



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA

**IMPACTO DA DETECÇÃO DE BLASTOS LEUCÊMICOS DURANTE O PROTOCOLO
DE TRATAMENTO DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B: IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E
LABORATORIAIS**

CLAUDIO LUCAS DOS SANTOS CATÃO

Manaus-AM

2024

CLAUDIO LUCAS DOS SANTOS CATÃO

**IMPACTO DA DETECÇÃO DE BLASTOS LEUCÊMICOS DURANTE O PROTOCOLO
DE TRATAMENTO DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B: IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E
LABORATORIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas, em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia.

Orientador: Dr. Allyson Guimarães da Costa, doutor em Medicina Tropical pela Universidade do Estado do Amazonas, HEMOAM.

Coorientadora: Dra. Leny Nascimento da Motta Passos, doutora em Medicina Tropical pela Universidade do Estado do Amazonas, HEMOAM.

Manaus-AM

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas

S237i Santos Catão, Claudio Lucas dos

Impacto da detecção de blastos leucêmicos durante o protocolo de tratamento dos pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda de células b: implicações clínicas e laboratoriais / Claudio Lucas dos Santos Catão. Manaus: [s.n], 2024.

84 f.: il.; 21,0 cm.

Dissertação - Hemoterapia- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2024.

Inclui Bibliografia.

Inclui Anexo.

Orientador: Allyson Guimarães da Costa.

Coorientador: Leny Nascimento da Motta Passos.

1. Leucemia pediátrica. 2. Células leucêmicas residuais. 3. Doença residual mensurável; 4. Citometria de fluxo. 5. Prognóstico. I. Allyson Guimarães da Costa (Orient.) II. Leny Nascimento da Motta Passos (Coorient.) III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título

CDU (1997)615.38

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo autor.

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 10/2024


Ao vigésimo oitavo dia do mês de agosto do ano de 2024, às 14h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação do discente **Claudio Lucas dos Santos Catão**, sob o título: “**Impacto da Detecção de Blastos Leucêmicos Durante o Protocolo de Tratamento dos Pacientes Pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B: Implicações Clínicas e Laboratoriais**”, tendo como orientador o Prof. Dr. **Allyson Guimarães da Costa** e coorientadora a Prof.^a Dr.^a **Leny Nascimento da Motta Passos**, segundo encaminhamento da Prof.^a Dr.^a **Andréa Monteiro Tarragô**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído ao discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa – Presidente (UFAM / HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: _____ CPF: <u>887.165.032-87</u>
Prof. ^a Dr. ^a Leticia Gomes de Pontes – Membro (UFMG)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: _____ CPF: <u>319.865.698-29</u>
Prof. Dr. Nilberto Dias de Araújo – Membro (HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: _____ CPF: <u>051.353.474-10</u>


O parecer final da Defesa de Dissertação foi:


Aprovado

Não Aprovado

Documento assinado digitalmente
 ALLYSON GUIMARAES DA COSTA
Data: 28/08/2024 17:00:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 LETICIA GOMES DE PONTES
Data: 28/08/2024 19:00:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 NILBERTO DIAS DE ARAUJO
Data: 28/08/2024 17:21:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

FICHA DE JULGAMENTO

**IMPACTO DA DETECÇÃO DE BLASTOS LEUCÊMICOS DURANTE O PROTOCOLO
DE TRATAMENTO DOS PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B: IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E
LABORATORIAIS**

Banca examinadora composta por:

Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa
(Presidente)

Nilberto Dias de Araújo
(Membro Titular Interno do Programa)

Letícia Gomes Pontes
(Membro Titular Externo do Programa)

A minha mãe, pelo exemplo de vida e por todo incentivo e dedicação. Estou certo de que o maior motivo de cada conquista minha está em suas orações e apoio.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que é minha inspiração, minha fé e meu destino, e a Ele agradeço todos os dias por permitir que meu esforço me conduza a vitória. Assim me conduzindo me dando forças e saudade para persevera em minhas conquistas.

A minha mãe Ângela Maria dos Santos Catão pelo exemplo de vida e dedicação, sempre acreditando nas minhas conquistas e que sempre acreditou e me apoiou em toda minha jornada me dando forças em suas palavras e incentivo para um futuro melhor.

As minhas quatro irmãs, que eu sei que posso contar em toda as etapas da minha vida e que sempre vão me apoiar, me ajudar em tudo que eu precisar e nos dias mais difíceis serão sempre a minha família que irei procurar, porque sei que posso contar.

Não posso esquecer dos meus amigos que estão comigo há anos e aos que chegaram recentemente. Sei que são pessoas que eu tenho um grande carinho e sempre que posso me faço presente. Nesses momentos difíceis que o mestrado me colocou, eu pude ter certeza quem são os meus amigos e contar com quem estava ao meu lado também para me distrair e tudo ficar mais leve.

Um carinho especial ao meu grupo de pesquisa Amazon InterScience, pois sem o suporte deles o projeto não ia ser o mesmo. Agradeço a ajuda no laboratório, correções e dicas que sempre são muito ricas de conhecimento.

Agradeço em especial a aluna de iniciação científica Estela Coelho que me acompanhou e sua ajuda foi essencial para a conclusão do projeto. Além disso, agradeço aos meus queridos amigos do grupo Fábio Magalhães e Juliana Neves que no pouco tempo que nos conhecemos já construímos uma amizade sólida e linda. Eles sempre muito atenciosos quando eu precisei tanto na área da pesquisa quanto pessoal, espero que possamos levar essa amizade além do mestrado, pois amo como família.

A minha turma 11/2022 do PPGH, espero que nossa união permaneça e que possamos continuar nos ajudando e dando apoio quando precisamos, só tenho a agradecer mesmo por eu ter ficado nessa turma.

Ao Prof. Dr. Allyson Guimarães que me deu a oportunidade de realizar este trabalho sendo meu orientador. Me dando todo o apoio e suporte até nos momentos mais difíceis, meu exemplo a seguir como pessoa e profissional. Tem todo meu carinho, admiração e orgulho. Eu sei tudo que passou por esse tempo e sei que você ama o que faz e é lindo como conduz tudo com a maior dedicação visando a perfeição, por isso é meu exemplo e que tenho maior admiração.

A Prof^a Dr^a. Leny da Mota Passos que me ajudou nos detalhes dos protocolos de tratamento e nas avaliações dos pacientes. Além de ter aceitado ser minha Coorientadora.

Aos colaboradores do Laboratório de Marcadores Celulares, por todo o apoio oferecido para que o projeto fosse realizado com excelência.

Aos colaboradores do SAME, por nos ajudarem com a logística de busca em prontuários e coleta de todas as informações necessárias.

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) por ceder os espaços e equipamentos necessários para a execução do projeto.

A Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH), seus Docentes e Técnicos pelos ensinamentos, auxílio e oportunidade de qualificação profissional.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro para a realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte e estrutura da Pós-Graduação.

“Não são as nossas habilidades que revelam quem realmente somos. São as nossas escolhas.”

Alvo Dumbledore

DECLARAÇÃO DE AGÊNCIAS FINANCIADORAS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela Bolsa de Estudos (através da resolução nº 005/2022 - Programa POSGRAD 2022/2023) e por financiar indiretamente esta pesquisa (através das resoluções nº 002/2008, 007/2018 e 005/2019 - Programa PRÓ-ESTADO).

RESUMO

A doença residual mensurável (DRM) é o mais importante preditor independente de risco de recaída e sobrevivência a longo prazo em crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B), sendo definida como a detecção e/ou quantificação de blastos leucêmicos residuais além do nível de sensibilidade da citomorfologia, ou seja, por metodologias mais sensíveis como citometria de fluxo ou métodos moleculares. Considera-se DRM negativa, de forma variável e de acordo com a técnica adotada, como $<0,01$ a $0,1\%$ de blastos leucêmicos na medula óssea (MO). Com base em seu resultado é possível otimizar a quimioterapia, minimizando a toxicidade e diminuindo o risco de recaída. Assim, nosso estudo descreveu as implicações clínicas e laboratoriais após a identificação de blastos leucêmicos durante o protocolo de tratamento dos pacientes pediátricos com LLA-B. Foi realizado um estudo analítico, do tipo longitudinal e prospectivo, com avaliação de amostras de Medula Óssea (MO) e sangue periférico (SP) de pacientes pediátricos submetidos a terapia de indução da remissão da LLA-B na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) para avaliação da DRM por citometria de fluxo (CF). Foram utilizados os protocolos e diretrizes do Consórcio EuroFlow, com a aquisição das amostras no citômetro FACSCanto II da Fundação HEMOAM a análise dos dados da imunofenotipagem com o software Kaluza (v1.2). Em paralelo, foram coletados os dados sociodemográficos e clínico-laboratoriais, a partir dos registros do Sistema iDoctor, prontuários físicos dos pacientes e sistema SofLab. Foram incluídos no estudo 25 pacientes diagnosticado com LLA-B com idade mediada de 6 anos, com predomínio do sexo feminino (68%). Os indivíduos foram avaliados e iniciaram o tratamento com o protocolo BFM-2009, sendo classificados nos grupos de alto risco (40%), risco intermediário (32%) e baixo risco (28%). Ao realizarmos o comparativo entre as técnicas adotadas pela rotina com a análise por citometria de fluxo utilizando o protocolo adaptado do Consórcio EuroFlow, nota-se que houve aquisição e avaliação significativamente maior das células pelo método descrito em nosso estudo. Quando comparamos a detecção das CLs, observamos que o nosso protocolo (adaptado do Consórcio EuroFlow) foi significativamente melhor na detecção dos blastos nos tempos D15, D35 e D84. Embora no D8 não tenha se observado diferenças significativas, nota-se que a CF foi relativamente melhor que a contagem automatizada. Em conclusão, podemos perceber que nosso estudo indicou melhores resultados quanto a detecção precoce de blastos leucêmicos e a avaliação da DRM durante o tratamento quimioterápico, com impacto positivo para o prognóstico dos pacientes.

Palavras Chaves: leucemia pediátrica; células leucêmicas residuais; doença residual mensurável; citometria de fluxo; prognóstico.

ABSTRACT

Measurable residual disease (MRD) is the most important independent predictor of relapse risk and long-term survival in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), defined as the detection and/or quantification of residual leukemic blasts beyond the sensitivity level of cytomorphology, i.e., by more sensitive methodologies such as flow cytometry or molecular methods. Negative MRD is considered, to a variable extent and according to the technique adopted, as <0.01 to 0.1% of leukemic blasts in the bone marrow (BM). Based on this result, it is possible to optimize chemotherapy, minimizing toxicity and reducing the risk of relapse. Thus, our study described the clinical and laboratory implications after the identification of leukemic blasts during the treatment protocol of pediatric patients with B-ALL. A longitudinal, prospective, analytical study was conducted to evaluate bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) samples from pediatric patients undergoing remission induction therapy for B-ALL at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) for evaluation of MRD by flow cytometry (FC). The protocols and guidelines of the EuroFlow Consortium were used, with the acquisition of samples on the FACSCanto II cytometer of the HEMOAM Foundation and the analysis of immunophenotyping data with the Kaluza software (v1.2). In parallel, sociodemographic and clinical-laboratory data were collected from the iDoctor System, physical records of patients and the SofLab system. Twenty-five patients diagnosed with B-ALL at an average age of 6 years, predominantly female (68%), were included in the study. The individuals were evaluated and started treatment with the BFM-2009 protocol, being classified into high-risk (40%), intermediate-risk (32%), and low-risk (28%) groups. When comparing the techniques adopted by the routine with flow cytometry analysis using the protocol adapted from the EuroFlow Consortium, it was noted that there was significantly greater acquisition and evaluation of cells by the method described in our study. When comparing the detection of LCs, we observed that our protocol (adapted from the EuroFlow Consortium) was significantly better in detecting blasts at times D15, D35, and D84. Although no significant differences were observed at D8, it was noted that the FC was relatively better than the automated count. In conclusion, we can see that our study indicated better results regarding the early detection of leukemic blasts and the evaluation of MRD during chemotherapy treatment, with a positive impact on the patients' prognosis.

Keywords: pediatric leukemia; residual leukemic cells; measurable residual disease; flow cytometry; prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de Hematopoiese na LLA-B com o bloqueio na diferenciação da célula progenitora linfoide, que acarreta a superprodução de linfoblastos, com diminuição no desenvolvimento das demais linhagens hematopoiéticas.....	19
Figura 2: Demonstração dos blastos no sangue periféricos, e sua interação com o microambiente tumoral.....	20
Figura 3: Processo da translocação do BCR-ABL1 durante o desenvolvimento fetal..	21
Figura 4: Incidência de casos de LLA no estado do Amazonas e seus municípios.	23
Figura 5: Sinais e sintomas presentes na leucemia, causado pelo aumento do número de blastos leucêmicos e a diminuição de células sanguíneas maduras.....	25
Figura 6: Estágios de maturação imunofenotípica de células B.....	27
Figura 7: Influência dos mediadores imunológicos na proliferação e sobrevivência de blastos leucêmicos no microambiente tumoral de pacientes com LLA-B	29
Figura 8: Estratégia de análise de dados para maturação dos linfócitos B, com base nos marcadores principais (CD19/CD10/CD20/CD34/CD45)	35
Figura 9: Fluxograma do trabalho	41
Figura 10: Processo de aquisição e análise da imunofenotipagem, amostra passando pelo citometro de fluxo e gerando gráficos para análise.	44
Figura 11: Representação gráfica da aquisição em citometro de fluxo.....	45
Figura 12: Fluxograma das análises obtidas por grupo.....	47
Figura 13: Correlação das técnicas utilizadas durante o tratamento.....	48
Figura 14: Correlação ao número de eventos do linfoblastos.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da LLA-B pela OMS de 2022.	26
Tabela 2: Critérios de estratificação de risco no diagnóstico	30
Tabela 3: Critérios de estratificação de risco no diagnóstico, de acordo com o GBTLI LLA-2009.	31
Tabela 4: Comparação das metodologias para a quantificação de blastos leucêmicos e avaliação de DRM	39
Tabela 5: Painel de marcadores para avaliação da DRM	43
Tabela 6: Característica demográficas e clínicas dos pacientes pediátricos com LLA-B.	48
Tabela 7: Hemograma do sangue periférico dos pacientes pediátricos com LLA-B durante a quimioterapia de remissão.	50
Tabela 8: Hemograma da medula óssea dos pacientes pediátricos com LLA-B durante a quimioterapia de remissão.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 9: Performance da avaliação da DRM vs. metodologias aplicadas na rotina durante o tratamento dos pacientes pediátricos com LLA-B	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

AR	Alto Risco
BD	Becton & Dickinson
BFM	Berlin-Frankfurt-Munster
BR	Baixo Risco
CD	Cluster of Differentiation
CF	Citometria de Fluxo
CLs	Células Leucêmicas
CM	Contagem Manual
COG	Children's Oncology Group
DRM	Doença Residual Mensurável
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D8	Dia 8 da terapia de indução da remissão
D15	Dia 15 da terapia de indução da remissão
D35	Dia 35 da terapia de indução da remissão
D84	Consolidação da terapia da remissão
EBV	Vírus Epstein Barr
FAB	Franco-Americano-Britânico
FSC	Forward Scatter
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL	Interleucina
LAIP	Imunofenótipos Associados à Leucemia
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfoblástica Crônica
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda de células T
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
MO	Medula óssea
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da Cadeia Polimerase
Ph ⁺	Philadelphia positivo
RI	Risco Intermediário
RNA	Ácido Ribonucleico
SAME	Setor de Atendimento Médico e Estatístico
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sangue Periférico
SSC	Side Scatter
TA	Temperatura Ambiente
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda.....	17
2.1.1 Etiopatogenia.....	18
2.1.2 Epidemiologia	21
2.1.3 Aspectos Clínicos.....	23
2.1.4 Diagnósticos da LLA	24
2.1.5 Protocolos de Tratamento para a LLA	28
2.2 Doença Residual Mensurável	32
2.2.1 Detecção de blastos leucêmicos através do mielograma	32
2.2.2 Detecção da DRM por Citometria de Fluxo.....	33
2.2.3 Detecção da DRM pelo teste molecular (qPCR).....	36
2.3 Aspectos Clínicos para DRM na LLA-B.....	37
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Aspectos éticos.....	41
4.2 Modelo, Área e População de estudo	41
4.3 Critérios de elegibilidade	42
4.4 Obtenção dos dados clínicos e laboratoriais	42
4.5 Obtenção das amostras	42
4.6 Protocolo de <i>Bulk Lyse</i>	42
4.7 Imunofenotipagem Celular para DRM na LLA-B.....	43
4.8 Análise da Imunofenotipagem	44
4.9 Definição da DRM nos tempos de tratamento: D8, D15, D35 e 84.....	45
4.10 Análise descritiva e estatística	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1 Características da população do estudo e dados laboratoriais	47
5.2 Monitoramento da DRM durante o tratamento da LLA-B	52
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIA	61
9. APÊNDICES.....	68

9.1	Apêndice 01: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HEMOAM.....	68
9.2	Apêndice 02: Protocolo <i>Bulk Lyse</i> do Consórcio EuroFlow.....	71
9.3	Apêndice 03: Protocolo de Imunofenotipagem Celular para DRM.....	74
10.	ANEXOS	76
10.1	Resumos publicados em anais de eventos 2022-2024	76
10.2	Artigos publicados em Revistas Internacionais 2022-2024	80

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna hematológica caracterizada pela expansão anormal de linfócitos imaturos ou blastos leucêmicos na medula óssea (MO), com liberação no sangue periférico (SP) e sítios extramedulares. Dentre os subtipos, destaca-se a LLA de células B (LLA-B), correspondendo a 80% dos casos na fase pediátrica (2 a 5 anos). Dados científicos, apontam uma taxa de cura de aproximadamente 80-90%, no entanto, ainda podem ocorrer recaídas numa taxa aproximada entre 10 e 20% (1,2).

