



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA A PREDNISONA NO DIA 8 DA
FASE DE INDUÇÃO DO TRATAMENTO DE LEUCEMIAS
LINFOBLÁSTICA AGUDA: ENFOQUE NA DETERMINAÇÃO
DO PERCENTUAL DE BLASTOS RESIDUAIS POR
CITOMETRIA DE FLUXO E VALOR PREDITIVO DE
PROGNÓSTICO**

Khalil Lima da Costa Maia dos Santos

São Luís
2020

KHALIL LIMA DA COSTA MAIA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA A PREDNISONA NO DIA 8 DA
FASE DE INDUÇÃO DO TRATAMENTO DE LEUCEMIAS
LINFOBLÁSTICA AGUDA: ENFOQUE NA DETERMINAÇÃO
DO PERCENTUAL DE BLASTOS RESIDUAIS POR
CITOMETRIA DE FLUXO E VALOR PREDITIVO DE
PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Processos Biológicos em saúde

Linha de Pesquisa: HPV e câncer

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Antonio Gomes Oliveira

Coordenador:

São Luís
2020

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

LIMA DA COSTA MAIA DOS SANTOS, KHALIL.

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA A PREDNISONA NO DIA 8 DA FASE DE INDUÇÃO DO TRATAMENTO DE LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICA AGUDA: ENFOQUE DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE BLASTOS RESIDUAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO E VALOR PREDITIVO DE PROGNÓSTICO / KHALIL LIMA DA COSTA MAIA DOS SANTOS. - 2020.

74 p.

Orientador(a): RAIMUNDO ANTONIO GOMES OLIVEIRA.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, Prédio de Pós-Graduação do CCBS/ Cidade Universitária, 2020.

1. CITOMETRIA DE FLUXO. 2. LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS. 3. OITAVO DIA. 4. PROTOCOLO DE TRATAMENTO. I. ANTONIO GOMES OLIVEIRA, RAIMUNDO. II. Título.

KHALIL LIMA DA COSTA MAIA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA A PREDNISONA NO DIA 8 DA FASE DE INDUÇÃO
DO TRATAMENTO DE LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICA AGUDA: ENFOQUE
DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE BLASTOS RESIDUAIS POR
CITOMETRIA DE FLUXO E VALOR PREDITIVO DE PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof. Dr. Raimundo Antonio Gomes Oliveira. (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dra. Elda Pereira Noronha Ávila (Examinador)
Instituto Nacional do Câncer - INCA

Prof. Dr. Marcelo Sousa de Andrade(Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Socorro Cartagenes (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

A meu Deus e senhor JESUS CRISTO, a quem devo tudo que tenho e sou.

Aos meus pais José e Maria, grandes investidores dos meus estudos. Além dos meus amados irmãos Ibne e Taiana, e meus sobrinhos Davi, Maria Alice, Benjamin, Andre, Rafisa e Ana Cecilia.

À minha esposa maravilhosa Ana Karoline e meu filho amado, Asaph.

A todos os pacientes do IMOAB

À minha família Lima da Costa e Maia dos Santos.

AGRADECIMENTOS

À Jesus, o meu maior agradecimento, por todo sustento, força e saúde a mim dado todos os dias.

Ao meu orientador, colega de profissão, grande exemplo profissional, o Prof. Dr. Raimundo Antonio Gomes Oliveira, quem permitiu que eu contribuísse com meu trabalho em prol do desenvolvimento de pesquisas. À Dra Elda Noronha Avila, colega de profissão, exemplo de capacidade, humildade e amor as pesquisas, por todas as sugestões para a melhoria deste trabalho, que se tornou indispensável neste sentido. Aos meus amigos e colegas do laboratório de pesquisa clinica, Ingrid Carneiro e Nilma Pinheiro, que me ensinam todos os dias. Além das amigas Thaiana Rabelo e Heliana Marinho, que por lá passaram.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, em especial a professora Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento e a todos os professores que compõem o corpo docente, por todos os ensinamentos pessoais e teóricos durante o periodo em que fiz parte dos discentes. Não poderia deixar de agradecer também a todo pessoal que compõe a secretaria do programa, que sempre nos recepcionou e nos deu suporte quando precisávamos, em especial ao Sr. Domingos (*In memorian*).

