

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOMOLECULAR DAS LEUCEMIAS LINFOIDES
AGUDAS TIPO B (LLA-B) EM CRIANÇAS NO ESTADO DO MARANHÃO E
ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS AO
PROGNÓSTICO NAS LLA *ETV6-RUNX1* POSITIVAS**

ANA LUIZA FARIAS SERPA

São Luís, MA

2019

ANA LUIZA FARIAS SERPA

CARACTERIZAÇÃO IMUNOMOLECULAR DAS LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS TIPO B (LLA-B) EM CRIANÇAS NO ESTADO DO MARANHÃO E ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS A RESPOSTA AO TRATAMENTO NAS LLA *ETV6-RUNX1* POSITIVAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Co-orientadora: Prof^a Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

São Luís, MA

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

SERPA, ANA LUIZA.

CARACTERIZAÇÃO IMUNOMOLECULAR DAS LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS TIPO B LLA-B EM CRIANÇAS NO ESTADO DO MARANHÃO E ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS AO PROGNÓSTICO NAS LLA ETV6-RUNX1 POSITIVAS / ANA LUIZA SERPA. - 2019.

73 f.

Orientador(a): Raimundo Antônio Gomes Oliveira Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. CD56. 2. CD9. 3. Clínica. I. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos, Raimundo Antônio Gomes Oliveira. II. Título.

ANA LUIZA FARIAS SERPA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOMOLECULAR DAS LEUCEMIAS LINFOIDES
AGUDAS TIPO B (LLA-B) EM CRIANÇAS NO ESTADO DO MARANHÃO E
ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS A RESPOSTA
AO TRATAMENTO NAS LLA *ETV6-RUNX1* POSITIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira
Doutorado em Análises clínicas – Hematologia – Orientador

Prof^o Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Doutorado em Anatomia dos animais domésticos e silvestres

Prof^o Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira
Doutorado em Ciências

Prof^a Dra. Elda Pereira Noronha Avila
Doutorado em Oncologia

“Tout passe, tout lasse, tout
casse et tout se remplace.”

Provérbio francês

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai que me passou os valores que hoje levo para toda minha vida e que estaria orgulhoso em me ver hoje concluindo essa nova etapa da vida, agradeço também a minha família que me deu sempre o devido suporte durante toda minha trajetória acadêmica;

Ao meu esposo, Carlos Arthur, pela paciência, carinho, amor e conversas que me auxiliaram a não desistir e ter calma e prudência nos momentos de crise, assim como toda a sua família pelo auxílio e compreensão sempre que precisei.

Ao meu orientador Prof. Raimundo Antônio Gomes Oliveira, assim como toda a equipe do Centro de Pesquisa Clínica – CEPEC - HUUFMA, pela confiança e auxílio dado em todos os momentos da pesquisa.

À professora Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos, pela confiança cega no meu trabalho e pelo auxílio incessante durante todas as etapas do mestrado, assim como toda a equipe do Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer, pela amizade, auxílio e confiança.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao CEPEC-HUUFMA, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	A leucemogênese e as leucemias.....	15
2.2	As leucemias linfóides agudas (LLA).....	16
2.3	A classificação das leucemias segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde).....	17
2.4	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância – 2009 (GBTLI – 09).....	19
2.5	Fatores prognósticos nas LLA.....	21
2.6	Alterações bioquímicas nas LLA.....	22
2.7	Alterações genéticas recorrentes nas LLA.....	23
2.8	<i>t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1</i>	25
2.9	Associações imunofenótipo-genético nas LLA.....	26
3.	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos.....	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.	RESULTADOS.....	37
6.	DISCUSSÃO.....	49
7.	CONCLUSÃO.....	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
	ANEXOS.....	63

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALT	Transaminase Glutâmico Pirúvico
AST	Transaminase Glutâmico Oxalacética
ALP	Fosfatase Alcalina
CEPEC-HUUFMA	Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
CD	Grupamento de diferenciação
EGIL	<i>European group for the immunological classification of leukemias</i>
E/R	<i>ETV6-RUNX1</i>
FAB	<i>French-American-British Cooperative Group</i>
GGT	Gama Glutamil-transferase
IMOAB	Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello
LLA	Leucemias linfoides agudas
LLA-B	Leucemia linfoide aguda do subtipo B
LLA-T	Leucemia linfoide aguda do subtipo T
LDH	Lactato desidrogenase
OMS	Organização Mundial de Saúde
QPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Principais vias de sinalizações afetadas pelo gene de fusão <i>ETV6-RUNX1</i> e suas características nas células leucêmicas	26
Figura 2:	Fluxograma representando as etapas do estudo	32
Figura 3:	Alterações moleculares dos genes de fusão nas leucemias linfoides agudas tipo B (LLA-B).	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Caracterização clínico-laboratorial a partir da classificação imunofenotípica dos 34 pacientes atendidos no CEPEC-HUUFMA no ano de 2018.....	38
Tabela 2:	Caracterização clínica e imunofenotípica dos 29 pacientes classificados imunofenotípicamente como LLA-B atendidos no CEPEC-HUUFMA no ano de 2018.....	41
Tabela 3:	Caracterização imunofenotípica dos pacientes com LLA-B, positivos e negativos para <i>ETV6-RUNX1</i> atendidos no CEPEC-HUUFMA no ano de 2018.....	42
Tabela 4:	Caracterização dos marcadores imunofenotípicos associados aos genes de fusão dos pacientes com LLA-B, positivos e negativos para <i>ETV6-RUNX1</i> atendidos no CEPEC-HUUFMA no ano de 2018.....	43
Tabela 5:	Avaliação do tratamento dos pacientes LLA-B positivos e negativos para o gene <i>ETV6-RUNX1</i> de acordo com os dias de avaliação da resposta ao tratamento.....	44
Tabela 6:	Caracterização dos pacientes <i>ETV6-RUNX1</i> positivos e negativos de acordo com os parâmetros bioquímicos.....	46
Tabela 7:	Caracterização clínica, imunofenotípica e de resposta ao tratamento dos pacientes LLA-B <i>ETV6-RUNX1</i>	47

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1:	Classificação da OMS para as LLA.....	18
Quadro 2:	Critérios utilizados para inclusão dos pacientes de LLA pediátrico nos grupos de alto e baixo risco definidos pelo GBTLI 2009.....	19
Quadro 3:	Principais anormalidades genéticas primárias, prognóstico e imunofenótipo associado.....	28
Quadro 4:	Descrição dos painéis utilizados para definição dos subtipos de LLA.....	33
Quadro 5:	Descrição dos parâmetros bioquímicos analisados e suas metodologias.....	34

RESUMO

Introdução: As leucemias linfoides agudas (LLA) constituem 25% dos casos de cânceres pediátricos e são divididas em LLA-T e LLA-B, sendo o último subtipo mais frequente. As LLA-B são classificadas pela presença genes de fusão, tendo destaque o *ETV6-RUNX1*(E/R) devido a sua presença em 25% dos casos de LLA-B e sua associação a um prognóstico incerto. Este estudo objetivou caracterizar as LLA-B no Estado do Maranhão, assim como associar parâmetros imunomoleculares e bioquímicos ao prognóstico dos pacientes LLA-B E/R positivas. **Material e métodos:** trinta e quatro pacientes oriundos do centro de referência do estado Maranhão tiveram dados clínicos, morfológicos, laboratoriais e imunofenotípicos cadastrados em um banco de dados para posterior associação. Após caracterização molecular, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (QPCR), os pacientes foram estratificados pela presença ou não dos genes de fusão: *MLL-AF4*, *BCR-ABL* (p190), *E/R* e *TCF3-PBX1*. No grupo positivo para o gene E/R foi feita a associação entre prognóstico com dados imunofenotípicos e bioquímicos, tendo como grupo de comparação pacientes *ETV6-RUNX1* negativos, sem excluir a ausência de outros genes de fusão. **Resultados:** Dos 34 pacientes estudados inicialmente, 29 foram classificados como LLA-B e 5 como LLA-T. A frequência dos genes de fusão nos pacientes com LLA-B foi de 38% (n=11) E/R, 21% (n=6) *TCF3-PBX1* e 41% (n=12) negativo para os genes de fusão estudados. A faixa etária média dos pacientes E/R positivos foi de $3,7 \pm 3,4$ anos enquanto nos pacientes negativos foi de $4,9 \pm 3,5$ anos. Os subtipos das LLA-B E/R encontrados foram a LLA-B comum em 72,7% (n=8) e 27,3% (n=3) de LLA pré-B. Dentre os parâmetros bioquímicos analisados, não houve diferença entre os grupos analisados. Em relação aos marcadores imunofenotípicos aberrantes e/ou ligados a genes de fusão analisados em ambos os grupos, não houve diferença, entretanto os marcadores CD56 e CD9 estiveram expressos entre os pacientes E/R. Em referência ao prognóstico dos pacientes E/R durante a avaliação de resposta ao tratamento, observou-se que 3 dos 5 pacientes CD9⁺ e 2 dos 3 pacientes CD56⁺ tiveram respostas ruins em algum dos pontos de checagem de resposta tratamento. Além disso, observou-se 27,3% (n=3) dos casos evoluíram para óbito e destes 2 expressavam CD9 e 1 expressava CD56.

Conclusão: De acordo com os resultados, realizamos pela primeira vez a caracterização das alterações moleculares recorrentes das LLA-B no Estado do Maranhão e observamos que os pacientes positivos para o gene de fusão E/R podem apresentar um desfecho clínico variável de acordo com os perfis imunofenotípicos encontrados.

Palavras-chaves: clínica; CD9; CD56.

ABSTRACT

Introduction: Acute lymphoid leukemias (ALL) constitute 25% of cases of pediatric cancers and are divided into T-ALL and B-ALL, the latter being the most frequent subtype. The B-ALL is classified by the presence of fusion genes, highlighting ETV6-RUNX1 (E / R) due to its presence in 25% of cases of B-ALL and its association with an uncertain prognosis. This study aimed to characterize the B-ALL in the State of Maranhão, as well as to associate immunomolecular and biochemical parameters with the prognosis of patients with ALL-B E/R positive. **Material and methods:** Thirty four patients from the reference center of the state of Maranhão had clinical, morphological, laboratory and immunophenotypic data recorded in a database for later association. After molecular characterization by PCR, the patients were stratified by the presence or absence of the fusion genes *MLL-AF4*, *BCR-ABL* (p190), E/R and *TCF3-PBX1*. In the positive group for the E/R gene, the association between prognosis with immunophenotypic and biochemical data was made, having as a comparison group negative *ETV6-RUNX1* patients, without excluding the absence of other fusion genes. **Results:** Of the 34 patients initially studied, 29 were classified as B-ALL and 5 as T-ALL. The frequency of fusion genes in patients with B-ALL was 38% (n = 11) E/R, 21% (n = 6) TCF3-PBX1 and 41% (n = 12) negative for the fusion genes studied. The mean age of the positive E / R patients was 3.7 ± 3.4 years whereas in the negative patients it was 4.9 ± 3.5 years. The subtypes of ALL-B E/R found were common B-ALL in 72.7% (n = 8) and 27.3% (n = 3) of pre-B ALL. Among the biochemical parameters analyzed, there was no difference between the analyzed groups. In relation to the aberrant and / or fusion-immunofenotypic markers analyzed in both groups, there was no difference, however the CD56 and CD9 markers were expressed among the E/R patients. Regarding the prognosis of the E/R patients during the evaluation of response to treatment, it was observed that 3 of the 5 CD9 + patients and 2 of the 3 CD56 + patients had poor responses at some of the treatment response checkpoints. In addition, 27.3% (n = 3) of the cases evolved to death and of these 2 expressed CD9 and 1 expressed CD56. **Conclusion:** According to the results, we performed for the first time the characterization of the recurrent molecular alterations of B-ALL in the State of Maranhão and we observed that patients positive for the E/R fusion gene can present a clinical outcome variable according to the immunophenotypic profiles.

Keywords: clinic; CD9; CD56.

1.INTRODUÇÃO

As leucemias linfoides agudas (LLA) são as neoplasias mais comuns na infância compreendendo 25 a 30% dos casos da faixa etária até 15 anos de idade (BHOJWANI et al., 2015). É caracterizada pelo bloqueio maturativo e proliferação de células precursoras da linhagem linfóide após sofrerem alterações genético-moleculares específicas (JULIUSSON; HOUGH, 2016). Esta doença é dividida em dois subgrupos de acordo com os marcadores imunofenotípicos expressos em cada fase maturativa, as LLA do subtipo B que podem ser divididas em LLA-B-I, B-II, B-III ou B-IV e as LLA-T que são divididas em LLA-TI, T-II, T-III ou T-IV (HUNGER; MULLIGHAN, 2015), sendo o subtipo LLA-B-II mais frequente em pacientes pediátricos (BONGIOVANNI et al., 2017).

No ano de 2016 a Organização Mundial de Saúde (OMS) atualizou a classificação vigente das LLA que utiliza critérios imunológicos, além de dividir as LLA de acordo com alterações genético-moleculares recorrentes: *t(9;22)(q34.1;q11.2)*, *BCR-ABL1*; *t(v;11q23.3)*, rearranjo do gene *KMT2A*; *t(12;21)(p13.2;q22.1)*, *ETV6-RUNX1*; hiperdiploidia; hipodiploidia; *t(5;14)(q31.1;q32.3)*, *IL3-IGH*; *t(1;19)(q23;p13.3)* *TCF3-PBX1*; *BCR-ABL1-like* e *iAMP21* (ARBER et al., 2016) sendo cada uma dessas alterações relacionadas a diferentes prognósticos.

O gene de fusão *ETV6-RUNX1* é a alteração genética mais frequente nas LLA sendo identificada em 25 a 40% dos casos (BHOJWANI et al., 2015; MALOUF; OTTERSBAACH, 2018), sendo associada a um bom prognóstico, no entanto dados recentes da literatura apontam que os pacientes *ETV6-RUNX1* positivos apresentam heterogeneidade clínica no que diz respeito à sua evolução e tratamento (MALOUF; OTTERSBAACH, 2018; AMPATZIDOU, 2018). Devido à sua frequência, pesquisas tentam identificar de forma precoce a presença deste gene, como o perfil de marcadores imunofenotípicos que está associada ao *ETV6-RUNX1* como a expressão dos marcadores CD24, CD13 e CD33 e a ausência de expressão de NG2, CD66c, CD9 e CD15 (HRUŁÁK et al., 2002; KATO; MANABE, 2018), a presença destes marcadores podem auxiliar na identificação desta alteração assim como também, podem indicar o mau prognóstico como é o caso do CD9 (MOYA; PIO, 2015; LIU et al., 2016).

Nosso grupo foi o primeiro a implantar e realizar a caracterização imunofenotípica das leucemias no Maranhão, e devido a isso caracterizou de modo pioneiro no estado as leucemias infantis em pacientes atendidos no centro de referência em oncologia pediátrica (NORONHA et al., 2011) e também realizou um estudo visando caracterizar a expressão antígenos aberrantes nas LLA no estado do Maranhão (LOPES et al., 2014). Dando continuidade aos estudos já feitos pela nossa equipe com pacientes leucêmicos pediátricos, estamos caracterizando molecularmente as leucemias, mais exatamente analisando a frequência dos genes de fusão recorrentes preconizados pela OMS, em especial o gene *ETV6-RUNX1* devido a sua frequência nas LLA e aspectos clínicos heterogêneos (SUN et al., 2017; MALOUF; OTTERSBAACH, 2018).

Assim, nosso estudo que visou encontrar associações entre marcadores precoces, como é o caso dos parâmetros laboratoriais e marcadores imunofenotípicos e o gene de fusão *ETV6-RUNX1* para auxiliar na identificação de um desfecho desfavorável dos pacientes que apresentarem esta alteração genética.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A leucemogênese e as leucemias

As leucemias correspondem a um grupo heterogêneo de neoplasias que se originam em células hematopoéticas na medula óssea após sofrerem lesões genético-moleculares específicas em genes associados a proliferação, diferenciação, maturação e/ou apoptose celular (WEINBERG, 2008; OLIVEIRA et al., 2016), sendo classificadas de acordo com a linhagem celular afetada e seu estágio maturativo (JULIUSSON; HOUGH, 2016).