Eventualmente, a recaída da LLA está relacionada à resistência aos medicamentos quimioterápicos utilizados, onde os blastos leucêmicos diminuem a capacidade proliferativa e adquirem resistência a apoptose, promovendo um agravamento na doença e destacando a importância do monitoramento durante a quimioterapia (1).

Nesse sentido, torna-se fundamental a avaliação da doença residual mensurável (DRM), definida como a detecção e/ou quantificação de blastos leucêmicos residuais além do nível de sensibilidade da citomorfologia, ou seja, por metodologias mais sensíveis como citometria de fluxo (CF) ou métodos moleculares (3).

A avaliação da DRM no Brasil ocorre a partir de amostras coletadas em diferentes pontos de tempo do regime terapêutico, sendo baseado em dois protocolos principais, o Protocolo Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) e, em especial, o Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI) (4). Esses protocolos buscam atingir a remissão completa dos pacientes, avaliando a resposta terapêutica, estratificando os pacientes em grupos de risco de tratamento, de acordo com parâmetros clínicos e laboratoriais, a exemplo: idade, sexo, contagem de leucócitos, imunofenótipo, presença de infiltrado de blastos leucêmicos no sistema nervoso, além de translocações cromossômicas (5).

A detecção da DRM é o fator preditor independente mais importante para avaliar o risco de recaída e sobrevivência a longo prazo em pacientes com LLA-B. No entanto, a avaliação da DRM não foi amplamente adotada e vários centros de tratamento ainda utilizam a análise citomorfológica, que possui baixa sensibilidade, não permitindo a avaliação da DRM (6). Sabe-se que a detecção e monitoramento da DRM tornou-se fundamental na terapia da LLA-B, visto que o risco de recaída pode ser identificado

inicialmente através da avaliação da DRM nas fases iniciais do tratamento quimioterápico.

Além disso, sabe-se que os protocolos atuais de tratamento da LLA-B avaliam a resposta ao quimioterápico através da análise da DRM em diferentes pontos de tempo das fases da quimioterapia de remissão, referidos como: dia 15 (D15) e dia 35 (D35) da terapia de indução da remissão. No entanto, no dia 8 (D8) da terapia de indução da remissão e dia 84 da terapia de consolidação da remissão (D84), o primeiro e o último momento de avaliação da resposta terapêutica, respectivamente, a maioria dos protocolos utiliza análise citomorfológica do sangue periférico e medula óssea para estratificação de risco, com respostas boas ou ruins definidas como contagens de blastos leucêmicos abaixo e acima de 1.000/mm³ ou percentuais abaixo de 0,01%, respectivamente.

Por conta disso e com o objetivo de refinar essa avaliação, além de obter informações prognósticas mais precoces e precisas do resultado do tratamento, o protocolo do *Children's Oncology Group* adotou a avaliação de DRM indo do D8 ao D84, observando resultados significativamente positivos na resposta ao tratamento. No entanto, a avaliação precoce da DRM no D8, D15 e D84 não foi amplamente adotada e vários protocolos ainda utilizam a análise citomorfológica ou com contadores hematológicos pouco específicos. Desta forma, o presente estudo buscará avaliar o impacto da detecção precoce da DRM no prognóstico clínico de pacientes pediátricos com LLA atendidos no Amazonas. Os resultados aqui obtidos poderão auxiliar no estabelecimento de intervenções terapêuticas mais assertivas de maneira antecipada, diminuindo a exposição a terapias ineficazes e potencialmente tóxicas, além de diminuir a chance de recaídas após a quimioterapia de remissão, uma vez que as células leucêmicas residuais se tornam resistentes e são fontes de recorrência e metástase.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

A distinção entre as linhagens linfoblásticas e mieloblásticas e suas formas agudas e crônicas da leucemia só foi possível após 1968, com a identificação das diferentes linhagens celulares envolvidas na leucemia. Com o objetivo de estabelecer um sistema de subclassificação para as leucemias agudas em 1976, um grupo de hematopatologistas formou o Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) que separou a leucemia linfoblástica da mieloblástica, com base nas suas diferentes características celulares. Este sistema baseava-se exclusivamente na avaliação microscópica/ morfológica, que é realizada a partir dos esfregaços de aspirado de medula óssea, complementados por um procedimento de coloração citoquímica (7)

Em 1985, o sistema foi revisado para fornecer esclarecimentos e melhorar as técnicas de diagnóstico, com base em novas informações da avaliação celular, obtidas através de citometria de fluxo. Atualmente é o método utilizado para definir o diagnóstico, identificando a linhagem celular e o estágio de maturação acometido (3,8).

Atualmente, a classificação tradicional das leucemias agudas é baseada nas características imunofenotípicas. A classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para as leucemias linfoblásticas reconhece dois subtipos: precursora de origem de células B e T, ambas abrangendo espectros das alterações clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e citogenéticas, além das características moleculares distintas. Alguns fatores de risco foram identificados, como: síndromes de Klinefelter e Down, ataxia, telangiectasia, síndrome de Bloom e telomeropatias, anemia de Fanconi, disceratose congênita e síndrome de Shwachman-Diamond. Infecções virais, com os vírus Epstein Barr (EBV) e vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV), exposição à radiação ionizante, radioterapia, exposição ambiental com benzeno, histórico de tabagismo, histórico de quimioterapia com agentes alquilantes e agentes topoisomerase II também foram associados no desenvolvimento de leucemias agudas (9,10).

Assim, foi definido que a LLA é uma neoplasia hematológica maligna de células imaturas da linhagem linfoblástica e que o acúmulo de linfoblastos na medula óssea, resulta no comprometimento da hematopoese normal e na liberação de blastos leucêmicos na corrente sanguínea, o que resulta na tríade da leucemia caracterizada por anemia,

neutropenia e trombocitopenia. Além disso, também pode comprometer tecidos extramedulares, uma vez que os blastos leucêmicos podem invadir órgãos como gânglios linfáticos, fígado, baço, além do sistema nervoso central (SNC) (11).

A LLA-B corresponde a cerca de 80% dos casos de LLA, possuindo um pico de incidência em torno de 2-5 anos. Já a população mais velha que é acometido pela LLA representa uma porcentagem menor que 5%, com uma faixa etária de 25 a 59 anos e apresentam um número maior de subtipos de Leucemia Linfoblástica Aguda de células T (LLA-T) que possui características diferenciadas da LLA-B (12).

2.1.1 Etiopatogenia

A fisiopatologia da LLA é caracterizada por anormalidades cromossômicas e alterações genéticas envolvidas na diferenciação e proliferação de células precursoras linfoides. Apesar da escassez de informações, acredita-se que o processo envolve a interação entre fatores ambientais e genéticos, que combinados, levam a modificações celulares. Essas alterações são conhecidas como leucemogênese e ocorrem no compartimento medular, levando ao comprometimento hematopoiético e de maturação das células, com posterior proliferação das células leucêmicas (CLs) (**Figura 1**) (13,14).

O compartimento da MO é um microambiente fisiológico específico para células-tronco-hematopoiéticas (CTH), abrigando ainda células-tronco mesenquimais (CTM). Esse local possui a capacidade de manter as características das células-tronco pluripotentes, como auto renovação e proliferação, tendo uma estrutura complexa e sendo composto por dois nichos distintos: o osteoblástico e o vascular. Em um nicho normal, esses osteoclastos e osteoblastos desempenham papéis críticos na remodelação e estrutura do nicho, regulando a maturação e a proliferação das células na MO através da expressão e secreção de várias moléculas reguladoras. No contexto leucêmico, ocorrem alterações nos nichos da MO e nas células estromais, que passam a contribuir para a promoção e manutenção da malignidade (9,16).

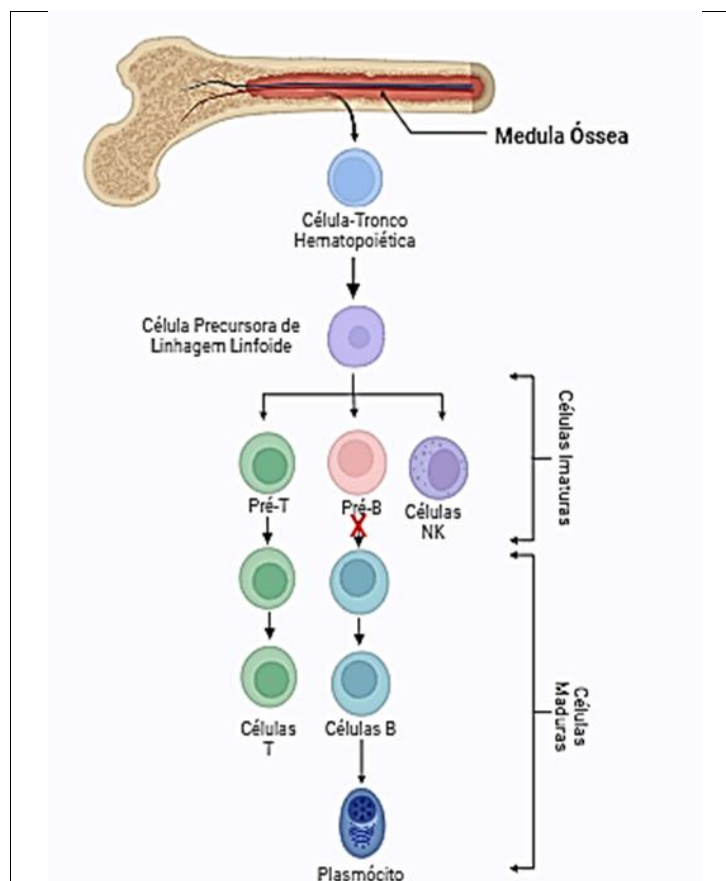


Figura 1: Processo de Hematopoiese na LLA-B com o bloqueio na diferenciação da célula progenitora linfóide, que acarreta a superprodução de linfoblastos, com diminuição no desenvolvimento das demais linhagens hematopoiéticas

Fonte: (15), adaptador pelo autor com o software Biorender®.

As CLs possuem uma independência parcial dos sinais regulatórios provenientes do microambiente hematopoiético para sua sobrevivência e proliferação, induzindo sinais proliferativos, que podem ser mediados por moléculas do sistema imunológico. Estas, possuem a capacidade de ativar inapropriadamente fatores que orquestram o crescimento celular, com replicação do DNA e divisão celular. A presença de uma população celular anormal acaba suprimindo a população normal devido a sua alta proliferação germinativa na MO, podendo acometer locais extramedulares, como o SP (**Figura 2**) (10).

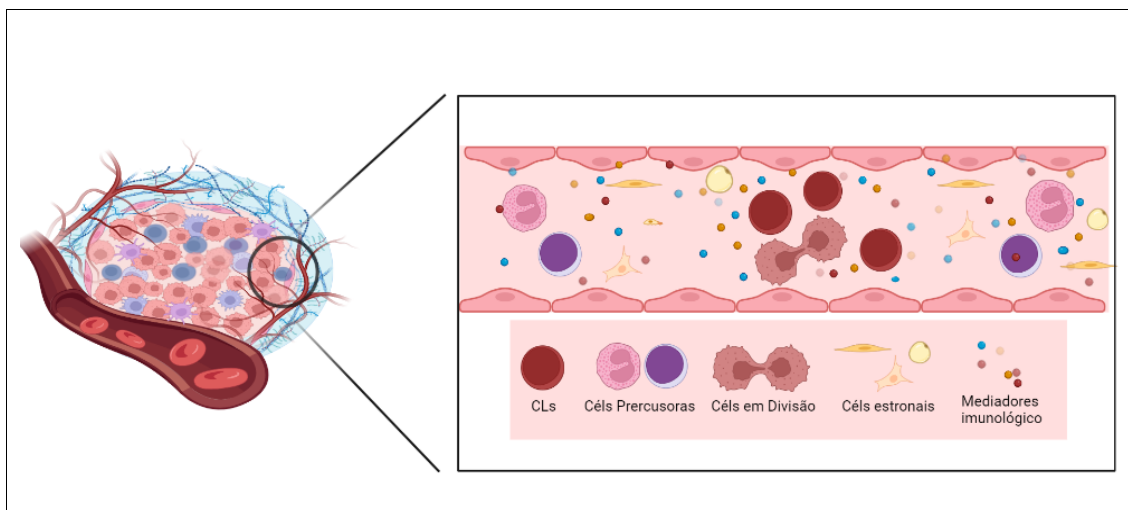


Figura 2: Demonstração dos blastos no sangue periféricos, e sua interação com o microambiente tumoral.

Fonte: (10), adaptado pelo autor com o software Biorender®.

Atualmente, há evidências convincentes que as translocações cromossômicas são frequentemente associadas com eventos iniciais na leucemia, ocorrendo durante o desenvolvimento fetal. Essa evidência vem de duas teorias: estudos com bebês gêmeos idênticos e com crianças com LLA. Quando se analisa esses casos, percebe-se que a maioria apresentam a fusão dos genes TEL e AML1 com a translocação t(12;21) que formam um gene quimérico ou de fusão. Esses pontos de interrupção precisos nos genes TEL e AML1 podem ser identificados ou mapeados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). As quebras sempre ocorrem, dentro de uma região limitada desses genes, mas as CLs de cada paciente têm um ponto de quebra único na sequência de DNA (12,17).

As anomalias cromossômicas da LLA são caracterizadas em numéricas e estruturais grosseiras, incluindo hiperploídia (>50 cromossomos), hipoploídia (<44 cromossomos) e translocações [t (12;21), t (1;19), t (9;22), t (4;11)] (18,19). Muitos rearranjos interferem os genes que regulam a hematopoiese normal, como resultado se desenvolvem os blastos leucêmicos, que ativam oncogenes e as tirosinas quinases. As hiperdiploidias e o rearranjo ETV6–RUNX1 estão associados a resultados favoráveis, já as hipodiploidias e o rearranjo MLL são associados a um pior prognóstico em crianças e adultos. De acordo com Mel Greaves, há evidências convincentes de que o cromossomo envolvido na translocação, são muitas vezes os iniciadores dos eventos na leucemia, ocorrendo durante o desenvolvimento fetal (**Figura 3**) (12,17).