Agradeço aos médicos Cesar Casagrande, Aline Reis, e Geni Ramos, por contribuir com seus trabalhos clínicos para que a pesquisa fosse desenvolvida e para que novas e promissoras pesquisas sejam desenvolvidas.

Todo saber é vão, exceto quando há trabalho. E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor. E quando trabalhais com amor, vós vos unis a vós próprios, e uns aos outros, e a Deus.

Khalil Gibran

RESUMO

Introdução: As leucemias linfoides agudas (LLA) são as neoplasias mais comuns na infância contando com 25 a 30% dos casos nessa faixa etária de 1 a 9 anos. Contudo em adultos representa cerca de 20%. É caracterizada pelo bloqueio maturativo e proliferação de células precursoras da linhagem linfóide após sofrerem alterações genético-moleculares específicas. Os pacientes são submetidos a protocolos de tratamento que determinam como estratificação de risco: a resposta a prednisona do Dia 8 (D8) do tratamento, avaliado pela citomorfologia, doença residual mínima (DRM) no D15 e D35 do tratamento, avaliados por imunofenotipagem por citometria de fluxo (CMF). Pacientes com < 1.000 blastos/ mm^3 (valor absoluto) em sangue periférico (SP) no D8 são considerados como bons respondedores. Da mesma forma são considerados como bons respondedores quando doença residual mínima (DRM) em medula óssea (MO) $< 0,01\%$ de blastos nos D15 e D35 do tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar se a quantificação relativa de células leucêmicas (percentual de blastos) no SP no D8 de tratamento de pacientes com LLA tem associação com DRM no D15, D35, recaída e sobrevida global (SG). **Material e métodos:** setenta e quatro pacientes diagnosticados com LLA, no período de 2014 a 2019, oriundos do centro de referência em oncologia do estado do Maranhão foram incluídos neste estudo. Foram coletados os dados clínicos, laboratoriais e imunofenotípicos e cadastrados em um banco de dados para posterior análises de correlação. No D8 de tratamento realizou-se hemograma automatizado, avaliação citomorfológica e imunofenotipagem por CMF para determinação do valor absoluto (por mm^3) e relativo de blastos em sangue periférico. Estabeleceu-se como ponto de corte do valor relativo 5% de blastos em SP para as análises comparativas. Foram analisadas as sobrevidas globais (SG), em 48 meses, pelo método de *Kaplan-Meier* e diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de *log-rank*. Um *p* valor $< 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. **Resultados:** 85,1% atingiram uma contagem de blastos no dia 8 de tratamento $\leq 1.000/\text{mm}^3$. Observou-se que grande parte dos pacientes (73%) não foram bons respondedores a quimioterapia no D15 do tratamento, os quais apresentaram DRM $> 0,01\%$. No dia 35 ou 33 de tratamento, 44,6% responderam a terapia (DRM negativos) e 47,3%, não (DRM $> 0,01\%$). Dos 74 pacientes analisados 22 foram a óbito (29,7%) e 11 (14,9%) recidivaram. A correlação do percentual de