A classificação das leucemias leva em consideração dois critérios: 1) a linhagem hematopoética afetada, podendo ser dos subtipos mieloides, linfoides e linhagem ambígua; e 2) suas características maturativas adquiridas, sendo divididas em agudas e crônicas (OLIVEIRA; POLI-NETO, 2004; OLIVEIRA et al., 2016; ARBER et al., 2016).

Para que haja o desenvolvimento desta doença, existe o processo de transformação de uma célula normal para uma célula neoplásica que é denominado como leucemogênese (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

Este evento ocorre a partir de lesões iniciadoras ou anormalidades primárias, que podem ser motivadas por fatores intrínsecos ou extrínsecos à célula, sendo as mais comuns as translocações cromossômicas ou as grandes aneuploidias (número de cromossomos anormais) (GREAVES; WIEMELS, 2003). Em seguida, ocorrem as anormalidades secundárias que são comumente mutações pontuais ou alterações de números de cópias cromossômicas. (GREAVES et al., 2003; MOORMAN, 2016).

As anormalidades primárias definem as características principais e o subtipo celular da leucemia. As alterações secundárias são relacionadas às manifestações da doença. (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

2.2 As leucemias linfoides agudas

As leucemias linfoides agudas (LLA) são neoplasias causadas por anormalidades genéticas primárias e secundárias nas células precursoras da linhagem linfóide. São subdivididas em B (LLA-B) ou T (LLA-T). Esta doença é mais frequente na infância, sendo as LLA-B presentes em 85% dos casos e as LLA-T em 15% dos casos de LLA pediátrica no mundo (BONGIOVANNI et al., 2017). As LLA representam 25% de todas as neoplasias, sendo o câncer mais comum da infância (BHOJWANI et al., 2015).

A incidência das LLA é de 1 a 1,5 por 100 mil habitantes e o pico se dá nas idades de 2 a 5 anos, com outro pico menos frequente a partir dos 50 anos (FADERL et al., 2010). No Brasil, a prevalência das LLA é de 53,3 casos por milhão de habitantes. No entanto, esta prevalência pode ser variável quando comparamos as diversas regiões do país devido aos diferentes perfis sócio-demográficos que são observados dentre as cidades brasileiras (REIS et al., 2011).

As LLA tiveram um aumento das taxas de cura com o passar dos anos, as taxas, dos anos de 1990 e 2000, foram respectivamente de 83% e 90%, isso se deve às alterações nos protocolos de tratamento com quimioterápicos levando em consideração aspectos individuais, assim como a descobertas de novas terapias (SOUSA et al., 2015). No entanto, a taxa de recidiva desta doença ainda é de 20%, e em 86% dos casos é relacionada a uma doença mais agressiva, pela presença de um subclone mais resistente selecionado pelo tratamento quimioterápico e que, por

vezes, apresenta outras alterações genéticas ausentes no momento do diagnóstico (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014).

A anamnese e diagnóstico clínico são critérios fundamentais para a identificação de algumas características que podem estar relacionada a uma doença mais agressiva e podem ser utilizados para classificar os pacientes entre aqueles que apresentam um prognóstico favorável onde as taxas de resposta ao tratamento são maiores assim como a taxa sobrevida do pacientes, e aqueles com prognóstico desfavorável que apresentam taxas de resposta e sobrevida menores (OLIVEIRA et al., 2016).

2.3 A classificação das leucemias

A classificação da OMS passou por várias edições, sendo que a última classificação realizada em 2016 que foi uma revisão e atualização da sua quarta edição de 2008. Sua principal característica é manutenção dos dados de outras classificações, porém incorporando “novos” dados com impacto para definir diagnóstico, e principalmente o prognóstico, estratificação de risco e tratamento dos pacientes com leucemias (ARBBER et al., 2016).

Os critérios utilizados vão desde dados clínicos (doença primária ou secundária) com ou sem associação a outras síndromes genéticas, morfológicos (presença ou não de displasias e definição da porcentagem de blastos), subtipo imunológico (linfoide, mieloide ou híbrido), e suas alterações genético-moleculares específicas. Como protocolo de acompanhamento são indicados a realização da dosagem de ácido úrico, cálcio, fosfato e desidrogenase láctica do diagnóstico até o tratamento dos pacientes para monitorização da síndrome de lise tumoral (TERWILIGER; ABDUL-HAY, 2017).

A OMS subdivide as LLA de acordo com as anormalidades genéticas presentes (quadro 1), essas subdivisões são importantes no prognóstico e tratamento dos pacientes, sendo que cada uma destas divisões tem seus fatores de risco e tratamento associados (ARBBER et al., 2016).

Quadro 1. Classificação da OMS para as LLA.

Leucemia/linfoma linfoblástico B (LLA-B)
Leucemia/linfoma linfoblástico B, SOE
Leucemia/linfoma linfoblástico B, com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q23); <i>KMT2A</i> rearranjado
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22); <i>ETV6-RUNX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31;q32); <i>IL3/IGH</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástico B, <i>BCR-ABL1</i> -like
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástico B com <i>iAMP21</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico T (LLA-T)
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástico T Precursora
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástico de células matadoras naturais
SOE: sem especificação prévia. Modificado de: Arber et al.(2016).

2.4 Grupo Brasileiro de Tratamento da leucemia na Infância - 2009

No início dos anos 80 houve o surgimento do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância tendo como principal objetivo a realização de um protocolo único para o tratamento das LLA, houve vários estudos para definição deste, desde o ano de 1982 até o ano de 2009, que é o protocolo mais atual deste grupo de tratamento (LEE; PETRILLI, 2004; GBTLI, 2011).

Este protocolo é utilizado pelos principais centros de tratamento de leucemias infantis do país e usa alguns fundamentos de outras classificações mundiais de LLA para basear a sua diretriz.

O primeiro ponto importante desta instrução de tratamento é a divisão dos pacientes em grupo de alto risco e grupo de baixo risco (quadro 2). A influência dessas subdivisões está relacionada diretamente ao tratamento que será utilizado e suas dosagens (CAZÉ et al., 2010).

Quadro 2. Critérios utilizados para inclusão dos pacientes de LLA pediátrico nos grupos de alto e baixo risco definidos pelo GBTLI 2009.

GRUPO DE ALTO RISCO	GRUPO DE BAIXO RISCO
Subtipo imunofenotípico T	Subtipo imunofenotípico B
Idade menor que 1 ano e maior que 10 anos	Idade maior ou igual a 1 ano e menor de 10 anos
Contagem global de leucócitos maior que 50.000/mm ³ ao diagnóstico	Contagem global de leucócitos menor que 50.000/mm ³ ao diagnóstico
Contagem de blastos em sangue periférico (no hemograma) maior que 1.000/mm ³ no dia 8 do tratamento	Contagem de blastos em sangue periférico (no hemograma) menor que 1.000/mm ³ no dia 8 do tratamento
Contagem de blastos em medula óssea maior que 0,01% (por citometria de fluxo) no dia 15 do tratamento	Contagem de blastos em medula óssea menor que 0,01% (por citometria de fluxo) no dia 15 do tratamento
Contagem de blastos em medula óssea maior que 0,01% (por citometria de fluxo) no dia 35 do tratamento	Contagem de blastos em medula óssea menor que 0,01% (por citometria de fluxo) no dia 35 do tratamento
Com comprometimento do sistema nervoso central	Sem comprometimento do sistema nervoso central.
<i>BCR-ABL</i> , rearranjo <i>MLL</i> e hipodiploidia < 44 cromossomos	Não constam associações moleculares neste grupo

Os tratamentos quimioterápicos tradicionais são divididos em três fases: 1) *fase de indução da remissão*, tem como principal objetivo a diminuição da sintomatologia associada a doença e redução da contagem de blastos à menos de 5% do total de células nucleadas na contagem feita a partir da amostra de medula óssea, levando de 4 a 6 semanas; 2) *fase de consolidação da remissão*, tem 3 subfases com a função de erradicar aquelas células neoplásicas residuais, primeira subfase dura 2 semanas, a segunda subfase chamada de intensificação que tem a duração de 8 semanas e a terceira subfase chamada de consolidação tardia que dura 8 semanas; 3) *fase de manutenção*, é a fase mais longa, tendo duração de 1 ano e meio e tem o objetivo de diminuir o risco de recidiva e tem dosagens menos intensas de quimioterápicos (INABA et al., 2013; COOPER; BROWN, 2015).

Os pacientes são avaliados clínico e laboratorialmente no decorrer do tratamento para verificação de sua resposta aos medicamentos, sendo que a qualquer momento um paciente que inicialmente tiver sido agrupado no risco baixo poderá ser redirecionado para o grupo de risco alto caso estas verificações constatem critérios para este direcionamento (anexo E). As avaliações à resposta ao tratamento ocorrem a partir da contagem absoluta (/mm³) de blastos no sangue periférico no 8º dia do tratamento e pela avaliação da doença residual mínima (resíduos de blastos neoplásicos na medula óssea por citometria de fluxo ou biologia molecular) nos dias 15 e 35 do tratamento. Estas datas variam de acordo com os centros, mas sem exceder de forma aberrante esta verificação.

A doença residual mínima (DRM) é definida como uma quantidade ínfima de células neoplásicas, que não podem ser detectadas pelas técnicas tradicionais de análise, devendo ser realizada com auxílio de técnicas mais refinadas como citometria de fluxo para identificação do imunofenótipo associado às células neoplásicas ou PCR quantitativo para avaliação da presença de genes de fusão específicos dos blastos doentes. O ponto de corte utilizado para a avaliação da DRM no dia 15 e 35 por citometria de fluxo é de 0,01% de células neoplásicas (CAMPANA, 2012).

2.5 Fatores prognósticos nas LLA

Os fatores clínicos são importantes para a definição da resposta ao tratamento dos pacientes, algumas classificações utilizam estes critérios para até mesmo modificar o tratamento, alguns fatores de prognóstico podem ser mais relevantes que outros (anexo F). O prognóstico nas LLA pode ser definido como favorável e desfavorável, sendo relacionados a uma doença menos responsiva e menor sobrevida e a uma melhor resposta ao tratamento e maior sobrevida, respectivamente. Os principais fatores utilizados para definir prognóstico nas LLA são idade ao diagnóstico, contagem de leucócitos ao diagnóstico, imunofenótipo e a presença de algumas alterações genéticas (MOORMAN, 2015).

A idade é um fator de prognóstico ruim quando é inferior a um ano e superior a dez anos ao diagnóstico, pois nesta faixa etária ocorrem com maior frequência alterações genéticas que são caracteristicamente ligadas a uma doença mais agressiva. Outro fator importante é a contagem de leucócitos ao diagnóstico superior a $50.000/\text{mm}^3$ devido a sua relação com alto risco de recidiva da LLA. O imunofenótipo T está relacionado a uma pior resposta ao tratamento, além de normalmente apresentar outros fatores de mau prognóstico associados como contagem de glóbulos brancos e idade < 1 ano ou > 10 anos. Por fim, as alterações genéticas como hipodiploidia, *BCR-ABL1* e rearranjos do gene *KMT2A* estão associadas a uma doença mais agressiva e a um maior risco de recidiva (VROOMAN; SILVERMAN, 2016).

2.6 Alterações bioquímicas nas LLA

Os exames bioquímicos são realizados durante o diagnóstico e seguimento do tratamento, sendo importantes no controle da toxicidade ao tratamento e verificação da evolução da doença, podendo ser um importante indicativo do prognóstico dos pacientes (INCA, 2001).

Os exames bioquímicos de rotina dos pacientes de LLA são as dosagens dos eletrólitos (sódio, potássio, cloretos, cálcio e fósforo) que podem ser indicativos de

desidratação, edemas, hipo ou hiperna-tremia; a dosagem de alanina e aspartato transferase, para a avaliação da função hepática e adequação ou não das concentrações de quimioterápicos no tratamento das LLA (MOTTA, 2009); a dosagem de ácido úrico e desidrogenase láctica para verificação principalmente da evolução da doença, pois são metabólitos relacionados à morte celular, seu aumento pode estar relacionado com a morte das células, podendo ser indicativo de altas taxas proliferativas ligadas às células neoplásicas (MOTTA, 2009); a dosagem de β 2-microglobulina, enolase neuronal específica e vitamina B12 estão relacionadas à proliferação celular neoplásica e assim a efetividade do tratamento quimioterápico, sendo fatores de prognóstico já reconhecidos nas leucemias mieloides agudas e mielodisplasias. As alterações de marcadores bioquímicos são decorrentes das modificações que ocorrem em nível celular (Anexo D) (DOKWAL et al., 2016).

Alguns estudos tentaram relacionar estas mudanças com a presença de alterações genético-moleculares nas LLA. O estudo por Liu et al.(2016) não encontrou relação entre o aumento da enzima enolase neuronal específica com a alteração no gene *BCR-ABL1* nas LLA-B, no entanto comprovou que esse marcador é preditivo para uma doença mais agressiva.

Outro estudo realizado por Moya e Pio (2015) descreveu que as enzimas ALT, AST, ALP, GGT e LDH se encontram aumentadas em pacientes com LLA antes da realização do tratamento quimioterápico convencional, demonstrando a importância da dosagem desses parâmetros como marcadores da doença e da sua evolução.

2.7 Alterações genéticas recorrentes nas LLA

As principais alterações genéticas presentes nas LLA são as translocações cromossômicas, onde ocorre a união de dois trechos de cromossomos distintos formando um cromossomo híbrido ou gene de fusão; e as alterações no número de cópias de cromossomos que podem ser por aumento do número de cromossomos (as hiperdiploidias) ou por diminuição (as hipodiploidias) (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

As anormalidades genéticas recorrentes utilizadas pela OMS para classificação das LLA-B são: *t(9;22) (q34.1;q11.2), BCR-ABL1; t(v;11q23.3)*, rearranjo do gene *KMT2A; t(12;21) (p13.2;q22.1), ETV6-RUNX1*; hiperdiploidia; hipodiploidia; *t(5;14) (q31.1;q32.3), IL3-IGH; t(1;19) (q23;p13.3), TCF3-PBX1; BCR-ABL1-like e iAMP21*, atualmente não existem consenso em relação às alterações genéticas que influenciem no prognóstico dos pacientes com LLA-T e devido isso não são utilizadas na classificação deste subtipo de LLA (tabela 3) (ROBERTS; MULLIGHAN., 2015; ARBER et al., 2016).

Dentre as alterações genéticas mais frequentes nas LLA-B pediátricas pode-se citar a hiperdiploidia em 30% casos, seguida das alterações *BCR-ABL like* em 15 a 20% dos casos, o gene de fusão *ETV6-RUNX1* em até 25% dos casos de LLA-B, o gene de fusão *MLL-AF4* que tem uma frequência de 85% nos casos de pacientes menores de 1 ano de idade. Posteriormente, com menores frequências tem-se o gene de fusão *TCF3-PBX1* em 6% dos casos, *BCR-ABL1* em 3% dos casos e a hipodiploidia em 2 % dos casos de LLA-B infantis (MALOUF; OTTERSBAACH, 2018).

As hiperdiploidias são definidas pelo aumento do número de cromossomos, esta alteração é relacionada a um prognóstico favorável devido a responderem bem aos tratamentos que inclui metrotexato (ROBERTS; MULLIGHAN, 2015; HAKEEM et al.,2015). Outra alteração genética relacionada ao número de cromossomos são as hipodiploidias que são definidas quando a contagem de cromossomos na célula é menor que 44. Pode ser dividida em 4 grupos: “*Near-aploidia*” quando a contagem de cromossomos é de 24 a 29; “*low-hipodiploidia*” quando a contagem de cromossomos é de 33 a 39; “*High-hipodiploidia*” quando a contagem de cromossomos é de 40 a 43; e “*Near-diploidia*” quando a contagem de cromossomos é 44 (JIMÉNEZ-MORALES et al., 2017).

Em seguida, temos as alterações reconhecidas com *BCR-ABL1 like*, definidas como mutações que apresentam o mesmo perfil de ativação de vias de sinalização que ocorrem com o gene de fusão *BCR-ABL1*, os produtos destas anormalidades genéticas são proteínas com atividade tirosina quinase assim como o *BCR-ABL1* (BOER et al., 2017). Essas alterações são associadas a um prognóstico ruim com

altas taxas de morte e de recidiva, caso sejam tratados com as quimioterapias tradicionais (BOER et al., 2009; ROBERTS; MULLIGHAN, 2015).