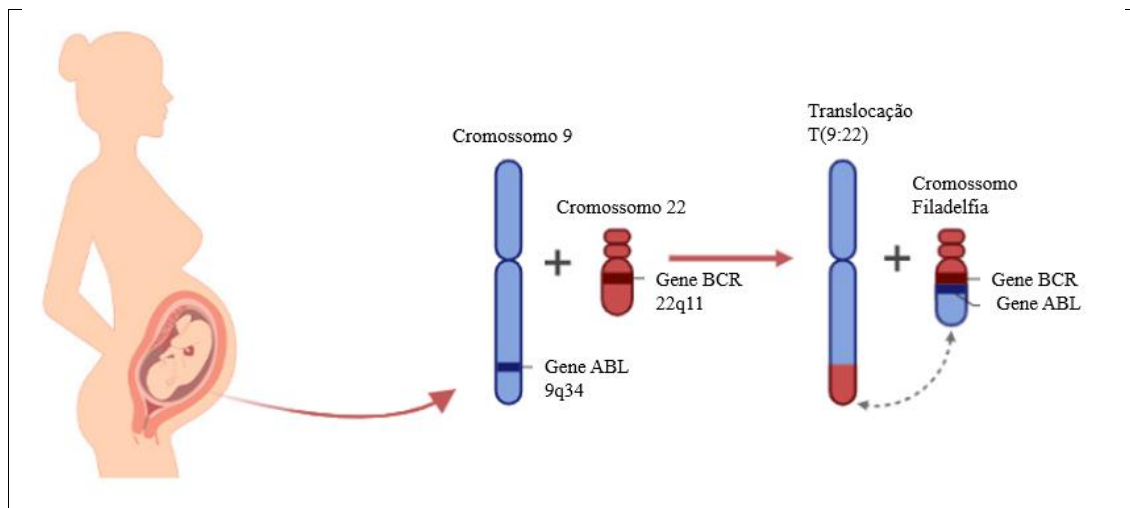


Figura 3: Processo da translocação do BCR-ABL1 durante o desenvolvimento fetal.

Fonte: (12), adaptado pelo autor através do Biorender®.

Estudos tem associado a LLA a anomalias congênitas, como: Síndrome de Down, Síndrome Bloom, Anemia de Fancone e Neurofibromatose; além de exposição ocupacional materna a produtos químicos e radiação ionizante, que coletivamente explicam menos de 10% dos casos (20). Além disso, estudos demonstraram que crianças que desenvolvem LLA apresentam ao nascimento, um desequilíbrio no sistema imunológico, que ocorre devido a uma baixa expressão da IL-10, uma citocina chave na regulação e duração das respostas imunológicas (21).

2.1.2 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leucemias atualmente podem ser classificadas com base na linhagem celular afetada. Dessa forma, as leucemias que acometem os linfócitos são chamadas de linfoblásticas, enquanto as que afetam as células mieloides são denominadas de mieloblásticas, sendo ainda subclassificadas em agudas ou crônicas, representadas por quatro principais subtipos: Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA), Leucemia Mieloblástica Crônica (LMC), Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e Leucemia Linfoblástica Crônica (LLC) (22).

As leucemias agudas são progressivas e agressivas, devido a rápida proliferação das células imaturas, denominadas de blastos leucêmicos, com agravamento em um curto intervalo de tempo. Enquanto as crônicas, resultam da proliferação de células maduras

bem diferenciadas, apresentando uma progressão lenta, seguida de uma fase acelerada que, ao longo do tempo, pode se transformar em uma leucemia aguda (23)

Em relação a leucemia mieloblástica, ocorre frequentemente em adultos com mais de 55 anos, já a leucemia linfoblástica é mais frequente em crianças menores de 15 anos. Assim, dentre as leucemias agudas da infância, a LLA destaca-se por ser a neoplasia pediátrica de maior ocorrência no mundo, representando 25% de todas as neoplasias infantis, tendo maior incidência entre crianças de dois a três anos, com uma ligeira predominância no sexo masculino (22).

Há diferentes tipos de LLA que são distribuídas de acordo com a linhagem acometida, podendo ser uma LLA de células B (85% dos casos), célula T (10-15% dos casos) e células Natural Killers (NK) (<1% dos casos). A incidência varia entre os diferentes continentes, mas pode ser influenciada, em parte, pela industrialização, além dos diferentes métodos de diagnósticos, bem como ferramentas de notificação. A incidência da LLA é maior em hispânicos (43 casos/milhão) e brancos (caucasianos) americanos (36 casos/milhão), com menores taxas em negros americanos e asiáticos (15 casos/milhão) (18,24).

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) descrevem que irão ocorrer 249 mil casos novos de leucemia no triênio 2023-2025. No Brasil, segundo informações publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), há uma estimativa de mais de 11.540 casos de leucemias, com um risco estimado de 6.250 casos para homens e 5.290 para mulheres (25).

A incidência nas regiões do país é variável, com os casos de leucemia ocupando a sexta posição entre os mais frequente nas Regiões Norte (4,53 por 100 mil habitantes) e Nordeste (5,54 por 100 mil) do Brasil, seguido pela Região Sudeste (5,83 por 100 mil), com a 11ª posição. Na Região Centro-oeste (4,29 por 100 mil), é a 12ª neoplasia mais frequente, enquanto na Região Sul (7,28 por 100 mil), ocupa a 14ª posição. Entre as mulheres, é o sexto mais frequente na Região Norte (3,64 por 100 mil), ocupando a nona posição na Região Nordeste (5,08 por 100 mil), seguida pela Região Sul (6,97 por 100 mil), com a 11ª posição. Nas Regiões Centro-oeste (3,27 por 100 mil) e Sudeste (4,36 por 100 mil), é o 13º e 14º tipo de câncer mais frequente, respectivamente. Em relação à mortalidade, em 2020, ocorreram no Brasil, 6.738 óbitos por leucemia (3,18 por 100 mil

habitantes), sendo 3.703 óbitos (3,58 por 100 mil) em homens, 3.035 óbitos (2,80 por 100 mil) em mulheres (25–27).

Referente a Região Norte, estudo realizado no estado do Amazonas, demonstrou alto número de casos de LLA (577 casos em 10 anos) no Estado do Amazonas, sendo 459 (79,55%) casos de LLA de células B, 52 (9,01%) de células T, e um caso de LLA bifenotípica (T/B). Em adição, 65 casos, não registravam o subtipo definido (11,27%). Os pacientes em sua maioria estavam na faixa etária de ≤ 10 anos, com uma predominância no sexo masculino. A capital do Estado, Manaus (**Figura 4**), foi identificada como a cidade com a maior incidência, com 310 (55,56) casos, seguido pelos municípios de Tefé e Maués (11 e 10 casos, respectivamente) (28,29).

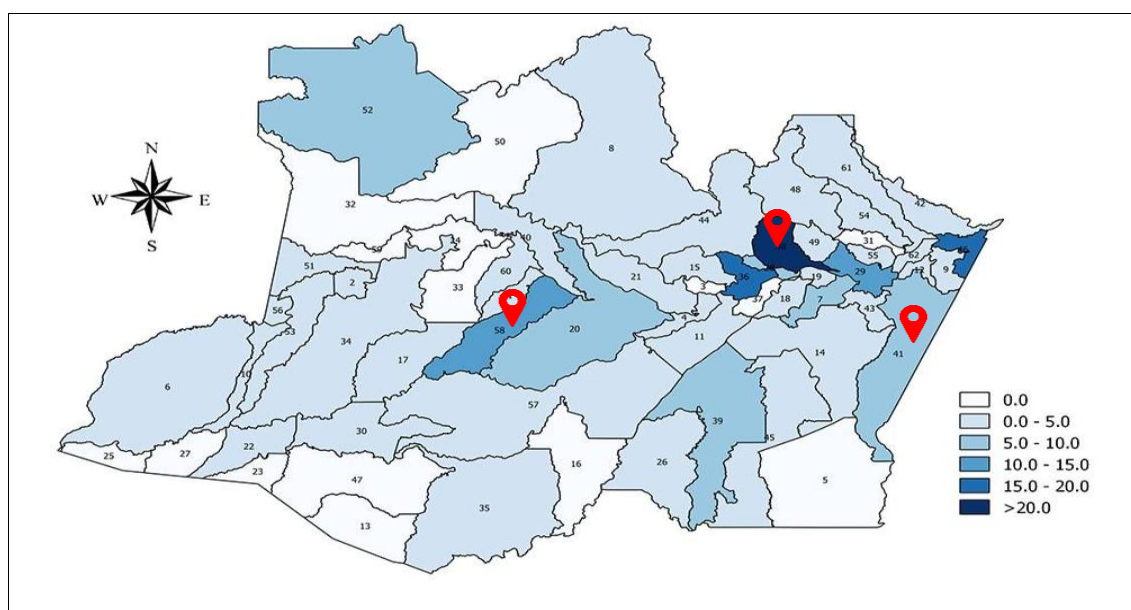


Figura 4: Incidência de casos de LLA no estado do Amazonas e seus municípios.

Fonte: (28), adaptado pelo autor.

2.1.3 Aspectos Clínicos

Nos estágios iniciais da LLA, o seu diagnóstico é difícil, pois os sintomas se assemelham ao de outras doenças. No entanto, conforme as CLs se acumulam na MO, impedem a expansão de células progenitoras hematopoiéticas normais. Digno de nota, as leucemias agudas, apresentam uma rápida evolução, sendo usualmente agressivas, evoluindo para óbito rapidamente. Nesse sentido, destaca-se a necessidade da realização

de um diagnóstico precoce, sensível e que possa inferir acerca do prognóstico e tratamento, possibilitando maior chance de cura ao paciente (30).

Assim, a maioria dos sinais e sintomas presente na LLA é resultado da diminuição de células sanguíneas maduras, tendo como principais sinais e sintomas a anemia, trombocitopenia e leucopenia com neutropenia. Os pacientes que são acometidos com anemia podem apresentar fadiga, dispneia, cefaleia ou dor torácica. Os que apresentam trombocitopenia podem apresentar hematomas ou sangramento faciais, principalmente do nariz e das gengivas ($\pm 60\%$ dos pacientes). Mesmo no cenário de uma contagem de leucócitos normal ou elevada, os pacientes podem apresentar sintomas de disfunção de suas células imunológicas. Isso pode ser evidente através de feridas cutâneas ou mal cicatrizadas, infecções recorrentes e, em alguns casos até sepse (31).

O aumento dos linfonodos acontece pela disseminação de blastos leucêmicos para os gânglios linfáticos, como, por exemplo, na região do pescoço, virilha ou axilas, podendo ser notado como nódulos sob a pele (**Figura 5**). Os linfonodos do tórax ou abdômen também podem aumentar de tamanho, mas, esses só podem ser diagnosticados por exames de imagem, como tomografia computadorizada ou ressonância magnética (32). Já o inchaço no abdômen ocorre em função do acúmulo de blastos leucêmicos no fígado e no baço, provocando aumento de tamanho desses órgãos. Isso pode provocar uma sensação de saciedade após uma pequena refeição, além de provocar dor no quadrante superior esquerdo do abdômen (32).

2.1.4 Diagnósticos da LLA

O diagnóstico clínico se inicia pelos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes, em conjunto com os achados laboratoriais. O primeiro exame realizado é o hemograma, que apresenta um quadro de pancitopenia, consistindo na redução das três linhagens hematopoiéticas, levando à anemia, leucopenia e plaquetopenia, caracterizados como a tríade leucêmica (33).

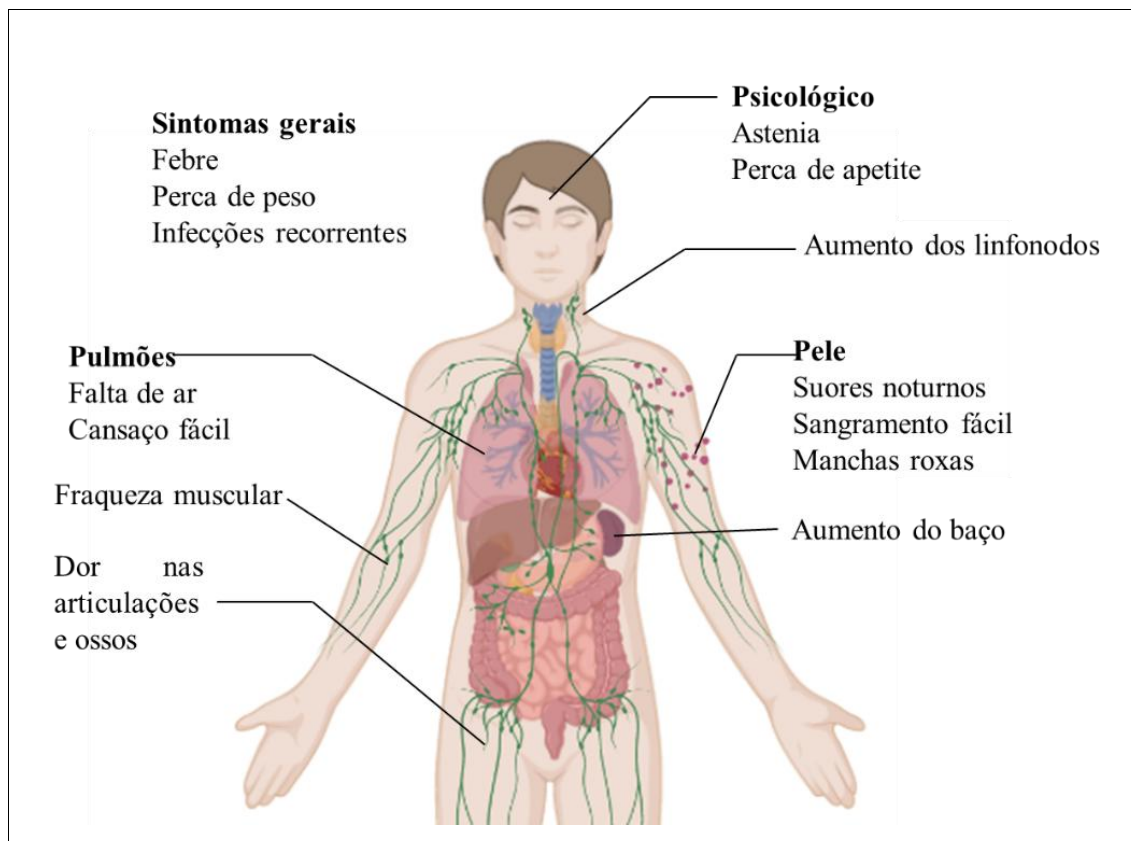


Figura 5: Sinais e sintomas presentes na leucemia, causado pelo aumento do número de blastos leucêmicos e a diminuição de células sanguíneas maduras.

Fonte: (32), adaptado pelo autor.

Em alguns casos, essas alterações podem ocorrer de forma mais acentuada, indicando um risco maior e progressão da doença, ou ainda em casos que apresentam forma mais moderada. Entretanto, para a confirmação do diagnóstico da LLA, é necessário a realização do exame denominado mielograma, que consiste na análise citomorfológica do material da MO, juntamente com exames de imunofenotipagem celular, citogenética e biologia molecular (34).

Para realizar a classificação da LLA é realizado a imunofenotipagem por citometria de fluxo, detectando os marcadores celulares específicos para cada tipo de linhagem e estágio de maturação celular, identificando os subtipos de leucemias, que não são distinguidos através da avaliação por morfologia. A identificação do tipo celular envolvido na leucemogênese é de grande importância médica, influenciando diretamente no regime terapêutico em que o paciente será submetido (35).

Em 2008, as LLA de células B e T foram subclassificadas pela OMS com base em suas alterações genéticas, como as translocações t(9;22) ou t(12;21), rearranjos no gene MLL ou alterações no número de cromossomos (aneuploidia). Essa subclassificação é de extrema importância para o manejo e acompanhamento do paciente, sendo atualizada em 2016, com a descrição de mais de 10 subtipos de LLA, que passaram a ser classificadas com base na combinação das características citomorfológicas, expressão de antígenos de superfície celular, além das alterações genéticas e moleculares, as quais estão relacionadas com o prognóstico da doença (9,36).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), juntamente com a OMS em 2018, iniciou o processo que definiu as atualizações referentes a classificação das leucemias, estabelecendo regras de governança e os princípios de classificação para classificação de tumores. A OMS reconhece a crescente importância dos dados genéticos e outros dados moleculares na avaliação das neoplasias de origem linfoides, no entanto, também foi levado em consideração o fato de que os recursos para os diagnósticos necessários não estão disponíveis universalmente. Assim, para facilitar uma abordagem mais detalhada ao diagnóstico foi realizada uma nova atualização para a classificação de neoplasias das células B em 2022, sendo assim, foi publicado a 5ª versão de classificação da LLA-B com base nas alterações genéticas (**Tabela 1**) (37).

Tabela 1: Classificação da LLA-B pela OMS de 2022.