blastos no D8 determinado por citomorfologia e CMF foi satisfatória ($r = 0.66$, $p < 0,001$.) Não houve associação dos valores absolutos (< 1.000 blastos/ mm^3 e ≥ 1.000 blastos/ mm^3) e relativos ($< 5\%$ de blastos e $\geq 5\%$ de blastos), identificados tanto pela citomorfologia quanto CMF, no D8, com DRM no D15, DRM no D35 e recaída. Observou-se na coorte total influencia na SG pela estratificação 1.000 blastos/ mm^3 e ≥ 1.000 blastos/ mm^3 e pelo ponto de coorte de 5% de blastos determinada apenas por CMF. SG de $44,4\%$ para < 1.000 blastos/ mm^3 e $73,4\%$ para ≥ 1.000 blastos/ mm^3 ($p = 0,03$). Para pacientes com $< 5\%$ de blastos no D8 a SG foi de $74,7\%$ e para aqueles com $\geq 5\%$, SG de $53,3\%$ ($p = 0,03$). No grupo de pacientes com < 1.000 blastos/ mm^3 observou-se que pacientes com $\geq 5\%$ de blastos apresentaram uma SG menor ($50,0\%$) e os pacientes com $< 5\%$ SG maior ($78,9\%$) ($p = 0,01$). **Conclusão:** O percentual relativo de blastos determinado por CMF deve ser levado em consideração no D8, principalmente no grupo de pacientes considerados bom respondedores (< 1.000 blastos/ mm^3), onde observou-se que o valor relativo (acima de 5% de blastos) demonstrou influenciar na sobrevida global de forma significativa.

Palavras-chave: Leucemias linfoblásticas aguda. Protocolo de tratamento. Citometria de Fluxo. Oitavo dia

ABSTRACT

Introduction: Acute lymphoid leukemias (ALL) are the most common neoplasms in childhood, accounting for 25 to 30% of cases in the age group from 1 to 9 years. However, in adults it represents about 20%. It is characterized by the maturation block and proliferation of precursor cells of the lymphoid lineage after undergoing specific genetic-molecular changes. Patients are submitted to treatment protocols that determine how risk stratification: the response to prednisone on Day 8 (D8) of treatment, assessed by cytomorphology, minimal residual disease (DRM) on D15 and D35 of treatment, assessed by cytometry immunophenotyping flow (CMF). Patients with $<1,000$ blasts / mm^3 (absolute value) in peripheral blood (SP) at D8 are considered to be good responders. Likewise, they are considered as good responders when minimal residual disease (DRM) in bone marrow (OM) $<0.01\%$ of blasts in D15 and D35 of treatment. The aim of this study was to assess whether the relative quantification of leukemic cells (percentage of blasts) in SP at D8 for treatment of ALL patients is associated with DRM at D15, D35, relapse and overall survival (SG). Material and methods: seventy-four patients diagnosed with ALL, from 2014 to 2019, from the oncology reference center in the state of Maranhão were included in this study. Clinical, laboratory and immunophenotypic data were collected and registered in a database for further correlation analysis. In the treatment D8, automated blood count, cytomorphological evaluation and immunophenotyping by CMF were performed to determine the absolute (per mm^3) and relative value of blasts in peripheral blood. It was established as a cohort point of the relative value of 5% of blasts in SP for comparative analysis. Overall survival (SG) at 48 months was analyzed using the Kaplan-Meier method and differences between groups were compared using the log-rank test. A p value <0.05 was considered to be statistically significant. Results: 85.1% reached a blast count on day 8 of treatment $\leq 1,000$ / mm^3 , which corresponds to 63 patients. It was observed that most of the patients (73%) were not good responders to chemotherapy in the D15 of the treatment, who presented $\text{DRM} > 0.01\%$. On day 35 or 33 of treatment, 44.6% responded to therapy (negative DRM) and 47.3% did not ($\text{DRM} > 0.01\%$). Of the 74 patients analyzed, 22 died (29.7%) and 11 (14.9%) relapsed. The correlation of the percentage of blasts in D8 determined by cytomorphology and CMF was satisfactory ($r = 0.66$, $p < 0.001$.) There was no association of absolute values ($<1,000$ blasts / mm^3 and $\geq 1,000$ blasts

