenotipagem, as alterações citogenéticas e de biologia molecular ao diagnóstico. Pacientes com LLA-T, por exemplo, geralmente tem pior prognóstico em comparação com a LLA-B, devido a seu comportamento biológico diferente. Embora, essa diferença tem diminuído consideravelmente após uma melhor estratificação da LLA-T baseada em DRM (PIETERS *et al.*, 2016). Algumas alterações citogenéticas também são consideradas de pior prognóstico como presença do gene de fusão BCR-ABL, rearranjo MLL e hipodiploidia  $< 45$  cromossomos (PUI *et al.*, 2011).

Sobre a resposta inicial ao tratamento, de um modo geral, avalia-se a resposta inicial ao corticoide em sangue periférico, a quantificação das células leucêmicas pela morfologia e DRM no dia 15 da indução e no final da indução da remissão (NCI, 2016). Em síntese, o desaparecimento das células leucêmicas do sangue periférico no 8º dia de tratamento e da medula óssea no 15º e no 35º dias de tratamento mensurado por técnicas de citologia, de citometria de fluxo (CF) e de reação em cadeia de polimerase (PCR) é um importante fator para avaliar o risco de recaída da doença (CAMPANA, 2010).

Além disso, até certo ponto, a intensidade da terapia também se tornou um importante fator prognóstico. À medida em que a terapia moderna para LLA se tornou cada vez mais intensa, muitas características clínicas e laboratoriais que antes eram características prognósticas relevantes perderam a importância. Ademais é importante

reconhecer que os grupos cooperativos relatam fatores prognósticos um pouco diferentes sobre os regimes de tratamento contemporâneos, uma vez que as especificidades de cada regime de tratamento afetam os resultados (PIZZO; POPLACK, 2015).

Dessa forma, o reconhecimento de que a LLA é uma doença muito heterogênea e de que as crianças podem ser classificadas em vários grupos de risco tem influenciado profundamente a terapêutica. A alocação do tratamento baseado na integração complexa de características da doença e de fatores prognósticos baseados em resposta tem desempenhado um papel crítico, bem como, garantem a intensificação da terapia para pacientes com alto risco de recaída, enquanto poupa toxicidade para aqueles com uma alta probabilidade de cura (PIZZO; POPLACK, 2015).

A tendência futura é um tratamento cada vez mais personalizado. Isso dependerá de avanços no reconhecimento e direcionamento terapêutico de anormalidades moleculares das células leucêmicas, inovações no desenvolvimento de inibidores de vias de sinalização, avanços no desenvolvimento de imunoterapia e de farmacogenética (PUI *et al.*, 2012).

Na atualidade, existem numerosos estudos multi-institucionais para o tratamento das LLAs da infância. Entre eles, os estudos do Grupo *Berlim-Frankfurt-Münster* (BFM) e os estudos do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfoide Aguda na Infância (GBTLI). De um modo geral, os estudos clínicos têm obtido taxas de sobrevida livre de doença de 79 a 82% na LLA em crianças e adolescentes (MORICKE *et al.*, 2008). Sendo que alguns estudos mais recentes demonstram sobrevida próxima e até maior do que 90% para alguns subtipos específicos com terapia adaptada ao risco (PUI *et al.*, 2016).

No Brasil, a maioria das instituições utilizam esquemas de tratamento baseados nos protocolos dos grupos BFM ou GBTLI para terapia inicial das LLAs pediátricas.

Entretanto, é importante ressaltar que o Brasil não inclui pacientes no grupo de estudo do BFM. As instituições brasileiras que seguem o regime terapêutico proposto pelo grupo BFM, optam por seguir essa linha de tratamento, por ser um grupo reconhecido internacionalmente, com publicações atualizadas, resultados favoráveis e por terem protocolos de tratamento adaptados a países em desenvolvimento como o nosso.

O serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) utilizou o tratamento sugerido pelo protocolo GBTLI 2009 para tratar as crianças com diagnóstico recente de LLA até o início de 2017. Porém, seus dados não chegaram a ser incluídos no grupo cooperativo brasileiro. Enquanto que o tratamento dos casos de LLA infantil do Serviço de Hematologia Pediátrica do HCPA é baseado no regime terapêutico proposto pelo grupo BFM.

No presente estudo, analisamos a concordância entre as classificações dos grupos de riscos em pacientes classificados pelos diferentes protocolos utilizados para tratamento da LLA da infância em uma instituição de referência no sul do Brasil e avaliamos a influência da análise de DRM nas classificações de risco dos pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA B atendidos no HCPA que apresentaram avaliação de DRM no dia 15 e no final da fase de indução do tratamento quimioterápico.

Até o momento, não identificamos dados publicados no Brasil sobre a distribuição dos grupos de risco, com a avaliação de DRM, das LLAs na infância e adolescência em nossa população. Dados sobre a inclusão da DRM em protocolos nacionais e internacionais e como esta pode ter influenciado a classificação de risco em pacientes portadores de LLA no Brasil também ainda não foram descritos até a presente data. Por isso, é relevante a compreensão do impacto da variação dos fatores de estratificação de risco entre os protocolos de tratamento de leucemias linfoides agudas da infância utilizados em uma instituição de referência brasileira e sua repercussão no prognóstico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

#### 2.1.1 Aspectos históricos

A palavra “leucemia” origina-se da palavra grega *leukos* que significa branco, nome que foi dado pelo médico polonês Rudolf Ludwig Karl Virchow em 1847. Rudolf Virchow foi o primeiro cientista a publicar um trabalho sobre leucemia. Além disso, ele criou a “teoria celular”, pela qual todas as formas de lesão orgânica se originam de alterações moleculares ou estruturais das células (OERTEL, 1921). A partir da compreensão dessa teoria, os estudiosos começaram a entender que a leucemia era uma proliferação maligna dos glóbulos brancos no sangue (MUKHERJEE, 2010).

Pelo fim dos anos de 1900, já se tinha o conhecimento de que a doença poderia se apresentar de diversas formas e de que nas crianças, a leucemia mais comum era a LLA. O primeiro caso conhecido de leucemia infantil foi descrito em 1860 por um aluno de Virchow, Michael Anthon Biermer (LASZLO, 1995). Desde então, o entendimento sobre essa patologia na infância vem se aprimorando cada vez mais.

Inicialmente, a leucemia não foi dividida em origem mieloide e linfoide. Os avanços em técnicas de laboratório em histoquímica, citometria de fluxo e citogenética progrediram em paralelo com os avanços clínicos (COLE, 2015). Até a década de 1940 e 1950 todas as crianças com leucemia infelizmente morriam. O primeiro cientista a considerar a possibilidade de cura da doença foi Sidney Farber, um patologista pediátrico, que a partir de 1947 dedicou sua atenção a essa doença considerada na época desoladora, a leucemia infantil (MUKHERJEE, 2010). Ele foi o primeiro a descrever uma resposta

documentada ao tratamento para leucemia ao usar a aminopterina, um antagonista do folato e análogo do metotrexato, e verificar o controle do crescimento das células de leucemia em cultura. Após isso, a síntese de 6-mercaptopurina de Hitchens e Elion e a cortisona também foram utilizadas na leucemia infantil. No entanto, esses agentes individualmente só postergavam a progressão da doença (COLE, 2015).

Na década de 1960, Emil Freireich, um dos cientistas pioneiros envolvidos no tratamento do câncer, descreveu a importância da idade do paciente e da contagem inicial de células brancas como fatores prognósticos, que continuam sendo a base da estratificação de risco ao diagnóstico no tratamento da LLA até hoje. Ele com um grupo de clínicos do *National Cancer Institute* mostraram o sucesso de combinações de drogas para o tratamento do câncer, de modo análogo ao uso de múltiplos antibióticos para evitar a resistência ao tratamento para tuberculose (COLE, 2015). Após muitos desafios experimentais, descobriram que o uso de metotrexato, vincristina, 6-mercaptopurina (6-MP) e prednisona em conjunto induziria remissões a longo prazo em crianças com LLA.

Em 1970, já existiam vários grupos cooperativos ao redor do mundo utilizando ensaios clínicos randomizados para aprimorar a terapia contra LLA. No final da década de 1980, a sobrevida mediana era maior do que 10 anos e 85% das crianças sobreviviam a longo prazo (HUNGER *et al.*, 2012). A melhora progressiva nos desfechos proveniente da terapia direcionada ao risco e melhores cuidados de suporte, permitiram intensificar a terapia na década de 90. Nesta década, também houve o reconhecimento de efeitos colaterais em sobreviventes de leucemia infantil a partir do acompanhamento longitudinal dos pacientes e maiores estudos epidemiológicos de sobreviventes (MODY *et al.*, 2008).

Sobre a DRM em LLA, um dos objetos de estudo desse trabalho, os primeiros estudos sobre a detecção de DRM em LLA datam da década de 1980, usando microscopia com imunofluorescência (VAN DONGEN *et al.*, 2015). A partir de então, a técnica foi

se aprimorando de modo que a terapia personalizada dirigida conforme a estratificação de risco baseada na resposta ao tratamento precoce é rotina desde o início do século XXI com a utilização de DRM usando reação em cadeia de polimerase (PCR) ou citometria de fluxo (CF) (COLE, 2015).

Ao longo da primeira década dos anos 2000, a aplicação de diagnóstico de DRM em pacientes com LLA expandiu-se significativamente de grupos de estudo na Europa e nos Estados Unidos para aplicação mundial (BOROWITZ *et al.*, 2008). Atualmente, praticamente todos os pacientes pediátricos com LLA e uma grande parte dos casos de adultos estão sendo monitorados com técnicas de DRM, para avaliar a eficácia do tratamento e atribuir pacientes a grupos de risco baseados em DRM (VAN DONGEN *et al.*, 2015).

### **2.1.2 Epidemiologia**

A LLA é o câncer mais comum em crianças e representa aproximadamente um quarto de todos os diagnósticos de câncer entre crianças menores de 15 anos (HOWLADER *et al.*, 2015). Desde 1975, está sendo registrado um aumento gradual da incidência de LLA (SHAH; COLEMAN, 2007). Nos Estados Unidos, cerca de 4.900 crianças são diagnosticadas com LLA por ano, com uma incidência de 2 a 5 casos para cada 100.000 crianças (HOWLADER *et al.*, 2015).

As leucemias correspondem a 30% dos casos de câncer diagnosticados em crianças menores de 15 anos, sendo que a LLA representa aproximadamente 75% de todas as leucemias pediátricas (BELSON *et al.*, 2007). Esta porcentagem é muito menor em adultos, em quem os tipos mais comuns são a LMA e a leucemia linfocítica crônica (LLC) (ACS, 2011).

O pico de incidência da LLA na infância ocorre entre 2 e 5 anos de idade e com maior predomínio no sexo masculino (PIZZO; POPLACK, 2015). Porém, o subtipo LLA de células T precursoras predomina entre adolescentes (DE BONT *et al.*, 2004).

A incidência de LLA parece ser maior em crianças com etnia hispânica e é substancialmente maior em crianças brancas do que em crianças negras, com uma incidência três vezes maior de LLA em crianças brancas de 2 a 3 anos do que em crianças negras (HOWLADER *et al.*, 2013).

Melhorias dramáticas na sobrevida foram alcançadas em crianças e adolescentes com câncer (SMITH *et al.*, 2014). Entre 1975 e 2010, a mortalidade por câncer na infância diminuiu em mais de 50%. Para LLA, a taxa de sobrevida em 5 anos aumentou ao longo do mesmo período de 60% para aproximadamente 90% para crianças menores de 15 anos e de 28% para mais de 75% para adolescentes de 15 a 19 anos (HOWLADER *et al.*, 2015).

### **2.1.3 Etiologia**

A leucemia infantil e outros tipos de câncer parecem resultar de uma combinação de fatores de susceptibilidade genética e exposições ambientais. Os estudos propõem que a LLA surja a partir de uma combinação de susceptibilidade e mutações somáticas em genes críticos para o desenvolvimento de células linfóides (LIM *et al.*, 2014).

Uma sequência de eventos mutagênicos, que ocorrem em diferentes intervalos, poderia desencadear a doença. Essa hipótese se baseia em várias observações, incluindo a demonstração de anormalidades cariotípicas aleatórias e não aleatórias nas células leucêmicas da maioria das crianças com LLA, a associação entre várias anormalidades cromossômicas constitucionais e LLA da infância, a ocorrência de leucemia familiar, a

alta incidência de leucemia em gêmeos idênticos e a evidência epidemiológica molecular da importância de vários alelos em genes específicos (PIZZO; POPLACK, 2015).

A importância dos eventos genéticos *in utero* tem sido estudada por muitos anos com base em estudos de concordância em gêmeos com leucemia (GREAVES *et al.*, 2003). Estudos já demonstraram fusões gênicas de células leucêmicas ou imunoglobulina (Ig) e os rearranjos de genes de Ig clonal em gêmeos idênticos portadores da doença e em análises retrospectivas de sangue colhido de recém-nascidos, como em “teste do pezinho” e em sangue de cordão umbilical estocado que apresentaram uma incidência de fusões de genes encontrados em LLA 100 vezes maior que a incidência de LLA na população pediátrica (GREAVES, 2006). Obviamente, que a maioria dessas crianças não desenvolve leucemia clínica, mas essas informações demonstram que eventos iniciais importantes para a leucemogênese podem ocorrer no útero (PIZZO; POPLACK, 2015).

Apesar dos avanços no tratamento da leucemia infantil, os fatores causais ainda permanecem sombrios. Estudos epidemiológicos de leucemias agudas em crianças já examinaram possíveis fatores de risco, incluindo genéticos, infecciosos e ambientais, na tentativa de determinar a etiologia. Em geral, o benzeno e a radiação ionizante são duas exposições ambientais fortemente associadas ao desenvolvimento de LLA ou LMA infantil. A maioria dos fatores de risco ambientais tem sido associada de forma fraca e inconsistente a qualquer uma das formas de leucemia aguda da infância (BELSON *et al.*, 2007).

Na maioria dos casos, a leucemia é esporádica, mas certas doenças hereditárias estão associadas a um maior risco de desenvolver leucemia, como síndrome de Down, síndrome de Bloom, neurofibromatose tipo I, síndrome de Shwachman e ataxia-telangiectasia (SPECTOR *et al.*, 2006).

As infecções também têm sido implicadas na etiologia da LLA. Algumas observações tentam explicar a teoria de que um agente transmissível pode estar potencialmente envolvido no processo oncogênico da leucemia infantil. Em primeiro lugar, o pico de incidência da leucemia infantil e das infecções mais comuns da infância ocorre entre 2 e 5 anos de idade, faixa etária em que a criança ainda não possui sistema imunológico sofisticado (GREAVES, 2002). Alguns, supõem que uma resposta anormal às infecções virais comuns da infância possa ter um papel relevante na origem da LLA. (GREAVES, 2006). Em segundo lugar, uma etiologia viral foi relacionada a alguns cânceres de animais e de humanos, como o vírus Epstein-Barr para linfoma de Burkitt (GREAVES; ALEXANDER, 1993). Em terceiro lugar, alguns estudos apontaram uma aparente variação sazonal entre data do nascimento e início da leucemia infantil. Mas um grande estudo já demonstrou que não há nenhuma evidência de sazonalidade em qualquer mês de nascimento ou mês de diagnóstico em qualquer subgrupo de câncer infantil (HIGGINS et al., 2001). Dessa forma, nenhum mecanismo dependente de vírus para a gênese da LLA foi identificado até o momento.

#### **2.1.4 Apresentação clínica**

O quadro clínico da LLA é decorrente da infiltração leucêmica na medula óssea e em outros órgãos, como fígado, baço, rim, ossos, testículos e SNC. As manifestações clínicas são subjacentes a anemia, trombocitopenia e neutropenia que por sua vez, reflete a falha na hematopoiese normal. Os sinais e sintomas clínicos mais comuns são palidez, astenia, dor óssea, petéquias, púrpuras, sangramento e febre. Linfadenopatias e hepatoesplenomegalia são frequentes. Hepatoesplenomegalia ocorre em dois terços dos pacientes e geralmente são assintomáticos. Sintomas neurológicos decorrentes da invasão do sistema nervoso central são raros (PIZZO; POPLACK, 2015).

Metade dos pacientes apresentam leucometria com valores de leucócitos acima de  $10.000/\text{mm}^3$  e 20% apresentam leucócitos acima de  $50.000/\text{mm}^3$ . A contagem de leucócitos ao diagnóstico é um dos mais importantes fatores de prognóstico, sendo que pacientes com valores acima de  $50.000/\text{mm}^3$  apresentam uma evolução desfavorável (PUI *et al.*, 2011). Anemia (hemoglobina  $< 10\text{g/dl}$ ) ocorre em 80% dos casos e trombocitopenia (plaquetas  $< 100.000/\text{mm}^3$ ) também ocorre na maioria dos pacientes. Hemorragia grave é rara, mesmo quando a contagem de plaquetas é inferior a  $20.000/\text{mm}^3$ , a menos que febre e infecção estejam presentes, pois ambos podem afetar a sobrevivência e função plaquetária (GAYDOS *et al.*, 1962).

Embora raro, a LLA também pode se manifestar com pancitopenia e deve ser diferenciada da anemia aplásica. Esse tipo de apresentação pode representar um estado pré-leucêmico ou uma inibição de progenitores hematopoiéticos normais por células leucêmicas causando um período de aplasia, que é seguido por um diagnóstico definitivo de LLA (PIZZO; POPLACK, 2015).

Uma série de outros resultados anormais pode ser observada em exames laboratoriais de pacientes recém-diagnosticados com LLA. A maioria desses achados e o seu grau de anormalidade refletem a carga celular leucêmica, a extensão da doença extramedular ou a proliferação e destruição excessivas das células leucêmicas. Por exemplo, a hiperuricemia ocorre mais frequentemente em pacientes com grande volume de doença, refletem o aumento do anabolismo e o catabolismo das purinas (PIZZO; POPLACK, 2015).

Outra alteração laboratorial que pode ser encontrada é a elevação da enzima desidrogenase láctica (LDH) sérica, decorrente da lise celular leucêmica, da hematopoiese ineficaz e do envolvimento hepático. Além disso, alterações na coagulação podem ocorrer, mas geralmente não são uma característica típica da doença. Coagulação

intravascular disseminada, por exemplo, é encontrada com pouca frequência na apresentação inicial (PIZZO; POPLACK, 2015).

O envolvimento extramedular pode ser detectável clinicamente ou demonstrável apenas por exames e procedimentos de diagnóstico. A maioria dos pacientes tem alguma evidência de envolvimento extramedular ao diagnóstico, sendo os locais mais comuns o SNC, os testículos, o fígado, os rins, os gânglios linfáticos e o baço. Na prática clínica, os dois locais mais importantes de envolvimento extramedular são o SNC e os testículos. Entretanto, qualquer local do corpo pode estar envolvido na apresentação inicial ou na recaída (ANTONY *et al.*, 2004).

### **2.1.5 Diagnóstico**

A LLA compreende um grupo de neoplasias linfoides que morfológicamente e imunofenotipicamente se assemelham a células precursoras (linfoblastos) de linhagem B e linhagem T. Essas neoplasias geralmente se apresentam como um processo leucêmico, com envolvimento extensivo da medula óssea e de sangue periférico. Para a maioria dos protocolos de tratamento de LLA, um limiar de 25% de linfoblastos é usado para definição de leucemia linfóide aguda (SWERDLOW *et al.*, 2008).

O envolvimento medular da leucemia aguda visto por microscopia óptica é tradicionalmente definido em medula M1 (menos de 5% de blastos), M2 (5% a 25% de blastos) e M3 (maior do que 25% de blastos) (NCI, 2016).