O gene de fusão *TCF3-PBX1*, também conhecido como *E2A-PBX1* é originado pela translocação do gene *PBX1* localizado no cromossomo 1 com o gene *E2A* localizado no cromossomo 19 (PANG et al., 2015). Essa alteração dá origem a um fator *helix-loop-helix* que pertence à família das proteínas ligantes E-box, estas proteínas são importantes no desenvolvimento da célula B, esta alteração é classificada como relacionada a um mau prognóstico (SERA et al., 2016)

O rearranjo do gene *KMT2A* também conhecido como rearranjo do gene *MLL*, é ligado a um prognóstico de alto risco sendo associada à resistência ao tratamento, infiltração do sistema nervoso (BUENO et al., 2011) e as taxas de recidiva e morte são maiores nos pacientes que carregam esse gene de fusão (SANJUAN-PLA et al., 2018). Esta alteração está presente em todas as idades, sendo mais frequente em pacientes menores de um ano de idade (MOORMAN, 2016).

O cromossomo Philadelphia (Ph) que é formado pela translocação de uma porção *ABL1* localizada cromossomo 9 e de uma porção *BCR* localizada cromossomo 22 dá origem ao gene de fusão *BCR-ABL1* (BHOJWANI et al., 2015). Esta anormalidade é uma das mais conhecidas nas leucemias devido ao direcionamento dos tratamentos com terapia alvo (através de inibidores de tirosina quinase), e a sua ampla frequência nas leucemias, já foram descritas a presença deste gene nas LLA tanto o subtipo B quanto T, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica e leucemia de fenótipo misto (KANG et al., 2016).

No entanto, dentre todos os genes de fusão LLA-B infantis, a alteração *ETV6-RUNX1* é a mais frequente nas LLA-B e devido ao prognóstico controverso e heterogeneidade de apresentações clínicas, tem-se mostrado importante nesta doença.

2.9 *ETV6-RUNX1*

Esta anormalidade cromossômica, antes conhecida como *TEL-AML1*, ocorre em 25% de todas LLA de faixa etária de 2 a 10 anos e em pacientes com o subtipo

LLA-B (BHOJWANI et al., 2015). Alguns estudos demonstram a associação da presença desse gene de fusão com um bom prognóstico e outros relatam a ocorrência de 20% de casos de recidiva em pacientes positivos para *ETV6-RUNX1* (MALOUF; OTTERSACH, 2018).

Essa alteração genética ocorre ainda na fase pré-natal sendo a anormalidade genética primária que necessita de outras mutações pontuais ou microdeleções em vias de sinalizações específicas para levar a manifestação da LLA-B (figura 2) (SUN et al., 2017).

As translocações cromossômicas envolvendo o gene *ETV6* estão presentes em várias doenças hematológicas e podem estar associados com vários genes, no entanto a mais comum é a translocação com o gene *RUNX1*. Estes genes codificam fatores de transcrição indispensáveis para a regulação da hematopoese (SOOD et al., 2018). Esta anormalidade está normalmente relacionada a trombocitopenia e ao tamanho dos eritrócitos que pode ser normal ou aumentado (HOCK; SHIMAMURA, 2017).

A parte do gene de fusão *ETV6* funciona como um repressor da transcrição de alguns fatores importantes em vias como JAK2-STAT5, PI3K/AKT/mTOR e devido a isso pode influenciar a atividade apoptótica e de proliferação celular, já a parte *RUNX1* tem a função de ativação de fatores em algumas outras vias como TGF- β , relacionadas principalmente à proliferação celular (figura 2) (SUN et al., 2017).

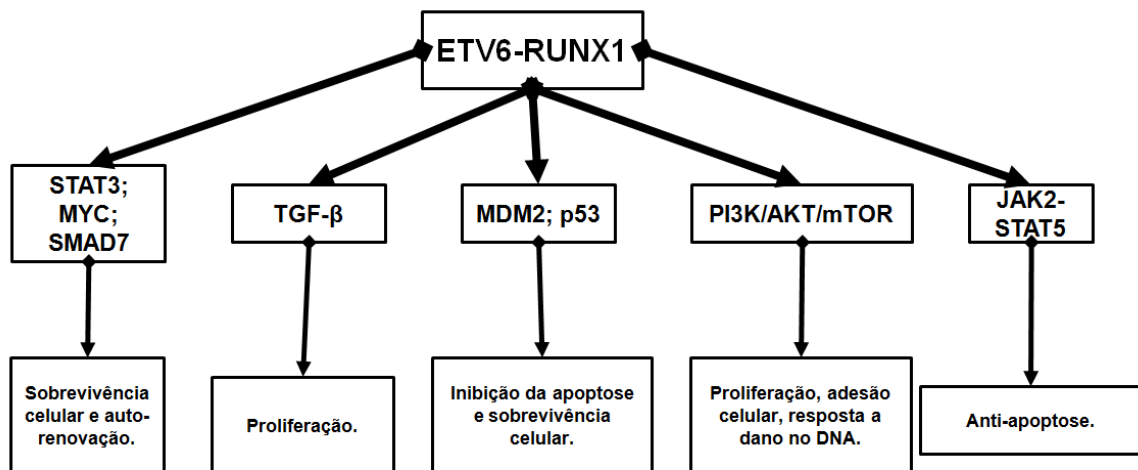


Figura 1. Principais vias de sinalizações afetadas pelo gene de fusão *ETV6-RUNX1* e suas características nas células leucêmicas. Algumas das principais alterações nas células *ETV6-RUNX1* são relacionadas a modificações no perfil de sinalização causadas pela presença do gene de fusão que levam a alterações celulares diversas. Modificado de Sun et al.(2017).

As características imunofenóticas associadas a esta anormalidade genética são o CD66c negativo, CD13 positivo, CD33 positivo, CD9 negativo, CD24 positivo e NG2 negativo (HRUŁÁK et al., 2002; KATO; MANABE, 2018).

2.9 Marcadores imunofenóticos nas LLA

Os marcadores imunofenóticos relacionados tanto a ontogenia da linhagem linfóide são importantes na definição do prognóstico das LLA por esclarecer o subtipo, estágio maturativo, de diferenciação e de ativação das células leucêmicas. Desta forma, pode-se definir um dos critérios de alto risco para as LLA que é o subtipo de linhagem T (LLA-T) (TOVAR; ZERÓN, 2016).

Assim, classifica-se imunofenoticamente cada uma das leucemias linfóides de acordo com a expressão de marcadores protéicos em cada uma das fases maturativas destas células, sejam do subtipo T ou B.

Também devem ser pesquisadas outras proteínas pertencentes a outras linhagens (anexo F) pois existem possibilidades de expressão anômala por parte das células neoplásicas e estas expressões podem estar relacionadas com presença de alterações genético-moleculares (quadro 3). Alguns marcadores

comumente encontrados nas LLA são o CD13 e CD33 que são marcadores da linhagem mieloide, os quais podem ser úteis na identificação do clone neoplásico em comparação com clones normais que não expressam aberração maturativa, além desses dois marcadores terem relação com a presença do gene de fusão *ETV6-RUNX1* (HRUŁÁK et al., 2002; LOPES et al., 2014).

Quadro 3. Principais anormalidades genéticas primárias, prognóstico e imunofenótipo associado.

Anormalidade genética primária	Prognóstico	Imunofenótipo associado	Fontes
(12;21) (p13;q22) <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i>	Bom	CD9 negativo; CD13 positivo; CD33 positivo; NG2 negativo; CD66c negativo;	HRUŁÁK 2002; MOORMAN, 2016; JIMÉNEZ-MORALES et al., 2017; KATO; MANABE, 2018
Hiperdiploidia	Bom	CD19 positivo; CD13 negativo; CD33 negativo; NG2 negativo; CD66c positivo;	HRUŁÁK 2002; MOORMAN, 2016; JIMÉNEZ-MORALES et al., 2017; KATO; MANABE, 2018
<i>t(1;19) (q23;p13.3) TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)</i>	Bom	CD19 positivo; CD9 positivo; CD13 negativo; CD33 negativo; NG2 negativo; CD66c negativo;	HRUŁÁK 2002; MOORMAN, 2016; JIMÉNEZ-MORALES et al., 2017; KATO; MANABE, 2018
<i>t(5;14) (q31;32) IL3-IGH</i>	Bom	CD19 positivo; CD10 positivo	HRUŁÁK 2002; MOORMAN, 2016; JIMÉNEZ-MORALES et al., 2017; KATO; MANABE, 2018
<i>t(9;22) (q34;q11) BCR-ABL</i>	Ruim	CD13 positivo; CD33 positivo; CD19 positivo; CD24 positivo; CD66c positivo; NG2 negativo;	HRUŁÁK 2002; MOORMAN, 2016; JIMÉNEZ-MORALES et al., 2017; KATO; MANABE, 2018
Hipodiploidia	Ruim	Não foi encontrado perfil imunofenotípico associado;	HRUŁÁK 2002; MOORMAN, 2016; JIMÉNEZ-MORALES et al., 2017; KATO; MANABE, 2018

t(v;11q23) MLL-AF4	Ruim	CD19 positivo; CD13 negativo; CD33 negativo; CD9 positivo; CD24 negativo; CD66c negativo; NG2 positivo ;	HRUŁÁK 2002; MOORMAN, 2016; JIMÉNEZ-MORALES et al., 2017; KATO; MANABE, 2018
-------------------------------------	------	--	--

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os aspectos imunomoleculares das LLA-B em pacientes pediátricos no estado do Maranhão e associar parâmetros clínico-laboratoriais ao prognóstico nas LLA-B *ETV6-RUNX1* positivas.

3.2 Objetivos Específicos

Caracterizar o perfil clínico-laboratorial dos pacientes pediátricos LLA *ETV6-RUNX1* no estado do Maranhão

Caracterizar o perfil imunofenotípico das LLA *ETV6-RUNX1* no centro de referência regional em oncologia pediátrica.

Associar os resultados clínicos, bioquímicos, imunofenotípicos e moleculares à resposta ao tratamento (D8, D15 e D35).

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram estudadas 34 amostras de pacientes diagnosticados com LLA advindos do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB) no período de outubro de 2017 a outubro de 2018. Posteriormente, foram verificados e caracterizados os pacientes de acordo com as seguintes informações: nome, idade, cor, sexo, diagnóstico, % de blastos ao diagnóstico, hemograma ao diagnóstico, resposta ao tratamento nos dias 8, 15 e 35 do tratamento e perfil imunofenotípico associado. Dos 34 pacientes com LLA incluídos na pesquisa, foram realizados os exames moleculares e a partir deste dividimos os pacientes em dois grupos *ETV6-RUNX1* positivos e negativos para realização das análises estatísticas de comparação entre os grupos de acordo com as variáveis analisadas. Dentre os 34 pacientes participantes do estudo, 23 pacientes apresentaram material biológico (soro) necessário para a realização dos exames laboratoriais bioquímicos, os resultados das análises bioquímicas foram utilizados para realização de estudos de associação com os outros dados clínicos, moleculares e laboratoriais coletados.

4.2 Tipo de estudo, critérios de inclusão e aspectos éticos

A definição das amostras foi por conveniência. O estudo foi realizado sob a aprovação da Comissão Científica do Hospital Universitário – COMIC – HUUFMA em 06 de outubro de 2016 sob o protocolo 23523.005250/2016-16 (Anexo A) e aceitação pela plataforma Brasil CAAE: 84333517.5.0000.5086 (Anexo C).

4.3 Características das amostras

As amostras recebidas pelo Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário (CEPEC-HUUFMA) foram de aspirados de medula óssea e sangue periférico coletados em tubo com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (Becton Dickinson®) e soro coletado em tubo com gel separador (Becton Dickinson®). Primeiramente, os soros dos pacientes foram analisados através da técnica de imunoquimioluminescência. Em seguida, a amostra de sangue periférico foi enviada para realização do hemograma pelo laboratório de apoio no Hospital Universitário – UFMA, e em seguida, foi realizada a análise citomorfológica das amostras para definição do % de blastos por microscopia ótica convencional e após foram

realizados os painéis de anticorpos monoclonais para definição da linhagem celular e diagnóstico diferencial das LLA por Citometria de fluxo.

4.4 Desenho experimental

Para realização das análises estatísticas, os dados clínicos, imunofenotípicos, os resultados das análises laboratoriais e moleculares foram registrados em planilhas.

As alterações moleculares foram classificadas entre mau e bom prognóstico, sendo classificadas como de mau prognóstico nas LLA-B: *BCR-ABL1*, *MLL-AF4* e *TCF3-PBX1* e de bom prognóstico: *ETV6-RUNX1*.

A avaliação da resposta ao tratamento foi realizada em três momentos distintos, sendo a primeira análise no oitavo dia através da determinação morfológica do total de blastos/mm³ no hemograma, os pacientes bons respondedores foram aqueles cuja contagem era inferior ou igual a 1.000 blastos por mm³. Em seguida, foi feita a contagem de blastos em medula óssea no décimo quinto dia e trigésimo quinto dia de tratamento através da determinação imunofenotípica dos blastos neoplásicos após análise de 1.000.000 de células, por citometria de fluxo, nos dias 15 e 35 do tratamento. Foram classificados como bons e maus respondedores os pacientes que tiverem, respectivamente, menos que 0,01% e mais que 0,01% de células neoplásicas (DRM). De acordo com a evolução dos pacientes após estas checagens de tratamento foram classificados os pacientes que foram a óbito como má evolução.

O estudo de associação da presença do gene *ETV6-RUNX1*, parâmetros laboratoriais e de prognóstico foi realizado a partir dos resultados das análises descritas anteriormente. O fluxograma representativo de todas as etapas realizados no estudo está descrito abaixo (figura 4).

Casuística: 34 pacientes atendidos no CEPEC-HUUFMA, deste universo 23 pacientes apresentaram todos os critérios de inclusão atendidos e foram incluídos nas análises de associação.

Característica da amostra: conveniência.

Dados coletados: : nome, idade, cor, sexo, diagnóstico, % de blastos ao diagnóstico, hemograma ao diagnóstico, resposta ao tratamento (D8, D15 e D35), perfil imunofenotípico associado e exames laboratoriais bioquímicos.

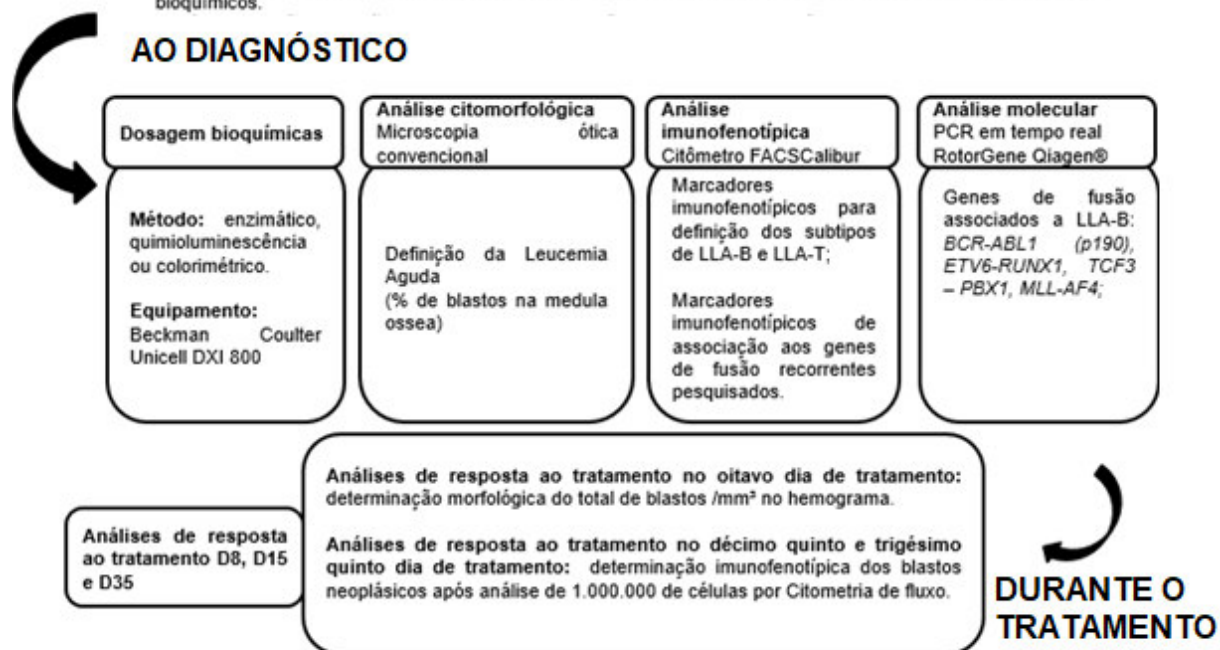


Figura 2. Fluxograma representando as etapas do estudo.