Neoplasias de células B precursoras
--

Leucemia/linfoma linfoblástico B, NOS
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com iAMP21
leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22) (q34;q11.2); BCR-ABL1
Leucemia/linfoma linfoblástico B, tipo BCR-ABL1
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q23.3); KMT2A- reorganizado
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21) (p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
Leucemia/linfoma linfoblástico B com ETV6: Características do tipo RUNX1
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(1;19) (q23;p13.3); TCF3-PBX1
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(5;14) (q31.1;q32.1); IGH / IL3
Leucemia/linfoma linfoblástico B com fusão de TCF3: HLF
Leucemia/linfoma linfoblástico B com outras anormalidades genéticas definidas

Fonte: (37), adaptado pelo autor.

A OMS descreve que na leitura citomorfológica do mielograma, o achado de no mínimo 20% de blastos leucêmicos são suficientes para o diagnóstico de Leucemia Aguda, pois caracteriza um estado de monotonia e clonalidade celular, representando um ambiente medular doente. Após esse achado, utiliza-se a técnica de citometria, com o objetivo de identificar os blastos leucêmicos a partir de antígenos de superfície, citoplasmático e nucleares, denominados “*cluster of differentiations*” (CD). Estes permitem identificar o grau de maturação de cada blasto, com posterior subclassificação fenotípica da LLA-B (**Figura 6**) (38).







Medula Óssea			Periferia		
					
Pró-B	Pré-B I	Pré-B II	B Imaturo	B Maduro	Plasmócito
CD34	CD34	CD34			
TdT	TdT	TdT			
	CD10	CD10	CD10		
	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19
		CD20	CD20	CD20	CD20
CD22	CD22	CD22	CD22	CD22	
	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45
		CyIgu	CyIgu		CyIg
			SmlgM	SmlgM	
					CD38
					CD138
					CD56

Figura 6: Estágios de maturação imunofenotípica de células B.

Fonte: (39), adaptado pelo autor.

2.1.5 Protocolos de Tratamento para a LLA

Durante muitos anos, a LLA permaneceu como doença sem tratamento e o seu prognóstico era desfavorável ao paciente. Com o passar dos anos, avanços foram observados, principalmente relacionados ao conhecimento da fisiopatologia da doença, com aperfeiçoamento dos protocolos clínicos, além da descrição de drogas quimioterápicas testadas e utilizadas nesses pacientes. Atualmente, a LLA possui uma taxa de cura alta, com a quimioterapia intensiva, no entanto, existem pacientes que não respondem de forma desejada ao tratamento (19).

Nesse sentido, a pesquisa de células clonais residuais foi iniciada, pois é um forte indício de recaída e que ocorre entre 10-20% dos pacientes, sendo observado a não resposta aos agentes quimioterápicos. Isso ocorre devido a fatores intrínsecos e extrínsecos e por conta disso, foi proposto a criação dos grupos de risco de tratamento, onde os pacientes serão estratificados de acordo com critérios clínicos e laboratoriais, tais como idade, contagem de leucócitos no momento do diagnóstico e as características citogenéticas como aneuploidia e presença de translocações. Com esses aprimoramentos, resultados positivos foram observados, aumentando as taxas de sobrevida global livre da doença para até 80% (40,41).

Adicionalmente, foi descrito que a participação de mediadores imunológicos no microambiente tumoral pode influenciar na proliferação e sobrevivência de blastos leucêmicos (**Figura 6**). Estudos demonstram que a participação da interleucina 15 (IL-15) demonstrou promover a sobrevivência da LLA no SNC. Em adição, níveis elevados de IL-7 no líquido cefalorraquidiano (LCR) têm sido associado a doenças inflamatórias do SNC (42).

Outros mediadores que podem colaborar com a promoção de um microambiente favorável a progressão doença é a citocina IL-10, promovendo a diminuição de respostas imunes citotóxicas. Outra citocina que colabora para a resistência leucêmica é a IL-6, que atua sustentando a proliferação, sobrevivência e disseminação de células malignas no microambiente tumoral. Além disso, as quimiocinas CXCL-9, CXCL-10 e CXCL-11 também demonstraram exercer uma atividade pró-tumoral, diminuindo a apoptose de blastos leucêmicos induzida pela quimioterapia em pacientes com LLA-B (1,43,44).

Aliado aos critérios descritos, desde 1999, grupos estudam a eficácia dos tratamentos utilizados para LLA, como o Children's Oncology Group (COG) combinados com a avaliação da doença residual mensurável (DRM) por Citometria de Fluxo (CF) durante a terapia de indução. Até hoje, esse critério é considerado um dos mais importantes preditores de prognóstico e resposta terapêutica em crianças, adolescentes e adultos. Os grupos Italian Association of Pediatric Oncology Ematology (IAPOE) e Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) em 2000 também estudaram a avaliação da DRM baseados em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) realizados no dia 33 e no dia 78 de tratamento, para dividir os indivíduos em grupos de baixo, intermediário e alto risco, fornecendo uma melhor visualização de acompanhamento dos pacientes (45).

Nesse sentido, um dos protocolos de maior notoriedade internacional, o Protocolo BFM, na sua versão de 2009 (BFM-2009), estratifica os pacientes em grupos de risco, com base em parâmetros clínicos e laboratoriais, além da avaliação da DRM. Dessa forma, há um ajuste na dose dos medicamentos utilizados, onde os pacientes de alto risco são tratados com quimioterapia mais intensiva.

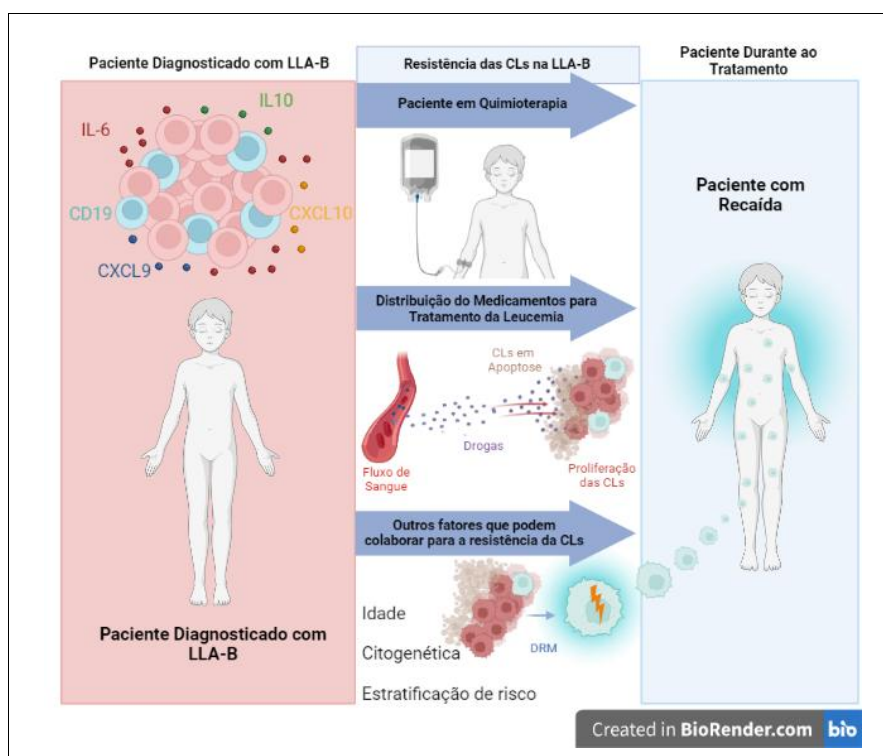


Figura 7: Influência dos mediadores imunológicos na proliferação e sobrevivência de blastos leucêmicos no microambiente tumoral de pacientes com LLA-B.

Fonte: 1,43, adaptado pelo autor com o Biorender®.

O tratamento pelo protocolo BFM-2009 é dividido em quatro fases: Indução da Remissão, Consolidação, Manutenção e Profilaxia do SNC. A terapia de indução da remissão, tem como objetivo principal alcançar a remissão completa da doença, atingindo uma contagem <5% de blastos saudáveis na MO. A consolidação tem como objetivo reduzir a DRM e ajustar a intensidade do tratamento conforme a estratificação de risco de recaída. Já a profilaxia do SNC é iniciada durante a fase de indução e inclui quimioterapia e radioterapia (46). Segundo o protocolo BFM-2009, os pacientes são estratificados ao diagnóstico com base nos seguintes critérios: idade, número de leucócitos no sangue periférico e análise citogenética (**Tabela 2**) (47,48).

Tabela 2: Critérios de estratificação de risco no diagnóstico, de acordo com BFM-2009 (49).

Parâmetro de risco	BR	RI	AR
Idade	Idade > 1 ano e < 6 anos	Idade > 1 ano e < 6 anos	Idade > 1 ano e < 6 anos
Leucometria ao Diagnóstico	< 20.000 leucócitos/ μ l	< 20.000 leucócitos/ μ l	< 20.000 leucócitos/ μ l
Citogenética	Ausência de t(9;22) ou de recombinação BCR-ABL; ausência de t(4;11) ou de recombinação MLL-AF4	Ausência de t(9;22) ou de recombinação BCR-ABL; ausência de t(4;11) ou de recombinação MLL-AF4	Presença de t(9;22) ou de recombinação BCR-ABL; ou presença de t(4;11) ou de recombinação MLL-AF4

Abreviação: BR, Baixo Risco; RI, Risco Intermediário; AR, Alto Risco.

No Brasil, com a implementação do protocolo nacional a partir da década de 80, foram obtidos bons resultados no tratamento da LLA infantil. O Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI), publicou em 1983 o primeiro protocolo multicêntrico de tratamento da LLA infantil. Desde então, quatro estudos foram realizados e concluídos referente aos anos de 1982, 1985, 1993, 1999 (50).

Em 2009 foi realizada a última atualização, com o protocolo GBTLI-2009 apresentando uma nova proposta de tratamento, com estratificação dos pacientes nos grupos terapêuticos de baixo risco (BR) e alto risco (AR), levando em consideração

fatores de prognóstico. Com essa nova atualização, foi relatado que a taxa de sobrevivência das crianças tratada com o protocolo foi de aproximadamente 76,3% para o grupo de baixo risco (BR) e 59,8% para o grupo de alto risco (AR), o que demonstrou um grande avanço referente ao acompanhamento ao paciente ao longo das sessões de terapia (51).

Dentre as fases do tratamento, temos a terapia de indução da remissão, que se apresenta como uma etapa de grande importância para o prognóstico do paciente, cujo objetivo consiste em alcançar a remissão clínica completa em 4 semanas de acordo com o grupo de risco que o paciente se encontra. Assim como o Protocolo BFM-2009, a estratificação de risco ocorre com base em parâmetros clínicos e laboratoriais, como: idade, contagem de leucócitos, imunofenótipo, presença de linfoblastos no sistema nervoso central e análise citogenética (**Tabela 3**). Além disso, o acompanhamento da resposta precoce da quimioterapia também é um fator de prognóstico crítico para avaliar a resposta ao tratamento (36).

Tabela 3: Critérios de estratificação de risco no diagnóstico, de acordo com o GBTLI-LLA-2009.

Parâmetro de risco	Baixo risco (BR)	Alto risco (AR)
Idade em anos	≥ 1 e <9	<1 ou ≥ 9
Contagem de Leucócitos	$<50.000 / \text{mm}^3$	$\geq 50.000 / \text{mm}^3$
Linfoblastos no SNC	Ausente	Presente
Citogenética	Ausência de achados citogenéticos de alto risco	Presença de achados citogenéticos de alto risco: t(9;22) - BCR/ABL ou t(4;11) - KMT2-AFF1

Fonte: (5), adaptado pelo autor.

Na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia (HEMOAM), atualmente o protocolo utilizado para o tratamento de LLA-B é o BFM-2009 e o GBTLI-2009. Esses protocolos são distribuídos em 6 fases da terapia que é realizado da seguinte forma: para a estratificação dos pacientes em BR e AR de recaída, é realizado a contagem e avaliação morfológica de blastos no SP ao final da terapia de pré-fase ou 8º dia da indução (D8). Posteriormente, é realizado a contagem de blastos na MO no 15º e 35º dia da indução (D15 e D35, respectivamente), para avaliar se o paciente alcançou a remissão

da doença, apresentando quantidades indetectáveis de blastos leucêmicos residuais, caracterizando a ausência de DRM. Essa avaliação é considerada para que sejam realizados ajustes na terapêutica adotada, reestratificando os pacientes ou alterando o protocolo de tratamento (52).

2.2 Doença Residual Mensurável

A doença residual mensurável (DRM) é caracterizada como a presença de blastos leucêmicos residuais além do nível de sensibilidade avaliado pela citomorfologia, ou seja, por metodologias mais sensíveis como citometria de fluxo ou métodos moleculares, sendo em última análise, de fundamental importância para o acompanhamento do paciente. As avaliações de DRM são definidas pelos médicos como uma ferramenta clínica para estratificar os pacientes em grupos de risco durante o curso de quimioterapia, imunoterapia e/ou terapia com o transplante de MO. A pesquisa de DRM também é um determinante prognóstico primário do progresso pós-terapêutico que irá direcionar o médico em sua conduta para o melhor manejo clínico (1,53).

Para realizar a avaliação da DRM são utilizadas técnicas capazes de detectar a presença de blastos residuais na MO e SP do paciente, podendo ser usado a citometria de fluxo, com marcadores específicos para detectar os antígenos de superfície de células malignas, além da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR), para detectar transcritos de fusão específicos ou rearranjos de genes de receptores de imunoglobulina. À medida que os ensaios de detecção da DRM se tornam mais sensíveis, o futuro da terapia da LLA irá utilizar cada vez mais a análise como um critério para intensificar ou modificar a terapia, visando a prevenção de recaídas, ou desintensificar a terapia, visando a redução da morbidade e mortalidade relacionadas ao tratamento (1,53)

2.2.1 Detecção de blastos leucêmicos através do mielograma

O mielograma é o exame que avalia uma porção do órgão formador das células do sangue, a medula óssea. Após sua punção, é feita a extensão sanguínea da amostra em lâmina e posteriormente é realizada a análise morfológica. Esse exame medular se torna de grande importância para o diagnóstico e monitoramento das doenças hematológicas. Quando uma doença hematológica eminente não puder ser diagnosticada ou classificada

pelo sangue, o mielograma é indispensável. A avaliação histológica da medula óssea por biopsia só é necessária se a punção do aspirado de medula não for representativa, ou quando o diagnóstico diferencial da doença em suspeita requerer obrigatoriamente a biopsia de medula óssea (54).

Embora os métodos morfológicos sejam capazes de detectar populações de blastos leucêmicos com uma sensibilidade geralmente de 5% de células anormais ou mais, a detecção de DRM, só é possível com os níveis de sensibilidade atingindo 0,01% podendo chegar até 0,001% de CLs. Embora ainda seja utilizado em muitos centros, como a Fundação HEMOAM, o método possui baixos níveis de detecção da DRM, com sensibilidade de $< 5^2$, ou seja, detecção de 1 CL em até 500 células normais.

Além disso, em contraste com a avaliação morfológica padrão, métodos para detecção de DRM não permitem uma distinção confiável do células progenitoras normais que caracterizam a recuperação da medula pós-terapia das células progenitoras leucêmicas que representam a persistência da doença. Contudo, para a detecção da DRM, é necessária uma maior sensibilidade, exigindo dessa forma, a aplicação de métodos não convencionais (55).

2.2.2 Detecção da DRM por Citometria de Fluxo

A Citometria de Fluxo (CF) é uma técnica sofisticada, que funciona com base no princípio de dispersão de luz e emissão de fluorescência por células marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos específicos, que são interceptadas por um laser. Essa metodologia oferece várias vantagens, pois permite análises multiparamétricas rápidas e quantitativas de populações de células, com resolução célula-célula. Além disso, também permite a classificação morfológica das células para separar as subpopulações com base em diferentes parâmetros. A dispersão da luz visível é medida em duas direções diferentes, a dispersão frontal (*Forward Scatter ou FSC*) que pode indicar o tamanho relativo da célula e a dispersão lateral (*Side Scatter ou SSC*) que indica a complexidade interna ou granulosidade da célula (56).

O Citômetro, equipamento responsável por realizar essas análises, é composto por três sistemas principais: sistema fluídico, óptico e eletrônico. O sistema fluídico consiste em fluido de bainha (geralmente uma solução salina tamponada) que é

pressurizado para fornecer e focar a amostra para a interceptação do laser ou ponto de interceptação onde a amostra é analisada. O sistema óptico consiste na excitação de lasers à medida que as células incidem nesse foco de luz, com obtenção de dados que serão avaliados por uma série de filtros dicróicos que direcionam a luz fluorescente para detectores específicos e os filtros determinam os comprimentos de onda da luz que são lidos para que cada fluorocromo individual possa ser detectado e mensurado. Mais especificamente, filtros dicróicos são filtros que passam a luz através de um comprimento de onda mais curto ou mais longo e refletem a luz restante em um ângulo.