Embora, as características morfológicas sejam muito importantes para o diagnóstico, atualmente, elas não são mais utilizadas de modo isolado, mas complementadas com estudos de imunofenotipagem e citogenética. Antes da imunofenotipagem, a classificação *French-American-British* (FAB) foi aceita como avaliação morfológica padrão (PIZZO; POPLACK, 2015). Ela foi a primeira

classificação proposta para as LLAs baseada principalmente na aparência microscópica das células leucêmicas em esfregaços corados com Wright-Giemsa (BENNETT *et al.*, 1976). Três grupos morfológicos de LLA eram descritos: L1 (linfoblastos são pequenos a intermediário, com citoplasma escasso, cromatina nuclear condensada e nucléolos indistintos ou ausentes), L2 (blastos podem ser maiores, com quantidades moderadas de citoplasma basofílico pálido, cromatina nuclear finamente dispersa e nucléolos proeminentes e L3 (blastos grandes, com citoplasma abundantemente basofílico e vacúolos frequentes, cromatina nuclear de proporção grosseira e nucléolos proeminentes de forma variável) (ONCIU, 2009). Entretanto, a classificação FAB, continha pouca informação prognóstica ou terapêutica que pudesse ajudar a orientar a escolha do tratamento (LITZOW; HEYMAN, 2016).

Na prática, a distinção morfológica mais importante é entre LLA e LMA, para orientar o manejo clínico. A coloração de Wright-Giemsa de rotina é geralmente adequada para essa tarefa. Os bastonetes de Auer, se presentes, fornecem evidências de linhagem mieloide. No entanto, nenhuma outra característica distingue inequivocamente entre LLA e LMA, e não há características morfológicas que diferenciem de forma confiável entre LLA de linhagem B e LLA de linhagem T (PIZZO; POPLACK, 2015).

Como os linfoblastos leucêmicos não apresentam características morfológicas e citoquímicas específicas, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é essencial para o diagnóstico definitivo de LLA e as análises genéticas e de biologia molecular contribuem com informações adicionais importantes para a avaliação prognóstica. A imunofenotipagem irá determinar a linhagem das células leucêmicas, o estágio de maturação e as alterações imunofenotípicas que irão permitir a investigação de DRM após o início do tratamento (DUARTE *et al.*, 2013).

Para a imunofenotipagem, é necessário um painel de anticorpos para estabelecer o diagnóstico e distinguir entre as diferentes subclasses imunológicas de células leucêmicas. Em geral, o painel inclui anticorpos de pelo menos um marcador muito sensível para cada linhagem hematopoiética e linfóide (CD19 para células de linhagem B, CD7 para células de linhagem T e CD13 ou CD33 para células mielóides) e anticorpos para um marcador relativamente específico (CD79a citoplasmático e CD22 para células de linhagem B, CD3 citoplasmático para células de linhagem T e CD20 e imunoglobulina de superfície para células B maduras) (LITZOW; HEYMAN, 2016).

Para melhorar a compreensão da biologia e da patogênese molecular das leucemias, a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) foi revisada em 2008 (SWERDLOW *et al.*, 2008). Além de descartar os termos da classificação FAB, a classificação da OMS dividiu essas doenças linfóides heterogêneas em duas categorias principais: neoplasias linfóides de células precursoras e neoplasias linfóides de células maduras. As doenças linfóides de células precursoras incluem leucemia / linfoma linfoblástico B e leucemia / linfoma linfoblástico T (LITZOW; HEYMAN, 2016).

Na LLA B, as células leucêmicas expressam antígenos de elevada especificidade para a linhagem B, como CD19, o CD22 intracitoplasmático e o CD10. Geralmente, também expressam o CD79a intracitoplasmático, CD24, HLA-DR, TdT e CD34. A expressão de CD79a intracitoplasmático é menos específica, pois também pode ser observada numa proporção significativa dos casos de LLA T. O antígeno pan-leucocitário CD45 pode apresentar expressão de intensidade bastante variável, mas geralmente é expresso com intensidade diminuída, sendo totalmente negativo em aproximadamente 20% dos casos (DUARTE *et al.*, 2013).

A expressão de antígenos mielóides, como o CD13, CD33 e CD15, sem coexpressão de mieloperoxidase intracitoplasmática, pode ser observada em 20% dos

casos. O padrão de expressão de antígenos mieloides está correlacionado com certas características genéticas dos blastos. CD15 e CD65 são frequentemente expressos em LLA associada a gene MLL rearranjado e CD13 e CD33 são frequentemente expressos em pacientes com a fusão *ETV6-RUNX1* (também conhecida como *TEL-AML1*), bem como em LLA com cromossomo Filadélfia positivo (Ph+), mas não são marcadores específicos dessas alterações moleculares (LITZOW; HEYMAN, 2016). O CD58 é um antígeno que não é expresso pelos precursores B normais, mas pode ser observado em mais de 90% dos linfoblastos nos casos de LLA B. A expressão anormal de antígenos mieloides, do CD58 e a perda do antígeno CD45 são achados imunofenotípicos exclusivamente observados nas células leucêmicas, possui significância prognóstica e o mais importante, são úteis no monitoramento imunológico de pacientes com doença residual mínima após o início do tratamento (DUARTE *et al.*, 2013).

Com relação a leucemia de origem nos linfócitos T, LLA T, ela é definida por expressar em seus blastos leucêmicos antígenos associados a células T (CD3 citoplasmático, CD7, CD5 ou CD2), sendo o CD3 intracitoplasmático o primeiro marcador definitivo de comprometimento com a linhagem T. Os progenitores linfoides comuns expressam TdT, CD34 e HLA-DR (DUARTE *et al.*, 2013).

Desde a revisão da classificação da OMS de 2008, houve numerosos avanços na identificação de biomarcadores associados a algumas neoplasias mieloides e leucemias agudas, em grande parte derivadas da expressão, análise e sequenciamento gênico que podem melhorar significativamente os critérios de diagnóstico, bem como a relevância prognóstica. A edição de 2016 representa uma revisão da classificação anterior buscando incorporar novos dados clínicos, prognósticos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos que emergiram desde a última edição (ARBER *et al.*, 2016).

A revisão de 2016 da classificação da OMS de tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfoides lista as seguintes entidades para leucemias linfoides agudas:

***Leucemia / linfoma linfoblástico B***

- Leucemia / linfoma linfoblástico B, não especificado de outra forma (NOS).
- Leucemia / linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes.
- Leucemia / linfoma linfoblástico B com t(9; 22) (q34,1; q11,2); *BCR-ABL1*.
- Leucemia / linfoma linfoblástico B com t(v; 11q23.3); *KMT2A* rearranjado.
- Leucemia / linfoma linfoblástico B com t(12; 21) (p13.2; q22.1); *ETV6-RUNX1*.
- Leucemia / linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia.
- Leucemia / linfoma linfoblástico B com hipodiploidia.
- Leucemia / linfoma linfoblástico B com t(5; 14) (q31,1; q32,3); *IL3-IGH*.
- Leucemia / linfoma linfoblástico B com t(1; 19) (q23; p13,3); *TCF3-PBX1*.
- Entidade provisória: leucemia / linfoma linfoblástico B, tipo *BCR-ABL1*.
- Entidade provisória: leucemia / linfoma linfoblástico B com iAMP21.

***Leucemia / linfoma T-linfoblástico***

- Entidade provisória: *Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia*.
- Entidade provisória: *Natural killer(NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma*.

Essa nova classificação subdivide ainda mais os casos de LLA B por anormalidades moleculares e citogenéticas recorrentes, para tentar fornecer informações prognósticas e terapêuticas e facilitar a implementação de terapias específicas (LITZOW; HEYMAN, 2016).

### 2.1.6 Fatores prognósticos

As crianças portadoras de LLA tem sua doença classificada e tratada de acordo com os grupos de riscos para recaída, que são em geral denominados baixo risco, risco intermediário e alto risco. A classificação depende das características clínicas e biológicas ao diagnóstico e resposta às fases iniciais do tratamento (PUI *et al.*, 2011).

Entre as variáveis de prognóstico estão idade, leucometria, sexo, raça e etnia, estado nutricional, imunofenotipagem, citogenética, genética molecular, doença extramedular e velocidade de resposta ao tratamento (PIZZO; POPLACK, 2015).

#### 2.1.6.1 Fatores clínicos e laboratoriais

Com relação a idade, pacientes menores de 1 ano e com idade maior ou igual a 10 anos tem um prognóstico pior do que crianças no grupo entre 1 e menores do que 10 anos de idade. Adolescentes geralmente apresentam leucometria ao diagnóstico acima de  $50.000/\text{mm}^3$ , leucemia derivada de células T ou maior frequência da fusão BCR/ABL, que são características de mau prognóstico (DE BONT *et al.*, 2004). Entretanto, o resultado para as crianças mais velhas, especialmente os adolescentes, melhorou significativamente ao longo do tempo. As taxas de sobrevida em cinco anos para adolescentes de 15 a 19 anos passaram de 36% no período de 1975 a 1984 para 72% entre 2003 a 2009 (HOWLADER *et al.*, 2013).

A LLA que incide em lactentes menores de 12 meses também determina um prognóstico desfavorável. A sobrevida livre de eventos (SLE) dos lactentes está entre 28 e 45% (PIETERS, 2009). Estas taxas variam conforme a faixa etária, sendo muito pior nos menores de 3 meses, intermediário entre 3 e 6 meses e pouco melhor entre 6 e 12 meses de idade (PIETERS *et al.*, 2007). Nesses casos, os linfoblastos geralmente são

mais resistentes a quimioterapia, apresentam maior envolvimento do SNC, leucometria elevada, alta frequência de anormalidades no gene MLL localizado no cromossomo 11q23 que está associado a um prognóstico desfavorável e geralmente são de imunofenótipo B muito imaturo (pró B) (BIONDI *et al.*, 2000).

A leucometria acima de  $50.000/\text{mm}^3$  observada em aproximadamente 20% das LLAs, é fator de mau prognóstico (SMITH *et al.*, 1996). Leucometrias elevadas se associam a alterações genéticas desfavoráveis, entre elas as translocações  $t(4;11)(q21;q23)$  e  $t(9;22)(q34;q11)$  (PUI *et al.*, 2011). Além disso, têm um risco aumentado de falha no tratamento em comparação com pacientes com baixa contagem de leucócitos ao diagnóstico (HASTINGS *et al.*, 2015).

O envolvimento do SNC pelos blastos linfoides também é fator de prognóstico desfavorável e está presente em menos de 5% das crianças com LLA B e em 10% a 15% das crianças com LLA T (LANINGHAM *et al.*, 2007). Ele é definido conforme a presença ou ausência de blastos no líquido e o número de células da seguinte maneira:

- SNC 1: ausência de blastos e menos de cinco células/ $\mu\text{L}$ ;
- SNC 2: presença de blastos e menos de cinco células/ $\mu\text{L}$ ;
- SNC 3: presença de blastos e cinco ou mais células/ $\mu\text{L}$ .

A classificação SNC 3 tem maior risco de falha terapêutica e a classificação SNC 2 tem maior risco de recidiva em SNC (PUI; HOWARD, 2008).

Já o envolvimento testicular ao diagnóstico ocorre em aproximadamente 2% dos meninos mais comumente na LLA de células T. Nos primeiros estudos clínicos de LLA, o envolvimento testicular era considerado um fator prognóstico adverso. Entretanto, atualmente, não parece que o envolvimento testicular ao diagnóstico tenha significância prognóstica (SIRVENT *et al.*, 2007). A maioria dos grandes grupos de ensaios clínicos

em LLA nos Estados Unidos e na Europa não consideram a doença testicular ao diagnóstico como uma característica de alto risco (NCI, 2016).

Crianças com LLA e síndrome de Down (trissomia do 21) historicamente apresentam resultados pouco inferiores aos observados em crianças que não tem síndrome de Down. Em alguns estudos, a menor sobrevida de crianças com síndrome de Down parece estar relacionada a maior mortalidade relacionada ao tratamento, bem como taxas mais altas de falha de indução e de recaída em pacientes com síndrome de Down (BASSAL *et al.*, 2005).

Com relação ao gênero, alguns estudos mostram que o prognóstico entre as meninas é discretamente melhor do que entre os meninos (CORNACCHIONI *et al.*, 2004).

A respeito da raça e etnia, esses fatores são melhores estudados nos Estados Unidos onde, ao longo das últimas décadas, encontraram taxas de sobrevida pouco inferiores em crianças negras e hispânicas com LLA do que em crianças brancas com LLA (BHATIA, 2004).

Sobre o estado nutricional, a desnutrição ao diagnóstico geralmente é mais prevalente nos países em desenvolvimento, onde os estudos já descreveram resposta e sobrevida inferior, maior toxicidade relacionada ao tratamento, aumento dos atrasos e modificações do tratamento e diminuição da qualidade de vida. De um modo geral, deve-se considerar que os fatores prognósticos significativos nos países em desenvolvimento geralmente diferem dos relatados nos países desenvolvidos devido a muitas diferenças nas características da doença, comorbidades, adequação e acesso aos cuidados de suporte (MAGRATH *et al.*, 2005). A obesidade também tem sido associada a sobrevida menor e aumento do risco de recaída principalmente em pacientes maiores do que 10 anos de idade (BUTTURINI *et al.*, 2007).

### 2.1.6.2 Características imunofenóticas

Apresentam ainda implicância prognóstica as diferentes características das células leucêmicas de acordo com sua morfologia, imunofenotipagem e citogenética. Os pacientes com LLA B derivada e idade entre 1 e 5 anos apresentam sobrevida livre de eventos ao redor de 80%. Para os pacientes com LLA T derivada, o prognóstico não tem relação com a idade e a sobrevida livre de eventos é de aproximadamente 58% entre 1 e 5 anos de idade (PUI *et al.*, 2004).

A maioria dos casos de LLA mimetiza o perfil imunofenotípico de uma das fases de diferenciação das células precursoras. Esse perfil pode ser utilizado para determinar os vários estágios de diferenciação da LLA B através da imunofenotipagem em LLA pró-B, LLA B comum, LLA pré-B e LLA B transicional (CAMPANA *et al.*, 2006). Na LLA B comum, subtipo mais frequente, as células B anômalas expressam CD10 positivo e nenhuma imunoglobulina de superfície ou citoplasmática. Este subtipo geralmente apresenta melhor prognóstico e é associado a t(12;21)(p13;q22). A LLA Pró-B caracteriza-se pela ausência de expressão do antígeno CD10 e nenhuma imunoglobulina de superfície ou citoplasmática. Este subtipo é pouco frequente, é geralmente identificado em neonatos e crianças menores de um ano de idade e possui prognóstico desfavorável. Além disso, frequentemente se correlaciona com hiperleucocitose, envolvimento do SNC e rearranjos gênicos *MLL* (DUARTE *et al.*, 2013).

A LLA Pré-B distingue-se dos outros estágios de diferenciação pela presença de imunoglobulina de cadeia pesada subtipo IgM citoplasmática. Aproximadamente 25% desses casos apresentam a translocação t(1;19)(q21;p13) com *TCF3-PBX1* (também conhecido como *E2A-PBX1*). Os pacientes com este fenótipo geralmente respondem bem à terapia utilizada para LLA de células B (UCKUN *et al.*, 1998). Raríssimos casos de LLA pré-B não coexpressam o antígeno CD10 e essa combinação CD19/cIgM+/CD10-

/TdT é altamente preditiva de rearranjos no gene MLL, uma alteração genética de prognóstico desfavorável e encontrada em mais de 80% dos casos com esse perfil imunofenotípico (DUARTE *et al.*, 2013).

Já a LLA transicional é o subtipo mais raro de LLA B. Corresponde a aproximadamente 3% dos pacientes e suas células estão em fase final de diferenciação, entre a etapa pré-B e o linfócito B maduro, visto que expressam imunoglobulina de cadeia pesada IgM de superfície sem a expressão de imunoglobulinas de cadeia leve. Esse subtipo de LLA geralmente possui marcadores de imaturidade, como CD34 e TdT, não exibem morfologia típica do linfoma de Burkitt (L3), com o qual poderia ser confundido imunofenotipicamente, e não possui envolvimento de genes *MYC*. Pacientes com este fenótipo geralmente respondem bem à terapia utilizada para LLA B (KOEHLER *et al.*, 1993).

O padrão de expressão antigênica também pode ser usado para subclassificar as LLAs T de acordo com os estágios de maturação dos timócitos em LLA pró-T, LLA pré-T, LLA T cortical e LLA T medular. As células leucêmicas da LLA pró-T expressam CD3 intracitoplasmático e CD7. Na classificação LLA Pré-T, o CD2 passa a ser expresso acompanhado ou não pelo CD5, ou seja, é caracterizada por cCD3/CD7/CD2 e/ou CD5+. A LLA T cortical é caracterizada pela expressão de CD1a+ e coexpressão de CD4 e CD8. Enquanto que a principal característica da LLA T medular é a expressão de CD3 de superfície e a coexpressão de CD4 ou de CD8, mas não de ambos (FARIAS; CASTRO, 2004). Na maioria dos estudos clínicos, os pacientes com LLA T são classificados em dois grupos apenas: LLA T precoce ou inicial (pró-T e pré-T) e LLA T tardia ou madura (cortical e medular) (DUARTE *et al.*, 2013).

Entretanto, recentemente tem sido descrito um subtipo de LLA de células T com imunofenótipo muito mais primitivo que as subclassificações já descritas, a nova entidade

patobiológica *early T-cell ALL*. Este subtipo é extremamente agressivo e está associado a um risco muito elevado de falha de indução da remissão ou recaída em pacientes tratados com protocolos contemporâneos de quimioterapia intensiva para LLA. O seu reconhecimento precoce é essencial, para o desenvolvimento de uma estratégia de manejo clínico mais efetiva, provavelmente com regimes mais agressivos de tratamento (COUSTAN-SMITH *et al.*, 2009).

De um modo geral, a LLA T geralmente está associada a algumas características clínicas que incluem sexo masculino, idade avançada, leucocitose e massa mediastinal (SCHRAPPE *et al.*, 2000). Porém, há poucos fatores prognósticos comumente aceitos para pacientes com LLA T e alguns dados são conflitantes (PULLEN *et al.*, 1999). A presença ou ausência de massa mediastinal, por exemplo, ao diagnóstico não tem significância prognóstica. Além disso, se presente, a taxa de regressão da massa não tem demonstrado relevância prognóstica (ATTARBASCHI *et al.*, 2002).

#### 2.1.6.3 Citogenética e genética molecular

A respeito da citogenética e genética molecular, mais de 200 alterações gênicas já foram descritas nas leucemias, incluindo mutações, deleções e inversões. Várias anormalidades cromossômicas recorrentes têm relevância prognóstica, especialmente na LLA B. Algumas alterações cromossômicas estão associadas com resultados mais favoráveis, como alta hiperdiploidia (51-65 cromossomos) e a fusão *ETV6-RUNX1*. Outras são associadas a um prognóstico desfavorável, incluindo o cromossomo de Filadélfia [t(9;22)(q34;q11.2)], rearranjos do gene *MLL (KMT2A)*, hipodiploidia e amplificação intracromossômica do gene *AML1 (iAMP21)* (MOORMAN *et al.*, 2010).

A hiperdiploidia (> 50 cromossomos) é um fator favorável, pois as células da leucemia hiperdiploide estão associadas a uma maior sensibilidade a quimioterapia e maior susceptibilidade de sofrer apoptose espontânea. A hiperdiploidia pode ser avaliada pelo cariótipo ou medindo o conteúdo de DNA das células (índice de DNA), que representa uma relação entre o conteúdo de DNA da célula leucêmica/conteúdo de DNA da célula normal (LOOK *et al.*, 1985). Alta hiperdiploidia é definida como 51 a 65 cromossomos por célula ou um índice de DNA superior a 1,16 e ocorre em 20% a 25% dos casos de LLA B, mas muito raramente em LLA T (PAULSSON; JOHANSSON, 2009).

As trissomias dos cromossomos 4, 10 ou 17 associadas a idade e leucometria favoráveis geralmente também tem bom prognóstico (CHAUVENET *et al.*, 2007).