4.5 Análises imunofenotípicas

As análises imunofenotípicas foram realizadas pela equipe do CEPEC-HUUFMA. A classificação imunológica foi feita através da técnica de Imunofluorescência direta pelo o uso de anticorpos conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), clorofilperidina (PerCP) e alicianina (APC).

A aquisição e análise das amostras foram feitas no citômetro de fluxo FacsCalibur™ da Becton Dickinson, usando o programa CellQuest™ (BD), após calibração do citômetro com o kit Calibrite beads (BD), através do programa FacsComp™ (BD). Os marcadores considerados positivos quando expressados em mais de 20% das células. As metodologias utilizadas na marcação das amostras foram descritas pelo estudo anterior do grupo (Noronha et al., 2011). Abaixo estão descritos os painéis utilizados para identificação dos subtipos das LLA:

Quadro 4. Descrição dos painéis utilizados para definição dos subtipos de LLA.

Características	Anticorpos monoclonais
CDs para caracterização da maturação de células B	CD10, CD19, CD20, citCD22, citCD79a, citIgM;
CD para associados à linhagem de células T	citCD3, CD7, CD8, CD4, CD1a, TCR, CD3;
CDs para identificação de células linfoides imaturas	TdT
CDs para identificação de células mieloides	CD117, citMPO;
CDs expresso em todas as linhagens leucocitárias	CD45;
CDs expressos em células precursoras de diferentes linhagens hematopoéticas	CD34; HLA-DR;
CDs para caracterização de expressão anômala, ou associados a algum gene de fusão	CD13, CD33, CD99, CD66c, CD9, NG2, CD24, CD58, CD56.

4.6 Análise dos parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas foram realizadas pelo laboratório BioVel localizado em Cascavel - Paraná, este laboratório serve como apoio do CEPEC-HUUFMA para realização das análises bioquímicas.

As amostras dos pacientes foram colhidas por punção venosa e o sangue periférico (SP) foi colocado em tubo com gel separador (Becton Dickinson®) no Hospital Aldenora Bello. Ao chegar no CEPEC-HUUFMA, essas amostras foram transferidas para tubos criogênicos (SPL®) para armazenamento em freezer -80°C. As amostras foram encaminhadas através de transporte aéreo para o laboratório de apoio e foram enviadas dentro de caixas de isopor refrigeradas e devidamente identificadas, a chegada e o processamento das amostras no laboratório de apoio não ultrapassou o prazo de 24 horas após o envio das amostras. As dosagens

realizadas estão referidas a seguir e foram feitas de acordo com as instruções do fabricante (tabela 1):

Tabela 1. Descrição dos parâmetros bioquímicos analisados e suas metodologias.

Parâmetro bioquímico	Metodologia empregada	Plataforma	Referência do kit (código)
Desidrogenase láctica	Enzimático	Beckman Coulter – AU 680	LD Reagent (OSR6127)
β2-microglobulina;	Quimioluminescência	Beckman Coulter – AU 680	β-2-Microglobulin Reagent (OSR6151)
Fosfatase alcalina;	Enzimático	Beckman Coulter – AU 680	Alkaline Phosphatase (ALP) Reagent (OSR6004)
Enolase neuronal específica;	Radioimunoensaio	Beckman Coulter Unicell - DXI 800	Neuron Specific Enolase reagente (A15607)
Ácido úrico;	Enzimático/automatizado	Beckman Coulter – AU 680	Uric Acid reagente (OSR6098)
Transaminase Glutâmico pirúvico (ALT);	Enzimático/automatizado	Beckman Coulter – AU 680	ALT Reagent (OSR6107)
Transaminase Glutâmico Oxalacética (AST);	Enzimático/automatizado	Beckman Coulter – AU 680	AST Reagent (OSR6109)
Gama-Glutamiltransferase	Enzimático	Beckman Coulter – AU 680	GGT Reagent (OSR6119)

(GGT);			
Vitamina B12;	Quimioluminescência	Beckman Coulter Unicell-DXI 800	
Níveis séricos de eletrólitos (Cálcio, Magnésio, Fósforo);	Colorimétrico/Automatizado	Beckman Coulter – AU 680	Calcium Reagent (OSR60117) Magnesium Reagent (OSR6189) Inorganic Phosphorus Reagent (OSR6122)
Bilirrubina total, direta e indireta;	Enzimático/automatizado	Beckman Coulter – AU 680	Total Bilirubin Reagent (OSR6112) Direct Bilirubin Reagent (OSR6111)
Ferro, Capacidade total de ligação do Ferro, Índice de Saturação de transferrina.	Colorimétrico/Automatizado	Beckman Coulter Unicell-DXI 800	Iron reagent (OSR6186) Total Iron Binding Capacity (465970) Transferrin Reagents (OSR6152)
Ferritina	Enzimático	Beckman Coulter Unicell-DXI 800	Ferritin Reagent (OSR61203)

4.7 Caracterização molecular

A caracterização molecular dos pacientes foi realizada no CEPEC-HUUFMA e o kit Ribopure® (cod. A1928) para a extração do RNA mensageiro (RNAm), o kit Superscript IV® One-step QPCR System (cod.12594025) para realização do cDNA e execução da PCR em tempo real foram utilizados os reagentes Taqman™ universal PCR master mix (cod.4318157) e as sondas Taqman™.

4.7.1 Extração do RNAm

As amostras de medula óssea e sangue periférico passaram por uma triagem anterior ao processo de extração com o objetivo de verificar se quantidade de amostra atendia os requerimentos dos kits utilizados.

A extração do RNA genômico foi feita com o kit Ribopure® (cod.A1928) o protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (ThermoFisherScientific). Os ácidos nucleicos foram extraídos em duplicata, uma das amostras foi armazenada em freezer -80°C para posteriores análises que se fizessem necessárias.

O RNA extraído foi quantificado pelo equipamento Qubit® (Qiagen) através do kit Qubit® 4 quantitation stater kit (cod. Q3327), seguindo as instruções do fabricante.

4.7.2 Síntese do cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de 2 nanogramas de RNA total, utilizou-se o kit Superscript IV® One-step QPCR System (cod.12594025) e foi feito seguindo as orientações do fabricante (Thermofischer). Em seguida, colocamos as amostras no termociclador convencional Veriti™ (Applied biosystem) e utilizamos a ciclagem preconizada pelo kit.

4.7.3 PCR em tempo real (qPCR)

Foram utilizados os reagentes Taqman™ universal PCR master mix (cat.4318157) e as sondas de hibridização Taqman® disponíveis comercialmente para a detecção dos seguintes genes de fusão: *ETV6-RUNX1* (cod. HL03043640), *BCR-ABL1* (cod. Hs03024844_ft), *TCF3-PBX1* (cod. Hs03024664_ft), para MLL-AF4 (cod. Hs03043414_ft). O protocolo para a realização da qPCR foi feito seguindo as orientações do fabricante (Thermofischer).

4.8 Análises de dados

Para avaliar a normalidade das variáveis quantitativas foi usado o teste Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Sminorv. Após esse procedimento, a análise comparativa entre os grupos foi feita utilizando os testes T independente ou Teste Mann-Whitney, dependendo da normalidade da distribuição dos dados. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Os dados foram analisados utilizando os recursos do software GraphPadPrism 7. A estatística descritiva foi realizada utilizando medidas de

frequência tendência central e dispersão. Os testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher foram utilizados para analisar a distribuição das variáveis categóricas entre os grupos (positivos e negativos para *ETV6-RUNX1*).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes com LLA

Foi realizada a caracterização clínica e imunofenotípica dos 34 pacientes atendidos inicialmente pelo laboratório (tabela 2). Dentre os 34 pacientes, 85,3% foram classificados imunofenotipicamente como LLA-B e 14,7% como LLA-T, devido a suas características clínicas diferentes, os pacientes foram divididos entre estes dois grupos, inicialmente.

Dentre os dados observados, 61,8% dos 34 pacientes com LLA eram do sexo masculino, a maioria estavam na faixa etária de 1 a 10 anos (88,2%). Em relação a raça dos pacientes não tivemos esta informação em 52,9% dos casos, entretanto aqueles que foram informados foram divididos em 17,9% da cor de pele parda e branca, e 11,9% negra.

Em relação a contagem leucocitária ao diagnóstico, observou-se diferença estatística entre a contagem global de leucócitos nos pacientes com LLA-B e LLA-T ($p=0,001$), sendo que os pacientes com LLA-T apresentaram nível mais elevado de contagens leucocitárias. Outra característica que apresentou diferença estatística foi em relação à classificação de risco dos pacientes ao diagnóstico, no caso deste último critério não pode ser considerada a diferença estatística já que todos os pacientes com LLA-T são automaticamente classificados como grupo alto risco.

Tabela 2. Caracterização clínico-laboratorial a partir da classificação imunofenotípica dos 34 pacientes atendidos no CEPEC-HUUFMA no ano de 2018.

Características clínico-laboratoriais		Total N=34	LLA-B N= 29	LLA-T N=5	p valor
		No. (%)			
Sexo	Masculino	21(61,8)	17(58,6)	4(80,0)	0,627
	Feminino	13(38,2)	12(41,4)	1(20,0)	
Idade ao diagnóstico	< 1 ano	1(3,0)	1(3,4)	0(0,0)	0,676
	1 a 10 anos	30(88,2)	25(86,2)	5(100,0)	
	> 10 anos	3(8,8)	3(10,3)	0(0,0)	
Cor da pele	Negra	4(11,9)	4(13,8)	0(0,0)	0,411
	Branca	6(17,6)	6(20,7)	0(0,0)	
	Parda	6(17,6)	5(17,2)	1(20,0)	
	Não informada	18(52,9)	14(48,3)	4(80,0)	
Contagem de leucócitos ao diagnóstico	< 50.000/mm ³	24(70,6)	23(79,3)	0(0,0)	0,001*
	> 50.000/mm ³	9(26,5)	5(17,3)	5(100,0)	
	Não informado	1(2,9)	1(3,4)	0(0,0)	
Imunofenótipo B		29(85,3)			
	Pró-B ou B-I	1(3,0)	1(3,4)	-	
	B-comum ou B-II	19(55,8)	19(65,5)	-	
	Pré-B ou B-III	9(26,5)	9(31,1)	-	
Imunofenótipo T		5(14,7)	-	-	-
	LLA-T <i>early</i>	1(3,0)	-	1(20,0)	
	T-I ou pró-T	0(0,0)	-	0(0,0)	
	T-II ou pré-T	0(0,0)	-	0(0,0)	
	T-III ou cortical-T	2(5,9)	-	2(40,0)	
	T-IV ou madura	2(5,9)	-	2(40,0)	
Classificação de risco ao diagnóstico					
	Baixo Risco (GBTLI-09)	21 (61,8)	21(72,4)	0(0,0)	0,005
	Alto risco (GBTLI-09)	13 (38,2)	8(27,6)	5(100,0)	

5.2 Caracterização molecular dos pacientes com LLA-B

Posteriormente, os pacientes com LLA-B (n=29) foram divididos entre as anormalidade genéticas pesquisadas: *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1*, *TCF3 – PBX1*, *MLL-AF4*. A frequência das anormalidades genéticas encontradas nos pacientes classificados como LLA-B foi de 38% (n=11) positivos para o gene *ETV6-RUNX1*, 21% (n=6) para *TCF3-PBX1* e 41% (n=12) negativos para os genes pesquisados (Figura 3).

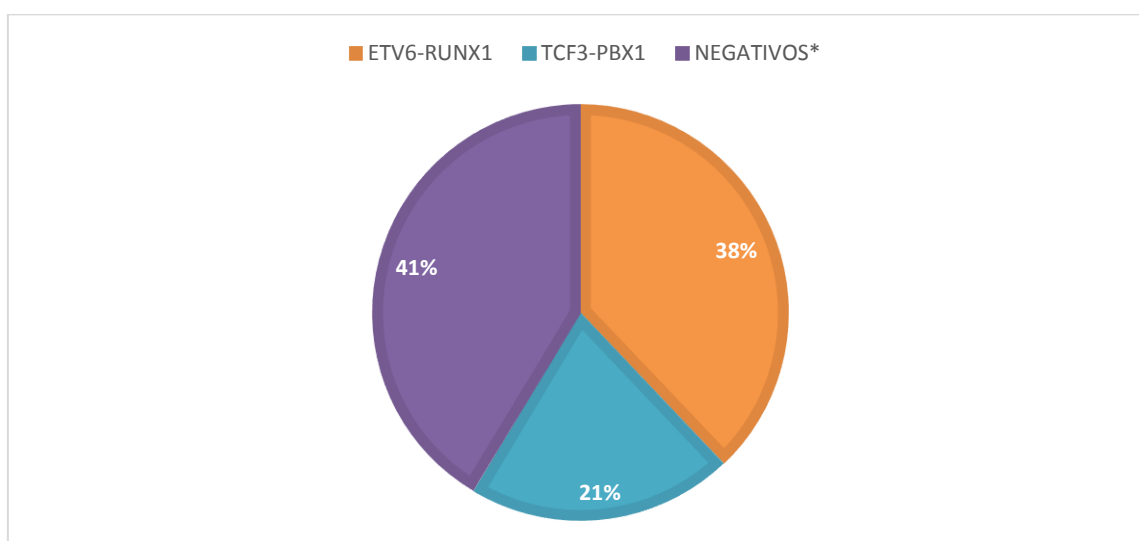


Figura 3. Alterações moleculares dos genes de fusão nas leucemias linfoides agudas tipo B (LLA-B). Frequência das alterações moleculares em 29 pacientes com LLA-B atendidos no Centro de Referência de Câncer do Maranhão em 2018.

5.3 Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com LLA-B *ETV6-RUNX1* positivos e negativos

Dentre os 29 pacientes classificados como LLA-B, dividiu-se dois grupos utilizando como critério a positividade ou não para o gene *ETV6-RUNX1*. Os 11 pacientes positivos para o gene de fusão *ETV6-RUNX1* tinha a faixa etária média foi de $3,7 \pm 3,4$ anos, enquanto que nos 18 pacientes negativos a média foi de $4,9 \pm 3,5$ anos de idade. Não houve diferença estatística entre as idades ($p=0,4268$) entre estes grupos.

O sexo masculino foi o que apresentou maior frequência nos dois grupos, tanto pacientes *ETV6-RUNX1* positivos, com 54,5% (n=6) dos casos, quanto

pacientes negativos, com 61,1% (n=11) dos casos. Estes dados não tiveram diferença estatisticamente significativa ($p=0,999$). Em relação à cor da pele dos pacientes não houve diferença estatística entre os dois grupos ($p=0,637$).

A contagem leucocitária ao diagnóstico foi menor que $50.000/\text{mm}^3$ em 72,7% (n=8) dos pacientes positivos para o gene *ETV6-RUNX1* e em 77,8% (n=14) nos pacientes negativos. Não houve diferença estatística em relação a este parâmetro entre os grupos ($p = 0,999$).

Em relação à classificação dos pacientes pelo subtipo imunofenotípico preconizado pela EGIL (fase maturativa da linhagem B), os pacientes *ETV6-RUNX1* tiveram maior percentagem do subtipo B-comum ou BII, com 72,2% (n=8), seguido do subtipo B-III presente em 27,3% (n=3). No grupo dos pacientes negativos para o gene *ETV6-RUNX1*, a frequência do subtipo B-II foi de 61,1% (n=11), o subtipo B-III 33,4% (n=6) e o subtipo B-I 5,5% (n=1), sendo a frequência subtipo B-III foi superior ao do grupo positivo. Entretanto, os dados não mostraram diferença estatística entre os grupos ($p=0,659$), conforme a tabela 3.