O sistema eletrônico converte os sinais dos detectores em sinais digitais que podem ser lidos por um computador. Os filtros *band-pass* detectam uma pequena janela de um comprimento de onda específico da luz. Por exemplo, um filtro *band-pass* 450/50 permite a passagem de luz fluorescente com um comprimento de onda de 450 nm +/- 25nm através do filtro para ser lida pelo detector. Já um filtro 450 *long-pass* permite que a luz com um comprimento de onda maior que 450 nm passe pelo filtro e reflita os comprimentos de onda mais curtos da luz em um ângulo para ser enviado para outro detector. Com isso a citometria de fluxo é uma ferramenta poderosa que tem aplicações em vários campos, como imunologia, virologia, biologia molecular, biologia do câncer e monitoramento de doenças infecciosas (57).

No contexto da DRM, essa metodologia permite a avaliação de blastos leucêmicos residuais com uma sensibilidade de aproximadamente um blasto leucêmico entre 10^{-4} até 10^{-6} células nucleadas, tendo uma resolução de detecção de 1 blasto leucêmico em um intervalo de 10.000 a 1.000.000 células analisadas. Contudo, é importante destacar que existe a possibilidade das mudanças fenotípicas que podem ocorrer durante a terapia de indução, sendo comum observar mudanças transitórias de antígeno induzidas pela terapia, sugerindo maturação da população de blastos. Mudanças para um fenótipo mais maduro, incluindo reduções na intensidade de CD10 e CD34, bem como aumentos na intensidade da expressão de CD20 e CD45, podem ser observadas. Ao considerar terapias citotóxicas convencionais, a expressão de CD19 é relatada como um marcador relativamente estável, no entanto, o aumento do uso de novas terapias direcionadas ao CD19 como o (CAR-T) tornou esse antígeno menos confiável em alguns cenários terapêuticos da LLA-B (58).

A avaliação de DRM baseada na CF proporciona melhor identificação do perfil de maturação dos blastos. Isso pode ser refletido na avaliação de marcações com anticorpos monoclonais para LLA-B, sendo importante identificar alguns marcadores específicos, como CD10, CD19, CD20, CD34, CD45 e CD38, descritos tanto para fase inicial dos estágios de maturação, quanto para definição de estágios mais tardios desse processo. O marcador de superfície CD19, é uma molécula de transdução de sinal que se expressa ao longo do desenvolvimento das células B, devido a essa alta expressão, é um marcador clínico ideal para identificação dessa linhagem celular (39).

Para avaliar a maturação da linhagem de células B, é necessário avaliar o CD10, CD19, CD20, CD34, CD38 e CD45. Além disso, é importante levar em consideração que alguns desses marcadores sofrem modulação de expressão, como CD19 e CD20 (*upregulation*), CD10 e CD34 (*downregulation*), durante a terapia de indução, devido à ação dos corticosteroides (**Figura 8**). Portanto, alguns marcadores imunofenotípicos associados à leucemia (LAIP) são adicionados para distinguir mais claramente as células regenerativas das células leucêmicas residuais após a imunossupressão (59).

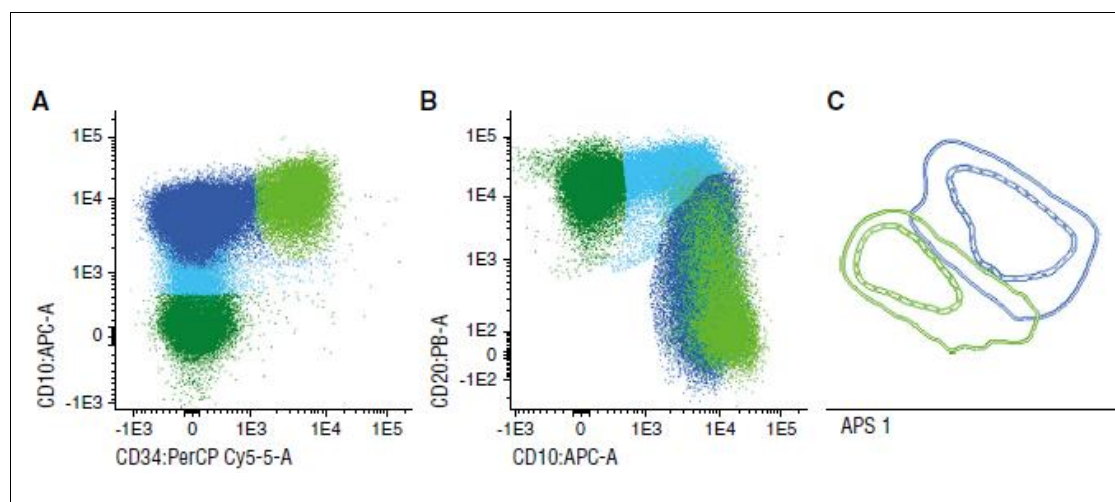


Figura 8: Estratégia de análise de dados para maturação dos linfócitos B, com base nos marcadores principais (CD19/CD10/CD20/CD34/CD45). A) Gráficos de pontos de CD34 vs CD10; B) CD10 vs CD20. C) Definição de 1 desvio padrão (DP) (linha tracejada) ou 2 DP (linha sólida) dos 2 subconjuntos de células B mais imaturos (pré-BI [verde claro] e pré-B-II/imaturo [azul escuro]) exibidas em uma visão APS para maturação das células.

Fonte: (60).

Em relação aos marcadores que são associados as translocações, destaca-se o CD66c e o CD123 que estão associados à hiperdiploidia. O CD66c é expresso em grande proporção na leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-CPB) pediátrica, sendo significativamente mais frequente nos casos BCR-ABL1 positivos do que nos negativos. Embora o CD123 seja um marcador característico de células dendríticas plasmocitóides (pDC), há evidências de que um subconjunto de pDC pode ser desenvolvido a partir do progenitor linfóide comum. Esse subconjunto de pDC tem expressão intermediária do CD19 e expressa o CD22 e o CD81, de forma semelhante às células B. Essas células CD123⁺/CD19⁺ podem ser observadas quando mais de 5 milhões de eventos são adquiridos e devem ser diferenciadas dos blastos leucêmicos residuais CD10⁺ e CD19⁺ (59,61).

Outros marcadores, como o CD73 e o CD304 são avaliados, mas estes geralmente são negativos nas células precursoras B (CPB) normal e frequentemente super expressos na LLA-CPB. Já o CD73 pode ser regulado positivamente em células B leucêmicas e o CD304 pode ser expresso em níveis baixos em células pré-B (CD34⁺), associado à translocação TEL-AML1. Embora a expressão de CD304 permaneça positiva em avaliações pós-terapia, ela pode diminuir em avaliações posteriores. Além disso, o NG2 (associado ao rearranjo MLL) podem ser usados como marcadores da DRM opcionais para casos de LLA pré-B (59,61).

2.2.3 Detecção da DRM pelo teste molecular (qPCR)

A PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR. Durante a qPCR, o acúmulo de amplicons é detectado em “tempo real”, para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas/sequências específicas ou primers usados na reação. A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação. Várias tecnologias de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado (62).

A mensuração molecular de DRM envolve a identificação de um marcador leucêmico no momento do diagnóstico, seja uma fusão gênica anormal, mutação genética ou rearranjos de um receptor de célula B, sendo usado para rastrear a presença de células malignas em níveis baixos durante as remissões. Isso pode ser realizado por meio de abordagens baseadas em qPCR. A sensibilidade dos métodos moleculares varia entre diferentes estudos e técnicas e elas podem alcançar de 10^{-4} a 10^{-6} , mas deve-se mencionar que um dos principais determinantes da sensibilidade de um ensaio é a quantidade de DNA/RNA obtido após a coleta da amostra (63).

A maioria dos protocolos de tratamento atuais da LLA-B inclui avaliações para DRM baseadas na análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) de genes de receptores de rearranjos gênicos. Embora a CF também possa ser usada para detecção de DRM, estudos indicam que a especificidade e a sensibilidade do diagnóstico para a DRM baseados em CF são inferiores ao diagnóstico de DRM baseadas na qPCR. No entanto, foi mostrado que o uso de marcadores fluorescentes combinando 6 ou 7 cores, além da introdução de novos marcadores e novas combinações melhorou significativamente a análise da DRM por CF em pacientes com LLA-B. Essas melhorias foram particularmente relacionadas à especificidade, enquanto a sensibilidade ainda continua menor do que para os métodos baseados em qPCR. Para melhorar ainda mais a avaliação da DRM, foi incorporado um novo protocolo do Consórcio EuroFlow, denominado Bulk Lyse, que permite uma maior eficiência na aquisição e análise, baseado no aumento do número de leucócitos no momento do preparo das amostras (64).

2.3 Aspectos Clínicos para DRM na LLA-B

A avaliação da DRM na LLA tem se mostrado uma ferramenta indispensável para orientar os protocolos terapêuticos em direção a um tratamento mais assertivo e eficaz. Nesse sentido, podemos dizer que esse método é um poderoso preditor da resposta terapêutica, fundamental na prática clínica. Os pacientes com LLA podem alcançar a remissão completa seguindo o protocolo de tratamento indicado pelo hematologista, mas a recidiva da leucemia ainda ocorre em uma proporção significativa nos pacientes. A avaliação da resposta durante a fase de indução da remissão tem sido feita por morfologia, através do aspirado de MO, no entanto, esse método tem a sensibilidade e especificidade

limitada assim podendo apresentar resultados errôneos para a avaliação da DRM. Nesse sentido, é preciso incorporar novos métodos que possam apresentar alta sensibilidade para acompanhar a resposta terapêutica com precisão, identificando os pacientes que alcançaram a remissão completa ou que ainda possuam a doença não detectável (65,66).

Novas abordagens, como a CF multiparamétrica, tem como objetivo permitir alcançar uma sensibilidade de 10^{-4} a 10^{-6} , comparável à sensibilidade alcançada pela análise da DRM por qPCR. Dessa forma, se uma amostra apresentar de 10 a 40 blastos leucêmicos, deve ser adquirido pelo menos 4 milhões, de modo a garantir a sensibilidade necessária. Como a celularidade das amostras de MO obtidas durante as fases iniciais do tratamento é frequentemente baixa, a marcação de amostras de MO usando os protocolos normais do Consórcio EuroFlow não permitiria a aquisição de milhões de células.

Nesse sentido, as análises por citometria de fluxo devem ser atualizadas, sendo proposto a utilização do protocolo de *Bulk Lyse* de eritrócitos, também descrito pelo Consórcio EuroFlow. Neste método de enriquecimento de células em amostras com baixa celularidade, se realiza a lise dos eritrócitos e a concentração no número de células a serem avaliadas. Esse aumento significativo pode chegar em valores acima de 10 milhões de células, que são necessárias para uma avaliação eficaz e com uma sensibilidade alta da DRM (64).

A detecção molecular da DRM em pacientes com LLA é considerada como “padrão ouro”, sendo utilizado como método sensível para avaliar números baixos de blastos leucêmicos (67,68). Embora, outros métodos sejam utilizados para monitoramento da DRM, tecnicamente tanto a CF quanto a qPCR possuem uma sensibilidade a partir 10^{-4} , sendo igualmente adequadas para proporcionar uma avaliação precisa do estado da doença (69). Essas técnicas quando utilizadas em conjunto, permitem identificar a eliminação insuficiente de blastos durante o tratamento inicial e consequentemente o reaparecimento de blastos leucêmicos, assim evidenciando os critérios para definir de remissão morfológica completa ou recidiva medular (70,71).

Em resumo, a análise citomorfológica a partir do mielograma apresenta baixa sensibilidade e por ser mais demorada e manual, erros podem acontecer, impedindo uma precisão adequada. Em comparação, a CF, tem um grande potencial para realizar o acompanhamento devido a uma rápida aquisição, além de uma sensibilidade de 10^{-4} ,

podendo chegar até 10^{-6} , quando executados com protocolos de otimização e aumento de celularidade, como o uso do protocolo de *Bulk lyse*. Por fim, a qPCR possui ótima sensibilidade, todavia, uma grande desvantagem que deve ser considerada é o grande número de translocações e rearranjos que os pacientes leucêmicos podem apresentar, dificultando a identificação da translocação/rearranjo específico, além de apresentar um alto custo (**Tabela 4**) (63,64,72,73).

Tabela 4: Comparação das metodologias para a quantificação de blastos leucêmicos e avaliação de DRM

Técnicas	Sensibilidade	Tempo	Aplicabilidade	Custo	Ref
Mielograma	$<10^{-2}$	Demorada	Mais trabalhosa	Baixo	(20)
CF	10^{-4} a 10^{-6}	Rápida	$< 90\%$	Baixo	(64,74)
qPCR	10^{-4} a 10^{-6}	Rápida	40-50%	Alto	(75)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Demonstrar as implicações clínicas e laboratoriais da identificação de blastos leucêmicos, caracterizando a presença da DRM, durante o protocolo de tratamento dos pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever o perfil clínico-laboratorial dos pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B durante a terapia de indução da remissão;
- Avaliar a detecção precoce da doença residual mensurável no sangue periférico ao oitavo dia (D8) da terapia de indução da remissão de pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B;
- Estimar a detecção da doença residual mensurável na medula óssea ao décimo quinto dia (D15) e trigésimo quinto dia (D35) da terapia de indução da remissão de pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B;
- Investigar as implicações clínicas e laboratoriais da identificação precoce da DRM em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM, sob número de parecer 4.982.395/2021 e CAAE 51257921.2.0000.0009.

4.2 Modelo, Área e População de estudo

Trata-se de um estudo analítico, do tipo longitudinal e prospectivo, realizado na Fundação HEMOAM, localizada na cidade de Manaus-AM, para avaliação da negatividade/positividade para doença residual mensurável (DRM) em pacientes pediátricos recém-diagnosticados com LLA-B, admitidos no serviço de hematologia pediátrica no período de vigência do estudo (**Figura 8**).

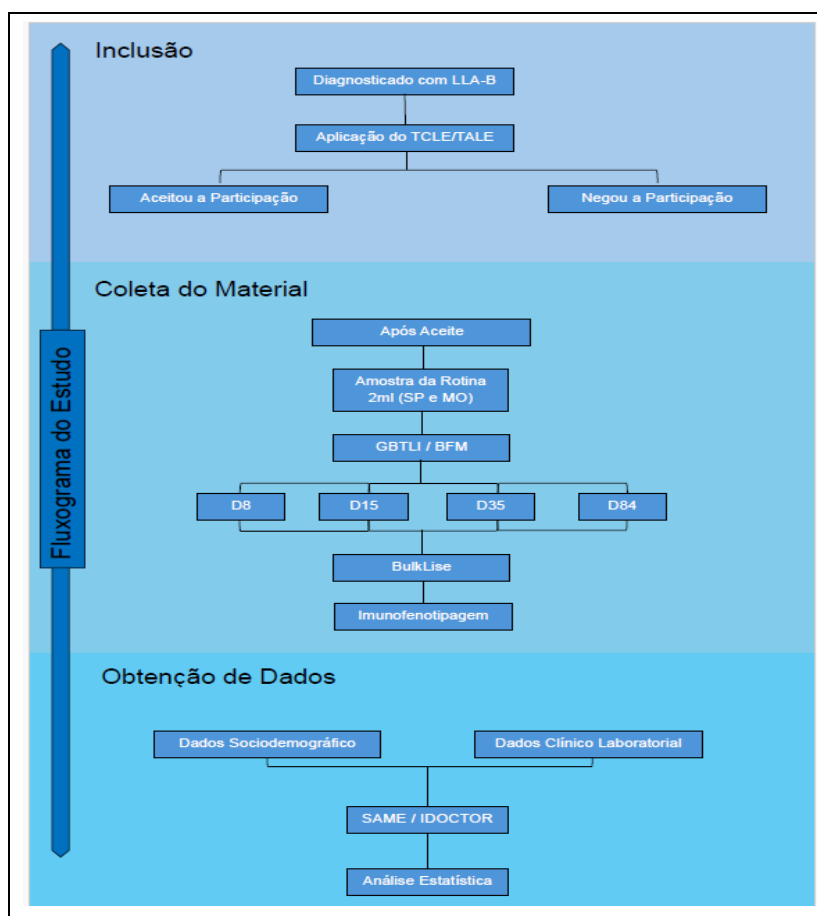


Figura 9: Fluxograma do trabalho

4.3 Critérios de elegibilidade

Foram utilizados como critérios de inclusão: pacientes recém-diagnosticados com LLA-B, admitidos no Serviço de Hematologia Pediátrica da Fundação HEMOAM no período de abril de 2023 a fevereiro de 2024, com idade entre 1 a menor de 18 anos, tratados com o Protocolo GBTLI-2009 ou BFM-2009, mediante aceitação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e/ou Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE), para aquelas acima de 6 anos de idade, alfabetizadas; critérios de não inclusão: material biológico insuficiente ou coagulado; e critérios de exclusão: solicitação da retirada do TCLE e/ou TALE.