A hipodiploidia (< 45 cromossomos) ocorre em menos de 1% das crianças com LLA e é um fator de mau prognóstico, pois estes pacientes apresentam alto risco de falha terapêutica, que se acentua conforme o menor número de cromossomos, com perspectiva de sobrevida em torno de 38,5 +/- 4,4% (LOOK *et al.*, 1985). Conforme o número cromossômico, a LLA hipodiploide pode ser estratificada em quase haploide (24 a 29 cromossomos), baixa hipodiploidia (33 a 39 cromossomos), alta hipodiploidia (40 a 43 cromossomos) e quase diploide (44 cromossomos) (NACHMAN *et al.*, 2007). Nas LLA com baixa hipodiploidia, as alterações genéticas envolvendo *TP53*, *RBI* e *IKZF2* são as mais comuns. As mutações *TP53* têm sido identificadas em 91% desses casos, com quase metade dessas mutações ocorrendo na linha germinativa (HOLMFELDT *et al.*, 2013). Na LLA quase haploide, as alterações na via de sinalização *RTK*, *RAS* e *IKZF3* são as mais frequentes (IRVING *et al.*, 2014).

Os genes mais envolvidos na LLA são *TEL*, *AML1*, *AF4* e *E2A* combinados a outros genes ou entre si. A translocação mais comum na LLA de linhagem B é a

t(12;21)(p13;q22), ocorre mais frequentemente em crianças entre 1 a 10 anos de idade e em casos de LLA B comum. A fusão gênica *ETV6-RUNX1* ou *TEL-AML1*, como era chamada antigamente, consequente a essa translocação está presente em cerca de 25% das LLA-B derivadas da infância e a presença dessa translocação é um fator de bom prognóstico, pois correlaciona-se com taxas de sobrevida livre de eventos de 86 a 90% (RUBNITZ *et al.*, 2008). No entanto, o impacto prognóstico desta alteração genética pode ser modificado por alguns fatores como a resposta precoce ao tratamento, estratificação de risco e regime de tratamento (ENSHAEI *et al.*, 2013).

A translocação t(1;19)(q23;p13) é a segunda mais comum na LLA, resulta na fusão gênica *E2A-PBX* e está presente em cerca de 25% das LLAs pré-B (PUI *et al.*, 1994). A SLE dos pacientes com esta translocação está ao redor de 90%, quando tratados com quimioterapia intensiva (CHAUVENET *et al.*, 2007).

A translocação t(9;22)(q34;q11) resulta no cromossomo Filadélfia ou Ph<sup>+</sup> e é encontrada em 3 a 5% das crianças com LLA. Essa translocação é decorrente da fusão do gene *BCR* no cromossoma 22 com o gene *ABL1* no cromossoma 9. As crianças portadoras de LLA positiva para o cromossomo Ph<sup>+</sup>, geralmente são mais velhas, tem leucometria elevada e era associado a um prognóstico sombrio (SCHULTZ *et al.*, 2009). Todavia, o tratamento da LLA Ph<sup>+</sup> foi revolucionado pelo desenvolvimento dos inibidores da tirosina quinase ativos contra a fusão *BCR-ABL1*. O uso dessa medicação aumentou a sobrevida para aproximadamente 80%, sendo que o transplante de células-tronco hematopoiéticas em primeira remissão já não é mais considerado para LLA Ph<sup>+</sup> (SCHULTZ *et al.*, 2014).

Há várias outras alterações genéticas relevantes na LLA, como as anormalidades que envolvem o gene *MLL* no cromossomo 11q23. Os rearranjos no gene *MLL* estão presentes em 80% dos lactentes menores de 1 ano de idade com diagnóstico de LLA.

Envolvem a fusão gênica *MLL-AF4 KMT2A* e *MLLT1/ENL* e são considerados de altíssimo risco para recaída (PIETERS, 2009).

Várias translocações recorrentes em LLA envolvem o *locus* da cadeia pesada de imunoglobulina (*IGH*). Estas alterações compreendem aproximadamente 4% da LLA da infância e envolvem genes parceiros que incluem *BCL2*, a família *CEBP*, *EPOR*, *ID4* e *CRLF2*. Em geral, o grupo de pacientes com translocações *IGH* tende a ser mais velhos e pode ter um prognóstico pior, embora este achado possa ser limitado a adultos (RUSSELL *et al.*, 2014).

Amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (*iAMP21*) foi incluída na revisão de 2016 da OMS. A *iAMP21* com múltiplas cópias do gene *RUNX1 (AML1)* em 21q22 ocorre em aproximadamente 2% dos casos de LLA B e está associada geralmente a idade avançada, quantidade de leucócitos inferior a 50.000/mm<sup>3</sup> ao diagnóstico, leve predomínio do sexo feminino e doença residual mínima alta no final da indução (HARRISON *et al.*, 2014).

As deleções de *IKZF1*, incluindo deleções de todo o gene e deleções de exons específicos, estão presentes em aproximadamente 15% dos casos de LLA B. Esses casos são mais comuns nos pacientes com critérios clínicos de alto risco (MULLIGHAN *et al.*, 2009). As mutações ou deleções *IKZF1* são frequentemente relatadas como associadas a outros fatores prognósticos desfavoráveis, como translocação *BCR-ABL1*, expressão de genes *BCR-ABL1 like*, mutações *JAK* e rearranjos *CRLF2* (DEN BOER *et al.*, 2009).

Existe ainda, a LLA do tipo Filadélfia (*Ph-like*) que é caracterizada por um perfil de expressão de genes semelhante ao da LLA positiva para *BCR-ABL1*, alterações dos genes do fator de transcrição linfoide (*IKZF1*) e um desfecho ruim (ROBERTS *et al.*, 2014). Esse tipo de LLA ocorre em 10% a 20% dos pacientes pediátricos, é associada a

idade mais avançada, a pior prognóstico e à deleção ou mutação de *IKZF1* (MULLIGHAN et al., 2009).

Na LLA T derivada, múltiplas translocações cromossômicas foram identificadas com rearranjos cromossômicos estruturais que fundem muitos genes de fatores de transcrição como *TALI*, *LMO1*, *LMO2*, *LYL1*, *TLX1 / HOX11* e *TLX3 / HOX11L2*. A t(1;14) gera ativação do *TALI*, está presente em cerca de 25% das LLAs-T na infância e está relacionada a um prognóstico desfavorável (VAN GROTEL et al., 2006). A expressão do *TLX1/HOX11* resultante de t(10;14)(q24.3; q11.2) envolvendo esse gene ocorre em 5% a 10% das LLAs T pediátricas e está associada a um prognóstico favorável e a expressão de *TALI*, *LYL1* ou *TLX3 (HOX11L2)* está associada a um pior prognóstico (SCHNEIDER et al., 2000).

#### 2.1.6.4 Resposta ao tratamento

Sobre a velocidade de resposta ao tratamento, o desaparecimento das células leucêmicas do sangue periférico no 8º dia de tratamento e da medula óssea no 15º e no 35º dias de tratamento é um importante fator para avaliar o risco de recaída da doença (CAMPANA, 2010). Esses 35 dias de tratamento iniciais, em alguns protocolos 33 dias, correspondem a primeira fase de tratamento da LLA na infância, a chamada fase de indução da remissão da doença.

Resposta precoce ao tratamento é um indicador muito importante de prognóstico e pode ser avaliada pela depuração dos blastos em sangue periférico após uma semana de corticoide. Pacientes considerados bons respondedores ao esteroide são aqueles que apresentam uma contagem de blastos  $< 1.000/\text{mm}^3$  em sangue periférico após 7 dias de corticoide e uma dose de metotrexato intratecal. Estes pacientes têm uma melhor sobrevida em comparação aqueles com uma pobre resposta ao corticoide, ou seja, com

uma contagem de blastos em sangue periférico  $\geq 1.000/\text{mm}^3$  no dia 8 da indução da remissão (MORICKE *et al.*, 2010). Uma pobre resposta ao corticoide é observada em menos de 10% dos pacientes e esse parâmetro é utilizado para estratificação de risco nos protocolos atuais, sendo os maus respondedores considerados de alto risco de recaída (SCHRAPPE *et al.*, 2000).

Além dessa análise de sangue periférico na primeira semana da terapia de indução da LLA, também é utilizado a análise de esfregaços de medula óssea durante e após a terapia de indução, para avaliação de resposta precoce (SCHRAPPE *et al.*, 2012). Porém, a avaliação morfológica da medula óssea por microscopia óptica é uma técnica de baixa sensibilidade. Tradicionalmente, um ponto de corte de 5% de blastos na medula óssea foi usado para determinar o estado de remissão morfológica (medula M1). Isso corresponde a um nível de 1 em 20 células normais. Porém, nos dias atuais, são recomendados métodos analíticos com melhor sensibilidade que permitem a detecção de células leucêmicas em proporções muito menores do que as obtidas por avaliação morfológica, denominada técnica de doença residual mínima (DRM) (CAMPANA, 2008).

Atualmente, a DRM é considerada o principal fator de prognóstico da LLA em crianças (BOROWITZ *et al.*, 2008). Por conta disso, ela está sendo utilizada para refinar a estratificação de risco dos protocolos de tratamento mais modernos e para redirecionar o tratamento. Uma resposta precoce à quimioterapia, com rápida redução das células neoplásicas, especialmente no final da terapia de indução é considerada um indicador importante de uma evolução mais favorável e um menor risco de recaída (STOW *et al.*, 2010).

As avaliações realizadas nos primeiros 3 meses de tratamento são consideradas as mais informativas para a estratificação do risco de recaída. A DRM negativa no final da fase de indução (dia 33 ou dia 35) é considerada o principal preditor de resultados

favoráveis e uma avaliação de DRM mais precoce, como após cerca de 2 semanas do início da quimioterapia de indução (dia 15), mostrou benefício adicional na estratificação de risco (BASSO *et al.*, 2009).

A obtenção de níveis de DRM em 10 a 12 semanas após o início do tratamento (consolidação da remissão) também mostrou importância prognóstica. Pacientes com níveis elevados de DRM neste momento têm SLE significativamente inferior (BOROWITZ *et al.*, 2015).

A técnica de detecção de DRM pode ser realizada por: CF de imunofenótipos aberrantes, pesquisa de rearranjos no DNA dos genes que codificam as imunoglobulinas (Ig) ou o receptor de linfócitos T (TCR) por PCR, e por pesquisa de transcritos de fusão (RNA) também por PCR que é o método de eleição, por exemplo, nos casos de LLA com Ph+, para detectar o transcrito *BCR/ABL* (VAN DONGEN *et al.*, 2015).

As técnicas por PCR são mais sensíveis e são capazes de detectar uma célula leucêmica em 100.000 células normais. Já o limite de sensibilidade da técnica por citometria de fluxo é de 0,01% ou  $10^{-4}$ , ou seja, detecta uma célula leucêmica em 10.000 células normais. As tecnologias apontam para uma sensibilidade de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$ , para definir grupos de risco com precisão. No entanto, discussões sobre como diminuir esse limite de detecção para menos de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  estão sendo realizadas e ignoram os limites de celularidade de amostras de medula óssea na tentativa de se atingir a sensibilidade de técnicas como a da PCR (VAN DONGEN *et al.*, 2015).

As principais vantagens do estudo de DRM por CF são a rapidez, custo, ampla disponibilidade do método e quantificação precisa de células anormais. As principais desvantagens são a necessidade de elevada expertise técnica, sensibilidade variável, devido a semelhanças entre células normais de regeneração e células malignas, e a possibilidade de mudanças no fenótipo após o início do tratamento, seja pela evolução

clonal das células leucêmicas, seja pelas drogas utilizadas (VAN DONGEN *et al.*, 2015). A citometria de fluxo tem ainda a vantagem de detectar células intactas, em contraste com a PCR, em que o material de ácido nucleico contaminante de células mortas pode complicar a interpretação (PIZZO; POPLACK, 2015).

Outras técnicas para detecção de DRM têm sido estudadas, como o uso de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento que ainda está em caráter de pesquisa (FAHAM *et al.*, 2012). Além disso, outros fatores prognósticos também têm sido estudados para LLA. Por exemplo, alguns dados recentes sugerem que, além da quantificação da resposta celular da leucemia à terapia, a medida da contagem absoluta de linfócitos do paciente durante a indução também pode ter impacto prognóstico. Uma menor quantidade de linfócitos durante a indução mostrou ter um impacto prognóstico adverso na sobrevida em vários estudos, em alguns estudos foram significantes de forma independentes e em outros associados a DRM (RABIN *et al.*, 2012).

### **2.1.7 Estratificação de risco**

Os sistemas iniciais de classificação de risco utilizavam apenas fatores clínicos como a idade e a contagem de glóbulos brancos. Nesse sentido, os critérios de risco do *National Cancer Institute* (NCI) tradicionalmente são considerados os critérios-padrão, em uma tentativa de uniformizar os vários grupos de pacientes para definir os riscos de recaída. Por esta classificação são considerados baixo risco os pacientes com idade entre 1 e 9 anos e com leucometria menor que  $50.000/\text{mm}^3$  ao diagnóstico. Os demais são classificados como de alto risco para recaída (PUI *et al.*, 2011). A velocidade de resposta às medidas terapêuticas foi subsequentemente adicionada a esses critérios de risco. Porém, os sistemas modernos de classificação de risco continuam a utilizar fatores

clínicos como a idade e a contagem de leucócitos, mas também incorporaram avaliação citogenética e genômica das células leucêmicas ao diagnóstico (SCHRAPPE et al., 2011).

A partir dos fatores prognósticos já explicados, incluindo o grupo de risco de NCI ou critérios clínicos estabelecidos pelo grupo de estudo, o imunofenótipo, as determinações de resposta precoce, citogenética e alterações genômicas, todos os protocolos de tratamento de LLA pediátrica modificam a intensidade da terapia de pós indução. Além disso, a detecção do cromossomo Filadélfia leva a mudanças imediatas na terapia de indução (SCHULTZ *et al.*, 2007).

Existem numerosos estudos multi-institucionais para o tratamento das LLAs da infância. O presente estudo é baseado na estratificação de risco para LLA B dos estudos do grupo BFM (*Berlim-Frankfurt-Munster*) e do GBTLI (Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias da Infância). As estratificações de risco para LLA B conforme esses protocolos estão descritas de forma sucinta na tabela 1.

**Tabela 1 - Classificação de risco conforme regimes de tratamento BFM e GBTLI**

<b>Grupos de risco</b>			
<b>Protocolos</b>	<b>BR</b>	<b>RI</b>	<b>AR</b>
<b>GBTLI 99</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Idade &gt; 1 ano e &lt; 9 anos;</li> <li>- Leucócitos &lt; 50.000/mm<sup>3</sup> ao diagnóstico e &lt; 5000 /mm<sup>3</sup> no SP do D8;</li> <li>- Ausência de blastos em SP no D14 e medula M<sub>1</sub>/M<sub>2</sub> no D14;</li> <li>- MO M<sub>1</sub> no D28;</li> <li>- Pacientes classificados como BR que durante o tratamento tenham requisitos para inclusão no grupo de AR trocam de grupo.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Idade &lt; 1 ano e ≥ 9 anos e/ou Leucometria &gt; 50.000/mm<sup>3</sup> ao diagnóstico;</li> <li>- Respondedores lentos ao tratamento (contagem de leucócitos ≥ 5.000/mm<sup>3</sup> no D8 da indução);</li> <li>- Presença de blastos no SP no D14;</li> <li>- MO M<sub>3</sub> no D14 e/ou M<sub>2</sub>/M<sub>3</sub> no D28 e/ou evidência de acometimento leucêmico extramedular.</li> </ul>

*Continua*

<b>GBTLI 2009</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Idade <math>\geq 1</math> ano e <math>&lt; 9</math> anos;</li> <li>- Leucócitos <math>&lt; 50.000/\text{mm}^3</math>;</li> <li>- SNC negativo</li> <li>- Sem citogenética de mau prognóstico (BCR/ABL, rearranjo MLL e hipodiploidia <math>&lt; 46</math> cromossomos).</li> </ul> <p><b>Baixo Risco Verdadeiro:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- SP no D8 <math>&lt; 1000\text{blastos}/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- MO no D15 = M1 com DRM-CF <math>&lt; 0,01\%</math> e D35 = M1 com DRM-PCR <math>&lt; 10^{-3}</math>.</li> </ul>	<p><b>Baixo Risco Intermediário</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- SP no D8 <math>&lt; 1.000\text{blastos}/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- MO no D15 = M1/M2 com DRM-CF (<math>\geq 0,01 &lt; 10\%</math>)</li> <li>- D35 = M1 com DRM-PCR <math>&lt; 10^{-3}</math>.</li> <li>- Nos casos em que não houver resultado disponível da CF-DRM (D15) ou do PCR-DRM (D35), será considerado o critério citomorfológico da MO. Para permanência neste subgrupo: MO M1/2 no D15 e M1 no D35. Nos casos de discordância de resultados entre DRM e morfologia, prevalecerá a DRM para as decisões terapêuticas.</li> </ul>	<p>Todos os demais.</p> <p><b>Respondedor Rápido:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- D8 <math>&lt; 1.000\text{blastos}/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- MO no D15 = M1/M2 com DRM-CF <math>&lt; 10\%</math>;</li> <li>- D35 = M1 com DRM-PCR <math>&lt; 10^{-3}</math>.</li> </ul> <p><b>Respondedor Lento:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- D8 <math>&gt; 1000\text{blastos}/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- MO no D15 = M2/M3 com DRM-CF <math>\geq 10\%</math>;</li> <li>- D35 = M2/M3 com DRM-PCR <math>\geq 10^{-3}</math>.</li> </ul>
<b>BFM 95</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sem critério para Alto Risco;</li> <li>- Contagem de leucócitos <math>&lt; 20.000/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- Idade ao diagnóstico entre 1 e 6 anos;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sem nenhum critério de Alto Risco</li> <li>- E contagem de leucócitos <math>\geq 20.000/\mu\text{L}</math></li> <li>- E/ou idade ao diagnóstico <math>&lt; 1</math> ano ou <math>\geq 6</math> anos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pobre resposta ao corticoide;</li> <li>- E/ou sem RC no D33 da indução;</li> <li>- E/ou evidência de t(9;22) ou BCR/ABL;</li> <li>- E/ou evidência de t(4;11) ou gene <i>MLL-AF4</i>.</li> </ul>
<b>IC-BFM 2002</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SP no dia 8 (D8) da indução <math>&lt; 1.000\text{blastos}/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- E idade ao diagnóstico maior ou igual a 1 ano e menor do que 6 anos;</li> <li>- Leucócitos ao diagnóstico <math>&lt; 20.000/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- E MO no dia 15 (D15) da indução M1 ou M2;</li> <li>- E MO no dia 33 (D33) da indução M1.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SP no D8 da indução <math>&lt; 1.000\text{blastos}/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- E idade ao diagnóstico <math>&lt; 1</math> ano ou <math>\geq 6</math> anos e/ou leucócitos ao diagnóstico <math>\geq 20.000/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- MO no D15 = M1 ou M2;</li> <li>- E MO no D33 = M1 ou critérios risco "Standard", mas MO no D15 = M3;</li> <li>- MO no D33 = M1.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pelo menos um dos seguintes critérios:</li> <li>- RI e MO no D15 = M3 (não risco <i>standard</i> e M3 no D15);</li> <li>- Blastos no SP no D8 <math>\geq 1.000\text{blastos}/\mu\text{L}</math>;</li> <li>- MO no D33 = M2 ou M3;</li> <li>- Presença da t(9;22) ou t(4;11)[<i>MLL-AF4</i>].</li> </ul>

Continuação

<b>IC-BFM 2009</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SP no D8: &lt;1.000 blastos/<math>\mu</math>L;</li> <li>- E idade <math>\geq</math> 1 ano e &lt; 6 anos;</li> <li>- E contagem inicial de leucócitos &lt; 20.000/<math>\mu</math>L;</li> <li>- E se houver disponibilidade: DRM-CF &lt; 0,1% ou MO M1/M2 no D15;</li> <li>- E M1 na MO do D33.</li> <li>- Todos os critérios devem ser preenchidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Todos os pacientes que não forem estratificados como BR ou AR.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RI e, se houver disponibilidade: DRM-CF &gt;10% ou M3 na MO do D15;</li> <li>- BR e, se houver disponibilidade: DRM-CF &gt; 10%;</li> <li>- SP no D8 <math>\geq</math> 1.000 blastos/<math>\mu</math>L;</li> <li>- M2 ou M3 na MO do D33;</li> <li>- Translocação t(9;22) [BCR/ABL] ou t(4;11) [MLL/AF4];</li> <li>- Hipodiploidia <math>\leq</math> 44.</li> <li>- Somente um destes critérios já classifica como AR.</li> </ul>
------------------------	---	--	--

BR = baixo risco; RI = risco intermediário; AR = alto risco; MO = medula óssea; SP = sangue periférico. M1 = < 5% blastos na MO; M2 = 5% a menos de 25% blastos na MO; M3 =  $\geq$  25% de blastos na MO; DRM = doença residual mínima; D8 = dia 8 da indução; D15 = dia 15 da indução.