Tabela 3. Caracterização clínica e imunofenotípica dos 29 pacientes classificados imunofenotipicamente como LLA-B atendidos no CEPEC-HUUFMA no ano de 2018.

		Total N=29	<i>ETV6-RUNX1</i> positivos N=11	NEGATIVOS* N=18	p valor
No. (%)					
Sexo	Masculino	17(58,6)	6(54,5)	11(61,1)	0,999
	Feminino	12(41,4)	5(45,5)	7(38,9)	
Idade ao diagnóstico	< 1 ano	1(3,4)	1(9,1)	0(0,0)	0,426
	1 a 10 anos	25(86,2)	9(81,8)	16(88,9)	
	> 10 anos	3(10,4)	1(9,1)	2(11,1)	
Cor da pele	Negra	4(13,8)	2(18,2)	2(11,1)	0,637
	Branca	6(20,7)	2(18,2)	4(22,2)	
	Parda	5(17,2)	1(9,1)	4(22,2)	
	Não informada	16(48,3)	6(54,5)	8(44,5)	
Contagem de leucócitos ao diagnóstico	< 50.000/mm ³	22(75,9)	8(72,7)	14(77,8)	0,999
	> 50.000/mm ³	5(17,2)	2(18,2)	3(16,7)	
	Não informado	2(6,9)	1(9,1)	1(5,5)	
Imunofenótipo	Pró-B ou B-I	1(3,4)	0(0,0)	1(5,5)	0,659
	B-comum ou B-II	19(65,5)	8(72,7)	11(61,1)	
	Pré-B ou B-III	9(31,1)	3(27,3)	6(33,4)	
Classificação de risco ao diagnóstico	Baixo Risco (GBTLI-09)	20 (68,9)	6(54,5)	14(77,8)	0,400
	Alto risco (GBTLI-09)	8(27,7)	4(36,4)	4(22,2)	
	Não informado	1(3,4)	1(9,1)	-	

Negativos*: pacientes com LLA-B que foram negativos para gene de fusão *ETV6-RUNX1*.

5.4 Caracterização do imunofenótipo em pacientes com LLA-B *ETV6-RUNX1* positivos e negativos

As frequências de positividade dos marcadores imunofenotípicos utilizados para a caracterização das LLA-B foram descritos na tabela a seguir:

Tabela 4. Caracterização imunofenotípica dos pacientes com LLA-B, positivos e negativos para *ETV6-RUNX1* atendidos no CEPEC-HUUFMA no ano de 2018. Número de pacientes e frequência para a expressão dos marcadores fenotípicos usados na classificação das LLA-B.

Marcadores imunofenotípicos	Total N=29	<i>ETV6-RUNX1</i> positivos N=11	NEGATIVOS* N=18	p valor
Antígenos de célula B				
CD19 ⁺	28(96,5)	11(100,0)	17(94,4)	0,434
cCD79a ⁺	28(96,5)	11(100,0)	17(94,4)	0,434
cCD22 ⁺	26(89,6)	11(100,0)	15(83,3)	0,160
CD10 ⁺	26(89,6)	11(100,0)	15(83,3)	0,160
CD20 ⁺	8(27,6)	3(27,3)	5(27,8)	0,977
clg ⁺	8(27,6)	4(36,4)	4(22,2)	0,417
Antígenos de célula T				
cCD3 ⁺	2(6,9)	0(0,0)	2(11,1)	0,260
CD7 ⁺	2(6,9)	1(9,1)	1(5,5)	0,720
Outros antígenos				
HLA-DR ⁺	27(93,1)	11(100,0)	16(88,9)	0,260
TdT ⁺	12(41,4)	6(54,5)	6(33,3)	0,269
CD45 ⁺	29(100,0)	11(100,0)	18(100,0)	0,194
CD34 ⁺	12(41,4)	6(54,5)	6(33,3)	0,269
Antígenos mieloide				
CD13 ⁺	25(86,2)	11(100,0)	14(77,8)	0,098
CD33 ⁺	16(55,2)	5(45,4)	11(61,1)	0,419
CD117 ⁺	3(10,3)	2(18,2)	1(5,5)	0,287
MPO ⁺	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0,194

Negativos*: pacientes com LLA-B que foram negativos para gene de fusão *ETV6-RUNX1*.

Os marcadores acima foram utilizados para realização do diagnóstico diferencial das LLA-B, não houve diferença estatística entre estes marcadores dentre os grupos analisados. Em seguida, verificou-se os marcadores imunofenotípicos associados aos genes de fusão nas LLA para buscar possíveis diferenças entre os grupos, visto a frequência das anormalidades moleculares distintas entre estes (tabela 5). Os dados não mostraram diferença estatística, entretanto o CD56 não tenha alcançado diferença estatística ($p=0,054$), observou-se uma frequência de positividade de 36,4% nos pacientes *ETV6-RUNX1* positivos, assim como o marcador CD9 que foi positivo em 54,5% dos casos.

Tabela 5. Caracterização dos marcadores imunofenotípicos associados aos genes de fusão dos pacientes com LLA-B, positivos e negativos para *ETV6-RUNX1* atendidos no CEPEC-HUUFMA no ano de 2018. Para realização das análises estatísticas de comparação, utilizou-se os grupos *ETV6-RUNX1* positivos e negativos.

Marcadores imunofenotípicos associados aos genes de fusão	Total N=29	<i>ETV6-RUNX1</i> positivos N=11		NEGATIVOS* N=18	p valor
		No.(%)			
Antígenos associados ao <i>ETV6-RUNX1</i>					
CD99 ⁺	22(75,9)	9(81,8)	13(72,2)		0,676
Antígenos associados ao <i>E2A-PBX1</i>					
CD9 ⁺	18(62,1)	6(54,5)	13(72,2)		0,239
Antígenos associados ao <i>MLL-AF4</i>					
NG2 ⁺	4(13,8)	3(27,3)	1(5,5)		0,139
Antígenos associados ao <i>BCR-ABL1</i>					
CD24 ⁺	26(89,6)	10(90,9)	16(88,9)		0,999
CD66c ⁺	5(17,2)	2(18,2)	3(16,7)		0,999
Outros antígenos associados a mais de um gene de fusão					
CD13 ⁺	25(86,2)	11(100,0)	14(77,8)		0,268
CD19 ⁺	27(93,1)	11(100,0)	16(88,9)		0,512
CD33 ⁺	16(55,2)	5(45,4)	11(61,1)		0,466
CD34 ⁺	12(41,4)	6(54,5)	6(33,3)		0,438
CD56 ⁺	6(20,7)	4(36,4)	1(5,5)		0,054
CD58 ⁺	26(89,6)	11(100,0)	15(83,3)		0,268

Negativos*: pacientes com LLA-B que foram negativos para gene de fusão *ETV6-RUNX1*.

5.5 Evolução dos pacientes nos dias de avaliação da doença residual mínima (DRM) durante o tratamento

Os dois grupos em seguida foram avaliados nos dias 8 (D8), 15 (D15) e 35 (D35) do tratamento e foram classificados entre bons e maus respondedores segundo o critério utilizado pelo GBTLI-09 (tabela 6).

Tabela 5. Avaliação do tratamento dos pacientes LLA-B positivos e negativos para o gene *ETV6-RUNX1* de acordo com os dias de avaliação da resposta ao tratamento.

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO	TOTAL N=29	<i>ETV6-RUNX1</i> positivos N= 11	NEGATIVOS* N=18	p valor
No (%)				
Resposta a prednisona (D8)				
Boa (Blastos < 1.000/mm ³)	18 (62,1)	7 (63,6)	11 (61,1)	0,999
Ruim (Blastos > 1.000/mm ³)	6 (20,7)	2 (18,2)	4 (22,2)	
Não realizado*	5 (17,2)	2 (18,2)	3 (16,7)	
DRM (D15)				
Negativo (Blastos < 0,01) = boa resposta	9 (31,0)	2 (18,2)	7 (38,9)	0,229
Positivo (Blastos > 0,01) = má resposta	16 (55,2)	8 (72,7)	8 (44,4)	
Não realizado**	4 (13,8)	1 (9,1)	3 (16,7)	
DRM (D35)				
Negativo (Blastos < 0,01) = boa resposta	15 (51,7)	8 (72,7)	7 (38,9)	0,085
Positivo (Blastos > 0,01) = má resposta	8 (27,6)	1 (9,1)	7 (38,9)	
Não realizado***	6 (20,7)	2 (18,2)	4 (22,2)	

Não realizado*: dentre os pacientes que não constavam dados da avaliação da resposta ao tratamento realizada no oitavo dia (D8) houve 1 óbito antes da realização dessa avaliação e 4 pacientes não foram analisados pela falta de material.

Não realizado**: dentre os pacientes que não constavam dados da avaliação da resposta ao tratamento realizada no décimo quinto dia (D15) não houve óbitos antes da realização dessa avaliação e 3 pacientes não foram analisados pela falta de material.

Não realizado***: dentre os pacientes que não constavam dados da avaliação da resposta ao tratamento realizada no trigésimo quinto dia (D35) houve 1 óbito antes da realização dessa avaliação e 4 pacientes não foram analisados pela falta de material.

Negativos*: pacientes com LLA-B que foram negativos para gene de fusão *ETV6-RUNX1*.

No primeiro ponto de avaliação da resposta ao tratamento (D8), 63,6% dos pacientes *ETV6-RUNX1* e 61,1% dos pacientes *ETV6-RUNX1* negativos responderam bem e houveram dois pacientes que evoluíram para óbito, um pertencente ao grupo positivo e outro negativo para o gene *ETV6-RUNX1*. Em seguida, ao analisar o D15, 18,2% dos pacientes *ETV6-RUNX1* positivos e 38,9% dos pacientes tiveram boa resposta ao tratamento, neste ponto de avaliação da resposta ao tratamento não houve novos óbitos em nenhum dos grupos. Por fim, analisou-se o D35 do tratamento, 72,7% dos pacientes *ETV6-RUNX1* positivos e 38,9% dos pacientes negativos foram classificados como bons respondedores, neste ponto de checagem houve um óbito de um paciente pertencente do grupo positivo

para a alteração *ETV6-RUNX1*. Após estas verificações de resposta ao tratamento, houver um paciente que evoluiu para o óbito do grupo *ETV6-RUNX1* positivo e um óbito de um paciente do grupo negativo. A presença do gene de fusão *ETV6-RUNX1* em comparação ao grupo negativo, não mostrou associação com as respostas ao tratamento nos dias de avaliações destes pacientes.

5.6 Caracterização dos parâmetros bioquímicos analisados em pacientes com LLA, positivos e negativos para *ETV6-RUNX1*

Dos 29 pacientes, foram realizadas as análises de associação entre parâmetros bioquímicos de 23 pacientes. Estas análises foram feitas após a verificação que dados clínicos e imunofenotípicos deste grupo (n=23) não apresentaram diferenças estatísticas em comparação ao grupo inicial de pacientes com LLA-B (n=29) (Anexo I).

Quando comparada as médias dos valores para os respectivos parâmetros bioquímicos estudados (tabela 6), os resultados não mostraram diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Entretanto, alguns parâmetros apresentaram as médias acima dos valores de referência no grupo de pacientes positivos para o gene *ETV6-RUNX1*, como β -2 microglobulina, enolase neuronal específica, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase, ferro sérico, % saturação total da transferrina e ferritina.

Tabela 6. Caracterização dos pacientes *ETV6-RUNX1* positivos e negativos de acordo com os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros (Valores de Referência)	Total Média ± desvio padrão	<i>ETV6-RUNX1</i> positivos Média ± desvio padrão	Negativos Média ± desvio padrão	p valor
Lactato desidrogenase (225,0 – 600,0 U/L)	789,8 ± 1120	714,3 ± 423,8	830,1 ± 1369	0,173
Bilirrubina total (0,20-1,10 mg/dL)	0,4 ± 0,2	0,37 ± 0,15	0,4 ± 0,25	0,828
Bilirrubina direta (0,10-0,30 mg/dL)	0,08 ± 0,1	0,07 ± 0,44	0,1 ± 0,12	0,603
Bilirrubina indireta (0,10-0,80 mg/dL)	0,3 ± 0,1	0,29 ± 0,12	0,3 ± 0,17	0,975
β-2 microglobulina (604-2.286 ng/mL)	3.774 ± 2.401	2.799 ± 356,3	4.506 ± 3.028	0,157
Enolase neuronal específica (até 12,5 ng/mL)	22,7 ± 32,7	25,8 ± 28,7	20,3 ± 37,3	0,170
Ferro sérico (35,0-150,0 ug/dL)	181,1 ± 76,1	206,8 ± 89,8	167,4 ± 66,9	0,298
Capacidade total de ligação do ferro (228,0-428,0 ug/dL)	212,3 ± 69,9	195,7 ± 59,9	222,8 ± 76,4	0,414
% Saturação total da transferrina (20-55 %)	93,8 ± 52,3	96,9 ± 49,4	91,8 ± 56,3	0,840
Vitamina B12 (180-900 pg/mL)	239 ± 179,2	233,6 ± 112,6	243,3 ± 225	0,912
Ferritina (16-243 ng/mL)	452,8 ± 485,8	473,6 ± 528,6	437,3 ± 487,9	0,849
Ácido úrico (3,6-7,7 mg/dL)	5,0 ± 4,3	3,7 ± 2,2	5,7 ± 5,0	0,437
Transaminase Glutâmico Oxalacética (até 40 U/L)	71,5 ± 169,3	46,25 ± 44,61	84,93 ± 208,6	0,692
Fosfatase alcalina (150-600 U/L)	172 ± 89,3	160,8 ± 81,8	177,9 ± 95,26	0,693
Transaminase Glutâmico pirúvico (até 41 U/L)	25 ± 44,3	18 ± 8,9	29 ± 55,5	0,373
Gama-Glutamiltransferase (10-71 U/L)	47,9 ± 65,3	43 ± 42,8	50,6 ± 75,9	0,763
Cálcio (8,5-10,5 mg/dL)	9,05 ± 1,4	9,1 ± 0,9	9,0 ± 1,6	0,382
Fósforo (4,0-7,0 mg/dL)	4,9 ± 1,6	5,2 ± 1,4	4,7 ± 1,7	0,499
Magnésio (1,58-2,55 mg/dL)	1,9 ± 0,4	1,82 ± 0,3	2,1 ± 0,4	0,108

5.7 Caracterização dos dados clínicos, imunofenotípicos, bioquímicos e de resposta ao tratamento nos pacientes com LLA-B positivos para *ETV6-RUNX1*

A fim de sumarizar as informações obtidas dos pacientes *ETV6-RUNX1*, elaboramos a tabela 7, onde constam os dados que foram considerados mais importantes, devido ao seu impacto no diagnóstico ou prognóstico dos pacientes.

Tabela 7. Caracterização clínica, imunofenotípica e de resposta ao tratamento dos pacientes LLA-B *ETV6-RUNX1*.

Pacientes	Idade	Subtipo	Contagem de leucócitos ao diagnóstico	CD9	CD56	Resposta ao tratamento			Óbito
						D8	D15	D35	
#1	3	B-II	14.800	NEG	NEG	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
#2	2	B-II	N/A	POS	POS	N/A	NÃO	NÃO	N/A
#3	3	B-III	5.050	NEG	NEG	SIM	SIM	SIM	NÃO
#4	1	B-I	394.000	POS	POS	N/A	N/A	N/A	SIM
#5	12	B-II	18.790	NEG	NEG	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
#6	7	B-II	221.000	POS	NEG	SIM	SIM	SIM	NAO
#7	4	B III	3.040	NEG	NEG	SIM	SIM	SIM	NAO
#8	5	B-II	2.740	NEG	POS	SIM	NÃO	NAO	NAO
#9	3	B-II	11.680	POS	NEG	NÃO	NÃO	SIM	SIM
#10	5m	B-III	3.380	POS	NEG	SIM	NÃO	N/A	ÓBITO
#11	1	B-II	6.410	NEG	POS	SIM	NAO	SIM	VIVO

POS: positivo; NEG: negativo; N/A: não avaliável.

Dentre os dados sumarizados observou-se que dentre os 11 pacientes *ETV6-RUNX1*, 81,8% (n=9) pertenciam a faixa etária entre 1 a 10 anos, 81,8% (n=9) eram do subtipo B-II, 100% (n=11) foram positivos para o marcador CD10, 45,4% (n=5)

foram positivos para o marcador CD9 e 36,3% (n=4) foram positivos para o marcador CD56, 27,3% (n=3) dos pacientes evoluíram para óbito.