4.4 Obtenção dos dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínico-laboratoriais foram coletados a partir de registros do Laboratório de Marcadores Celulares e dos prontuários dos pacientes, através do Setor de atendimento médico e estatístico (SAME) e sistema *iDoctor*. As variáveis coletadas foram: idade, sexo, estratificação do grupo de risco de tratamento, dados do hemograma e mielograma.

4.5 Obtenção das amostras

Para este estudo, foram utilizadas amostras de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP), obtidas através de punção aspirativa da crista ilíaca, esterno ou tíbia e através de punção venosa, respectivamente, sendo coletados aproximadamente 2mL de MO e 4mL de SP em tubos EDTA, pela equipe médica da Fundação HEMOAM. As coletas ocorreram nos dias 8, 15, 35 e 84 da terapia de indução da remissão e consolidação (D8, D15, D35 e 84, respectivamente). Parte do volume das amostras, foram encaminhados ao Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa, onde foram identificados com o código do projeto e então utilizados para a realização do protocolo de *Bulk Lyse* e posterior imunofenotipagem.

4.6 Protocolo de *Bulk Lyse*

Em função da baixa celularidade apresentada pelos pacientes na fase inicial do tratamento, o Consórcio EuroFlow padronizou protocolo para aperfeiçoar a preparação

das amostras, chamado de Protocolo de *Bulk Lyse*, utilizado para concentrar o número de leucócitos, a partir da lise expressiva dos eritrócitos. Após a lise, os leucócitos são ressuspensos em um pequeno volume de tampão de lavagem (PBS). Este novo protocolo permitiu a marcação de 10 milhões de células em 100 µl de suspensão de células por tubo, valor necessário para a avaliação da DRM.

Esse protocolo é validado para amostras de medula óssea e sangue periférico. Digno de nota, é necessário avaliar a concentração de células antes de qualquer manipulação por um contador hematológico. Para atingir a sensibilidade necessária, que é de 10^{-4} a 10^{-6} , foi utilizado esse protocolo antes da marcação com pelo menos de 10×10^6 células nucleadas para os tubos de CF contendo os marcadores descritos no protocolo do Consórcio EuroFlow, que é a condição necessária para a avaliação.

4.7 Imunofenotipagem Celular para DRM na LLA-B

Após a etapa de *Bulk Lyse*, foi realizado protocolo de imunofenotipagem, com painel de marcação específico para a detecção de blastos leucêmicos (**Tabela 5**).

Tabela 5: Painel de marcadores para avaliação da DRM

TUBOS	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7
1	CD20	CD66c/CD123	CD34	CD19	CD45	CD10
2	CD38	CD73/CD304	CD34	CD19	CD45	CD20
3	CD38	CD81	CD34	CD19	CD45	CD10

Primeiramente, os tubos foram identificados com as iniciais dos pacientes e tipo de amostra (MO ou SP), em seguida foi realizada a distribuição dos anticorpos monoclonais para cada tubo (seguindo o painel destinado ao intervalo do tratamento correspondente: D8 ao D84). Para essa etapa, foi importante utilizar os reagentes necessários para o procedimento, como o reagente de fixação e de lavagem, respeitando seus respectivos tempos de incubação e centrifugação. Ao final do processo, a amostra foi ressuspensa com 500 µl de PBS 1x para aquisição. O material foi adquirido no FACSCanto II, do Laboratório de Marcadores Celulares da Fundação HEMOAM, equipamento que, a partir da incidência de lasers, irá identificar e contabilizar as CLs de acordo com os marcadores relacionados ao comprometimento maturativo (**Figura 10**).

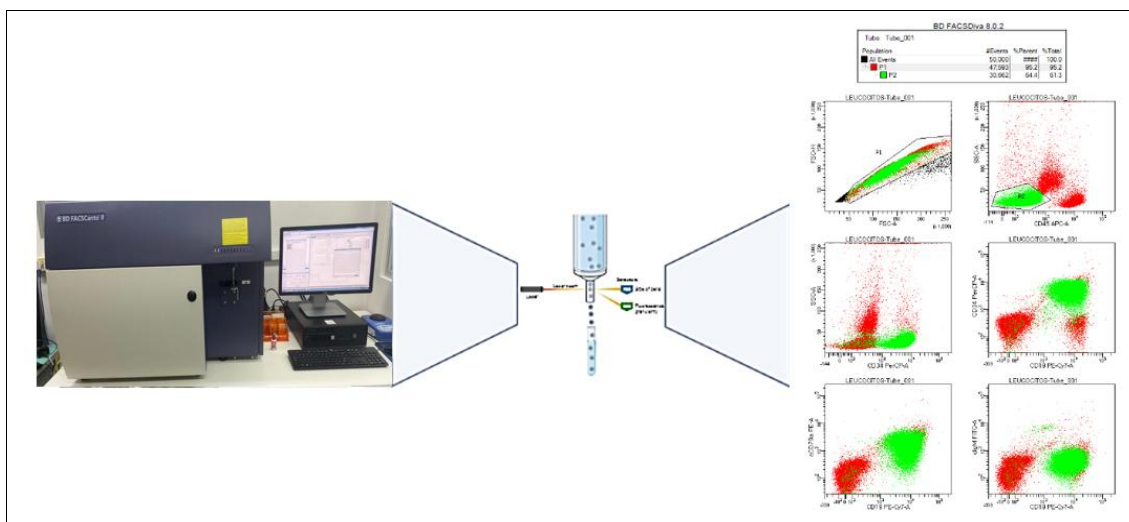


Figura 10: Processo de aquisição e análise da imunofenotipagem, amostra passando pelo citômetro de fluxo e gerando gráficos para análise.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Análise da Imunofenotipagem

Os resultados adquiridos no citômetro de fluxo, foram analisados com o software KaluzaC (v1.2) da Beckman Coulter, que oferece diferentes opções de gráficos e resultados com tabelas. Este software inclui recursos avançados, entre eles processamento de arquivos multicoloridos com até 20 milhões de eventos em tempo real, oferecendo também velocidade analítica que é drasticamente mais rápida do que outros softwares disponíveis no mercado.

A análise foi realizada com as células marcadas após a concentração com o protocolo *Bulk Lyse*. Em resumo, a população celular de interesse apresenta tamanho pequeno e baixa complexidade interna e foi identificado por meio de marcadores específicos utilizando gráficos para segregar os leucócitos até os blastos separadamente conhecido como gates, foram processados e adquiridos em gráficos do tipo *dotplots*, divididos em parâmetros de fluorescência, conforme descrito na **Figura 11**.

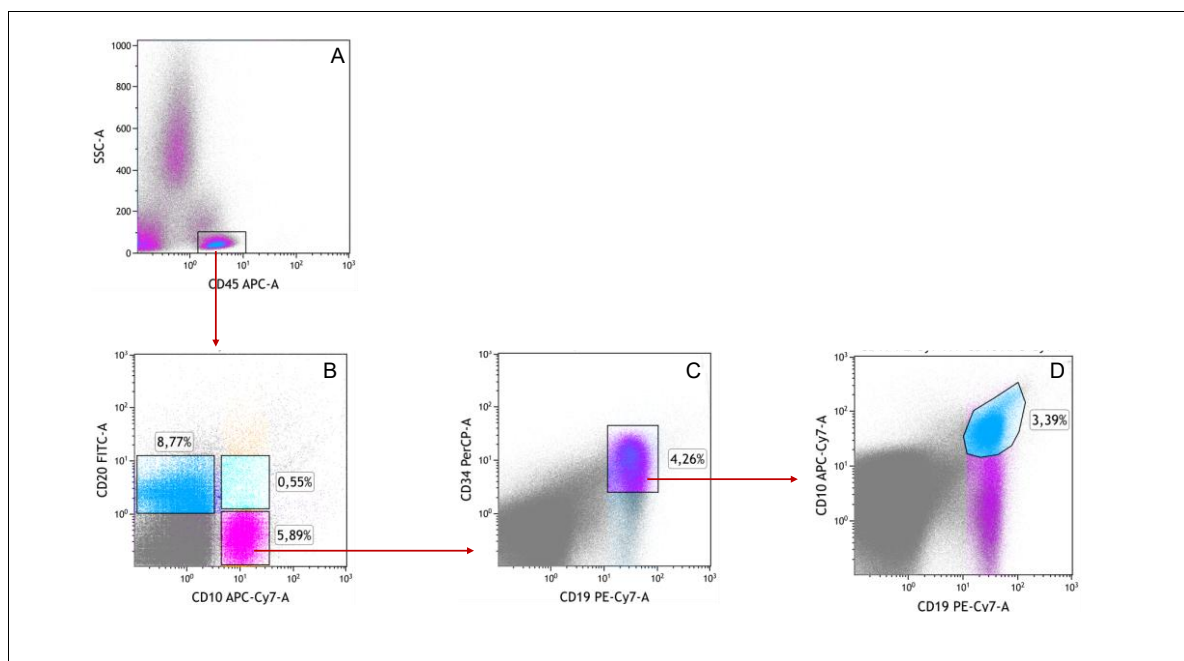


Figura 11: Representação gráfica da análise das populações celulares com o software *KaluzaC (v1.2)*. **A:** representação do gráfico de complexidade (SSC) x CD45, com a região de leucócito em destaque; **B:** representação do gráfico CD20 x CD10 para identificar a maturação do linfócito; **C:** representação do gráfico CD34 x CD19 assim utilizando os marcadores de células anômalas para marcar os blastos; **D:** representação do gráfico CD10 x CD19 para linfócitos imaturos com a dupla positividade para esses marcadores.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9 Definição da DRM nos tempos de tratamento: D8, D15, D35 e 84

Os protocolos para LLA-B atuais associam a análise morfológica com a avaliação da DRM para indicar a resposta ao tratamento em pontos de tempo precoces e tardios. No D8, que é o primeiro momento para a avaliação da resposta terapêutica, a maioria dos protocolos utilizam a análise morfológica de SP para estratificação de risco, definindo em respostas boas e ruins, com contagens de blastos leucêmicos no SP abaixo e acima de 1.000 células/mm³. Para refinar essa avaliação, a análise da DRM surge como uma maneira mais sensível de orientar o tratamento neste ponto de tempo mais precoce, com resultados positivos na resposta ao tratamento. Além disso, considerou-se DRM negativa a caracterização da contagem de blasto no SP <1.000 células/mm³ (5).

Para a avaliação da DRM no D15, o material coletado é o SP, juntamente com a MO, e o nível de corte considerado para a negatividade foi de <0,01% (<10⁻⁴). Este

parâmetro foi aplicado para a avaliação da resposta terapêutica nas duas primeiras semanas do tratamento, com o objetivo de orientar o esquema quimioterápico, identificando aqueles pacientes com uma resposta boa ou ruim a quimioterapia (76). No final da indução da remissão (D35), a avaliação da DRM por citometria de fluxo deve alcançar a sensibilidade variando de 10^{-4} e 10^{-6} , sendo que essa análise deve apresentar um resultado $<0,01\%$ a $<0,001\%$, para considerar o paciente com DRM negativa, caso contrário, considera-se a positividade para a DRM, reestratificando o paciente em alto risco (20). Paciente que está na fase de consolidação (D84) deve permanecer com a DRM negativa, pois caso tenha um valor $>0,01\%$ esse paciente está em fase de recaída da doença.

4.10 Análise descritiva e estatística

Os dados clínico-laboratoriais dos pacientes foram apresentados em formas de tabelas, elaboradas com o programa Microsoft Excel. Para elaboração das análises descritivas e estatísticas foram utilizado o software GraphPad Prism (v.8.2). Inicialmente foram realizados testes para verificar normalidade dos dados, através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados apresentaram distribuição não paramétrica e as análises comparativas entre duas variáveis foram realizadas com teste Mann-Whitney, enquanto para as comparações das variáveis com três ou mais grupos foi realizado através do teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações entre grupos. A significância estatística foi considerada em todos os casos em $p<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Características da população do estudo e dados laboratoriais

No período de abril de 2023 a fevereiro de 2024 foram incluídos no estudo 25 pacientes diagnosticado com LLA-B com idade mediada de 6 anos (IQR 3-11). O sexo feminino foi predominante com 17 (68%) pacientes. Todos os indivíduos foram avaliados e iniciaram o tratamento com o protocolo BFM-2009 e as características da população do estudo e dados laboratoriais estão descritos na **Tabela 06**.

Em relação aos grupos de risco de tratamento, ao diagnóstico (D0), 10 (40%) pacientes foram categorizados com o grupo alto risco, seguido do grupo de risco intermediário com 8 (32%) e baixo risco com 7 (28%) indivíduos. Essa classificação foi feita com base nos parâmetros definidos para caracterizar cada grupo, tais como idade, resultado da análise da citogenética e infiltração do SNC.

Posteriormente, esses parâmetros foram utilizados juntos com a análise da DRM, com o objetivo de re-estratificação dos pacientes no 15º dia após o diagnóstico (D15). Nessa análise, foi observado que os 25 (100%) pacientes avaliados apresentaram DRM positiva, sabendo-se que o valor de referência era <0,01%. Assim, após essa avaliação, foi observado mudança visível nos grupos de tratamento, com 17 (68%) pacientes classificados no grupo de alto risco, seguido de 7 (28%) com risco intermediário e 1 (4%) no grupo de baixo risco.

Para os valores de mielograma feito no D35, foi observada a seguinte classificação de acordo com a contagem de blastos na medula óssea: M1 com contagem <5%, sendo observado maior predominância com 16 (64%) pacientes e; M3 com contagem >25%, com 1 (4%) paciente. Além disso, o exame não foi realizado em 8 (32%) pacientes.

Por fim, a avaliação do mielograma no D84, foi utilizado os mesmos parâmetros do D35, sendo observado que a maioria dos pacientes foi classificada como M1, com 21 (84%) indivíduos. Novamente, foi observado que o exame não foi realizado, somando 4 (16%) pacientes. Por fim, observou-se que 3 (12%) pacientes foram a óbito dentre os 25 indivíduos incluídos no estudo (**Tabela 06**).

Tabela 6: Característica demográficas e clínicas dos pacientes pediátricos com LLA-B.

Variáveis	N = 25
Idade, mediana (IQR)	6 (1-11)
Sexo, masculino/feminino	8M/17F
Faixa etária, n (%)	
1 à <5	10 (40%)
5 à <10	9 (36%)
10 à <15	6 (24%)
Imunofenótipo	
LLA-B comum (CD10 ⁺)	25 (100%)
Protocolo de tratamento	
BFM-2009	25 (100%)
Estratificação de risco no D0	
Baixo risco	5 (20%)
Risco intermediário	13 (52%)
Alto risco	7 (28%)
Re-estratificação de risco no D15	
Baixo risco	2 (8%)
Risco intermediário	11 (44%)
Alto risco	10 (40%)
Doença residual mensurável no D15 [n (%)]	
Negativo	0 (0%)
Positivo	25 (100%)
Mielograma ao D35 [n (%)]	
M1	16 (64%)
M2	0 (0%)
M3	1 (4%)
NR	8 (32%)
Mielograma ao D84 [n (%)]	
M1	21 (84%)
M2	0 (0%)
M3	0 (0%)
NR	4 (16%)
Óbito durante a quimioterapia de remissão [n (%)]	
Não	22 (88%)
Sim	3 (12%)

Abreviaturas: LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de células B; NR, Não realizado; SP, sangue periférico; MO, medula óssea; IQR, intervalo interquartil; DRM, doença residual mensurável; D8, dia 8 da terapia de indução; D15, dia 15 da terapia de indução; D35, final da terapia de indução; D84, dia 84 da terapia de consolidação; M1, <5% linfoblastos; M2, 5-25% de linfoblastos; M3, >25% de linfoblastos.