BFM = *Berlim-Frankfurt-Munster*; IC = intercontinental; GBTLI = Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias da Infância.

Fonte: Adaptado de MORICKE *et al.*, 2008; SCHRAPPE *et al.*, 2002; SCHRAPPE *et al.*, 2009; BRANDALISE *et al.*, 2000; BRANDALISE *et al.*, 2009.

### 2.1.8 Aspectos gerais do tratamento

A abordagem através da estratificação de risco permite que crianças que apresentam uma doença com características de bom prognóstico recebam uma terapia menos intensa e sejam poupadas de tratamentos mais tóxicos e agressivos. Entretanto, aquelas que possuem uma doença com características de pior prognóstico a longo prazo recebem uma terapia mais intensa, para aumentar suas chances de cura (PIZZO; POPLACK, 2015).

Os regimes modernos de tratamento da LLA dividem a terapia em três a cinco principais elementos de tratamento: indução de remissão, terapia preventiva de doença em SNC, consolidação/intensificação e manutenção (PIZZO; POPLACK, 2015).

A primeira fase do tratamento é a indução da remissão. O objetivo dessa fase é induzir remissão completa (RC), restaurar a hematopoese normal e o estado clínico do

paciente. Para induzir RC, a quimioterapia deve reduzir o número total de células leucêmicas em mais de 99%. Esta fase normalmente é realizada durante um período de 4 semanas e inclui glicocorticoides (dexametasona ou prednisona), vincristina e asparaginase com ou sem antraciclina. Aproximadamente 98% dos pacientes portadores de LLA B derivada alcançam RC até o final desta fase, com taxas um pouco mais baixas em pacientes com LLA T ou contagem de leucócitos elevada ao diagnóstico (PUI *et al.*, 2010).

Uma vez atingida a RC, se segue o tratamento sistêmico em conjunto com a terapia dirigida ao SNC. Para efetivamente prevenir a recaída, a terapia de pós-indução deve suprimir o crescimento leucêmico e fornecer uma citorredução leucêmica contínua, sem permitir o surgimento de clones resistentes a fármacos. A intensidade da quimioterapia pós-indução varia dependendo do grupo de risco, mas todos recebem o que convencionalmente é chamado de consolidação e intensificação. A terapia de consolidação é o período de intensificar o tratamento e consolidar a remissão (HARRIS *et al.*, 1998).

Os regimes de consolidação frequentemente associam quimioterapia intratecal semanal e altas doses de quimioterapia sistêmica, com o objetivo de reduzir ao máximo a quantidade de células leucêmicas no SNC e em outros sítios, bem como consolidar a fase de indução de remissão na medula óssea. Vários regimes utilizam um ou múltiplos ciclos de terapia intensificada com drogas diferentes, para minimizar o desenvolvimento de resistência cruzada das medicações (PIZZO; POPLACK, 2015).

Após completar 6 a 12 meses de tratamento intensivo, inicia-se a fase de manutenção, com duração que oscila de 18 a 30 meses, com baixas doses de drogas para evitar a recidiva da leucemia. As drogas mais utilizadas durante a manutenção são o metotrexato e a 6-mercaptopurina (6-MP). Elas constituem o elemento principal durante

essa fase do tratamento na maioria dos protocolos atuais e prolongam substancialmente a remissão (PIZZO; POPLACK, 2015).

### **3 JUSTIFICATIVA**

A avaliação de risco visa o ajuste do tratamento de um determinado paciente ao potencial risco de recidiva ou resistência de sua doença. Até o momento, temos poucos dados publicados no Brasil sobre a distribuição dos grupos de risco de leucemias. Dados sobre a inclusão da DRM em protocolos nacionais e internacionais e como esta pode ter influenciado a classificação de risco em pacientes portadores de LLA no Brasil não foram também descritos até a presente data.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a concordância entre as classificações dos grupos de riscos em pacientes classificados conforme o protocolo GBTLI 2009 com relação aos protocolos do grupo BFM: BFM 95, IC-BFM 2002, IC-BFM 2009 e ao protocolo brasileiro anterior GBTLI 99.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o grau de equivalência na classificação de risco de pacientes que foram estratificados conforme o protocolo GBTLI 2009 quando comparado a outros protocolos que são ou já foram utilizados em instituições brasileiras como BFM 95, IC-BFM 2002, IC-BFM 2009 e GBTLI 99.

Avaliar o quanto a modificação dos protocolos implicou em diferença na estratificação de risco ao longo do tempo.

Avaliar a importância da análise de DRM na classificação de risco.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo epidemiológico do tipo transversal, descritivo e retrospectivo.

### 5.2 COLETA DE DADOS

As informações foram oriundas dos prontuários de registro das consultas médicas do HCPA. Foram analisados os seguintes dados no momento do diagnóstico e após início do tratamento independente do protocolo utilizado: idade, contagem de leucócitos, comprometimento do SNC pela leucemia, morfologia das células leucêmicas, imunofenotipagem, citogenética, biologia molecular, DRM e morfologia do D15 da indução, DRM e morfologia do final da indução (D33 / D35), estratificação de risco baseada nos critérios do NCI e conforme cada protocolo BFM 95, IC-BFM 2002, IC-BFM 2009, GBTLI 99 e GBTLI 2009, se houve recidiva ou óbito, situação atual e data da última notícia (APÊNDICE A).

Os dados foram consultados em banco de dados já existentes dos serviços de Oncologia Pediátrica e Hematologia Pediátrica tanto da assistência quanto das informações arquivadas no laboratório de Diagnóstico Personalizado onde encontram-se os registros de todos os pacientes que realizaram avaliação de DRM por citometria de fluxo no HCPA.

### 5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com idade entre 1 e 18 anos portadores de LLA B atendidos no HCPA a partir de janeiro de 2013 até abril de 2017.

#### 5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Ausência de dados para a estratificação de risco.

LLA de linhagem não B.

#### 5.5 ESTRUTURAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo amostral foi realizado pelo software WinPepi (v11.43) a partir de um kappa esperado de 0,8, intervalo máximo de 0,28 de amplitude para o kappa, nível de significância de 5% e prevalência de 47% (BASSO *et al.*, 2009) que determinou um tamanho de amostra de 74 pacientes.

O banco de dados foi realizado no software Excel versão 2016. A análise estatística foi realizada no software SPSS versão 20.0. Os dados foram expressos como frequências absolutas ou relativas, média, mediana ou percentis. As estimativas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e foram comparadas pelo teste Log Rank. A incidência cumulativa do risco de recidiva ou óbito foi estimada por Hazard Ratio. A duração da sobrevida global foi estimada pelo tempo desde o diagnóstico de LLA até a data do óbito e data do último contato. A duração da sobrevida livre de eventos foi estimada pelo tempo desde o diagnóstico de LLA até a data de recaída, refratariedade ao tratamento, data do óbito ou até data do último contato.

A concordância entre as classificações de risco de cada protocolo foi realizada através do coeficiente Kappa e os resultados foram interpretados conforme as diferentes faixas para os valores Kappa, segundo o grau de concordância sugerido por Landis e Koch e demonstrado na tabela 2 (LANDIS E KOCH, 1977). Para o cálculo do coeficiente Kappa, foram excluídas as classificações baseadas somente pelos critérios do NCI e as classificações baseadas pelos critérios do protocolo GBTLI 99.

O valor de p foi considerado significativo se  $p < 0,05$ .

**Tabela 2 - Interpretação dos valores Kappa.**

<b>Valor do Kappa</b>	<b>Interpretação da concordância</b>
0	Sem concordância
0 – 0,19	Discreta
0,20 – 0,39	Regular
0,40 – 0,59	Moderada
0,60 – 0,79	Substancial
0,80 – 0,99	Quase perfeita
1,00	Perfeita

Fonte: LANDIS E KOCH, 1977.

De um modo geral, valores maiores que 0,75 representam excelente concordância.

Valores abaixo de 0,40 representam baixa concordância e valores situados entre 0,40 e 0,75 representam concordância mediana.

## **6 ASPECTOS ÉTICOS**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CAAE: 55303916.5.0000.5327. As informações obtidas dos prontuários serão utilizadas de forma anônima, garantindo a privacidade dos pacientes durante a divulgação dos resultados. Os investigadores assinaram o termo de compromisso para utilização dos dados e assumiram o compromisso de cumprir os termos da Resolução nº 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde e demais resoluções complementares à mesma.

## 7 REFERÊNCIAS

ACS. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2011. Atlanta: **American Cancer Society** 2011.

ANTONY, R.; ROEBUCK, D.; HANN, I. M. Unusual presentations of acute lymphoid malignancy in children. **J R Soc Med**, v. 97, n. 3, p. 125-7, Mar 2004.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 19 2016.

ATTARBASCHI, A. et al. Mediastinal mass in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: significance and therapy response. **Med Pediatr Oncol**, v. 39, n. 6, p. 558-65, Dec 2002.

BASSAL, M. et al. Lymphoblast biology and outcome among children with Down syndrome and ALL treated on CCG-1952. **Pediatr Blood Cancer**, v. 44, n. 1, p. 21-8, Jan 2005.

BASSO, G. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 31, p. 5168-74, Nov 01 2009.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 1, p. 138-145, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1817663/> >. Acesso em 20 jan. 2017

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v. 33, n. 4, p. 451-8, Aug 1976.

BHATIA, S. Influence of race and socioeconomic status on outcome of children treated for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Pediatr**, v. 16, n. 1, p. 9-14, Feb 2004.

BIONDI, A. et al. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 24, 2000. Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/content/96/1/24.abstract> >. Acesso em: 27 nov. 2016.

BOROWITZ, M. J. 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**, v. 111, n. 12, p. 5477-85, Jun 15 2008.

BOROWITZ, M.J. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. **Blood**, v. 126, n. 8, p. 964-71, Aug 20 2015.

BRANDALISE, S. R.; PINHEIRO, V. R.; LEE, M. L. M. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI - LLA - 99. Campinas 2000.

BRANDALISE, S.R. et al. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente - GBTLI LLA - 2009. Campinas 2009.

BUTTURINI, A. M. et al. Obesity and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 15, p. 2063-9, May 20 2007.

CAMPANA, D. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. **Br J Haematol**, v. 143, n. 4, p. 481-9, Nov 2008.

CAMPANA, D. Progress of minimal residual disease studies in childhood acute leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**, v. 5, n. 3, p. 169-76, Jul 2010.

CAMPANA, D. et al. Classification and monitoring of childhood leukemia in developing countries. **ASCO Educational Book**: 553-556 p. 2006.

CHAUVENET, A. R. et al. Antimetabolite therapy for lesser-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood: a report from Children's Oncology Group Study P9201. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1105-11, Aug 15 2007.

COLE, C. H. Lessons from 50 years of curing childhood leukaemia. **J Paediatr Child Health**, v. 51, n. 1, p. 78-81, Jan 2015.

CONTER, V. et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. **Blood**, v. 115, n. 16, p. 3206-14, Apr 22 2010.

CORNACCHIONI, A. L. B. et al. Recidivas extramedulares em leucemia linfocítica aguda: impacto da quimioterapia e definição de um grupo particularmente favorável. São Paulo: **Pediatria**. 26: 27-33 p. 2004.

COUSTAN-SMITH, E. et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 2, p. 147-56, Feb 2009.

- DE BONT, J. M. et al. Significant difference in outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on pediatric vs adult protocols in the Netherlands. In: (Ed.). **Leukemia**. England, v.18, p.2032-5, 2004.
- DE CAMARGO, B. et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **Int J Cancer**. 126: 715-720 p. 2010.
- DEN BOER, M. L. et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 2, p. 125-34, Feb 2009.
- DUARTE, A. J. S. et al. Leucemias linfoblásticas agudas. In: ATHENEU (Ed.). *Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa*. São Paulo, cap. 10, p.107-119, 2013.
- ENSHAEL, A. et al. Long-term follow-up of ETV6-RUNX1 ALL reveals that NCI risk, rather than secondary genetic abnormalities, is the key risk factor. In: (Ed.). **Leukemia**. England, v.27, p.2256-9, 2013.
- FAHAM, M. et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 120, n. 26, p. 5173-80, Dec 20 2012.
- FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. D. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 91-98, 2004.
- GAYDOS, L. A.; FREIREICH, E. J.; MANTEL, N. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. **N Engl J Med**, v. 266, p. 905-9, May 03 1962.
- GREAVES, M. Childhood leukaemia. **Bmj**, v. 324, n. 7332, p. 283-7, Feb 02 2002.
- GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 3, p. 193-203, Mar 2006.
- GREAVES, M. F.; ALEXANDER, F. E. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? **Leukemia**, v. 7, n. 3, p. 349-60, Mar 1993.
- GREAVES, M. F. et al. Leukemia in twins: lessons in natural history. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2321-33, Oct 01 2003.

HARRIS, M. B. et al. Consolidation therapy with antimetabolite-based therapy in standard-risk acute lymphocytic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group Study. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 8, p. 2840-7, Aug 1998.

HARRISON, C. J. et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 1015-21, May 2014.

HASTINGS, C. et al. Increased post-induction intensification improves outcome in children and adolescents with a markedly elevated white blood cell count ( $\geq 200 \times 10^9 / l$ ) with T cell acute lymphoblastic leukaemia but not B cell disease: a report from the Children's Oncology Group. **Br J Haematol**, v. 168, n. 4, p. 533-46, Feb 2015.

HIGGINS, C. D. et al. Season of birth and diagnosis of children with leukaemia: an analysis of over 15 000 UK cases occurring from 1953-95. **Br J Cancer**, v. 84, n. 3, p. 406-12, Feb 02 2001.

HOLMFELDT, L. et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**, v. 45, n. 3, p. 242-52, Mar 2013.

HOWLADER, N. et al. Childhood cancer, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. Bethesda, Md: **National Cancer Institute** 2013.

HOWLADER, N. et al. Childhood cancer, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. Bethesda, Md: **National Cancer Institute** 2015.

HUNGER, S. P. et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 14, p. 1663-9, May 10 2012.

IRVING, J. et al. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. **Blood**, v. 124, n. 23, p. 3420-30, Nov 27 2014.

KOEHLER, M. et al. Transitional pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood is associated with favorable prognostic clinical features and an excellent outcome: a Pediatric Oncology Group study. **Leukemia**, v. 7, n. 12, p. 2064-8, Dec 1993.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-74, Mar 1977.

LANINGHAM, F. H. et al. Childhood central nervous system leukemia: historical perspectives, current therapy, and acute neurological sequelae. **Neuroradiology**, v. 49, n. 11, p. 873-88, Nov 2007.

LASZLO, J. **The Cure of Childhood Leukemia**: 15 p. 1995.

LIGHTFOOT, T. Aetiology of childhood leukemia. **Bioelectromagnetics**, v. Suppl 7, p. S5-s11, 2005.

LIM, J. Y. et al. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 120, n. 7, p. 955-62, Apr 01 2014.

LITZOW, M. R.; HEYMAN, M. Acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma. **American Society of Hematology Self-Assessment Program**: 531 - 546 p. 2016.

LOOK, A. T. et al. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 65, n. 5, p. 1079-86, May 1985.

MAGRATH, I. et al. Treatment of acute lymphoblastic leukaemia in countries with limited resources; lessons from use of a single protocol in India over a twenty year period [corrected]. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 11, p. 1570-83, Jul 2005.

MODY, R. et al. Twenty-five-year follow-up among survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5515-23, Jun 15 2008.

MOORMAN, A. V. et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 5, p. 429-38, May 2010.

MORICKE, A. et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. **Blood**, v. 111, p. 4477-4489, // 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-09-112920> >. Acesso em 24 nov. 2016.

MORICKE, A. et al. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. **Klin Padiatr**, v. 217, n. 6, p. 310-20, Nov-Dec 2005.

MORICKE, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. **Leukemia**, v. 24, n. 2, p. 265-84, Feb 2010.

MUKHERJEE, S. The Emperor of all Maladies - A Biography of Cancer. **New York: Simon & Schuster** 2010.

MULLIGHAN, C. G. et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 360, n. 5, p. 470-80, Jan 29 2009.

NACHMAN, J. B. et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1112-5, Aug 15 2007.

NCI. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. **NIH**. Disponível em <https://www.cancer.gov> 2016. Acesso em 14 nov. 2016.

OERTEL, H. The Centennial of Rudolf Virchow. **Canadian Medical Association Journal**. 11: 777-781 p. 1921.

OLIVEIRA, B. M.; DINIZ, M. S.; VIANA, M. B. Leucemias agudas na infância. **Revista Médica**, Minas Gerais. 14: 33 - 36 p. 2004.

ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 23, n. 4, p. 655-74, Aug 2009.

PAULSSON, K.; JOHANSSON, B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 48, n. 8, p. 637-60, Aug 2009.

PIETERS, R. Infant acute lymphoblastic leukemia: Lessons learned and future directions. **Curr Hematol Malig Rep**, v. 4, n. 3, p. 167-74, Jul 2009.

PIETERS, R. et al. Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 22, p. 2591-2601, 2016/08/01 2016. ISSN 0732-183X. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2015.64.6364>>. Acesso em 27 nov. 2016.

PIETERS, R. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. **Lancet**, v. 370, n. 9583, p. 240-50, Jul 21 2007.

PIZZO, A. P.; POPLACK, G. D. Principles and Practice of Pediatric Oncology. **Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers** 2015.

PUI, C. H. et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 551-65, Feb 10 2011.

PUI, C. H.; HOWARD, S. C. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. **Lancet Oncol**, v. 9, n. 3, p. 257-68, Mar 2008.

PUI, C. H. et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? **Blood**, v. 120, n. 6, p. 1165-74, Aug 09 2012.

PUI, C. H. et al. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. **Leukemia**, Sep 13 2016.

PUI, C.H. et al. Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 24, n. 2, p. 371-82, Feb 2010.

PUI, C.H. et al. Immunologic, cytogenetic, and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1;19) (q23; p13) or its derivative. **J Clin Oncol**, v. 12, n. 12, p. 2601-6, Dec 1994.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030-43, Mar 22 2008.

PUI, C. H. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2690-6, Nov 01 2004.

PULLEN, J. et al. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. **Leukemia**, v. 13, n. 11, p. 1696-707, Nov 1999.

RABIN, K. R. et al. Absolute lymphocyte counts refine minimal residual disease-based risk stratification in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, v. 59, n. 3, p. 468-74, Sep 2012.

ROBERTS, K. G. et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 371, n. 11, p. 1005-15, Sep 11 2014.

RUBNITZ, J. E. et al. Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 13, p. 2186-91, May 01 2008.

RUSSELL, L. J. et al. IGH@ translocations are prevalent in teenagers and young adults with acute lymphoblastic leukemia and are associated with a poor outcome. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 14, p. 1453-62, May 10 2014.

SCHNEIDER, N. R. et al. New recurring cytogenetic abnormalities and association of blast cell karyotypes with prognosis in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group report of 343 cases. **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2543-9, Oct 01 2000.

SCHRAPPE, M. et al. ALL IC-BFM 2002: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol. 2002.

SCHRAPPE, M. et al. ALL IC-BFM 2009: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol. 2009.

SCHRAPPE, M. et al. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 366, n. 15, p. 1371-81, Apr 12 2012.

SCHRAPPE, 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**, v. 95, n. 11, p. 3310-22, Jun 01 2000.

SCHRAPPE, M. et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2077-84, Aug 25 2011.

SCHULTZ, K. R. et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 31, p. 5175-81, Nov 01 2009.