/ mm³) and relative (<5% blasts and ≥5% blasts), identified both by cytomorphology and CMF, on D8, with DRM on D15, DRM on D35 and relapse. It was observed in the total cohort that it influenced the SG by stratification 1,000 blasts / mm³ and ≥1,000 blasts / mm³ and by the 5% blast cohort point determined only by CMF. SG of 44.4% for <1,000 blasts / mm³ and 73.4% for ≥1,000 blasts / mm³ ($p = 0.03$). For patients with <5% of blasts at D8, SG was 74.7% and for those with ≥ 5%, SG was 53.3% ($p = 0.03$). In the group of patients with <1,000 blasts / mm³, it was observed that patients with ≥ 5% of blasts had a lower SG (50.0%) and patients with <5% greater SG (78.9%) ($p = 0,01$). Conclusion: The relative percentage of blasts determined by CMF should be taken into account in D8, especially in the group of patients considered to be good responders (<1,000 blasts / mm³), where it was observed that the relative value (above 5% of blasts) demonstrated to significantly influence overall survival.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemias. Treatment protocol. Flow cytometry. Eighth day.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AR	Alto risco
AR-RL	Alto Risco Responder Lento
AR-RR	Alto Risco Responder Rápido
BFM	Berlim-Frankfurt-Munique
BR	Baixo Risco
BRI	Baixo Risco Intermediário
BRV	Baixo Risco Verdadeiro
CEPEC-HUUFMA	Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
CMF	Citometria de Fluxo
DRM	Doença Residual Mínima
EGIL	European group for the immunological classification of leukemias
FAB	French-American-British Cooperative Group
IMOAB	Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLA-B	Leucemia linfóide aguda do subtipo B
LLA-T	Leucemia linfóide aguda do subtipo T
OMS	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais antígenos de diferenciação utilizados para identificar diferentes tipos celulares durante a hematopoese normal e leucêmica.....	25
Tabela 2	Classificação imunofenotípica das LLA (EGIL).....	27
Tabela 3	Classificação da OMS para as leucemias agudas.....	29
Tabela 4	Critérios utilizados para inclusão dos pacientes de LLA nos grupos de alto e baixo risco.....	30
Tabela 5	Caracterização clínico-laboratorial dos 74 pacientes atendidos no CEPEC-HUUFMA no ano de 2013-2019.....	42
Tabela 6	Associação dos valores absolutos de blastos no D8 e DRM no D15.....	48
Tabela 7	Associação dos valores absolutos de blastos no D8 e DRM no D35.....	48
Tabela 8	Associação dos valores absolutos de blastos no D8 e recaída.....	49
Tabela 9	Associação do valor relativo (percentual) de blastos no D8 por morfologia e associação com DRM no D15.....	49
Tabela 10	Associação do valor relativo (percentual) de blastos no D8 por morfologia e associação com DRM no D35.....	49
Tabela 11	Associação do valor relativo (percentual) de blastos no D8 por morfologia e associação com recaída.....	50
Tabela 12	Associação do valor relativo (percentual) de blastos no D8 por citometria de fluxo e associação com D15.....	50
Tabela 13	Associação do valor relativo (percentual) de blastos no D8 por citometria de fluxo e associação com D35.....	51
Tabela 14	Associação do valor relativo (percentual) de blastos no D8 por citometria de fluxo e associação com recaída.....	51
Tabela 15	Análise de sobrevida no grupo de pacientes com $<1.000/\text{mm}^3$ no D8.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação das LLAs de acordo com a classificação FAB.....	26
Figura 2	Grupos de risco e critérios para estratificação de pacientes com LLA-B derivada após a última emenda do protocolo GBTLI-LLA/2009 nos dias 0, 8, 15 e 35 de tratamento.....	32
Figura 3	Grupos de risco e critérios para estratificação da LLAT após a última emenda do protocolo GBTLI-LLA/2009 nos dias 0, 8, 15 e 35 de tratamento.....	33
Figura 4	Fluxograma representando as etapas do estudo.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Comparação entre a porcentagem de blastos no D8, por morfologia (MORF) e citometria de fluxo (CMF).....	44
Gráfico 2	Comparação entre a porcentagem de blastos no D8, por morfologia e citometria de fluxo.....	45
Gráfico 3	Comparação entre os bons e maus respondedores ao tratamento através da porcentagem de blastos no D8, por morfologia.....	45
Gráfico 4	Comparação entre os bons e maus respondedores ao tratamento através da porcentagem de blastos no D8, por citometria de fluxo.....	46
Gráfico 5	Comparação do percentual de blastos avaliados por citometria de fluxo entre pacientes positivos e negativos para DRM no D15 de tratamento ($p < 0,043$).....	47
Gráfico 6	Comparação do percentual de blastos avaliados por citometria de fluxo entre pacientes positivos e negativos para DRM no D35 de tratamento ($p < 0,428$).....	47
Gráfico 7	Análise de sobrevida em pacientes com quantidade de leucócitos < 50.000 blastos/ mm^3 e os com quantidade ≥ 50.000 blastos/ mm^3	52
Gráfico 8	Análise de sobrevida em pacientes com quantidade de leucócitos < 1.000 blastos/ mm^3 e os com quantidade ≥ 1.000 blastos/ mm^3	52
Gráfico 9	Análise de sobrevida em pacientes com quantidade $< 5,0\%$ de blastos / mm^3 e os com quantidade $\geq 5,0\%$ de blastos / mm^3 , por morfologia.....	53
Gráfico 10	Análise de sobrevida em pacientes com quantidade $< 5,0\%$ de blastos/ mm^3 e os com quantidade $\geq 5,0\%$ de blastos/ mm^3 , por citometria de fluxo (CMF).....	53