Ao analisarmos os resultados do hemograma do sangue periférico, observamos que ao diagnóstico e ao longo do tratamento quimioterápico, os pacientes apresentaram alterações substanciais na contagem de células. Os dados podem ser observados na **Tabela 07**. Quando analisamos os valores de leucócitos totais, contagem de eritrócitos e concentração de hemoglobina, observamos que os pacientes apresentaram leucopenia e anemia em todos os tempos, com os menores valores no D0 e D8. Além disso, foi observado linfopenia ao D0, sendo observado aumento gradual dos linfócitos até o D84, sem alteração significativa na contagem dos neutrófilos. Em relação a contagem de monócitos, eosinófilos e basófilos, os pacientes apresentaram monocitose, eosinofilia e basofilia em todos os tempos avaliados, com exceção do D8, para a contagem dos basófilos e D15 para contagem dos eosinófilos e basófilos (**Tabela 07**).

Em relação aos resultados do hemograma da medula óssea, observamos a diminuição progressiva de leucócitos, com exceção do D84. Além disso, aumento progressivo da contagem de eritrócitos, plaquetas e concentração de hemoglobina. Adicionalmente, observamos valores flutuantes na contagem de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Os dados referentes a avaliação da medula óssea estão descritos na **Tabela 08**.

Tabela 7: Hemograma do sangue periférico dos pacientes pediátricos com LLA-B durante a quimioterapia de remissão.

Parâmetros	SP					Valor de Referência
	D0	D8	D15	D35	D84	
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	1,3 (3,2 - 3,7)	2,0 (1,2 - 2,5)	2,7 (1,1 - 3650)	3,4 (2,6 - 5,0)	3,3 (2,6 - 5,8)	5 - 13 $\times 10^3/\mu\text{L}$
Linfoblastos - ABS [%], mediana (IQR)	116 (16 - 542)	110 (14 - 442)	0 (0 - 20)	0 (0 - 10)	0 (0 - 22)	<20
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	9,0 (2,5 - 2,8)	1,2 (970 - 1,8)	1,1 (735 - 2,2)	2,1 (720 - 4,1)	1,2 (975 - 1,9)	1 - 5 $\times 10^3/\mu\text{L}$
Neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	4,7 (1,1 - 13)	1,5 (3,5 - 39)	3,2 (1,0 - 4,7)	2,5 (1,7 - 5,4)	3,8 (2,7 - 4,3)	1,5 - 8 $\times 10^3/\mu\text{L}$
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	3,0 (1,6 - 6,3)	5,0 (2,6 - 10)	4,0 (2,0 - 7,5)	1,0 (0,5 - 2,2)	3,7 (2,9 - 5,7)	0,2 - 1 $\times 10^3/\mu\text{L}$
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	3,5 (1,7 - 7,7)	5,0 (2 - 20,0)	0 (0 - 1,0)	5,0 (1 - 20,0)	2,1 (2,0 - 6,7)	0,1 - 1 $\times 10^3/\mu\text{L}$
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	2,1 (2,0 - 8,1)	0 (0 - 2,2)	0 (0 - 2,2)	1,0 (1,0 - 2,0)	1,0 (1,0 - 2,0)	0,02 - 0,1 $\times 10^3/\mu\text{L}$
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	2,9 (2,6 - 3,3)	2,9 (2,6 - 3,3)	2,9 (2,2 - 3,4)	3,0 (2,6 - 3,2)	3,0 (2,9 - 3,4)	4,5 - 5,9 $\times 10^6/\mu\text{L}$
Hemoglobina (g/dL), mediana (IQR)	8,7 (7,5 - 9,2)	8,1 (7,2 - 9,9)	8,3 (7,5 - 8,9)	8,8 (7,9 - 9,4)	10,0 (8,7 - 10,6)	12,5 - 18 g/dL
Plaqueta ($\times 10^6/\mu\text{L}$), mediana (IQR)	370 (200 - 780)	365 (220 - 975)	850 (340 - 189)	252 (181 - 422)	252 (181 - 422)	200 - 400 $\times 10^3/\mu\text{L}$

Abreviaturas: LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de células B; SP, sangue periférico; IQR, intervalo interquartil; D0, dia do diagnóstico; D8, dia 8 da terapia de indução; D15, dia 15 da terapia de indução; D35, final da terapia de indução; D84, dia 84 da terapia de consolidação.

Tabela 8. Hemograma da medula óssea dos pacientes pediátricos com LLA-B durante a quimioterapia de remissão.

Parâmetros	MO			
	D0	D15	D35	D84
Leucócitos totais (x10 ³ /uL), mediana (IQR)	89,2 (49,8 - 162,1)	52,7 (36,9 - 85,2)	10,5 (64,9 - 19,6)	24,9 (10,8 - 54,1)
Linfoblastos - ABS [%], mediana (IQR)	79 (27 - 11)	5 (20 - 117)	3 (0 - 137)	0 (0 - 117)
Linfócitos (x10 ³ /uL), mediana (IQR)	6,0 (3,3 - 9,9)	3,5 (1,4 - 6,2)	4,6 (1,3 - 6,9)	4,2 (2 - 8,5)
Neutrófilos (x10 ³ /uL), mediana (IQR)	1,5 (6,1 - 4,4)	7 (3,2 - 10)	3,0 (1,8 - 6,1)	13,8 (5,2 - 31)
Monócitos (x10 ³ /uL), mediana (IQR)	3,0 (1,2 - 6,3)	9,0 (7,5 - 1,7)	6,5 (3,5 - 1,5)	1,7 (1,1 - 3,1)
Eosinófilos (x10 ³ /uL), mediana (IQR)	7,0 (2,0 - 2,1)	1 (0,0 - 3,0)	2,0 (1,0 - 5,0)	9,0 (3,3 - 2,1)
Basófilos (x10 ³ /uL), mediana (IQR)	7,9 (2,1 - 1,9)	1,4 (4,5 - 4,8)	6,5 (3,4 - 1,2)	1,2 (3,9 - 2,6)
Eritrócitos (x10 ⁶ /uL), mediana (IQR)	2,6 (2,3 - 2,9)	2,7 (2,4 - 2,8)	2,7 (2,5 - 3,1)	2,9 (2,8 - 3,2)
Hemoglobina (g/dL), mediana (IQR)	7,8 (6,6 - 8,4)	7,9 (7,4 - 8,7)	8,7 (7,6 - 9,3)	9,4 (8,6 - 1,0)
Plaqueta (x10 ⁶ /uL), mediana (IQR)	46 (21 - 67)	67 (30 - 138)	155 (54 - 255)	212 (168 - 398)

Abreviaturas: LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de células B; MO, medula óssea; IQR, intervalo interquartil; D0, dia do diagnóstico; D8, dia 8 da terapia de indução; D15, dia 15 da terapia de indução; D35, final da terapia de indução; D84, dia 84 da terapia de consolidação.

5.2 Monitoramento da DRM durante o tratamento da LLA-B

Com o objetivo de acompanhar os pacientes incluídos no estudo e avaliar a DRM em todos os tempos, foi realizada a imunofenotipagem celular por citometria de fluxo com o protocolo adaptador pelo Consórcio EuroFlow. No total, foram incluídos 25 pacientes, no entanto, o acompanhamento e a avaliação da DRM pelo estudo não foi feita em todos os pacientes por conta da disponibilidade das amostras de SP / MO. A **Figura 12** resume o quantitativo de pacientes avaliados pelo estudo em cada momento do protocolo de tratamento.

Resumidamente, no D8 é realizada a coleta do sangue periférico, para avaliação do número absoluto de blastos com uso do contador hematológico. Nesse momento, conseguimos avaliar 15 pacientes pareados, sendo observado que pacientes com contagem ≥ 1.000 blastos/mm³ tiveram um resultado de DRM positiva. No D15, foi realizada a detecção da DRM por citometria de fluxo, tanto pela rotina da Fundação HEMOAM quanto pelo nosso estudo, sendo realizada em 11 pacientes pareados. A diferença entre os protocolos é que em nosso estudo, realizamos a *Bulk Lyse* para concentrar o número de células a ser avaliado aumentando a sensibilidade do teste.

Em relação ao D35 e D84, a avaliação foi feita pela Contagem Manual (CM) com a contagem e identificação de blastos em até 350 células por lâmina de MO. Em nosso estudo, realizamos os ensaios por citometria de fluxo, utilizando o protocolo de *Bulk Lyse* (quando necessário) com o objetivo de avaliar maior número de células e ter maior sensibilidade para identificar blastos residuais. Tanto para o D35 quanto o D84, foram avaliados 11 pacientes, obtendo-se maior sensibilidade para a detecção da DRM em pacientes que tinham uma baixa celularidade (<500.000 células por amostra).

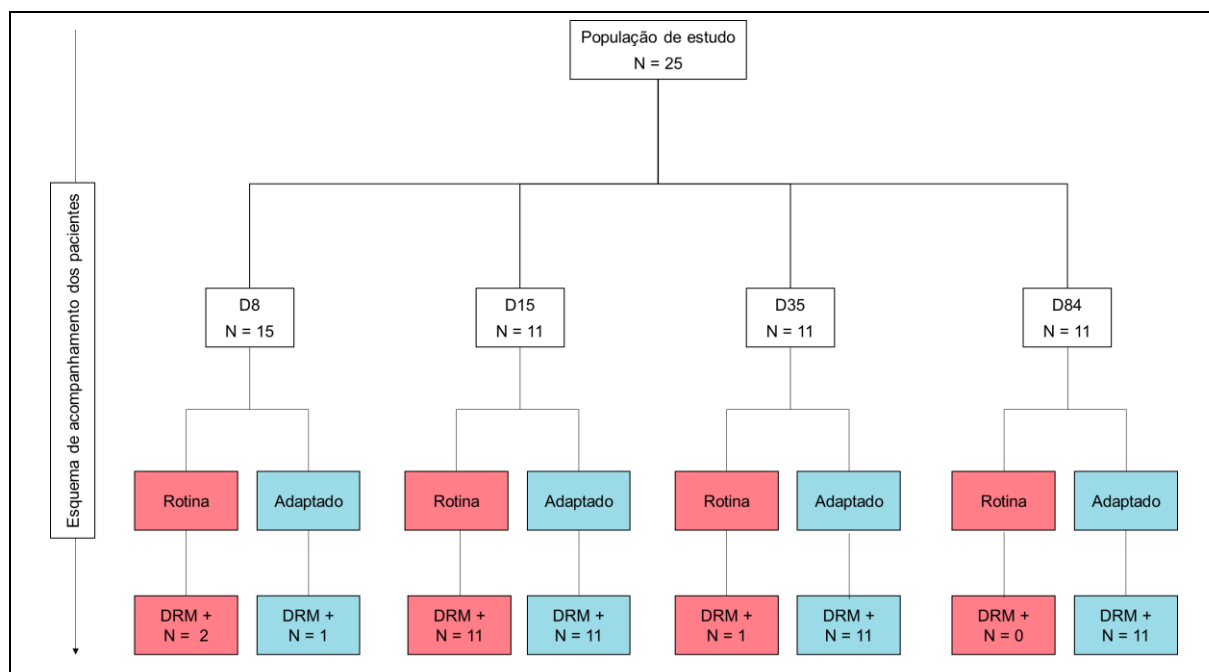


Figura 12: Fluxograma de análise das amostras por tempo de avaliação do protocolo de tratamento quimioterápico.

Ao realizarmos o comparativo entre as técnicas adotadas pela rotina com a análise por citometria de fluxo utilizando o protocolo adaptado do Consórcio EuroFlow, nota-se que houve aquisição e avaliação significativamente maior das células pelo método descrito em nosso estudo (**Figura 13**). Esse resultado tem um impacto direto na sensibilidade de detecção das CLs em todos os tempos a serem analisados, posteriormente.

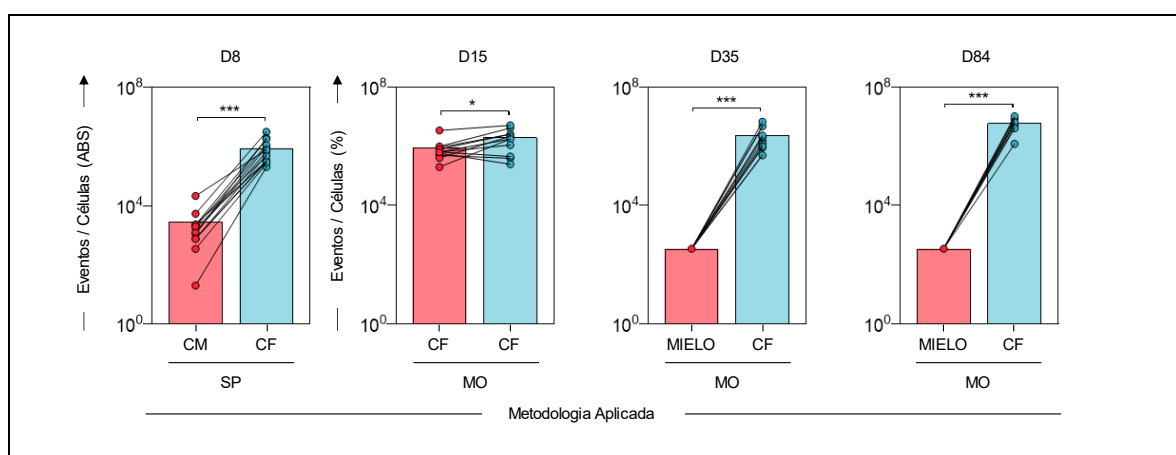


Figura 13: Análise comparativa do quantitativo de células pelas técnicas da rotina e do protocolo adaptado do Consórcio EuroFlow.

A análise comparativa entre as técnicas utilizadas na detecção de CLs demonstrou que o nosso protocolo (adaptado do Consórcio EuroFlow) foi significativamente melhor na detecção dos blastos nos tempos D15, D35 e D84 (**Figura 14**). Embora no D8 não tenha se observado diferenças significativas, nota-se que a CF foi relativamente melhor que a contagem automatizada. Além disso, pôde-se verificar que entre uma amostra com menor número de leucócitos, foi possível identificar os blastos, até mesmo comparando com os outros grupos de tempo de tratamento. Assim, foi nítido a discrepância entre avaliação morfológica e a análise da CF.

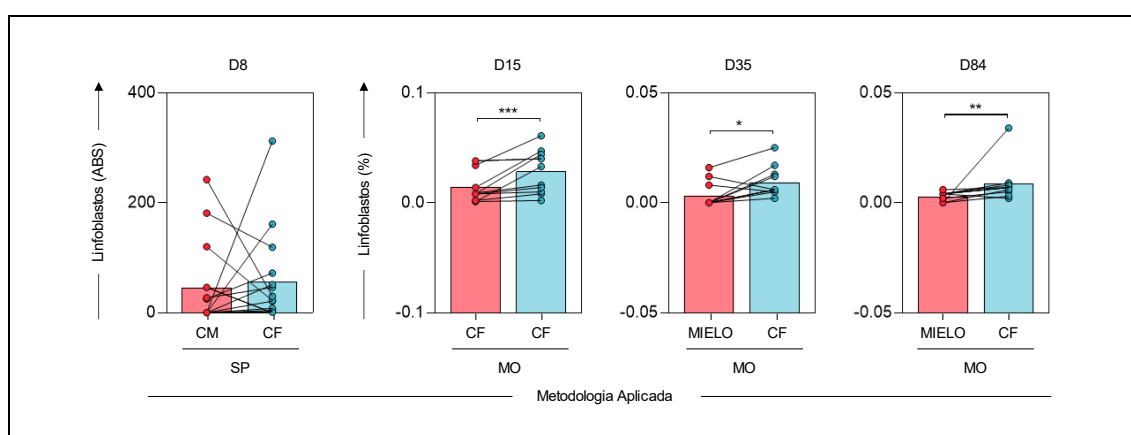


Figura 14: Detecção de células leucêmicas pela técnica utilizada na rotina (CM/CF/MIELO – barra vermelha) e protocolo adaptado do Consórcio EuroFlow (CF – barra azul). Para as análises de DRM durante o tratamento, foi utilizado como referência no D8 o valor $ABS \geq 1.000$ blastos/ mm^3 e para os demais tempos em percentual com o valor $>0,01$ para os casos de DRM positivas.