6. DISCUSSÃO

As LLA fazem parte de um grupo de neoplasias importantes, pois são os cânceres mais comuns da infância, representando mais de 25% de todos os casos de neoplasias infantis (NIGRO, 2013).

No nosso estudo, inicialmente identificamos na casuística de 34 pacientes com LLA, 85,3% (n=29) de linhagem B e 14,7%(n=5) de linhagem T. Na literatura encontram-se frequências de LLA-B de até 85%, demonstrando que não diferenças muito acentuadas em relação a frequência das LLA entre outras localidades no mundo (MOORMAN, 2015).Entretanto em um estudo realizado no Maranhão realizado no ano de 2011, foi verificado maior frequência de LLA-T (27%). Esta diferença pode estar associada com o período de coleta de dados do estudo anterior que foi diferente do nosso estudo (NORONHA et al., 2011), sendo na literatura relatado que fatores como status socioeconômico, miscigenação da população, tempo e variedade étnica podem alterar a frequências das LLA entre as regiões (STILLER et al., 2008; REIS et al., 2011).

Segundo a OMS a classificação da idade definida como infantil abrange a faixa etária de 2 a 12 anos de idade. Comumente, os pacientes que apresentam as LLA estão nas idades de 1 a 10 anos ou a partir dos 50 anos, a maioria é do sexo masculino e é diagnosticada em maior frequência na população branca ou asiática, sendo o subtipo B o mais recorrente (HUNGER; MULLIGHAN, 2015). As características clínicas dos nossos pacientes foram compatíveis com a literatura, sendo que a maioria dos nossos pacientes estava na faixa etária de 1 a 10 anos, eram do sexo masculino e 85% pertencia à linhagem B.

Em relação aos subtipos maturativos das LLA-B, o subtipo B-II foi o mais frequente, como descrito na literatura (HUNGER; MULLINGHAN, 2015). O imunofenótipo e as características clínicas relacionadas ao diagnóstico das LLA, neste trabalho, apresentaram-se compatíveis com a caracterização do subgrupo de baixo risco (BENE et al., 1995; MOORMAN, 2016).

As alterações genéticas mais frequentes neste subtipo de doenças são *ETV6-RUNX1* juntamente com a hiperdiploidia, ambos em aproximadamente 25% dos

casos, seguida dos rearranjos do gene *MLL* em 8%, *TCF3-PBX1* em 5% e *BCR-ABL1* em 3% dos casos (MOORMAN, 2016; MALOUF; OTTERSACH, 2018). Em relação à distribuição das alterações moleculares encontradas, a frequência do gene *ETV6-RUNX1* foi mais elevada em nossa casuística (37,9%) do que normalmente é descrito na literatura (2 a 25%) para população infantil (NIGRO, 2013; MALOUF; OTTERSACH, 2017; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; SUN et al., 2017). A frequência do gene *TCF3-PBX1* foi de 20,7% em nossos pacientes, demonstrando-se bem mais elevada em relação aos dados da literatura pesquisada que indica uma frequência deste gene em apenas 5% dos pacientes pediátricos (ASPLAND et al., 2001; PANG et al., 2015; SERA et al., 2016). Mesmo com um número amostral 3 a 5 vezes inferior aos normalmente visto em outros trabalhos, nosso estudo demonstrou que existem diferenças nas frequências destes genes de fusão em nossa região em comparação com outras localidades. A literatura relata que podem existir diferenças de apresentação clínica das LLA entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (ABBOUD et al, 2014). Os dados iniciais das frequências das fusões gênicas que demonstramos neste trabalho são de grande importância, devido a seu caráter pioneiro. E uma vez que, as pesquisas destas alterações foram implantadas na prática clínica dos pacientes pediátricos com LLA, nossos dados servirão de base para pesquisa e confirmações futuras.

O gene de fusão *ETV6-RUNX1* é a alteração molecular mais frequente em pacientes com LLA-B e associado a um prognóstico favorável na maioria dos casos (MOORMAN, 2016; NIGRO, 2017). Entretanto, estes pacientes podem apresentar heterogeneidade clínica por causa da presença de alterações secundárias e a presença de subclones leucêmicos e assim ter uma evolução clínica desfavorável (AMPATZIDOU et al., 2018). Desta forma, a pesquisa de biomarcadores que possam identificar pacientes *ETV6-RUNX1* que terão um prognóstico desfavorável é de extrema importância, pois podem direcionar estes pacientes para tratamentos mais eficazes.

Os pacientes com LLA-B foram analisados levando em consideração a expressão positiva ou negativa do gene de fusão *ETV6-RUNX1*. A maior frequência de casos positivos para *ETV6-RUNX1* estava na faixa etária entre 1 a 10 anos. Este

aspecto é associado pelo GBTLI como grupo de baixo risco. Isto ocorre, pois nessa faixa etária, normalmente, há uma maior incidência de genes de fusão relacionados a um bom prognóstico como é o caso do *ETV6-RUNX1*. Entretanto, encontramos esta fusão gênica em um paciente acima de 10 anos, idade na qual geralmente os genes de fusão mais frequente nesta faixa etária são *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* (PANG et al., 2015; KANG et al., 2016). Neste caso a paciente respondeu bem em todos os pontos de checagem de tratamento. Além disso, encontramos um paciente menor que um ano que apresentou o *ETV6-RUNX1*, e sabe-se que nesta faixa etária a anormalidade genética mais frequentes são rearranjos do gene *MLL (KMT2A)* (BUENO et al., 2012). Apesar da presença do *ETV6-RUNX1*, esta paciente não teve um bom prognóstico, sugerindo que a presença deste gene em uma faixa etária mais precoce pode ser relacionada a um mau prognóstico.

Em seguida, no que concerne o sexo dos pacientes, o sexo masculino foi mais frequente. Este dado é compatível com diversos estudos relacionados às LLA que mostram que normalmente o sexo masculino é mais frequente, tendo uma razão de aproximadamente 1:1,5 (MOORMAN, 2016; KATO; MANABE, 2018), sendo que este critério não é associado a nenhum prognóstico (HUNGER; MULLIGHAN, 2015).

A contagem global de leucócitos entre dois grupos analisados foi na maioria menor que $50.000/\text{mm}^3$, tal critério é relacionado ao grupo de baixo risco pelo GBTLI – 2009 e logo, a um bom prognóstico (HUNGER; MULLIGHAN, 2015). No entanto, no nosso estudo haviam alguns casos tanto de pacientes *ETV6-RUNX1* positivos e negativos com contagem leucocitárias superiores a $50.000/\text{mm}^3$, fator ligado a uma doença mais agressiva (GBTLI, 2011). Dentre os pacientes com contagens leucocitárias acima de $50.000/\text{mm}^3$, houve um falecimento de uma paciente positiva para o gene *ETV6-RUNX1*, demonstrando a importância da contagem de leucócitos como critério de estratificação de risco, já que a paciente mesmo apresentando um gene de fusão relacionado a um bom prognóstico teve uma evolução ruim. Estes dados reforçam a ideia da heterogeneidade dos pacientes *ETV6-RUNX1* positivos.

Os subtipos imunofenotípicos variaram em cada grupo pesquisado, sendo que os pacientes *ETV6-RUNX1* positivos foram classificados em sua maioria como LLA-B II, 72,7% (n=8), dado compatível com a literatura (LIU et al., 2016).

Segundo a literatura, o perfil imunofenótipo aberrantes associado ao *ETV6-RUNX1* são: CD66c negativo, CD13 positivo, CD33 positivo, CD9 negativo, NG2 negativo (HRULÁK et al., 2002; KATO; MANABE, 2018). Os pacientes *ETV6-RUNX1* positivos apresentaram um perfil imunofenotípico característico desta alteração que são a presença do CD13 e CD99, entretanto houve positividade para o CD9 em 54,5% dos pacientes, dado conflitante com aqueles da literatura pesquisada (GANDEMER et al., 2007).

O marcador CD9 é associado a mau prognóstico dos pacientes com leucemia mieloide aguda e nas LLA (LIANG et al., 2017). Dentre os 5 pacientes pesquisados que foram positivos para o CD9, três foram a óbito e 2 não responderam bem em algum momento de checagem de resposta ao tratamento, isto sugere que a presença deste marcador nos casos de pacientes *ETV6-RUNX1* pode estar relacionada a uma pior evolução e a heterogeneidade clínica normalmente descrita na literatura (MOORMAN, 2015; AMPATZIDOU et al., 2018).

O CD56 foi positivo em 36,4% dos pacientes com LLA-B *ETV6-RUNX1* positivos e houve uma tendência de diferença entre o grupo negativo e o positivo para este gene de fusão. Em nosso estudo observamos além da presença do CD56 dentre os pacientes *ETV6-RUNX1*, que estes pacientes positivos para o CD56 não foram bons respondedores ao tratamento em algum dos dias de checagem. Este marcador, normalmente, está relacionado ao mau prognóstico devido sua ligação a invasão sistema nervoso central (AREF et al., 2018), a inferior sobrevida livre de doença nas LLA (MONTERO et al., 2003) e está presente no subtipo agressivo de leucemia, como é o caso da leucemia das células matadoras naturais (XU et al., 2015; AREF et al., 2018). Não há estudos na literatura demonstrando a associação deste marcador com a presença do *ETV6-RUNX1* e sugerimos que o CD56 tenha importância na evolução destes pacientes, pois foi observada respostas distintas ao tratamento inicial dentre os pacientes LLA-B *ETV6-RUNX1* que expressavam este marcador.

As dosagens bioquímicas são a linha de frente dos exames realizados pelos pacientes com câncer, sendo alguns dos marcadores bem característicos dessa doença pela sua associação com a proliferação celular como é o caso da β -2

microglobulina, ou morte celular, como é o caso da lactato desidrogenase (MOTTA, 2009).

Existem atualmente alguns marcadores utilizados para estratificar as LLA como alto ou baixo risco ao diagnóstico, como é o caso da contagem leucocitária e faixa etária (GBTLI, 2011). No entanto, esta classificação em alguns casos pode não ser suficiente para definir o prognóstico dos pacientes devido a presença de outros fatores associados ao mau prognóstico como é o caso das alterações moleculares (HUNGER; MULLIGHAN, 2015). Então, encontrar associações mais específicas e que sejam realizadas na fase inicial da doença pode facilitar o direcionamento correto do tratamento dos pacientes e assim melhorar suas taxas de cura.

O nosso estudo se propôs a analisar a presença do gene *ETV6-RUNX1* e algumas alterações de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre estas variáveis. Tal resultado é compatível com o estudo realizado por Ajuba et al.(2018) que tentou relacionar a presença dos genes de fusão *ETV6-RUNX1* e *BCR-ABL1* à presença de alterações hematológicas como contagem de blastos, hematócrito, contagem de leucócitos e plaquetas, porém não encontrou associação entre estes, e diferentemente do estudo realizado por Liu et al.(2016) que verificou a correlação positiva entre os níveis aumentados de enolase neuronal específica e o prognóstico desfavorável das LLA. No entanto, deve-se levar em consideração que as condições sócio-demográficas dos pacientes pertencentes aos estudos analisados e dos nossos pacientes são distintas, podendo influenciar em tais resultados e comparações, pois este fator pode ter impacto direto na apresentação clínica das LLA (REIS et al., 2011; ABOUD et al., 2014; REIS et al., 2016).

Ao verificar os resultados dos parâmetros bioquímicos dentre os pacientes com os valores de referência na população hígida, alguns marcadores estavam alterados na maioria dos pacientes com LLA, como foi o caso da β 2- microglobulina, indicando a possibilidade que este marcador possa estar relacionado diretamente com a presença desta doença como já foi relatado em outras doenças como leucemia mieloide crônica (KYRTSONIS et al., 2014) e também, ao prognóstico do linfoma de células T angioimunoblástico (SHANG et al., 2018). Outros estudos

demonstram que marcadores como cálcio, fosfato e lactato desidrogenase podem estar aumentados nas LLA que apresentam altas contagens de células neoplásicas (KEBRIAEI et al., 2003), porém nossos dados não demonstraram tal aumento. Além disso, uma paciente pertencente ao grupo *ETV6-RUNX1* que teve evolução para o óbito apresentou o aumento apenas da lactato desidrogenase, estando a β -2 microglobulina e a enolase neuronal específica dentro dos limites aceitos, podendo indicar que estes dois últimos marcadores podem não ser suficientes para prever um prognóstico desfavorável.

Posteriormente, realizou-se a associação entre os níveis de lactato desidrogenase, β -2 microglobulina e a enolase neuronal específica e os grupos de alto e baixo risco, não houve diferença estatística dentre os marcadores e esta estratificação de risco, dado compatível com a literatura pesquisada (LIU et al., 2017; AJUBA et al., 2018), no entanto, devido ao número reduzido de pacientes não podemos afirmar que não há relação entre estes.

A resposta ao tratamento dos pacientes *ETV6-RUNX1* variou nos dias de checagem da DRM. Houve uma redefinição de alguns pacientes no 15º do tratamento e em seguida verificou-se uma diminuição da quantidade de pacientes mau respondedores no 35º dia do tratamento. Supõem-se que ao serem reclassificados como alto risco, os pacientes *ETV6-RUNX1* responderam corretamente a terapia, indicando que esse grupo deve ser observado com atenção desde o primeiro momento de checagem da resposta inicial ao tratamento (D8), devido a variação da resposta ao tratamento que pode ocorrer durante o tratamento. Tal dado pode estar relacionado a presença de mutações secundárias e a subclones neoplásicos que alterem a resposta destes pacientes ao tratamento menos agressivo e dificultem o sucesso deste (MOORMAN, 2016; AMPATZIDOU et al., 2018).

No caso dos pacientes negativos para o gene de fusão, não houve uma diferença entre a quantidade de pacientes mau respondedores nos dias de checagem de resposta ao tratamento. No entanto, houve uma diminuição progressiva da quantidade de pacientes com resposta adequada durante os dias de checagem do tratamento, podendo ser relacionada à presença de outras alterações

genéticas de aspecto maléfico ao paciente. Apesar destes dados, não houve diferença estatística quando comparamos os grupos negativos e positivos para o gene *ETV6-RUNX1* em relação aos pontos de checagem de resposta ao tratamento.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados observados podemos sugerir que a frequência dos genes *ETV6-RUNX1* e *TCF3-PBX1* nos pacientes do estado do Maranhão são diferentes da literatura. E que os pacientes que carregavam a alteração genética *ETV6-RUNX1* apresentaram perfis imunofenotípicos distintos, e que a presença dos marcadores CD56 e CD9 podem se associar a um prognóstico desfavorável para estes pacientes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD MR, GHANEM K, MUWAKKIT S. Acute lymphoblastic leukemia in low and middle-income countries: disease characteristics and treatment results. *Current Opinion in Oncology*, 26: 650-655; 2014.

AJUBA IC, MADU AJ, OKOCHA C, IBEGBULAM OG, OKPALA I, NNA OE. Frequency and clinical impact of *ETV6/RUNX1*, *AF4-MLL*, and *BCR/ABL* fusion genes on features of acute lymphoblastic leukemia at presentation. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 18: 237-241; 2016.

AMPATZIDOU M, PAPADHIMITRIOU SI, PATERAKIS G, PAVLIDIS D, TSITSIKAS K, KOSTOPOULOS IV, PAPADAKISI V, VASSILOPOULOS G, POLYCHRONOPOULOU S. *ETV6/RUNX1*-positive childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): the spectrum of clonal heterogeneity and its impact on prognosis. *Cancer Genetics*, 224-225: 1-11; 2018.

ARBER DA, ORAZI A, HASSERJIAN R, THIELE J, BOROWITZ MJ, BEAU MM, BLOOMFIELD CD, CAZZOLA M, VARDIMAN JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 127:2391-2405; 2016.

AREF S, AZMY E, EL-BAKRY K, IBRAHIM L, MABED M. Prognostic impact of CD200 and CD56 expression in adult acute lymphoblastic leukemia patients. *Hematology*, 23: 263-270; 2018.

ASPLAND SE, BENDALLI HH, MURRE C. The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene*, 20: 5708 – 5717; 2001.