SCHULTZ, K. R. et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. **Leukemia**, v. 28, n. 7, p. 1467-71, Jul 2014.

SCHULTZ, K. R. et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). **Blood**, v. 109, n. 3, p. 926-35, Feb 01 2007.

SHAH, A.; COLEMAN, M. P. Increasing incidence of childhood leukaemia: a controversy re-examined. **Br J Cancer**, v. 97, n. 7, p. 1009-12, Oct 08 2007.

SIRVENT, N. et al. Overt testicular disease (OTD) at diagnosis is not associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the EORTC CLG Study 58881. **Pediatr Blood Cancer**, v. 49, n. 3, p. 344-8, Sep 2007.

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

SMITH, M. A. et al. Declining childhood and adolescent cancer mortality. **Cancer**, v. 120, n. 16, p. 2497-506, Aug 15 2014.

SPECTOR, L. G. et al. Epidemiology and etiology. Childhood leukemias. **New York: Cambridge University Press**: 48-66 p. 2006.

STARÝ, J. et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 3, p. 174-84, Jan 20 2014.

STOW, P. et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4657-63, Jun 10 2010.

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

UCKUN, F. M. et al. Clinical significance of translocation t(1;19) in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary therapies: a report from the Children's Cancer Group. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 2, p. 527-35, Feb 1998.

VAN DONGEN, J. J. et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. **Blood**, v. 125, n. 26, p. 3996-4009, Jun 25 2015.

VAN GROTEL, M. et al. The outcome of molecular-cytogenetic subgroups in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of patients treated according to DCOG or COALL protocols. **Haematologica**, v. 91, n. 9, p. 1212-21, Sep 2006.

VROOMAN, L. M.; SILVERMAN, L. B. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. **Curr Opin Pediatr**, v. 21, n. 1, p. 1-8, Feb 2009.

## 8 ARTIGO ORIGINAL 1

### Concordância dos fatores de estratificação de risco entre os protocolos de tratamento para leucemia linfoblástica aguda de células B na infância

Klerize Anecely de Souza Silva<sup>1</sup>, Mariana Bohns Michalowski<sup>1</sup>, Liane Esteves Daudt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de pós-graduação em saúde da criança e do adolescente, Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondência:

Liane Esteves Daudt

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Serviço de Hematologia, 90035-935 Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: [ldaudt@hcpa.edu.br](mailto:ldaudt@hcpa.edu.br)

### RESUMO

**Introdução:** O tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (LLA) pediátrica é baseado na estratificação de risco. O objetivo desse estudo é analisar a concordância entre as classificações dos grupos de riscos pelos diferentes protocolos utilizados para tratamento da LLA da infância em uma instituição de referência no sul do Brasil.

**Métodos:** Estudo retrospectivo a partir da revisão de prontuários dos pacientes com idade entre 1 e 18 anos portadores de LLA B atendidos no HCPA a partir de janeiro de 2013 até abril de 2017. A concordância entre as classificações de risco foi realizada através do coeficiente Kappa.

**Resultados:** Foram analisados 75 pacientes. A concordância entre as estratificações de risco pelos protocolos GBTLI 2009 e BFM 95 ( $K= 0,22$ ;  $p= 0,003$ ), GBTLI 2009 e IC-BFM 2002 ( $K= 0,24$ ;  $p= 0,002$ ) foi baixa. A distribuição dos grupos de risco baseada na estratificação pelo GBTLI 2009 foi 13,3% BR, 32% RI e 54,7% AR e pelo IC-BFM 2002 foi 28% BR, 42,7% RI e 29,3% AR. A sobrevida global foi 68,6%.

**Conclusão:** Este estudo nos fornece inúmeros pontos para reflexão sobre o tratamento da leucemia em nosso país. Observamos uma maior porcentagem de pacientes classificados como alto risco em nossa realidade em relação à literatura internacional. Em nosso grupo de pacientes estudado, esta modificação não trouxe repercussão na sobrevida global que se mantém inferior a descrita na literatura internacional.

**Palavras chaves:** LLA pediátrica. Estratificação de risco. Doença residual mínima.

## INTRODUÇÃO

As leucemias correspondem a 30% dos casos de câncer diagnosticados em crianças menores de 15 anos, sendo 75% destas leucemias linfoides agudas (LLA).<sup>1</sup>

Assim como em outras neoplasias da infância, a sobrevida das crianças e adolescentes com LLA melhorou significativamente ao longo do tempo.<sup>2</sup> A taxa de sobrevida em 5 anos da LLA passou de 60% para aproximadamente 90% para crianças menores de 15 anos e de 28% para mais de 75% para adolescentes de 15 a 19 anos entre 1975 e 2010 nos Estados Unidos.<sup>3</sup>

Muito desta melhoria resulta da adequação do tratamento às características individuais e da doença. Por décadas, os grupos que estudam LLA na infância têm utilizado sistemas de classificação de risco para alocar os pacientes nos esquemas terapêuticos com base em seu risco estimado de falha no tratamento, de modo que as crianças com características clínicas e biológicas favoráveis recebam uma terapia menos tóxica, enquanto que uma terapia mais agressiva seja reservada aos pacientes com maior risco de recaída e com menor probabilidade de sobrevida a longo prazo.<sup>4</sup>

Essa estratificação é possível a partir da determinação de fatores prognósticos.<sup>5</sup> Inicialmente, os sistemas de classificação de risco utilizavam apenas fatores clínicos, como idade e contagem de glóbulos brancos ao diagnóstico. Atualmente, incorporaram as características moleculares das células leucêmicas ao diagnóstico e de resposta ao tratamento. Uma das tecnologias utilizada é a de detecção de Doença Residual Mínima (DRM).

Na atualidade, a DRM é considerada o principal fator de prognóstico da LLA em crianças.<sup>6</sup> Uma resposta precoce à quimioterapia, com rápida redução das células neoplásicas, especialmente no final da terapia de indução é considerada um indicador importante de uma evolução mais favorável e um menor risco de recaída.<sup>7</sup>

No Brasil, a maioria das instituições que tratam pacientes pediátricos com LLA se baseiam em protocolos do grupo *Berlim-Frankfurt-Münster* (BFM) ou em protocolos do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (GBTLI).

No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) foram aplicados dois protocolos diferentes no período de 2009 a 2017: tratamento sugerido pelo protocolo GBTLI 2009 e o regime terapêutico proposto pelo grupo BFM.

No presente estudo, descrevemos o perfil clínico e laboratorial, assim como o desfecho dos pacientes portadores de LLA B atendidos pelo HCPA e analisamos a concordância entre as classificações dos grupos de riscos em pacientes classificados pelos diferentes protocolos ou regimes de tratamento da LLA da infância em uma instituição de referência no sul do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População do estudo**

Estudo epidemiológico do tipo transversal, descritivo e retrospectivo, a partir da análise de prontuários de 75 pacientes com idade entre 1 e 18 anos portadores de LLA B atendidos no HCPA a partir de janeiro de 2013 até abril de 2017.

Foram analisados os seguintes dados no momento do diagnóstico e após início do tratamento: idade, contagem de leucócitos, envolvimento do SNC, morfologia das células leucêmicas, imunofenotipagem, citogenética, biologia molecular, DRM por citometria de fluxo (CF) e morfologia no D15 da indução, DRM por CF e morfologia do final da indução (D33/D35), estratificação de risco baseada nos critérios do NCI e nos critérios dos regimes/protocolos de tratamento BFM 95, IC-BFM 2002, IC-BFM 2009, GBTLI 99 e GBTLI 2009 (Tabela 1), se houve recidiva ou óbito, situação atual e data da última notícia.

Os critérios de exclusão foram ausência de dados para a classificação e LLA de linhagem não B.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA sob o número CAAE: 55303916.5.0000.5327.

### **Estruturação e Análise Estatística**

O cálculo amostral foi realizado pelo software WinPepi (v11.43) a partir de um kappa esperado de 0,8, intervalo máximo de 0,28 de amplitude para o kappa, nível de significância de 5% e prevalência de 47%<sup>8</sup> que determinou um tamanho de amostra de 74 pacientes.

O banco de dados foi realizado no software Excel versão 2016. A análise estatística foi realizada no software SPSS versão 20.0. Os dados foram expressos como frequências absolutas ou relativas, média, mediana ou percentis. As estimativas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e foram comparadas pelo teste Log Rank. A duração da sobrevida global foi estimada pelo tempo desde o diagnóstico de LLA até a data do óbito e data do último contato. A duração da sobrevida livre de eventos foi estimada pelo tempo desde o diagnóstico de LLA até a data de recaída, refratariedade ao tratamento, data do óbito ou até data do último contato.

A concordância entre as classificações de risco de cada protocolo foi realizada através do coeficiente Kappa e os resultados foram interpretados conforme as diferentes faixas para os valores Kappa, segundo o grau de concordância sugerido por Landis e Koch. Valores Kappa maiores do que 0,75 representam excelente concordância, valores abaixo de 0,40 representam baixa concordância e valores situados entre 0,40 e 0,75 representam concordância mediana.<sup>9</sup> Para o cálculo do coeficiente Kappa, foram excluídas as classificações baseadas somente pelos critérios do NCI e as classificações baseadas pelos critérios do protocolo GBTLI 99.

Todos os dados foram atualizados em outubro de 2017 e o valor de p foi considerado significativo se  $p < 0,05$ .

Tabela 1 - Classificação de risco conforme NCI e regimes de tratamento BFM e GBTLI

<b>Grupos de Risco</b>			
	<b>BR</b>	<b>RI</b>	<b>AR</b>
<b>NCI</b>	- Leucócitos $< 50.000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico e idade $> 1$ ano e $< 10$ anos		- Leucócitos $> 50.000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico e/ou idade $\geq 10$ anos
<b>GBTLI 99</b>	- Idade $> 1$ ano e $< 9$ anos; - Leucócitos $< 50.000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico e $< 5000/\text{mm}^3$ no SP do D8; - Ausência de blastos em SP no D14 e medula $M_1/M_2$ no D14; - MO $M_1$ no D28; - Pacientes classificados como BR que durante o tratamento tenham requisitos para inclusão no grupo de AR trocam de grupo.		- Idade $< 1$ ano e $\geq 9$ anos e/ou Leucometria $> 50.000/\text{mm}^3$ ao diagnóstico; - Respondedores lentos ao tratamento (contagem de leucócitos $\geq 5.000/\text{mm}^3$ no D7 da indução); - Presença de blastos no SP no D14; - MO $M_3$ no D14 e/ou $M_2/M_3$ no D28 e/ou evidência de acometimento leucêmico extramedular.
<b>GBTLI 2009</b>	- Idade $\geq 1$ ano e $< 9$ anos; - Leucócitos $< 50.000/\text{mm}^3$ ; - SNC negativo - Sem citogenética de mau prognóstico (BCR/ABL, rearranjo MLL e hipodiploidia $< 46$ cromossomos). <b>Baixo Risco Verdadeiro:</b> - SP no D8 $< 1000\text{blastos}/\mu\text{L}$ ; - MO no D15 = $M_1$ com DRM-CF $< 0,01\%$ e D35 = $M_1$ com DRM-PCR $< 10^{-3}$ .	SP no D8 $< 1.000\text{blastos}/\mu\text{L}$ ; - MO no D15 = $M_1/M_2$ com DRM-CF ( $\geq 0,01 < 10\%$ ) - D35 = $M_1$ com DRM-PCR $< 10^{-3}$ .	Todos os demais. <b>Respondedor Rápido:</b> - D8 $< 1.000\text{blastos}/\mu\text{L}$ ; - MO no D15 = $M_1/M_2$ com DRM-CF $< 10\%$ ; D35 = $M_1$ com DRM-PCR $< 10^{-3}$ . <b>Respondedor Lento:</b> - D8 $> 1000\text{blastos}/\mu\text{L}$ ; - MO no D15 = $M_2/M_3$ com DRM-CF $\geq 10\%$ ; - D35 = $M_2/M_3$ com DRM-PCR $\geq 10^{-3}$ .

*Continua*

<b>BFM 95</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sem critério para Alto Risco;</li> <li>- Contagem de leucócitos &lt; 20.000/<math>\mu</math>L;</li> <li>- Idade ao diagnóstico entre 1 e 6 anos;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sem nenhum critério de Alto Risco</li> <li>- E contagem de leucócitos <math>\geq</math> 20.000/<math>\mu</math>L</li> <li>- E/ou idade ao diagnóstico &lt; 1 ano ou <math>\geq</math> 6 anos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pobre resposta ao corticoide;</li> <li>- E/ou sem RC no D33 da indução;</li> <li>- E/ou evidência de t(9;22) ou BCR/ABL;</li> <li>- E/ou evidência de t(4;11) ou gene <i>MLL-AF4</i>.</li> </ul>
<b>IC-BFM 2002</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SP no dia 8 (D8) da indução &lt; 1.000 blastos/<math>\mu</math>L;</li> <li>- E idade ao diagnóstico maior ou igual a 1 ano e menor do que 6 anos;</li> <li>- Leucócitos ao diagnóstico &lt; 20.000/<math>\mu</math>L;</li> <li>- E MO no dia 15 (D15) da indução M1 ou M2;</li> <li>- E MO no dia 33 (D33) da indução M1.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SP no D8 da indução &lt; 1.000 blastos/<math>\mu</math>L;</li> <li>- E idade ao diagnóstico &lt; 1 ano ou <math>\geq</math> 6 anos e/ou leucócitos ao diagnóstico <math>\geq</math> 20.000/<math>\mu</math>L;</li> <li>- MO no D15 = M1 ou M2;</li> <li>- E MO no D33= M1 ou critérios risco “<i>Standard</i>”, mas MO no D15 = M3;</li> <li>- MO no D33 = M1.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pelo menos um dos seguintes critérios:</li> <li>- RI e MO no D15= M3 (não risco <i>standard</i> e M3 no D15);</li> <li>- Blastos no SP no D8 <math>\geq</math> 1.000 blastos/<math>\mu</math>L;</li> <li>- MO no D33 = M2 ou M3;</li> <li>- Presença da t(9;22) ou t(4;11)[<i>MLL-AF4</i>].</li> </ul>
<b>IC-BFM 2009</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SP no D8: &lt;1.000 blastos/<math>\mu</math>L;</li> <li>- E idade <math>\geq</math> 1 ano e &lt; 6 anos;</li> <li>- E contagem inicial de leucócitos &lt; 20.000/<math>\mu</math>L;</li> <li>- E se houver disponibilidade: DRM-CF &lt; 0,1% ou MO M1/M2 no D15;</li> <li>- E M1 na MO do D33.</li> <li>- Todos os critérios devem ser preenchidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Todos os pacientes que não forem estratificados como BR ou AR.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RI e, se houver disponibilidade: DRM-CF &gt;10% ou M3 na MO do D15;</li> <li>- BR e, se houver disponibilidade: DRM-CF &gt; 10%;</li> <li>- SP no D8 <math>\geq</math> 1.000 blastos/<math>\mu</math>L;</li> <li>- M2 ou M3 na MO do D33;</li> <li>- Translocação t(9;22) [BCR/ABL] ou t(4;11) [MLL/AF4];</li> <li>- Hipodiploidia <math>\leq</math> 44.</li> <li>- Somente um destes critérios já classifica como AR.</li> </ul>

NCI = National Cancer Institute; GBTLI = Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda na infância; BFM = grupo *Berlin-Frankfurt-Münster*; IC = Intercontinental; BR = baixo risco; RI = risco intermediário; AR = alto risco; MO = medula óssea; SP = sangue periférico; M1 = < 5% blastos na MO; M2 = 5% a menos de 25% blastos na MO; M3 =  $\geq$  25% de blastos na MO; DRM = doença residual mínima; D8 = dia 8 da indução; D15 = dia 15 da indução.  
 Fonte: Adaptado de Smith *et al.*, 1996; Moricke *et al.*, 2008; Schrappe *et al.*, 2002; Brandalise *et al.*, 2000; Schrappe *et al.*, 2009; Brandalise *et al.*, 2009.<sup>10; 11; 12; 13; 14; 15</sup>

## RESULTADOS

Foram analisados 75 pacientes com diagnóstico de LLA B entre 1 e 18 anos de idade. Destes, 57,3% foram do sexo masculino. Com relação a idade, a mediana foi de 5 anos. 25% das crianças eram menores de 3 anos e 25% eram maiores do que 10 anos. As principais características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico estão resumidas na Tabela 2.

Em relação ao cariótipo, 97,3% apresentavam cariótipos disponíveis. Entre os quais 28 (38,4%) eram normais, 33 (45,2%) alterados e 12 (16,4%) não obtiveram crescimento (sem metáfases).

Do total de 75 pacientes, 53 (70,6%) tiveram acesso a análise imunomolecular. Nestes casos, foram encontrados 5 deleções do *IKFZ1*, 1 *TCF3/PBX1*, 1 rearranjo *MLL* e 1 *ETV6/RUNX1*.

Um total de dezesseis pacientes recidivaram, correspondendo a 21,3% dos pacientes e um total de dezessete pacientes faleceram, correspondendo a 22,6%.

Tabela 2 - Características clínicas, laboratoriais e distribuição dos grupos de risco.

	Nº	%
<b>Idade</b>		
- Mediana, anos (percentil 25/75)	5 (3/10)	
- Mínimo/Máximo	1/17	
<b>Masculino</b>	43	57,3
<b>Leucometria inicial (/mm<sup>3</sup>)</b>		
< 20.000	39	52
20.000 e 50.000	18	24
> 50.000	18	24
<b>SNC</b>		
SNC 1	66	88
SNC 2	4	5,3
SNC 3	5	6,7
<b>Subtipos LLA</b>		
LLA Pró B	3	4
LLA B comum	70	93,3
LLA Pré B	2	2,7

<b>Alterações nos cariótipos</b>		
Hiperdiploide	10	
Alta hiperdiploidia	3	
Baixa hipodiploidia	1	
Quase diploides	3	
t(1;19)(q23;p13)	2	
t(4;11)(q21;q23)	1	
t(9;22)(q34;q11)	8	
Trissomia do 21	2	
Outras alterações:	3	
46, XY, -1, +mar [15]		
46,XX,+1der(1;16)(q10p10)[20]		
46, XX, dup(1)(q21q32)[26]		
<b>Biologia molecular</b>		
Deleções do <i>IKFZI</i>	5	
<i>TCF3/PBX1</i>	1	
Rearranjo <i>MLL</i>	1	
<i>ETV6/RUNX1</i> .	1	
<b>Recaídas</b>	16	21,3
MO	9	
Testículos	2	
SNC	2	
MO + SNC	2	
MO + linfonodos	1	
<b>Óbitos</b>	17	22,6
Doença	9	
Em RC pós QT	7	
Em RC pós TMO	1	
<b>Critérios NCI</b>		
BR	44	58,7
AR	31	41,3
<b>Classificação GBTLI 99</b>		
BR	37	49,3
AR	38	50,7
<b>Classificação GBTLI 2009</b>		
BR	10	13,3
RI	24	32
AR	41	54,7
<b>Classificação BFM 95</b>		
BR	23	30,7
RI	30	40
AR	22	29,3
<b>Classificação IC-BFM 2002</b>		
BR	21	28
RI	32	42,7
AR	22	29,3
<b>Classificação IC- BFM 2009</b>		
BR	8	10,7
RI	41	54,7
AR	34,7	34,7

SNC = sistema nervoso central; MO = medula óssea; RC = remissão completa; QT = quimioterapia; TMO= transplante de medula óssea; BR = baixo risco; RI= risco intermediário; AR = alto risco.

NCI = National Cancer Institute; GBTLI = Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda; BFM = grupo *Berlim-Frankfurt-Münster*; IC = Intercontinental.

As estratificações de risco foram comparadas entre os protocolos analisados e a partir disso, calculado o coeficiente Kappa. Todos os cálculos de coeficiente Kappa foram estatisticamente significativos.