Gráfico 11	Análise de sobrevida em pacientes DRM D15 positivas e DRM D15 negativas.	54
Gráfico 12	Análise de sobrevida em pacientes DRM D35 positivas e DRM D35 negativas.	54
Gráfico 13	Análise de sobrevida em pacientes com leucometria $<50.000/\text{mm}^3$ e $\geq 50.000/\text{mm}^3$ dentre os bons respondedores (<1.000 blastos/ mm^3).	55
Gráfico 14	Análise de sobrevida em pacientes com $<5,0\%$ e $\geq 5,0$ de blastos (morfologia), dentre os bons respondedores (<1.000 blastos/ mm^3).	56
Gráfico 15	Análise de sobrevida em pacientes com $<5,0\%$ e $\geq 5,0$ de blastos (citometria de fluxo-CMF), dentre os bons respondedores (<1.000 blastos/ mm^3).	56
Gráfico 16	Análise de sobrevida em pacientes com DRM em D15 negativa e os com DRM em D15 positiva, dentre os bons respondedores (<1.000 blastos/ mm^3).	57
Gráfico 17	Análise de sobrevida em pacientes com DRM em D35 negativa e os com DRM em D35 positiva, dentre os bons respondedores (<1.000 blastos/ mm^3).	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	As leucemias linfoblásticas agudas (LLA)	22
2.2	Análise imunofenotípica e mielograma	24
2.3	A classificação das leucemias	26
2.4	Grupo Brasileiro de Tratamento da leucemia na Infância - 2009 (GBTLI-09)	29
2.5	Fatores prognósticos nas LLA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Geral	35
3.2	Específicos	35
4	MÉTODOS	36
4.1	Caracterização dos pacientes	36
4.2	Tipo de estudo e critérios de inclusão	36
4.3	Características das amostras	36
4.4	Hemogramas	37
4.5	Desenho experimental	37
4.6	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	39
4.7	Análises de dados	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Cracterização da amostra	42
5.2	Avaliação da correlação da qualificação de blastos no D8, por morfologia e imunofenotipagem	44

5.3	Associação do D8 e DRM no D15 e D35.....	46
5.4	Análise de sobrevida.....	51
5.5	Análise de sobrevida considerando somente os pacientes com menos de 1000 ($<1.000/\text{mm}^3$).....	55
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÃO.....	63
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	ANEXOS.....	73