BENE MC, CASTOLDI G, KNAPP W, LUDWIG WD, MATUTES E, ORFAO AI, VAN'T VEER MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9:1783-6; 1995.

BHOJWANI D, YANG JJ, P C. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinical North American*, 62: 47–60; 2015.

BOER JM, STEEGHS EMP, MARCHANTE JRM, BOEREE A, BEAUDOIN JJ, BEVERLOO HB, KUIPER RP, ESCHERICH G, VELDEN VHJVD, SHOOT CEVD, GROOT-KRUSEMAN HA, PIETERS R, BOER MLD. Tyrosine kinase fusion genes in pediatric BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*, 8:4618-4628; 2017.

BOER MLD, SLEGTENHORST MV, MENEZES RX, CHEOK MH, BUIJS-GLADDINES JGCAM, PETERS STCJM, ZUVTEN LJCMV, BEVERLOO HB, SPEK PJVD, ESCHERICH G, HORSTMANN MA, JANJA-SCHAUB GE, KAMPS WA, EVANS WE, PIETERS R. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncology*, 10: 125–34; 2009.

BONGIOVANNI D, SACCOMANI V, PIOVAN E. Aberrant signaling pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 18:1-29; 2017.

BUENO C, MONTES R, CATALINA P, RODRÍGUEZ R, MENEDEZ P. Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement. *Leukemia*, 25:400-410; 2011.

CAMPANA D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Current opinion in hematology*, 19:313-318; 2012.

CAZÉ MO, BUENO D, SANTOS MEF. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda Infantil. *Revista HCPA*, 30: 1 - 8; 2010.

CONDUTAS DO INCA/MS. Leucemias agudas na infância e adolescência. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 47: 245-257; 2001.

COOPER SL, BROWN PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics Clinics of North America*, 62: 61–73; 2015.

DOKWAL S, GHALAUT VS, LOKANATHAN V, BANSAL P, SARKAR M, GUPTA G. Beta 2 microglobulin (B2M) as a marker of disease severity and progression in acute myeloid leukemia (AML). *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 4: 589-594; 2016.

FADERL S, O'BRIEN S, PUI C, STOCK W, WETZLER M, HOELZER D, KANTARJIAN HM. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 116:1165–1176; 2010.

GANDEMER V, RIO AG, DE TAYRAC M, SIBUT V, MOTTIER S, LY SUNNARAM B, HENRY C, MONNIER A, BERTHOU C, LE GALL E, LE TREUT A, SCHMITT C, LE GALL JY, MOSSER J, GALIBERT MD. Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1 positive leucemia. *BMC Genomics*, 23: 1-15; 2007.

GREAVES MF, WIEMELS J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, 3: 639-49; 2003.

HAKEEM A, SHIEKH AA, BHAT GM, LONE AR. Prognostification of ALL by cytogenetics. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 31:322-331; 2015.

HOCK H, SHIMAMURA A. ETV6 in hematopoiesis and leukemia predisposition. *Seminars in Hematology*, 5:98-104; 2017.

HRUŁÁK O, PORWIT-MACDONALD A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*, 16: 1233–1258; 2002.

HUNGER SP, MULLIGHAN CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *The New England Journal of Medicine*, 373:1541-1552; 2015.

INABA H, GREAVES M, MULLIGHAN CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 381: 1943–1955; 2013.

JULIUSSON G, HOUGH R. Leukemia. *Tumors in Adolescents and Young Adults*, 43: 87-100; 2016.

JIMÉNEZ-MORALES S, HIDALGO-MIRANDA A, RAMÍREZ-BELLO J. Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Boletín Medico del Hospital Infantil de México*, 74:13-26; 2017.

KATO M, MANABE A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics International*, 60: 4-12, 2018.

KANG Z, LIU Y, XU L, LONG Z, HUANG D, YANG Y, LIU B, FENG J, PAN Y, YAN J, LIU Q. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chinese Journal of Cancer*, 35: 1– 5; 2016.

KEBRIAEI P, LARSON RA. Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Current Opinion in Hematology*, 10: 284-289; 203.

KYRTSONIS MC, SARRIS K, KOULIERIS E, MALTEZAS D, NIKOLAOU E, ANGELOPOULOU MK, BARTZIS V, TZENOUE T, DIMOU M, SIAKANDARIS MP, VINIOU NA, SACHANAS S, KALPADAKIS C, SFIKAKIS PP, PANGALIS GA, PANAYIOTIDIS P. Serum soluble TACI, a BLys receptor, is a powerful prognostic marker of outcome in chronic lymphocytic leukemia. *BioMed Research International*, 2014: 1-5; 2014.

LEE MLM, PETRILLI, AS. O tratamento da criança com câncer no Brasil: debate da migração. *Pediatria*, 26: 11-12; 2004.

LIANG P, MIAO M, ZHUOGANG L, WANG H, JIANG W, MA S, LI C, HU R. C9 expression indicates a poor outcome in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Biomarkers*, 21: 781-786, 2017.

LIU C, WANG H, WANG J, WANG L, GENG Q, CHEN X, LU Y. Serum neuron-specific enolase levels are upregulated in patients with acute lymphoblastic leukemia and are predictive of prognosis. *Oncotarget*, 7: 55181-55190; 2016.

LOPES TC, ANDRADE KNS, CAMELO NL, RODRIGUES VP, OLIVEIRA RAG. Influence of aberrant myeloid expression on acute lymphoblastic leukemia in children and adolescent from Maranhão, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 13: 10301-10307; 2014.

MALOUF C, OTTERSBAACH K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75:417–446; 2018.

MOORMAN AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 101:407-416; 2016.

MOYA J, PIO L. Parámetros bioquímicos enzimáticos (ALT, AST, ALP, γ -GT, LDH) en niños con leucemia linfoblástica aguda antes del tratamiento antineoplásico. *Horizonte Médico*, 15: 52-58; 2015.

MOTTA VT. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. Editora Médica Missau; .5ªed: 400p; 2009.

NIGRO LL. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 35: 245-252; 2013.

NORONHA EP, MARINHO HT, THOMAZ EBAF, SILVA CA, VERAS GLR, OLIVEIRA RAG. Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhão, northeastern Brazil. *São Paulo Medical Journal*, 129: 392-401; 2011.

OLIVEIRA RAG, POLI-NETO A. *Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais*. Roca: 436; 2004.

OLIVEIRA RAG, PEREIRA J, BEITLER B. Mielograma e imunofenotipagem por citometria de fluxo em hematologia. *Roca*: 440; 2016.

PANG L, LIANG Y, PAN J, WANG J, CHAI Y, ZHAO W. Clinical features and prognostic significance of TCF3-PBX1 fusion gene in chinese children with acute lymphoblastic leukemia by using a modified ALL-BFM-95 protocol. *Pediatric Haematology and Oncology*, 32:173-181;2015.

REIS RSS, CAMARGO B, SANTOS MO, OLIVEIRA JM, SILVA AF, POMBO-DE-OLIVEIRA MS. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. *Pediatric Blood Cancer*, 56: 58-64, 2011.

REIS RS, SANTOS MO, CAMARGO B, OLIVEIRA JFP, THULER LCS, POMBO-DE-OLIVEIRA MS. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. *Pediatric Hematology and Oncology*, 33: 83-93; 2016.

ROBERTS KG, MULLIGHAN CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nature reviews Clinical Oncology*, 12: 344–357; 2015.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ G, SCHÄFER D, GAVILÁN A, VICENTE-DUEÑAS C, HAUER J, BORKHARDT A, SÁNCHEZ-GARCIA I. Modeling the process of childhood *ETV6-RUNX1* B-cell leukemias. *Oncotarget*, 8: 102674-102680; 2017.

ROSE-INMAN H, KUEHL D. Acute leukemia. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32: 579–596; 2014.

SANJUAN-PLA A, BUENO C, PRIETO C, ACHA P, STAM,RW, MARSCHALEK R, MENENDEZ P. Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF41 B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*,126: 2676-2685; 2018.

SERA Y, YAMASAKI N, ODA H, NAGAMACHI A, WOLFF L, INUKAI T, INABA T, HONDA H. Identification of cooperative genes for E2A-PBX1 to develop acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Science*, 107:890-898; 2016.

SHANG YF, FU X, CHANG Y, LI Y, ZHANG M. B2 microglobulin is a novel prognostic marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Scientific Reports*, 8: 1-9; 2018.

Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Protocolo Brasileiro de tratamento da leucemia linfóide aguda na infância GBTLI-LLA-2009. São Paulo:1-347; 2011.

SOOD R, KAMIKUBO Y, LIU P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood*,129:2070-2082;2017.

SOUSA DWL, FERREIRA FVA, FÉLIX HCF, LOPES MVO. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*, 37: 223-229; 2015.

STILLER CA, KROLL ME, BOYLE PJ, FENG Z. Population mixing, socioeconomic status and incidence of childhood acute lymphoblastic leukaemia in England and Wales: analysis by census ward. *British Journal of Cancer*, 98: 1006-1011; 2008.

SUN C, CHANG L, ZHU X. Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget*, 8:35445-35459; 2017.

TERWILIGER T, ABDUL-HAY M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7: e577; 2017.

TOVAR CFL, ZERÓN HM. Intracellular signaling pathways involved in childhood acute lymphoblastic leukemia; molecular targets. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion*, 32: 141-153; 2016.


VROOMAN LM, SILVERMAN LB. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Factors and Clinical Advances. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 11: 385-394; 2016.

XU S, LI X, ZHANG J, CHEN J. Prognostic value of CD56 in patients with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141:1859-1870, 2015.

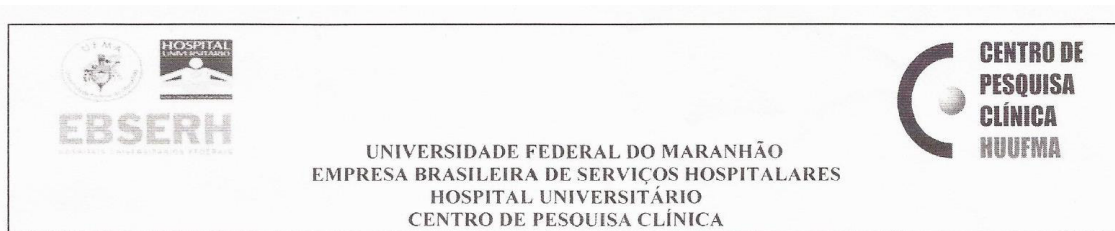
WEINBERG RA. *The biology of cancer*. Garland Science: New York, 850 p; 2006.

ANEXO A

EBSERH HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS FEDERAIS	
Número do Protocolo:	23523.005250/2016-16 (Processo Administrativo)
Data do Processo:	06/10/2016
Data/Hora Abertura Protocolo:	06/10/2016 09:28:51
Unidade Protocolizadora:	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
Origem do cadastro:	[PRTC / HU-UFMA] - Protocolo
Procedência:	Gerência De Ensino E Pesquisa
Interessado:	ANA LUIZA FARIAS SERPA
Tipo de Processo:	Administrativo
Número do Processo:	23523.005250/2016-16
Assunto:	PROJETO DE PESQUISA
Expressão-chave:	



ANEXO B



TERMO DE ANUÊNCIA

Eu, **JOÃO BATISTA SANTOS GARCIA**, concordo com a solicitação de apoio ao projeto de pesquisa intitulado “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS NO MARANHÃO E SUA ASSOCIAÇÃO A PARÂMETROS LABORATORIAIS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**” da mestranda Ana Luiza Farias Serpa sob orientação do Professor Doutor Raimundo Antônio Gomes Oliveira, coordenador do laboratório do CEPEC/HUUFMA/MEC/EBSEH, no que se refere a colaborar para realização do projeto através da liberação dos laudos e exames de imunofenotipagem e biologia molecular relativos aos pacientes oriundos do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello – IMOAB.

São Luís – MA, 16 de janeiro de 2018.

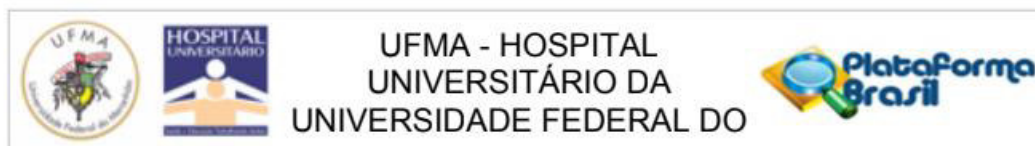
Prof. Dr. João Batista Santos Garcia
Chefe de Unidade de Pesquisa Clínica
CEPEC/HUUFMA/MEC/EBSEH
Matrícula 407719

Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
Centro de Pesquisa Clínica
CNPJ: 15.126.437/0004-96

HUUFMA - Rua Barão de Itapary, 227 Centro, São Luís/MA - C.E.P. 65.020-070

CEPEC - Rua Almirante Tamandaré, 01 Centro C.E.P. 65. 020-600 São Luís – Maranhão Tel: (98) 2109-1293 / Fax: (98) 2109-1294
E-mail cepec@huufma.br

ANEXO C



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS NO MARANHÃO E SUA ASSOCIAÇÃO A PARÂMETROS LABORATORIAIS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Pesquisador: RAIMUNDO ANTÔNIO GOMES OLIVEIRA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 84333517.5.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