Houve baixa concordância entre as estratificações de risco pelos protocolos GBTLI 2009 e BFM 95 (Kappa = 0,22; p = 0,003) e entre as classificações de risco pelos protocolos GBTLI 2009 e IC-BFM 2002 (Kappa = 0,24; p = 0,002). Entre as estratificações de risco pelos protocolos GBTLI 2009 e IC-BFM 2009 a concordância foi moderada. O coeficiente Kappa encontrado foi de 0,44 (p < 0,001) (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de concordância entre as estratificações de risco pelos protocolos GBTLI 2009 e BFM 95; GBTLI 2009 e IC-BFM 2002; GBTLI 2009 e IC-BFM 2009.

		RISCO GBTLI 2009			Total
		BR	RI	AR	
<b>RISCO BFM 95</b>	BR	7	13	3	23
	RI	3	9	18	30
	AR	0	2	20	<b>22</b>
<b>Total</b>		10	24	<b>41</b>	75
<b>RISCO IC-BFM 2002</b>	BR	7	12	2	21
	RI	3	10	19	32
	AR	0	2	20	<b>22</b>
<b>Total</b>		10	24	<b>41</b>	75
<b>RISCO IC-BFM 2009</b>	BR	6	2	0	8
	RI	4	20	18	42
	AR	0	2	23	<b>25</b>
<b>Total</b>		10	24	<b>41</b>	75

BR = baixo risco; RI= risco intermediário; AR = alto risco; GBTLI = Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda na infância; BFM = grupo *Berlim-Frankfurt-Münster*; IC = Intercontinental

Entre as estratificações de risco pelos protocolos IC-BFM 2009 e BFM 95 e entre as classificações pelos protocolos IC-BFM 2009 e IC-BFM 2002 a concordância foi melhor. O coeficiente Kappa encontrado foi de 0,67 (p < 0,001) e de 0,68 (p < 0,001) respectivamente.

Houve associação entre grupo de risco e óbito nos casos estratificados como alto risco independentemente do protocolo usado como tratamento. As porcentagens de pacientes classificados como alto risco que evoluíram para o óbito conforme as classificações dos protocolos GBTLI 99, GBTLI 2009, BFM 95, IC-BFM 2002 e IC-BFM 2009 foram 39,5% ( $p = 0,003$ ; qui quadrado), 36,6% ( $p = 0,013$ ; qui quadrado), 54,5% ( $p < 0,001$ ; qui quadrado), 54,5% ( $p < 0,001$ ; qui quadrado) e 48% ( $p = 0,001$ ; qui quadrado) respectivamente.

Com relação a recidiva e grupo de risco, observamos uma associação significativa entre alto risco e recidiva: GBTLI 2009, 29,3% ( $p = 0,03$ ; qui quadrado) e IC-BFM 2002, 45,5% ( $p = 0,003$ ; qui quadrado).

A sobrevida global (SG) independente do protocolo ou regime de tratamento em 4 anos foi de 68,6%. O tempo médio de sobrevida observado foi de 45,2 meses e o erro padrão de  $\pm 2,2$  meses. A estimativa de sobrevida livre de eventos (SLE) em 4 anos foi de 66,6%. O tempo médio de sobrevida observado foi de 44,7 meses e o erro padrão de  $\pm 2,2$  meses (Figura 1).

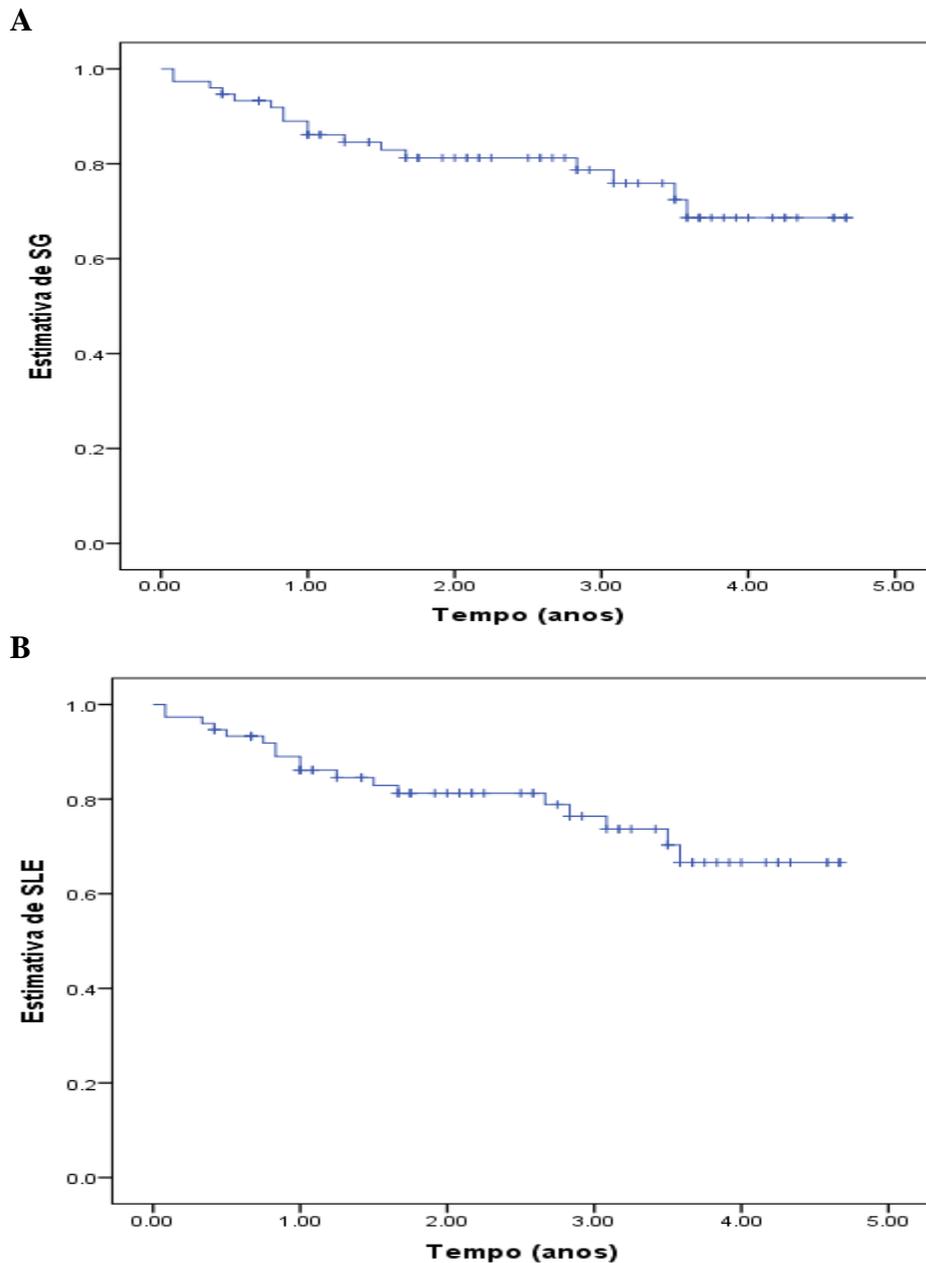


Figura 1 – (A) Estimativa de Sobrevida Global e (B) estimativa de Sobrevida livre de eventos dos 75 pacientes independente do protocolo.

## DISCUSSÃO

A partir da análise dos nossos resultados, observamos que conforme o esperado, a concordância foi melhor entre as estratificações de risco do grupo BFM com uma concordância considerada substancial, quase próxima do considerado excelente, pela classificação proposta por Landis e Koch.

Quando comparamos a estratificação de risco entre os protocolos BFM e GBTLI observamos que as principais diferenças são a idade e a contagem de leucócitos ao diagnóstico. Pacientes com idade  $\geq 9$  anos ou leucócitos  $\geq 50.000/\text{mm}^3$  e comprometimento do SNC ao diagnóstico são considerados de alto risco pelos protocolos brasileiros independente da resposta ao tratamento de indução.<sup>15</sup>

Já nos protocolos de estudo do grupo BFM analisados, pacientes com idade  $\geq 6$  anos ou leucócitos  $\geq 20.000/\text{mm}^3$  são inicialmente considerados de risco intermediário se não tiverem nenhuma alteração citogenética ou molecular de alto risco, podendo ser transferidos para o grupo de alto risco conforme a resposta a terapia de indução. O envolvimento do SNC não altera a estratificação de risco inicial.<sup>16</sup> Provavelmente por estes motivos, os nossos dados demonstraram que os protocolos brasileiros tendem a apresentar uma maior porcentagem de pacientes classificados como de alto risco (Tabela 2).

Entre as estratificações de risco pelos protocolos GBTLI 2009 e IC-BFM 2009, apesar de ambos já incorporarem o conceito de DRM em suas estratificações, a concordância foi moderada. Entretanto, a avaliação da DRM nesses protocolos ocorre de modo um pouco diferente. Enquanto o IC-BFM 2009 considera a DRM na indução apenas no D15 por CF, o GBTLI 2009 considera a DRM do D15 por CF e a DRM do D35 por reação em cadeia de polimerase (PCR).<sup>13; 15</sup> Entretanto, a análise de DRM de todos os pacientes foi realizada por citometria de fluxo, pois o hospital não possui tecnologia apropriada para análise de DRM por PCR.

Quando comparamos a classificação baseada nos protocolos GBTLI 2009, IC-BFM 2002 e IC-BFM 2009 em nossos pacientes com as distribuições dos grupos de risco já publicadas na literatura, observamos um maior percentual de pacientes alto risco (54,7%, 29,3% e 34,7% respectivamente versus 16,7% literatura) e um menor percentual

de pacientes baixo risco quando comparamos as classificações do GBTLI 2009 e do IC-BFM 2009 (13,3% e 10,7% respectivamente versus 30,9% na literatura).<sup>11; 16; 17</sup>

As sobrevidas global e livre de eventos em 4 anos, foram 68,6% e 66,6% respectivamente conforme Figura 1. Essas taxas são inferiores aos índices internacionais mais recentes, pois ensaios clínicos da América do Norte e Europa Ocidental tem mostrado taxas de sobrevida livre de eventos de até 85% e taxas de sobrevida global de até 90%.<sup>18</sup> Alguns estudos já demonstram sobrevida até maior do que 90% para alguns subtipos específicos com terapia adaptada ao risco em LLA B.<sup>19</sup>

Através da análise destes dados pudemos demonstrar que houve uma diferença de estratificação de risco conforme o protocolo ou regime usado, mas que não trouxe repercussão na sobrevida global destas crianças.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo nos fornece inúmeros pontos para reflexão sobre o tratamento da leucemia em nosso país. Em nosso estudo verificamos uma maior porcentagem de pacientes classificados como alto risco na população estudada em relação aos dados disponíveis na literatura internacional. Além disso, apesar de serem pacientes que foram tratados em uma instituição de referência no sul do Brasil, que dispõe de equipes especializadas em tratamento oncológico e com bons recursos para garantir um tratamento de suporte adequado para esses pacientes, observamos sobrevida inferior as descritas na literatura.

Novos estudos prospectivos laboratoriais e clínicos são necessários para entendermos melhor as razões destas diferenças, se elas ocorreram por uma questão populacional ou amostral, e o impacto da estratificação de risco na toxicidade e taxa de cura dos nossos pacientes.

## Conflitos de interesse

Os autores não possuem conflito de interesse.

## Agradecimentos

Agradecemos a Rede de Diagnóstico do Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrica do Instituto Nacional de Câncer (INCA) pelas análises imunomoleculares ao diagnóstico a partir de maio de 2015.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 1, p. 138-145, 2007. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1817663/>> Acesso em 01 set. 2017.
- <sup>2</sup> SMITH, M. A. et al. Declining childhood and adolescent cancer mortality. **Cancer**, v. 120, n. 16, p. 2497-506, Aug 15 2014.
- <sup>3</sup> HOWLADER, N. et al. **Childhood cancer, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013**. Bethesda, Md: National Cancer Institute 2015.
- <sup>4</sup> HUNGER, S. P. et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, v. 60, n. 6, p. 957-63, Jun 2013.
- <sup>5</sup> VROOMAN, L. M.; SILVERMAN, L. B. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. **Curr Opin Pediatr**, v. 21, n. 1, p. 1-8, Feb 2009.
- <sup>6</sup> BOROWITZ, M. J. 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**, v. 111, n. 12, p. 5477-85, Jun 15 2008.
- <sup>7</sup> STOW, P. et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4657-63, Jun 10 2010.

- 8 BASSO, G. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 31, p. 5168-74, Nov 01 2009.
- 9 LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-74, Mar 1977.
- 10 SMITH, M. et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 1, p. 18-24, Jan 1996.
- 11 MORICKE, A. et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. **Blood**, v. 111, p. 4477-4489, // 2008. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-09-112920> > Acesso em 24 nov. 2016.
- 12 SCHRAPPE, M. et al. **ALL IC-BFM 2002: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol.** 2002.
- 13 SCHRAPPE, M. et al. **ALL IC-BFM 2009: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol.** 2009.
- 14 BRANDALISE, S. R.; PINHEIRO, V. R.; LEE, M. L. M. **Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI - LLA - 99.** Campinas 2000.
- 15 BRANDALISE, S.R. et al. **Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente - GBTLI LLA - 2009.** Campinas 2009.
- 16 STARY, J. et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 3, p. 174-84, Jan 20 2014.
- 17 CONTER, V. et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. **Blood**, v. 115, n. 16, p. 3206-14, Apr 22 2010.

- <sup>18</sup> HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **N Engl J Med**, v. 373, n. 16, p. 1541-52, Oct 15 2015.
- <sup>19</sup> PUI, C. H. et al. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. **Leukemia**, Sep 13 2016.

## 9 ARTIGO ORIGINAL 2

### **Influência da DRM por CF no D15 da Indução na estratificação de risco de crianças tratadas para LLA B em um hospital de referência no sul do Brasil.**

Klerize Anecely de Souza Silva<sup>1</sup>, Fabiane Spagnol Pedrazzani<sup>2</sup>, Mariela Granero Farias<sup>2</sup>, Ana Paula Alegretti<sup>2</sup>, Mariana Bohns Michalowski,<sup>1</sup> Liane Esteves Daudt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Unidade de diagnóstico personalizado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondência:

Liane Esteves Daudt

Rua Ramiro Barcelos, 2350, serviço de hematologia, 90035-935 Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: [ldaudt@hcpa.edu.br](mailto:ldaudt@hcpa.edu.br)

## **RESUMO**

**Introdução:** A doença residual mínima (DRM) é considerada o principal fator de prognóstico da Leucemia Linfóide Aguda (LLA) em crianças. O objetivo desse estudo é avaliar a influência da avaliação de DRM do D15 na análise das classificações de risco pelos diferentes protocolos utilizados para tratamento da LLA da infância em uma instituição de referência no sul do Brasil.

**Métodos:** Estudo retrospectivo a partir da revisão de prontuários dos pacientes com idade entre 1 e 18 anos portadores de LLA B atendidos no HCPA a partir de janeiro de 2013 até abril de 2017.

**Resultados:** Foram analisados 75 pacientes. Houve significância estatística nas análises quando se agrupou a DRM por CF do D15, em três categorias < 0,1%, entre 0,1 e 10% e > 10% com a seguinte distribuição 30,7%, 52% e 17,3% respectivamente. Houve associação significativa entre DRM D15 por CF < 0,1% a não ter óbito e nem recidiva e DRM D15 por CF > 10% a evoluir a óbito ou a recidiva. O HR cumulativo do risco de recidiva dos pacientes que apresentaram DRM do D15 < 0,1%, entre 0,1 e 10% e > 10% foram respectivamente 19,2%, 59,8% e 80,1%.

**Conclusões:** As análises sugerem que DRM do D15 por CF < 0,1% foi um ponto de corte para pacientes que apresentaram melhores desfechos e que DRM do D15 nas classificações de risco é útil principalmente para a estratificação de pacientes com prognóstico mais favorável no nosso meio.

**Palavras chave:** LLA pediátrica. Classificação de risco. Doença residual mínima.

## INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide aguda (LLA) pediátrica é atualmente uma doença potencialmente curável na maioria dos casos. Os avanços nos estudos permitiram que as taxas globais de cura para essa doença que eram de menos de 10% em 1960 atingissem sobrevivência global de aproximadamente 90% nos Estados Unidos.<sup>1</sup> Apesar dessa melhora significativa, cerca de 20% dos pacientes ainda recaem e a taxa de cura após a recaída é de aproximadamente 25% a 40%.<sup>2,3</sup>

A recaída representa a principal causa de falha no tratamento. Uma resposta precoce a terapia é um indicador importante de prognóstico e pode tentar prever esse risco.<sup>4</sup> Pacientes com depuração rápida dos blastos em sangue periférico (SP) após uma semana de corticoide geralmente tem melhor prognóstico.<sup>5</sup> Assim como aqueles que apresentam redução dos blastos na medula óssea (MO) no dia 15 da indução ou D15.<sup>6</sup>

Atualmente, a maioria dos grupos de estudo explora a aferição e cinética de níveis submicroscópicos das células leucêmicas, ou seja, a doença residual mínima (DRM). A DRM é considerada o principal fator de prognóstico da LLA em crianças, mesmo em pacientes com características que sugerem um baixo risco de recaída. Por conta disso, ela está sendo utilizada para refinar a estratificação de risco dos protocolos de tratamento mais modernos e para redirecionar o tratamento.<sup>7</sup>

A detecção molecular da DRM já foi bem padronizada. As técnicas por reação em cadeia de polimerase (PCR) são mais sensíveis e são capazes de detectar uma célula leucêmica em 100.000 células normais. Já o limite de sensibilidade da técnica por CF é de 0,01% ou  $10^{-4}$ , ou seja, detecta uma célula leucêmica em 10.000 células normais. Embora menos padronizada, a CF é mais rápida, tem menor custo e é amplamente disponível.<sup>8</sup>

A DRM, sobretudo por biologia molecular, do final da indução é utilizada por quase todos os grupos de estudo como um fator que determina a intensidade do tratamento

pós indução. Já está bem estabelecido sua importância, quando indetectável ou em níveis muito baixos, como um indicador de uma evolução mais favorável e um menor risco de recaída.<sup>9</sup>

Entretanto, um estudo do grupo AIEOP BFM-ALL (*Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica and Berlin-Frankfurt Münster*) mostrou que a análise de DRM no D15 em medula óssea por citometria de fluxo (CF) também tem um forte impacto prognóstico e pode complementar a estratificação de risco.<sup>10</sup> Sendo esta uma metodologia de mais fácil acesso e específica por não confundir com células regenerativas presentes no final da indução.

Neste estudo, pretendemos avaliar a influência da avaliação de DRM do D15 na análise das classificações de risco em pacientes classificados por diferentes protocolos utilizados para tratamento da LLA da infância em uma instituição de referência no sul do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População do estudo**

Estudo epidemiológico do tipo transversal, descritivo e retrospectivo, a partir da análise de prontuários de 75 pacientes com idade entre 1 e 18 anos portadores de LLA B atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) a partir de janeiro de 2013 até abril de 2017. Os critérios de exclusão foram ausência de análise de DRM no D15 da indução e LLA de linhagem não B.

Todos realizaram imunofenotipagem de medula óssea ou de sangue periférico por CF ao diagnóstico. Além disso, foi avaliado idade, contagem de leucócitos, envolvimento do SNC, morfologia das células leucêmicas, citogenética e biologia molecular ao diagnóstico quando disponível.

O aspirado de MO foi realizado no D15 (depois de 14 dias de corticoterapia, 1 dose de vincristina, daunorrubicina e asparaginase e 1 intratecal) e no final da indução para a avaliação morfológica e pesquisa de DRM. A pesquisa de DRM por imunofenotipagem no HCPA foi realizada com o citômetro BD FACSCantoII (Becton Dickinson, São Jose, CA) inicialmente utilizando 6 cores e a partir do final de 2015, 8 cores. Os protocolos foram baseados na padronização do consórcio Euroflow.<sup>11</sup>

O painel de anticorpos utilizado para diagnóstico de LLA B por CF era composto por um *screening* com MPO, CD79a e CD3 marcados intracelularmente; CD34, CD19, CD7, CD3 e CD45 marcados na membrana celular. Na subclassificação da LLA B os anticorpos utilizados foram: CD20, CD45, CD58, CD66c, CD34, CD19, CD10, CD38, IgKappa, IgLambda, IgM de membrana e IgM citoplasmática, CD33, CD13, CD117, CD9, TdT nuclear, CD22 e CD24. Nos casos em que CD10 era negativo, adicionou-se um tubo contendo anticorpos preditores do rearranjo MLL: CD65, CD15 e NG2. As fluorescências utilizadas nos painéis foram FITC, PE, PerCP, PE-CY7, APC, APC-H7 (6 cores) e FITC, PE, PerCP-CY5.5, PE-CY7, APC, APC-H7, Pacif Blue e Pacif Orange (8 cores).

Para a pesquisa de DRM, foram utilizados dois tubos contendo marcadores comuns CD19, CD45, CD34, CD10, CD38 quando realizado com 6 cores e CD19, CD45, CD34, CD38, CD81, CD10 e CD20 com 8 cores, em combinação com os anticorpos CD66c e CD123. Para uma detecção precisa e sensível de baixa frequência de células malignas, ou seja, 1 em 10.000 células normais (0,01% ou  $10^{-4}$ ), foram adquiridos no mínimo 1.000.000 eventos. O acompanhamento da DRM foi realizado pela detecção de imunofenótipos normais versus reacionais versus clonais.

Todos os dados foram analisados utilizando o *software* Infinicyt (Cytognos, Salamanca, ES).

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA, CAAE: 55303916.5.0000.5327.

### **Definição de grupos de risco**

A estratificação de risco foi baseada nos critérios do *National Cancer Institute* (NCI) e nos critérios dos seguintes protocolos do grupo *Berlim-Frankfurt-Münster* (BFM): BFM 95, IC-BFM 2002 e IC-BFM 2009. Todos os pacientes foram estratificados conforme suas características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico e velocidade de resposta ao tratamento inicial independente do protocolo de tratamento que recebeu.

A classificação de risco pelo protocolo de tratamento que utiliza a DRM em sua estratificação de risco, o IC-BFM 2009, foi comparada as estratificações de risco pelos protocolos anteriores que não utilizavam DRM.

Os critérios de classificação de risco conforme NCI e regimes de tratamento do BFM estão no material suplementar desse artigo.

### **Estruturação e Análise Estatística**

O banco de dados foi realizado no software Excel versão 2016. A análise estatística foi realizada no software SPSS versão 20.0. As estimativas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier. A comparação do tempo médio de sobrevida foi feita pelo teste Log Rank. O risco cumulativo de recidiva ou óbito foi estimado por *Hazard Ratio* (HR). A duração da sobrevida global foi estimada pelo tempo desde o diagnóstico de LLA até a data do óbito e data do último contato. A duração da sobrevida livre de eventos foi estimada pelo tempo desde o diagnóstico de LLA até a data da recidiva, refratariedade ao tratamento, data do óbito ou até data do último contato.

Todos os dados foram atualizados em outubro de 2017.

## RESULTADOS

Foram analisados 75 pacientes com diagnóstico de LLA B entre 1 e 18 anos de idade. Entre os 75 pacientes, ocorreram 16 (21,3%) recaídas e 17 (22,6%) óbitos conforme tabelas 2 e 3.

A distribuição dos grupos de risco comparando as classificações pelos protocolos IC-BFM 2009 com as classificações pelo BFM 95 e pelo IC-BFM 2002 é demonstrada na tabela 1.

TABELA 1. Análise de concordância entre as estratificações de risco pelos protocolos IC-BFM 2009 e BFM 95 e entre IC-BFM 2009 e IC-BFM 2002.

		RISCO IC-BFM 2009			Total
		BR	RI	AR	
<b>RISCO BFM 95</b>	BR	8	13	2	23
	RI	0	29	1	30
	AR	0	0	22	22
<b>Total</b>		8	42	25	75
<b>RISCO IC-BFM 2002</b>	BR	8	12	1	21
	RI	0	30	2	32
	AR	0	0	22	22
<b>Total</b>		8	42	25	75

BR = baixo risco; RI= risco intermediário; AR = alto risco. BFM = grupo *Berlim-Frankfurt-Münster*; IC = Intercontinental; GBTLI = Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda na infância.

A DRM do D15 e DRM do final da indução foram estratificadas em quatro categorias inicialmente: < 0,01%, entre 0,01 a 0,1%, entre 0,1 a 10% e > 10%.

Sobre a DRM do final da indução, houve associação significativa entre recidiva e DRM entre 0,1 e 10% ( $p = 0,001$ ; qui quadrado) e DRM > 10% com óbito e recidiva ( $p < 0,001$ ; qui quadrado). Todos os pacientes com DRM > 10% no final da indução foram a óbito. Além disso, DRM < 0,01% foi associado com maior probabilidade de não evoluir a óbito e nem recidiva pelas análises de qui quadrado ( $p < 0,001$ ).

TABELA 2. Distribuição dos eventos conforme DRM do final da indução por CF.

	< 0,01%		0,01 - 0,1%		0,1 - 10%		> 10%		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Total</b>	63	84	4	5,3	4	5,3	4	5,3	75	100
<b>Recaídas</b>	9		1		4		2		16	21,3
MO	5		1		2		1			
Testículos	1				1					
SNC	2									
MO + SNC	1						1			
MO + linfonodos					1					
<b>Óbitos</b>	10		1		2		4		17	22,6
Doença	3				2		3			
Em RC pós QT	7									
Em RC pós TMO							1			

MO = medula óssea; SNC = sistema nervoso central; RC = remissão completa; QT = quimioterapia; TMO = transplante de medula óssea.

Com relação a DRM do D15, as curvas de sobrevida demonstraram resultado significativo quando os valores foram agrupados em apenas três categorias: < 0,1%, entre 0,1% e 10% e > 10%, para demonstrar os grupos de maior ou menor risco de recaída ou óbito. As curvas com quatro categorias: < 0,01%, entre 0,01% a 0,1%, entre 0,1% a 10% e > 10% não foram significativas e nem representativas. Do ponto de vista clínico, os nossos dados sugerem cortes adequados de DRM por CF do D15 de 0,1% para baixo risco e maior do que 10% para o grupo de maior risco de recidiva ou óbito. Houve associação significativa entre DRM D15 por CF < 0,1% a não ter óbito ( $p = 0,006$ ; qui quadrado) e nem recidiva ( $p = 0,03$ ; qui quadrado) e DRM D15 por CF > 10% a evoluir a óbito ( $p = 0,006$ ; qui quadrado) ou a recidiva ( $p = 0,03$ ; qui quadrado).

TABELA 3. Distribuição dos eventos conforme DRM do D15 por CF.

	< 0,1%		0,1 - 10%		> 10%		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Total</b>	23	30,7	39	52	13	17,3	75	100
<b>Morfologia</b>								
M1	18		26		2		46	61,3
M2	5		12		0		17	22,7
M3	0		1		11		12	16
<b>Recaídas</b>	2		10		4		16	21,3
MO			7		2			
Testículos	1		1					
SNC			2					
MO + SNC	1				1			
MO + linfonodos					1			
<b>Óbitos</b>	2		8		7		17	22,6
Doença			4		5			
Em RC pós QT	2		4		1			
Em RC pós TMO					1			

MO = medula óssea; SNC = sistema nervoso central; RC = remissão completa; QT = quimioterapia; TMO = transplante de medula óssea.

Todos os pacientes tiveram avaliação morfológica no D15 e no final da indução. Com relação a morfologia do D15, 46 (61,3%) apresentaram medula M1 (< 5% blastos na MO), 17 (22,7%) foram classificados como M2 (5% a menos de 25% blastos na MO) e 12 (16%) foram definidos como M3 ( $\geq$  25% de blastos na MO).

A estimativa de sobrevida global (SG) em 4 anos dos pacientes que apresentaram DRM do D15 < 0,1%, entre 0,1 a 10% e > 10% foram respectivamente 90%, 64,2% e 42,2% e o HR cumulativo do risco de óbito em 4 anos dos pacientes que apresentaram DRM do D15 < 0,1%, entre 0,1 a 10% e > 10% foram respectivamente 10,5%, 44,2% e 86,2% ( $p=0,003$ ; Log Rank test) (Figuras 1A e 1B).

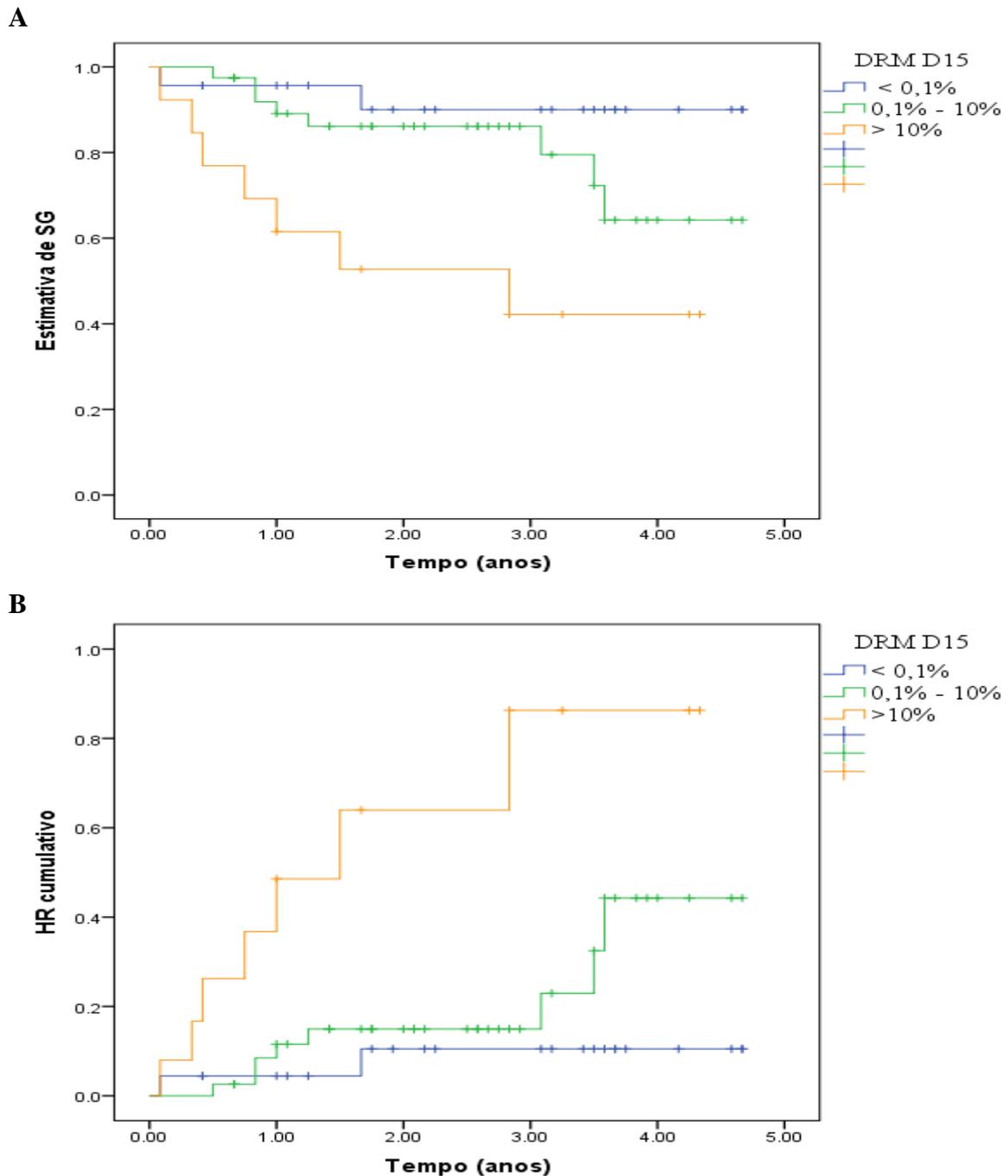


Figura 1. (A) Estimativa de SG conforme DRM D15 por citometria de fluxo e (B) HR cumulativo do risco de óbito conforme DRM D15.

A estimativa de sobrevida livre de eventos (SLE) em 4 anos dos pacientes que apresentaram DRM do D15 < 0,1%, entre 0,1 a 10% e > 10% foram respectivamente 82,5%, 55% e 44,9% e o HR cumulativo do risco de recidiva dos pacientes que apresentaram DRM do D15 < 0,1%, entre 0,1 a 10% e > 10% foram respectivamente 19,2%, 59,8%, 80,1% ( $p = 0,014$ ; Log Rank test) (Figuras 2A e 2B).

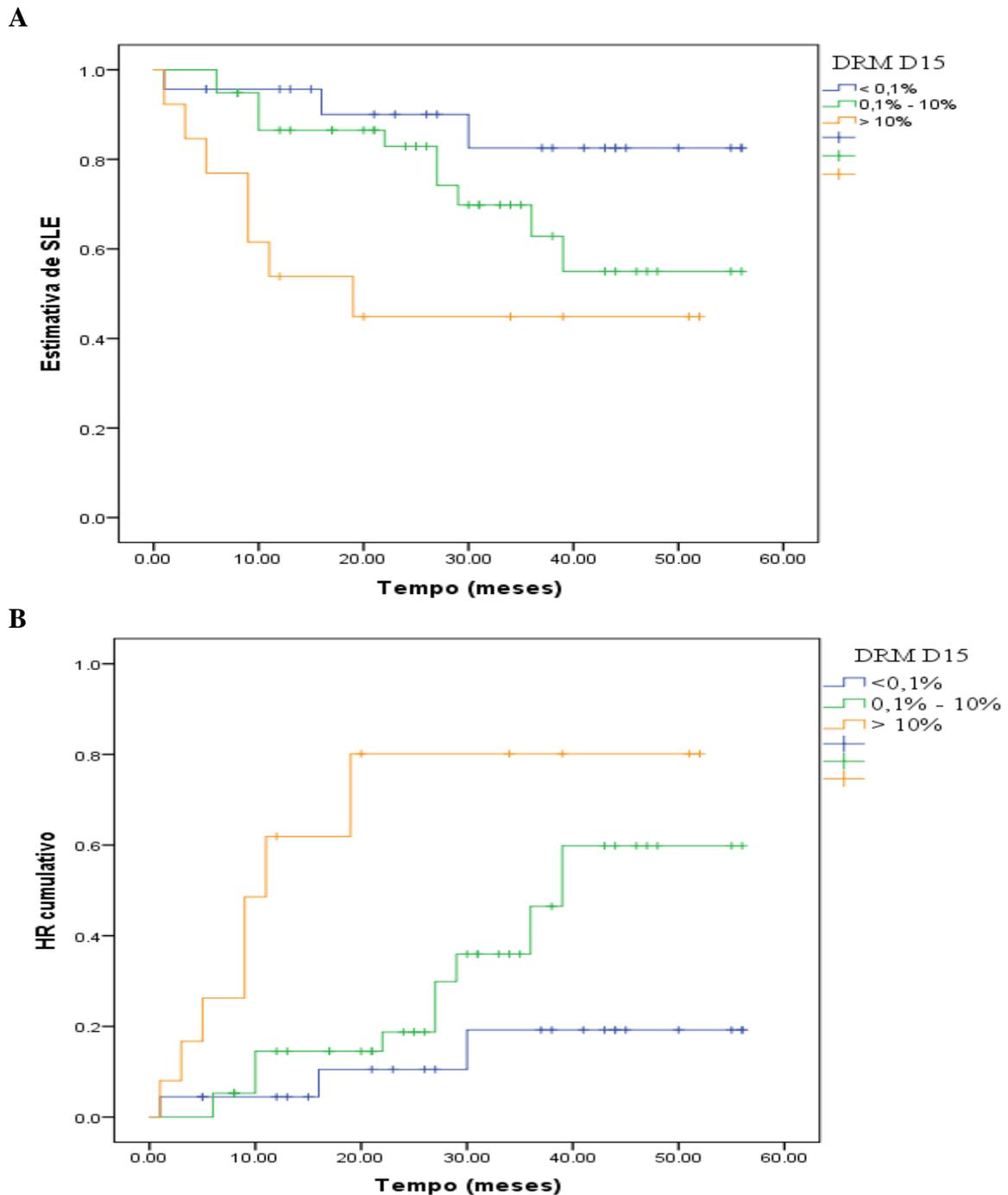


Figura 2. (A) Estimativa de SLE conforme DRM D15 por citometria fluxo e (B) HR cumulativo do risco de recidiva conforme a DRM do D15.

Outras variáveis como critérios do NCI, morfologia do D15 e resposta ao corticoide também demonstraram significância prognóstica. Nenhum paciente com DRM < 0,1% no D15 foi mau respondedor ao corticoide. A SLE conforme essas variáveis estão

descritas na tabela 4. Entretanto, outras análises como regressão multivariada de Cox não foram consideradas devido ao  $n$  e ao número de desfecho.

TABELA 4. Distribuição das variáveis conforme morfologia no D15, D8 e NCI

	N	%	SLE	P
Morfologia D15				(0,001; Log Rank)
M1	46	61,3	74,3%	
M2	17	22,7	67,7%	
M3	12	16	31,1%	
D8				(< 0,001; Log Rank)
< 1000blastos/mm <sup>3</sup>	65	86,7	78%	
> 1000blastos/mm <sup>3</sup>	10	13,3	20%	
NCI				(< 0,001; Log Rank)
BR	44	58,7	94,8%	
AR	31	41,3	28,3%	

SLE: Sobrevida livre de eventos; M1: < 5% blastos na MO; M2: 5 a < 25% blastos na MO; M3  $\geq$  25% de blastos na MO; BR: baixo risco; AR: alto risco.

## DISCUSSÃO

O tratamento da LLA é uma das terapias mais complexas dentre os programas terapêuticos contra o câncer. As crianças com LLA são classificadas e tratadas de acordo com grupos de risco de recaída.<sup>12</sup> A caracterização dos grupos de risco é baseada na integração de características da doença e de fatores prognósticos. Isso garante a intensificação da terapia para pacientes com alto risco de recaída, enquanto poupa toxicidade para aqueles com uma alta probabilidade de cura.<sup>13</sup>

O desaparecimento das células leucêmicas do sangue periférico no 8º dia de tratamento com corticoterapia e da medula óssea no 15º dia de tratamento e no final da indução é um importante fator para avaliar o risco de recaída da doença.<sup>14</sup> A avaliação do D8 é barata, rápida e disponível, pois só necessita da avaliação das contagens de blastos em sangue periférico. Uma pobre resposta ao corticoide é observada em menos de 10% dos pacientes e esse parâmetro é utilizado para estratificação de risco nos protocolos atuais, sendo os maus respondedores considerados de alto risco de recaída.<sup>5</sup> Nos nossos

dados, 13,3% dos pacientes apresentaram pobre resposta ao corticoide conforme tabela 4.

Além dessa análise de sangue periférico na primeira semana da terapia de indução da LLA, também é utilizado a análise de esfregaços de medula óssea durante e após a terapia de indução para avaliação de resposta precoce.<sup>15</sup> Porém, a avaliação morfológica da medula óssea por microscopia óptica é uma técnica de baixa sensibilidade. Por isso, nos dias atuais, são recomendados métodos analíticos com melhor sensibilidade que permitem a detecção de células leucêmicas em proporções muito menores do que as obtidas por avaliação morfológica, como a DRM.<sup>16</sup>

A técnica de detecção de DRM pode ser realizada por: CF de imunofenótipos aberrantes, pesquisa de rearranjos no DNA dos genes que codificam as imunoglobulinas (Ig) ou o receptor de linfócitos T (TCR) por PCR, e por pesquisa de transcritos de fusão (RNA) também por PCR que é o método de eleição, por exemplo, nos casos de LLA com Ph+, para detectar o transcrito *BCR/ABL*.<sup>8</sup>

As principais vantagens do estudo de DRM por CF são a rapidez, custo, disponibilidade e quantificação precisa de células anormais. As principais desvantagens são a necessidade de elevada expertise técnica, sensibilidade variável, devido a semelhanças entre células normais de regeneração e células malignas, e a possibilidade de mudanças no fenótipo após o início do tratamento, seja pela evolução clonal das células leucêmicas, seja pelas drogas utilizadas.<sup>8</sup>

A CF tem ainda a vantagem de detectar células intactas, em contraste com a PCR, em que o material de ácido nucleico contaminante de células mortas pode complicar a interpretação. Ambas as técnicas têm limitações, porque assim como o imunofenótipo dominante, o rearranjo de Ig / TCR também podem evoluir ao longo do tempo e, portanto, não ser reconhecido.<sup>13</sup>

Entretanto, a sensibilidade da CF é menor do que a técnica de PCR. Por isso, essa questão está sendo motivo de muitos debates nos últimos anos. Discussões sobre como diminuir esse limite de detecção para  $< 10^{-5}$  a  $10^{-6}$  estão sendo realizadas na tentativa de se atingir a sensibilidade de técnicas como a da PCR.<sup>8</sup>

A tendência futura é um tratamento cada vez mais personalizado. Os avanços históricos na área são imensos, mas ainda temos muito o que aperfeiçoar na nossa realidade. A tecnologia da PCR não é disponível na maioria dos centros de tratamento oncológico no Brasil. Por isso, a CF por ser um método mais barato e mais acessível tem sido motivo de estudo para aperfeiçoamento da técnica de análise de DRM em LLA principalmente em países com menos recursos financeiros.