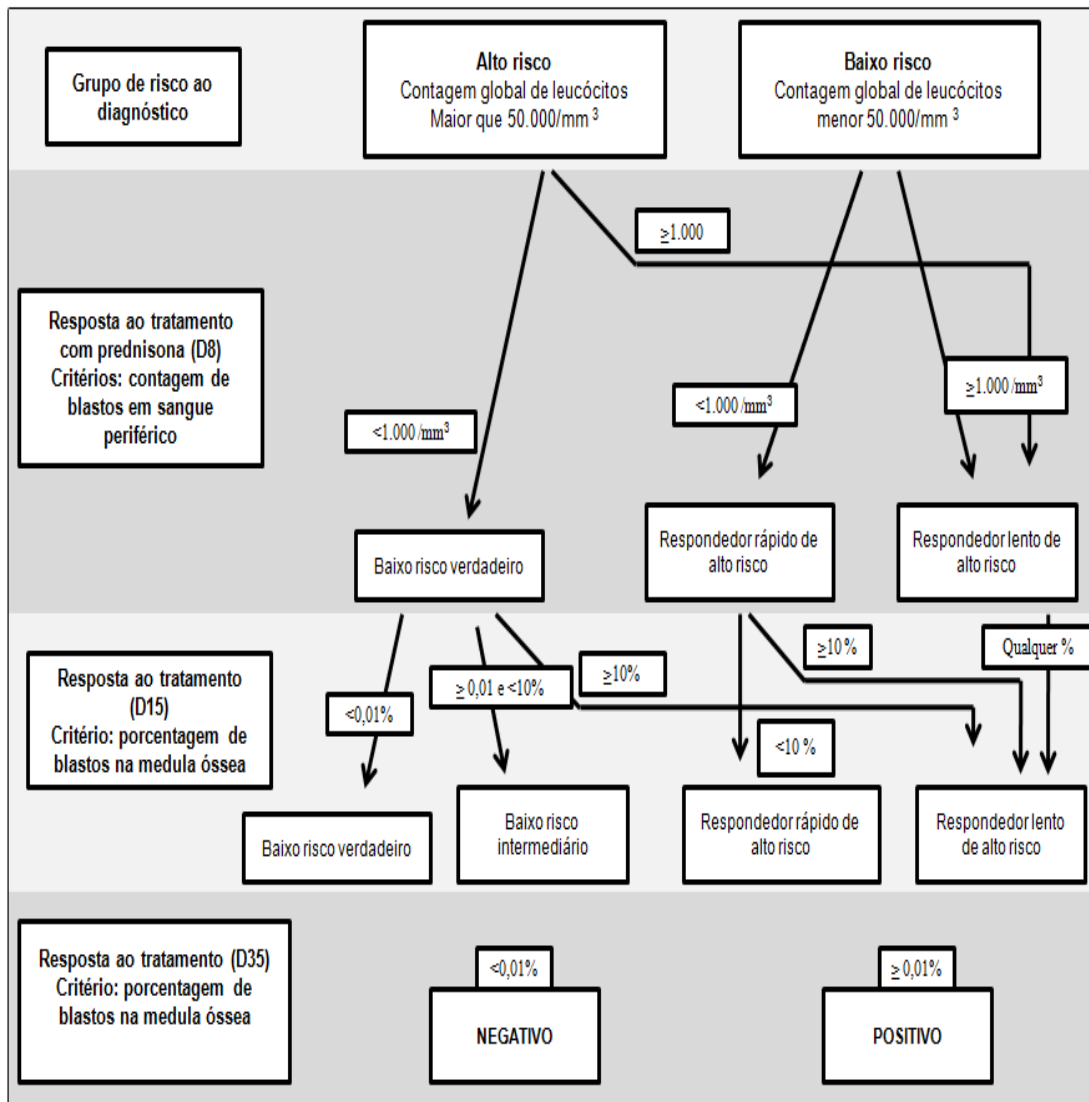
Número do Parecer: 2.793.600

ANEXO D

Marcadores bioquímicos e suas funções fisiológicas

Marcador bioquímico	Metabolismo envolvido	Mecanismo envolvido nas leucemias	Fonte
Lactato desidrogenase	Está presente no citoplasma celular e em maior concentrações no coração e músculo esquelético	Associada a um mau prognóstico, pois está associada com a quantidade de células neoplásicas.	Montillo et al., 2005; Silva et al., 2009;
Bilirrubinas (direta, indireta e total)	Relacionado com o metabolismo hepático	Utilizada para monitoramento de toxicidade ao tratamento	Martelli, 2012; Miura, 2015.
β -2 microglobulina	Proteína que compõe o complexo maior de histocompatibilidade.	Valor prognóstico em pacientes com leucemias	Molica, 2005; Vasconcelos, 2005; Montserrat, 2006;
Enolase neuronal específica	Encontrada principalmente em neurônios maduros ou em células de origem neuronal	Aumentada nas LLAs de mau prognóstico	Liu et al., 2016
Ferro sérico	Relacionado ao metabolismo do ferro, das células sanguíneas, infecções.	Normalmente aumentado devido as sucessivas transfusões de sangue feitas nas leucemias	Unal et al., 2014
Capacidade total de ligação ao ferro	Relacionado ao metabolismo do ferro, das células sanguíneas, infecções.	Normalmente aumentado devido as sucessivas transfusões de sangue feitas nas leucemias	Unal et al., 2014
Vitamina B12	A deficiência desta vitamina está associado a desordens na hematopoese e disfunções no sistema imune	A diminuição da vitamina B12 durante o tratamento da leucemia está relacionado a toxicidade do tratamento quimioterápico	Tandon et al., 2015
Ferritina	Relacionado ao metabolismo do ferro, das células sanguíneas, infecções.	Normalmente aumentado devido as sucessivas transfusões de sangue feitas nas leucemias	Unal et al., 2014
Ácido úrico	Relacionado ao metabolismo proteico e ácidos nucleicos	O aumento do ácido úrico nas leucemias está relacionado a síndrome de lise tumoral, prejudicial ao paciente com leucemia	Yamauchi et al., 2013
Transaminase Oxalacética	Relacionado com o metabolismo hepático	Utilizada para monitoramento de toxicidade ao tratamento	Ladas et al., 2010
Transaminase Glutâmico pirúvico	Relacionado com o metabolismo hepático	Utilizada para monitoramento de toxicidade ao tratamento	Ladas et al., 2010
Fosfatase alcalina	Molécula responsável por hidrolisar grupos fosfato, normalmente é utilizado como marcador de tecidos ósseos.	Os níveis de fosfatase alcalina estão normalmente aumentados nas leucemias	Rico et al., 2016
Gama – Glutamiltransferase	Relacionado com o metabolismo espleno-hepático	Utilizada para monitoramento de toxicidade ao tratamento	Roberts et al., 1978
Cálcio, fósforo e magnésio	Íons importantes para o funcionamento celular	O aumento destes íons nas leucemias pode indicar a síndrome de lise tumoral	Yamauchi et al., 2013

ANEXO E



Pontos de checagem do tratamento das LLA e suas modificações no decorrer do tratamento. A cada etapa do tratamento dos pacientes com LLA são realizadas avaliações para checar a efetividade do tratamento para continuação ou mudança do protocolo utilizado. Os dias de checagem são 8, 15 e 35 e os critérios avaliados variam de acordo com os dias. Modificado de Salina et al, 2016.

ANEXO F

Alterações genéticas nas LLA-B e suas características

Alteração genética	Prognóstico em crianças	Frequência em crianças	Mecanismo	Fonte
t(9;22) (q34.1;q11.2); BCR-ABL1	Desfavorável	1 a 3%	Geração de proteína com atividade tirosina quinase que atua em vias de sinalização celular que dão características proliferativas, de resistência a apoptose e arrasto na diferenciação celular.	BHOJWANI et al., 2015; ARBER et al., 2016; KANG et al., 2016; MALOUF; OTTERSBAACH, 2018;
t(v;11q23.3); rearranjo do gene KMT2A	Desfavorável	80% em crianças ≤ 1 ano 10% de crianças > 1 ano	ativação de alguns fatores presentes nas células troncos responsáveis principalmente pela proliferação celular e outras proteínas relacionadas ao escape da morte celular programada ou apoptose.	BUENO et al., 2011; MARSCHALEK, 2015; ARBER et al., 2016; SANJUAN-PLA et al., 2018.
t(12;21) (p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1	Favorável com variações na clínica	25%	Este gene de fusão codifica fatores de transcrição indispensáveis para a regulação da hematopoese e sua alteração propicia o desenvolvimento da LLA-B.	ARBER et al., 2016; MALOUF; SUN et al., 2017; OTTERSBAACH, 2018; SOOD et al., 2018.
Hiperdiploidia	Favorável	20 – 30%	Ocorre quando a contagem de cromossomos é maior que 50.;	HAKEEM et al., 2015; ARBER et al., 2016; MOORMAN, 2016
Hipodiploidia	Desfavorável	1 – 2%	É definida quando a contagem de cromossomos na célula é menor que 44.	HAKEEM et al., 2015; ARBER et al., 2016; MOORMAN, 2016
t(5;14) (q31.1;q32.3); IL3-IGH	Desfavorável	20%	Está relacionada ao aumento da IL3 que é responsável pelo crescimento e diferenciação celular.	KANEKO et al., 2014; ARBER et al., 2016; DERRIEUX et al., 2018. DERRIEUX et al., 2018.
t(1;19) (q23;p13.3); TCF3-PBX1	Desfavorável	3 – 6%	Responsável pelo aumento da expressão de fatores responsáveis pela proliferação das células B e pela hematopoese levando a um aumento na capacidade proliferativa das células.	ASPLAND et al., 2001; ARBER et al., 2016; SERA et al., 2016; MOORMAN, 2016.
BCR-ABL1-like	Desfavorável	15%	Mutações que apresentam o mesmo perfil de ativação de vias de sinalização que ocorre com o gene de fusão BCR-ABL1.	BOER et al., 2009; ARBER et al., 2016; BOER et al., 2017
iAMP21	Desfavorável	2%	Amplificação intracromossômica do cromossomo 21.	BHOJWANI et al., 2015; ARBER et al., 2016; MOORMAN, 2016.

ANEXO G

Marcadores imunofenotípicos nas leucemias.

Marcadores proteicos	Processo, relacionado	célula	Gene de fusão relacionado
CD 1	Célula T / Receptor TCR		
CD 2	Célula T / Receptor TCR		RUNX1-RUNX1T1
CD 3	Célula T		
CD 4	Célula T/ Receptor TCR		PML-RARA, MLLT3-LMT2A
CD 5	Célula T		
CD 7	Célula T/ Receptor TCR		RUNX1-RUNX1T1
CD 8	Célula T/ Receptor TCR		
CD 10	LLA-B e T e granulócitos/ TCR		Myc
CD 11b	Célula mieloide e nas LLA		PML-RARA, MLLT3-KMT2A
CD 11c	LLA		
CD 13	Célula mieloide		RUNX1-RUNX1T1, BCR-ABL1, PML-RARA
CD 14	Célula mieloide		PML-RARA
CD 15	Célula mieloide		RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA
CD 16	Células NK e mieloide		
CD 19	Célula B		TEL-AML1
CD 20	Célula B		Hiperdiploidia e hipodiploidia
CD 22	Célula B		Hiperdiploidia
CD 23	Célula B		
CD 24	Célula B		
CD 25			
CD 33	Célula Mieloide		PML-RARA, MLLT3-KMT2A, CBFβ-MYH11
CD 34	Células imaturas		TEL-AML1, MLL parceiros, BCR-ABL1
CD 36			
CD 38	Ativação e diferenciação celular de todas linhagens		
CD 41	Plaquetas		RBM15-MLL1
CD 41a			
CD 42	Plaquetas		
CD 45	Panleucocitário		Hiperdiploidia
CD 56	Células linfoides e NK		
CD 57	Células NK		
CD 58			
CD 61	Plaquetas		RBM15-MLL1
CD 65	Células mieloides		
CD 71	Proliferação celular e receptor de transferrina		
CD 79a	Célula B		
CD 99			

CD 103			
CD 117	Célula mieloide e células imaturas		RUNX1-RUNX1T1, AML/ETO, CFBF-MYH11
FMC7			
HLA-DR	Células Imaturas		RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA, MLLT3-KMT2A
IgM	Célula linfoide B		
Kappa/lambda	Célula linfoide B		
MPO	Células Mieloides		RUNX1-RUNXT1, PML-RARA
TdT	Células linfoides e mieloides imaturas		BCR-ABL1, MLL parceiros, TEL-AML4, RUNX1-RUNX1T1 e Hiperdiploidia
TCR α e β	Célula T		
NG2			MLLT3-KMT2A

ANEXO H

Importantes fatores prognósticos nas LLA.

Variável	Fatores favoráveis	Fatores desfavoráveis	Utilização na estratificação de risco
Características demográficas e clínicas			
Idade	De 1 ano até < 10 anos	< 1 ano ou ≥ 10 anos	Característica incluídas na definição de fatores de risco pela Instituição Nacional do Câncer - NCI
Sexo	Feminino	Masculino	Não
Raça ou grupo étnico	Branca, asiática	Negro, hispânico, Americano	Não
Contagem global de leucócitos ao diagnóstico	Baixa (<50.000/mm ³)	Alta (≥50.000/mm ³)	Característica incluídas na definição de fatores de risco pela Instituição Nacional do Câncer - NCI
Características genéticas e biológicas das células leucêmicas			
Imunofenótipo	Linhagem de célula B	Linhagem de célula T	Utilizada para definir terapia principal
Características citogenéticas	ETV6-RUNX1, hiperdiploidia, trissomias cromossômicas favoráveis	BCR-ABL1, rearranjos KMT2A, hipodiploidia	Utilizado para seleção da intensidade do tratamento ou transplante de medula óssea. Algumas características podem ser utilizadas para seleção de terapia alvo-específica.
Características genômicas	Deleções de ERG	Mutações ou deleções em IKZF1, BCR-ABL1-like com alterações em genes kinases	Alguns grupos de pesquisa utilizam as anormalidades associadas ao IKZF1 para intensificar a terapia; os genes kinase mutados podem ser utilizados para seleção de terapia alvo-específica.

Modificado de: HUNGER; MULLIGHAN, 2015.

ANEXO I

Caracterização de parâmetros bioquímicos em pacientes positivos e negativos para o gene *ETV6-RUNX1*.

Parâmetros (Valores de Referência)	Total Mediana/média (Min-Max)	<i>ETV6-RUNX1</i> Mediana/média (Min-Max)	Negativos Mediana/média (Min-Max)	p valor
Lactato desidrogenase (225,0 – 600,0)	383,05 (179,2–5.322,9)	919,6 (375,2-1.416,5)	349,95 (179,2–5.322,9)	0,081
Bilirrubina total (0,20-1,10)	0,4 (0,2–1,09)	0,375 (0,21-0,65)	0,46 (0,2–1,09)	0,327
Bilirrubina direta (0,10-0,30)	0,07 (0,02-0,52)	0,65 (0,02 – 0,15)	0,07 (0,04-0,52)	0,573
Bilirrubina indireta (0,10-0,80)	0,32 (0,13-0,65)	0,315 (0,3-0,41)	0,36 (0,13-0,65)	0,400
β-2 microglobulina (604-2.286)	2.999,5 (1.942-11.330)	2.764 (2.213-3.270)	3.718 (1.942-11.330)	0,199
Enolase neuronal específica (até 12,5)	8,6 (4 – 112,2)	10,2 (7,2-75,9)	6,15 (4 – 112,2)	0,181
Ferro sérico (35,0-150,0)	209 (60,7 – 364,4)	219,75 (60,7-364,4)	201,45 (113,2-314,4)	0,917
Capacidade total de ligação do ferro (228,0-428,0)	185,5 (103-318)	186 (103-235)	185,5 (117–318)	0,719
% Saturação total da transferrina (20-55)	100,42 (0 – 185,19)	113,21 (0-151,26)	93,76 (60,47–185,19)	0,614
Vitamina B12 (180-900)	179 (42 – 1.500)	179 (112–404)	225 (42–1.500)	0,615
Ferritina (16-243)	459,5 (92 – 1.500)	414,5 (187-1.500)	642 (92-1.500)	0,846
Ácido úrico (3,6-7,7)	2,8 (0,6 – 20,1)	2,5 (1,2-4,9)	3,25 (0,6-20,1)	0,219
Transaminase Glutâmico Oxalacética (até 40)	31,5 (19 – 837)	37,5 (19-152)	30 (20-837)	0,438
Fosfatase alcalina (150-600)	166,5 (78 – 396)	161 (86-329)	224,5 (78-396)	0,536
Transaminase Glutâmico pirúvico (até 41)	13,5 (7 – 217)	16 (8-30)	13,5 (7-217)	0,948
Gama- Glutamiltransferase (10-71)	39 (8 – 318)	47,5 (8-138)	24,5 (12–318)	0,999
Cálcio (8,5-10,5)	8,85 (4,8 – 10,2)	8,7 (8,2-9,9)	8,85 (4,8-10,2)	0,524
Fósforo (4,0-7,0)	4,7 (1,3 – 9,2)	4,75 (3,4-7,3)	4,65 (1,3-9,2)	0,885
Magnésio (1,58-2,55)	1,93 (1,18 – 2,75)	1,93 (1,48-2,12)	1,94 (1,5-2,75)	0,402

ANEXO J

Caracterização clínica e imunofenotípica dos pacientes classificados de acordo com a presença ou ausência dos parâmetros bioquímicos.

		LLA-B COM BIOQUÍMICA N= 23	LLA-B SEM BIOQUÍMICA N= 6	p valor
		No.(%)		
Sexo				0,056
	Masculino	16(69,4)	1(16,7)	
	Feminino	7(30,4)	5(83,3)	
Idade ao diagnóstico		-		0,107
	< 1 ano	21(91,2)	1(16,7)	
	1 a 10 anos	2(8,8)	4(66,6)	
	> 10 anos		1(16,7)	
Raça		4(17,3)	-	0,652
	Negra	5(21,9)	1(16,7)	
	Branca	4(17,3)	1(16,7)	
	Parda	10(43,5)	4(66,6)	
	Não informada			
Visceromegalias				0,103
	Presente	18(78,3)	2(33,3)	
	Ausente	1(4,4)	1(16,7)	
	Não informada	4(17,3)	3(50,0)	
Contagem de leucócitos ao diagnóstico				0,870
	< 50.000/mm ³	18(78,3)	5(83,3)	
	> 50.000/mm ³	4(17,3)	1(16,7)	
	Não informado	1(4,4)	-	
Imunofenótipo B				0,871
	Pró-B ou B-I	1(4,4)	0(0,0)	
	B-comum ou B-II	15(65,2)	4(66,6)	
	Pré-B ou B-III	7(30,4)	2(33,4)	
Classificação de risco ao diagnóstico				0,999
	Baixo Risco (GBTLI-09)	17(73,9)	4(66,6)	
	Alto risco (GBTLI-09)	6(26,1)	2(33,4)	
Caracterização molecular				0,369
	<i>ETV6-RUNX1</i>	8(34,8)	3(50,0)	
	<i>TCF-PBX1</i>	6(26,1)	-	
	<i>NEGATIVO</i>	9(39,1)	3(50,0)	