Os protocolos de tratamento para a LLA da infância recomendam o monitoramento da DRM em múltiplos pontos para avaliar a eficácia dos vários estágios de quimioterapia na depuração das células leucêmicas. Diversos estudos já demonstraram que a DRM do final da indução, principalmente por biologia molecular, é um importante preditor de desfecho em crianças e adolescentes com LLA B.<sup>17</sup> Entretanto, uma avaliação de DRM mais precoce também tem sido investigada e tem demonstrado valor prognóstico. A análise de DRM em medula óssea por CF após cerca de 2 semanas do início da quimioterapia de indução (dia 15) também mostrou benefício adicional na estratificação de risco.<sup>10</sup>

Em nosso estudo, verificamos a importância da DRM do D15 na estratificação do grupo de risco intermediário, quando comparamos os protocolos que utilizam DRM com os que não utilizavam a DRM. Dentre os 23 pacientes classificados como BR pelo BFM 95 e dos 21 pacientes classificados como BR pelo IC-BFM 2002, somente 8 foram classificados como BR pelo IC-BFM 2009. Os restantes foram classificados como RI pela classificação do IC-BFM 2009. Apesar do *n* limitado, isso é devido a inclusão da análise

de DRM no D15 pela classificação do IC-BFM 2009, pois a avaliação morfológica no D15 só apresentou medula óssea M1 e M2 e nenhum caso de M3 conforme. Se nesse momento fosse considerado apenas a avaliação morfológica, a concordância entre os grupos de baixo risco teria sido maior algo que não ocorreu.

As análises dos nossos dados sugerem que DRM do D15 por CF  $< 0,1\%$  foi um ponto de corte para pacientes que apresentaram melhores desfechos e DRM do D15 por CF  $> 10\%$  com piores resultados corroborando com os dados da literatura que demonstram a importância da análise da DRM do D15 por CF como um forte preditor precoce de prognóstico.<sup>10</sup> Porém, não podemos afirmar no estudo atual que a DRM do D15 por CF foi o principal preditor de prognóstico devido ao  $n$  e número de desfechos na análise multivariada. Algo que foi demonstrado pelo estudo do grupo AIEOP-BFM 2000.<sup>10</sup>

Além disso, pacientes com DRM do D15  $< 0,1\%$  por CF tiveram maior SG e SLE e menor HR cumulativo de risco de óbito ou recidiva conforme demonstramos nas figuras 1 e 2. Embora tenhamos estimado a sobrevida em 4 anos pelo tempo do estudo, os resultados não foram muito discrepantes ao do estudo do grupo AIEOP-BFM 2000 que estimou a sobrevida em 5 anos. No presente estudo, pacientes com DRM  $< 0,1\%$  por CF no D15 apresentaram estimativa de SLE em 4 anos de 82,5%, sendo que no estudo AIEOP-BFM 2000 a estimativa de SLE em 5 anos desses pacientes foi de 89,9%.<sup>10</sup> Isso demonstra que a DRM do D15 por CF pode contribuir para refinar ainda mais a classificação prognóstica e sugere que esse grupo de pacientes pode se beneficiar de redução de dose na terapia de indução.<sup>18</sup>

Verificamos, ainda, que DRM por CF  $< 0,01\%$  no final da indução foi associado com maior probabilidade de não evoluir a óbito, que DRM por CF positiva entre 0,1% e 10% no mesmo momento mostrou associação significativa com recidiva e DRM por CF

> 10% apresentou associação com óbito e recidiva também no final da indução. Esses dados corroboram com a literatura que demonstra que a ausência de DRM no final da fase de indução é considerada o principal preditor de resultados favoráveis e DRM detectável no final da indução tem maior risco de recaída e pior sobrevida.<sup>7</sup>

Um estudo do *St. Jude Children's Research Hospital* avaliou a DRM por CF no dia 19 da indução e identificou que o valor prognóstico da DRM do dia 19 em amostra de medula óssea por CF foi superior ao definido pela morfologia e permaneceu significativo após ajuste para outras variáveis clínicas e biológicas.<sup>19</sup> Outro estudo mais recente da mesma equipe demonstrou que DRM no D19 era particularmente útil para pacientes com apresentação favorável. Enquanto DRM no D46 ajudou a identificação de pacientes com risco aumentado de recaída dentro dos critérios NCI de alto risco. Além disso, constataram que pacientes com DRM  $\geq 1\%$  no D19 ou DRM detectável no D46 tiveram um maior risco de recaída e pior SLE e SG. Nesse estudo, a DRM foi realizada tanto por CF quanto por PCR. Qualquer método poderia detectar as células de LLA com uma sensibilidade de 0,01% ou melhor e os resultados foram geralmente concordantes. Nos poucos casos discrepantes, foi utilizado o valor mais alto da DRM para a atribuição de risco.<sup>18</sup>

O *Children's Oncology Group* (COG) relatou um prognóstico muito favorável para pacientes com LLA de células B, critérios de baixo risco e anormalidades citogenéticas favoráveis que apresentaram níveis de DRM por CF inferiores a 0,01% no dia 8 em sangue periférico e no final da indução em medula óssea. A presença de DRM nesses momentos foi associada com menor SLE em todos os grupos de risco.<sup>7</sup>

Um outro estudo avaliou o significado prognóstico da DRM em sangue periférico no dia 15 da indução e identificou um grande grupo de pacientes com excelente prognóstico e adicionou informações prognósticas à estratificação de risco com base na

DRM do final da indução e da semana 12 do tratamento. Entretanto, esse estudo avaliou a DRM do dia 15 por PCR. A avaliação de DRM por PCR exige tempo e requer pelo menos 2 semanas, mas geralmente 4, o que faria uma intervenção precoce no tratamento baseada em DRM por PCR no dia 15 algo difícil de ser efetivada.<sup>20</sup>

Definir o grupo de prognóstico mais favorável o mais precoce possível como no dia 15 da indução após uma semana de corticoide e uma semana de quimioterapia mais corticoide é extremamente útil e benéfico para os pacientes, pois oferece a possibilidade de modificar precocemente a quimioterapia, como diminuir a dose de antraciclina utilizada no tratamento de indução em protocolos baseados no grupo BFM por exemplo.<sup>20</sup> Isso pode contribuir para diminuir os efeitos tardios associados a um tratamento longo como o da leucemia.

O presente estudo é o primeiro estudo brasileiro que demonstra a influência da inclusão da DRM na classificação de risco em pacientes pediátricos portadores de LLA B. A DRM por citometria de fluxo é um método plausível em nossa realidade, para refinar a estratificação de risco dos nossos pacientes. Nossos dados sugerem a influência da DRM do D15 nas classificações de risco, sendo útil principalmente para a estratificação de pacientes com prognóstico mais favorável assim como demonstra a literatura.<sup>18</sup>

Em conclusão, reconhecemos as limitações do estudo por se tratar de um estudo retrospectivo, baseado em dados de uma única instituição brasileira de referência em tratamento oncológico, com tamanho de amostra e um período de análise limitados. Apesar disso, encontramos dados muito semelhantes aos da literatura com relação ao impacto da análise de DRM. Faz-se necessário mais estudos, de preferência prospectivos e cooperativos, para caracterizarmos melhor a nossa população, aprimorarmos o nosso conhecimento e garantirmos um tratamento cada vez mais personalizado como o preconizado por estudos internacionais.

## Conflitos de interesse

Os autores não possuem conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 16, p. 1541-1552, 2015/10/15 2015. ISSN 0028-4793. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1400972> >. Acesso em: 2016/11/27.
- <sup>2</sup> PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030-43, Mar 22 2008. ISSN 0140-6736.
- <sup>3</sup> CONTER, V. et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. **Blood**, v. 115, n. 16, p. 3206-14, Apr 22 2010. ISSN 0006-4971.
- <sup>4</sup> PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 354, n. 2, p. 166-78, Jan 12 2006. ISSN 0028-4793.
- <sup>5</sup> SCHRAPPE, 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**, v. 95, n. 11, p. 3310-22, Jun 01 2000. ISSN 0006-4971.
- <sup>6</sup> GAYNON, P. S. et al. Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. **Cancer**, v. 80, n. 9, p. 1717-26, Nov 01 1997. ISSN 0008-543X.
- <sup>7</sup> BOROWITZ, M. J. 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**, v. 111, n. 12, p. 5477-85, Jun 15 2008. ISSN 0006-4971.
- <sup>8</sup> VAN DONGEN, J. J. et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. **Blood**, v. 125, n. 26, p. 3996-4009, Jun 25 2015. ISSN 0006-4971.
- <sup>9</sup> STOW, P. et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 115, n. 23, p. 4657-63, Jun 10 2010. ISSN 0006-4971.

- 10 BASSO, G. et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 31, p. 5168-74, Nov 01 2009. ISSN 0732-183x.
- 11 VAN DONGEN, J. J. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1908-75, Sep 2012. ISSN 0887-6924.
- 12 PUI, C. H. et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 551-65, Feb 10 2011. ISSN 0732-183x.
- 13 PIZZO, A. P.; POPLACK, G. D. **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 2015.
- 14 CAMPANA, D. Progress of minimal residual disease studies in childhood acute leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**, v. 5, n. 3, p. 169-76, Jul 2010. ISSN 1558-8211.
- 15 SCHRAPPE, M. et al. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 366, n. 15, p. 1371-81, Apr 12 2012. ISSN 0028-4793.
- 16 CAMPANA, D. Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. **Br J Haematol**, v. 143, n. 4, p. 481-9, Nov 2008. ISSN 0007-1048.
- 17 BOROWITZ, M. J. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. **Blood**, v. 126, n. 8, p. 964-71, Aug 20 2015. ISSN 0006-4971.
- 18 PUI, C. H. et al. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. **Leukemia**, Sep 13 2016. ISSN 0887-6924.
- 19 COUSTAN-SMITH, E. et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 100, n. 1, p. 52-8, Jul 1 2002. ISSN 0006-4971.
- 20 VOLEJNIKOVA, J. et al. Minimal residual disease in peripheral blood at day 15 identifies a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic

leukemia with superior prognosis. **Haematologica**, v. 96, n. 12, p. 1815-21, Dec 2011. ISSN 0390-6078.

- 21 SMITH, M. et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 1, p. 18-24, Jan 1996. ISSN 0732-183X.
- 22 MORICKE, A. et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. **Blood**, v. 111, p. 4477-4489, // 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-09-112920> >. Acesso em: 2017/11/24.
- 23 SCHRAPPE, M. et al. ALL IC-BFM 2002: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol. 2002.
- 24 \_\_\_\_\_. ALL IC-BFM 2009: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol. 2009.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Classificação de risco conforme NCI e regimes de tratamento do BFM.

<b>Grupos de Risco</b>			
	<b>BR</b>	<b>RI</b>	<b>AR</b>
<b>NCI</b>	- Leucócitos < 50.000/mm <sup>3</sup> ao diagnóstico e idade > 1 ano e < 10 anos		- Leucócitos > 50.000/mm <sup>3</sup> ao diagnóstico e/ou idade ≥ 10 anos
<b>BFM 95</b>	- Sem critério para Alto Risco; - Contagem de leucócitos < 20.000/μL; - Idade ao diagnóstico entre 1 e 6 anos;	- Sem nenhum critério de Alto Risco - E contagem de leucócitos ≥ 20.000/μL - E/ou idade ao diagnóstico < 1 ano ou ≥ 6 anos	- Pobre resposta ao corticoide; - E/ou sem RC no D33 da indução; - E/ou evidência de t(9;22) ou BCR/ABL; - E/ou evidência de t(4;11) ou gene <i>MLL-AF4</i> .
<b>IC-BFM 2002</b>	- SP no dia 8 (D8) da indução < 1.000 blastos/μL; - E idade ao diagnóstico maior ou igual a 1 ano e menor do que 6 anos; - Leucócitos ao diagnóstico < 20.000/μL; - E MO no dia 15 (D15) da indução M1 ou M2; - E MO no dia 33 (D33) da indução M1.	- SP no D8 da indução < 1.000 blastos/μL; - E idade ao diagnóstico < 1 ano ou ≥ 6 anos e/ou leucócitos ao diagnóstico ≥ 20.000/μL; - MO no D15 = M1 ou M2; - E MO no D33= M1 ou critérios risco "Standard", mas MO no D15 = M3; - MO no D33 = M1.	- Pelo menos um dos seguintes critérios: - RI e MO no D15= M3 (não risco <i>standard</i> e M3 no D15); - Blastos no SP no D8 ≥ 1.000 blastos/μL; - MO no D33 = M2 ou M3; - Presença da t(9;22) ou t(4;11)[ <i>MLL-AF4</i> ].
<b>IC-BFM 2009</b>	- SP no D8: <1.000 blastos/μL; - E idade ≥ 1 ano e < 6 anos; - E contagem inicial de leucócitos < 20.000/μL; - E se houver disponibilidade: DRM-CF < 0,1% ou MO M1/M2 no D15; - E M1 na MO do D33. - Todos os critérios devem ser preenchidos.	- Todos os pacientes que não forem estratificados como BR ou AR.	- RI e, se houver disponibilidade: DRM-CF >10% ou M3 na MO do D15; - BR e, se houver disponibilidade: DRM-CF > 10%; - SP no D8 ≥ 1.000 blastos/μL; - M2 ou M3 na MO do D33; - Translocação t(9;22) [BCR/ABL] ou t(4;11) [MLL/AF4];

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hipodiploidia <math>\leq 44</math>.</li> <li>- Somente um destes critérios já classifica como AR.</li> </ul>
--	--	--	---

NCI = National Cancer Institute; GBTLI = Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda na infância; BFM = grupo *Berlin-Frankfurt-Münster*; IC = Intercontinental; BR = baixo risco; RI = risco intermediário; AR = alto risco; MO = medula óssea; SP = sangue periférico; M1 =  $< 5\%$  blastos na MO; M2 = 5% a menos de 25% blastos na MO; M3 =  $\geq 25\%$  de blastos na MO; DRM = doença residual mínima; D8 = dia 8 da indução; D15 = dia 15 da indução.  
 Fonte: Adaptado de Smith *et al.*, 1996; Moricke *et al.*, 2008; Schrappe *et al.*, 2002; Schrappe *et al.*, 2009. 21; 22; 23; 24.

## 10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil é um país de proporções continentais e heterogêneo. Apesar disso, ainda são poucos os dados nacionais que demonstrem claramente como essa pluralidade afeta a apresentação e o prognóstico de doenças como a LLA. Dessa forma, trabalhos que busquem descrever melhor as características da LLA em nossa população e sua resposta ao tratamento são extremamente importantes.

Nosso estudo apresenta diversas limitações: trata-se de um estudo retrospectivo, com tamanho de amostra e um período de análise limitados. Apesar disso, os dados obtidos são relevantes para começarmos a entender como essa doença se apresenta e se comporta em nossa realidade.

Em nosso estudo, verificamos alguns dados discrepantes com relação aos descritos na literatura como uma maior porcentagem de pacientes classificados como alto risco na população estudada e uma sobrevida inferior. No que tange a avaliação da DRM do D15 da indução fica clara a sua importância principalmente na estratificação de risco do grupo mais favorável o que está de acordo com o descrito na literatura.

A tendência futura é um tratamento cada vez mais personalizado. Entretanto, ainda temos muito o que aperfeiçoar. Estudos mais amplos de preferência prospectivos são necessários no Brasil, para que possamos caracterizar de forma mais consistente os nossos dados e melhorar os nossos desfechos.

**APÊNDICE A – FICHA DE COLETA DE DADOS**

Identificação: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Gênero: ( ) 1 – M ( ) 2 – F

Data do diagnóstico: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

Leucócitos ao diagnóstico:

( ) 1 - < 20.000/mm<sup>3</sup>; ( ) 2 – 20.000 a 50.000/mm<sup>3</sup>; ( ) 3 - > 50.000/mm<sup>3</sup>

SNC:

( ) 1 – negativo; ( ) 2 – acidente; ( ) 3 – positivo

Morfologia ao diagnóstico:

( ) 1 – L1; ( ) 2 – L2; ( ) 3 – L3; ( ) 4 – não realizado.

Imunofenotipagem ao diagnóstico:

( ) 1 – LLA pró B;

( ) 2 – LLA B comum;

( ) 3 – LLA pré B;

( ) 4 - LLA B intermediária.

Citogenética:

( ) 1 – normal;

( ) 2 – alterado.

Se alterado, descrever: \_\_\_\_\_

( ) 3 – sem crescimento

( ) 4 – não realizado.

pH:

( ) 1 – positivo; ( ) 2 – negativo.

Biologia molecular: descrever se disponível

\_\_\_\_\_

Síndromes associadas:

( ) 1 – sim; ( ) 2 – não.

Se sim, descrever: \_\_\_\_\_

D8:

( ) 1 - < 1000 blastos em SP;

( ) 2 - > 1000 blastos em SP.

Morfologia D15:

( ) 1 – M1;

( ) 2 – M2;

( ) 3 – M3.

DRM D15:

( ) 1 – negativa;

( ) 2 – positiva 0,01% a 10%;

( ) 3 – positiva > 10%.

Morfologia D33/ D35:

( ) 1 – M1;

( ) 2 – M2;

( ) 3 – M3.

DRM D15:

( ) 1 – negativa;

( ) 2 – positiva 0,01% a 10%;

( ) 3 – positiva > 10%.

Protocolo:

( ) 1 – GBTLI 99;

( ) 2 – GBTLI 2009;

( ) 3 – BFM 95;

( ) 4 – IC BFM 2002;

( ) 5 – IC BFM 2009.

Estratificação de risco conforme NCI:

( ) 1 – BR; ( ) 3 – AR.

Estratificação de risco conforme cada protocolo:

Risco\_gbtli99:

( ) 1 – BR; ( ) 2 – RI; ( ) 3 – AR.

Risco\_gbtli2009:

( ) 1 – BR; ( ) 2 – RI; ( ) 3 – AR.

Risco\_BFM95:

( ) 1 – BR; ( ) 2 – RI; ( ) 3 – AR.

Risco\_BFM IC 2002:

( ) 1 – BR; ( ) 2 – RI; ( ) 3 – AR.

Risco\_BFM IC 2009:

( ) 1 – BR; ( ) 2 – RI; ( ) 3 – AR.

Situação Atual:

( ) 1 – Remissão completa;

( ) 2 – Em tratamento;

( ) 3 – Recidiva;

( ) 4 – Óbito;

( ) 5 – Refratário.

Recidiva:

( ) 1 – sim; ( ) 2 – não.

Se sim, data da recidiva: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Se sim, local da recidiva:

( ) 1 – MO;

( ) 2 – Testículo;

( ) 3 – SNC;

( ) 4 – MO + SNC;

( ) 5 – MO + linfonodos

Óbito:

( ) 1 – sim; ( ) 2 – não.

Se sim, data do óbito: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Data da última notícia: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