Por fim, realizamos a avaliação da precisão diagnóstica entre os métodos utilizados, sendo possível observar que a acurácia foi de 55,3% (IC 95%: 41,3-68,6), com sensibilidade de 92,9% (68,5-98,7), especificidade com 39,4% (24,7-56,3), valor preditivo positivo (VPP) com 39,4% (24,7-56,3), valor preditivo negativo com 92,9% (68,5-98,7) e o índice de concordância Kappa de Cohen com 0,23 (0,03-0,44), conforme demonstração da **Tabela 9**.

Tabela 8: Performance da avaliação da DRM vs. metodologias aplicadas na rotina durante o tratamento dos pacientes pediátricos com LLA-B

Protocolo Adaptado EuroFlow	Acurácia (IC 95%)	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Kappa de Cohen (IC 95%)
Teste de Ref. (Rotina, %)	55,3% (41,3 - 68,59)	92,9% (68,5 - 98,7)	39,4% (24,7 - 56,3)	39,4% (24,7 - 56,3)	92,9% (68,5-98,7)	0,23 (0,0 - 0,4)

IC: Intervalo de Confiança de 95%.

6. DISCUSSÃO

É evidente que as CLs são eliminadas rapidamente após o início do tratamento, embora o nível de detecção da DRM no final da terapia está associado com os resultados positivos da terapia que o paciente foi submetido, prevenindo uma recaída ao longo prazo. As análises por citometria e técnicas moleculares são fortes preditores para o monitoramento da DRM durante o tratamento, devendo ser implementadas para o acompanhamento e estratificação de risco, bem como o manejo clínico, possibilitando melhores respostas após o uso dos quimioterápicos e sobrevida do paciente (77,78). Nesse sentido, nosso estudo mostrou uma avaliação comparativa entre as técnicas utilizadas na rotina de um centro de referência para o tratamento da leucemia infantil com os protocolos adaptados do Consórcio EuroFlow. Além disso, a análise foi feita com pacientes com LLA-B, com boa distribuição de faixa etária, gênero, protocolo de tratamento, grupo de risco e coletas em tempos de tratamento diferentes.

A maioria dos pacientes com LLA-B incluídos no estudo tinham <10 anos, estando esse resultado condizente com a literatura sobre a prevalência dos pacientes com leucemia infantil, sabendo que os resultados são inferiores para adultos com LLA-B (41). Além disso, foi descrito que a maior frequência dos indivíduos com LLA-B é caracterizada pela idade e o gênero masculino, embora alguns autores divergem sobre esse dado (79). Além disso, nosso estudo apresentou um dado divergente da literatura que descreve o maior índice para o sexo masculino, mas o nosso obteve uma predominância para o sexo feminino. Esse achado, embora não seja tão relevante, visto que a nossa análise é independente do sexo, deve ter ocorrido devido ao n amostral baixo incluído (25 pacientes).

Em relação ao protocolo BFM-2009 que foi único utilizado para os pacientes conforme demonstrado na tabela 6, observamos que usa os critérios de estratificação com base nos seguintes critérios: número de leucócitos por microlitro no sangue periférico ao diagnóstico; classificação imunológica de células T; presença de t(9;22) ou de recombinação BCR-ABL, ou de t(4;11), ou de recombinação MLL-AF4; número de blastos por microlitro no sangue periférico no D8 e estado de remissão no D33 (47,48). Assim, com esses critérios conseguimos observar que os pacientes iniciaram o tratamento com seus respectivos grupos de risco, no entanto, foram re-estratificados no D8 e D15 com base nos resultados obtidos com técnicas e protocolos diferentes para comparar e verificar

a presença de blastos. Conforme descrito na literatura, nossos achados confirmam que o método de CF foi mais sensível para acompanhar a DRM por conta do uso dos marcadores celulares específicos e o número de eventos analisados em cada amostra, possibilitando aumento nas chances de detecção dos eventos raros e superando os valores da técnica manual para identificação dos blastos residuais da LLA-B nos pacientes (80).

Nesse contexto, como tivemos limitação no número total de amostras coletadas e acompanhadas dos pacientes em seus tempos de tratamento, conseguimos notar a importância de se obter amostras de boa qualidade, bem como o uso de estratégias no laboratório capaz de melhorar o isolamento das CLs, como o protocolo de *Bulk Lyse* que foi elaborado pelo consórcio EuroFlow para concentrar os leucócitos. Nesse sentido, foi possível identificar resíduos de blastos que ainda podem estar presente após o tratamento. Outra medida necessária é o preparo dos equipamentos, sendo necessários os controles de qualidade para tal análise. Assim, o citômetro de fluxo precisa ter seus parâmetros de voltagem e compensação alinhados para se ter uma boa aquisição e análise dos dados em seguida. Tal medida é necessária para que a avaliação da DRM durante a terapia, pois os resultados gerados serão utilizados como preditor das decisões de tratamento e avaliação da eficácia da terapia (53,72,81).

Além disso, a identificação da célula B a partir de uma célula precursora comprometida, analisada em múltiplos parâmetros e verificando a aquisição para identificar os marcadores celulares, através da aquisição da CF pela comparação do painel de marcadores celular, pode mostrar informações importantes sobre a maturação do linfócito B e revelar os blastos leucêmicos (53,72,81). Tal identificação é necessária, principalmente com os métodos de diagnósticos avançados, pois a sensibilidade na detecção é primordial para identificar essas CLs. Nesse sentido, o uso de outros métodos, como a PCR em tempo real (qPCR) e o sequenciamento de nova geração (NGS) podem também ser empregados e tem a capacidade de fornecer o monitoramento das células chegando a uma sensibilidade de 10^{-7} .

Embora os ensaios de qPCR e CF possuam excelente sensibilidade (variando de 10^{-4} a 10^{-6}) e sejam considerados os principais métodos padrão para analisar a DRM dos pacientes durante o acompanhando da terapia quimioterápica, novas alternativas e atualizações nos protocolos, sempre devem ser avaliadas (1). Nesse sentido, tem-se estabelecido que avaliação da DRM por CF é o mais indicado para os centros hospitalares

que não possuem técnicas moleculares, com a utilização da citometria como recurso para avaliar e acompanhar a doença durante o tratamento, devido a sensibilidade ser superior as técnicas morfológicas, podendo até se igualar as técnicas moleculares utilizando os métodos específicos para aumentar a sensibilidade em conjunto com equipamento adequado (82,83).

É necessário ainda que avaliar e adequar, sempre que possível os marcadores específicos descrito na literatura para a detecção de blasto durante o tratamento dos pacientes. Theunissen et, at. 2017 relata a atualização do uso dos marcadores celulares melhorou significativamente a análise da DRM por CF em pacientes com LLA-B. Essa melhora na identificação dos blastos foi possível com o uso de marcadores específicos como o CD19, CD45, CD34, CD10 e CD20 para avaliar as CLs aliada a análise bidimensional e usando softwares capazes de identificar diferentes parâmetros simultaneamente, permitindo assim a identificação apropriada dos precursores de células B, bem como a caracterização de várias subpopulações oriundas dessas células. Além disso, os marcadores CD9, CD123, CD66c, CD81, CD24 e CD10 também foram mensurados e obtiveram resultados promissores para realizar o acompanhamento dos pacientes com LLA-B (64,84).

O estudo de Shaver et al analisaram primariamente a contribuição relativa que cada marcador indica para detectar a DRM e concluíram que um único tubo contendo 8 marcadores consistindo em CD9, CD10, CD19, CD20, CD34, CD38, CD45 e CD58 poderia fornecer utilidade diagnóstica e necessária para o acompanhamento da DRM durante a quimioterapia terapia (64,84). Adicionalmente, o monitoramento das CLs na análise por morfologia é um forte fator de prognóstico, mas essa técnica é muito limitada pela baixa sensibilidade a difícil distinção entre os linfoblastos e os precursores imaturos normais.

Assim, a citometria é a forma de detecção mais sensível que a morfológica, sendo indicada para os centros que não possuem técnicas moleculares, corroborando assim com os nossos achados comparativos entre os métodos. A detecção da DRM não depende apenas das células aberrantes encontradas na medula óssea, mas também do quantitativo alto de células que devem ser analisadas, tornando essa técnica a melhor alternativa para esses centros. Ressalta-se que para essa análise, é necessária uma amostra com cerca de 10 milhões de células, tornando possível a identificação de 1 célula-alvo

em 10^4 a 10^6 células, aumentando assim a sensibilidade necessária para alcançar todas as CLs na amostra do paciente e equiparando-se aos métodos moleculares (5,85).

Em nosso estudo, observamos que a contagem manual obteve valores baixos comparado com a citometria, como esta distrito na Tabela 8 e Figuras 12 e 13. Nessas análises foi possível comparar todos os tempos com técnicas diferentes, sendo observado que o D8 foi feito por contagem automatizada e demonstrou, embora com baixa sensibilidade, ser uma opção para a identificação da DRM. No entanto, esse achado é controverso, pois pacientes com baixa quantidade de CLs não foram detectados por esse método. Assim, conforme descrito na literatura, ainda há dificuldade para identificar as CLs por avaliação da morfologia, sendo promissor e necessário a identificação por marcadores celulares, que são os receptores específicos de cada célula, aumentando a sensibilidade do teste (83,86,87).

Além dessa técnica ser mais sensível, é necessário observar que o quantitativo de células analisados é importante para aumentar a sensibilidade conforme a análise comparativa do D15 demonstrou, onde observamos maior sensibilidade com o protocolo do estudo que utilizou uma forma de concentrar o número de células a partir da lise dos eritrócitos e ressuspensão calculada. Nesse sentido, verificamos que as análises que tiveram um número de aquisição >500.000 células avaliadas quando comparado com a análise com <500.000 obtiveram valor significativo mais sensível comparando as duas metodologias. Resultados similares foram observados nos tempos D35 e D84, onde foi comparado a análise da CM versus a avaliação por CF, com diferenças significativas entre as técnicas utilizadas e corroborando com os achados da literatura (83,86,87).

Por fim, observa-se o impacto positivo na detecção dos blastos precocemente, quando se avalia a re-estratificação dos grupos de risco de tratamento. Propomos aqui a inclusão dessa análise no D8, como descrito anteriormente, pois os ganhos para os pacientes será bem maior (88,89). Nesse sentido, foi observado que o grupo de risco dos pacientes ao iniciarem o tratamento no dia do diagnóstico (D0) sofreu ajustes significativos com base na contagem dos blastos no D8 e D15, sendo observado a mudança de vários indivíduos do grupo risco com o qual foi designado inicialmente. Essa avaliação precoce é importante para ajustar os protocolos de tratamento, sendo analisados atualmente apenas no D15 e leva em consideração a resposta medular e classificação com base nos critérios de estratificação (88,89). Essa perspectiva é importante para e

minimizar as recaídas ao final do tratamento, analisando o D8 como preditor precoce de monitoramento de blastos residuais na circulação, assim como investigar a DRM na MO no D15 por CF com o protocolo adaptado do Consórcio EuroFlow.

O presente estudo apresentou algumas limitações, tais como o número baixo de participantes do estudo, quando comparado a outros estudos prospectivos. Além disso, tivemos problemas com a análise de amostras de SP e MO no seguimento dos pacientes, uma vez que a prioridade seriam os testes de rotina. Embora o presente estudo forneça dados relevantes acerca da avaliação da DRM de forma precoce e com protocolo adaptado, visto que nem todos os centros possuem um equipamento com amplo espectro de detecção com 8 ou mais cores. Além disso, a Fundação HEMOAM passará em breve por um upgrade dos equipamentos utilizados na rotina e conseqüentemente adotará o protocolo internacional do Consórcio EuroFlow.

7. CONCLUSÃO

Como conclusão, podemos perceber que nosso estudo indicou melhores resultados quanto a detecção precoce de blastos leucêmicos e a avaliação da DRM durante o tratamento quimioterápico. Além disso, observa-se impacto positivo no prognóstico dos pacientes acompanhados e avaliados com o protocolo adaptador do Consórcio EuroFlow, principalmente quando se observa as análises comparativas das técnicas avaliadas. Por fim, nossos achados confirmam maior sensibilidade utilizando a CF com o protocolo adaptado nas avaliações do D8, D15, D35 e D84, mesmo quando comparamos a avaliação por CF feita no D15, pois o protocolo utilizado em nosso estudo realizou a concentração de células com o processo de Bulk Lyse para atingir valores significativamente maior de células para identificação da DRM durante o tratamento e o impacto que pode ocorrer se obtiver os melhores resultados para os pacientes.

8. REFERÊNCIA

1. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, Wang W, Lee R, Gang EJ, Khazal S, et al. Minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Sci* (2020) 21: doi: 10.3390/ijms21031054
2. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* (2017) 7:e577. doi: 10.1038/bcj.2017.53
3. DiGiuseppe JA, Wood BL. Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* (2019) 96:256–265. doi: 10.1002/cyto.b.21833
4. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* (2017) 7:e577. doi: 10.1038/bcj.2017.53
5. Da Costa Salina TD, Ferreira YA, Alves EB, Ferreira CM, De Paula EV, Mira MT, Da Mota Passos L. Role of peripheral blood minimum residual disease at day 8 of induction therapy in high-risk pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. *Sci Rep* (2016) 6:6–11. doi: 10.1038/srep31179
6. Simioni C, Conti I, Varano G, Brenna C, Costanzi E, Neri LM. The Complexity of the Tumor Microenvironment and Its Role in Acute Lymphoblastic Leukemia : Implications for Therapies. (2021) 11:1–14. doi: 10.3389/fonc.2021.673506
7. Rocha JMC, Xavier SG, de Lima Souza ME, Assumpção JG, Murao M, de Oliveira BM. Current strategies for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* (2016) 8: doi: 10.4084/MJHID.2016.024
8. Roberts I, Fordham NJ, Rao A, Bain BJ. Neonatal leukaemia. *Br J Haematol* (2018) 182:170–184. doi: 10.1111/bjh.15246
9. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood* (2009) 114:937–951. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262
10. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, Cappellini A, Neri LM, McCubrey JA, Martelli AM. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* (2016) 1863:449–463. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.08.015
11. Pedrosa F, Lins M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável Acute lymphoblastic leukemia: a curable disease. *Rev bras saúde matern infant* (2002) 2:63–68.
12. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* (2013) 381:1943–1955. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62187-4

13. Venturi V, Masek T, Pospíšek M. A blood pact: The significance and implications of eIF4E on lymphocytic leukemia. *Physiol Res* (2018) 67:363–382. doi: 10.33549/physiolres.933696
14. Dumont dUrville J-S-C, DOrbigny AD, Eyries JBB, Jacobs A. Leucemia linfoblástica aguda. *Histoire Générale des Voyages* (2015)593–597. doi: 10.1017/cbo9781139107563.069
15. Rashighi M, Harris JE. Clonal Hematopoiesis in Cancer. *HHS Public Access* (2020) 176:139–148. doi: 10.1053/j.gastro.2016.08.014.CagY
16. Azizidoost S, Babashah S, Rahim F, Shahjahani M, Saki N. Bone marrow neoplastic niche in leukemia. *Hematology* (2014) 19:232–238. doi: 10.1179/1607845413Y.00000000111
17. Greaves M. Childhood Leukemia. *Abeloff's Clinical Oncology* (2002) 324:1748-1764.e4. doi: 10.1016/B978-0-323-47674-4.00093-1
18. Fujita TC, Sousa-Pereira N, Amarante MK, Watanabe MAE. Acute lymphoid leukemia etiopathogenesis. *Mol Biol Rep* (2021) 48:817–822. doi: 10.1007/s11033-020-06073-3
19. Rafei H, Kantarjian HM, Jabbour EJ. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* (2019) 60:2606–2621. doi: 10.1080/10428194.2019.1605071
20. Moreira LA, Batista SC, Beira J. Diagnóstico de Leucemias linfóides agudas : Uma Revisão. *Saúde em Foco* (2018) 10:279–87.
21. Jeffrey S. Chang, Mi Zhou, Patricia A. Buffler, Anand P. Chokkalingam C, Metayer and JLW. Profound deficit of IL10 at birth in children who develop childhood acute lymphoblastic leukemia. *NIH* (2012) 23:1–7. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0162.Profound
22. A.F.Vieira, B. Neves, S.R.Tonelli. Perfil Epidemiológico Da Leucemia Linfoide Nas Regiões Do Brasil Epidemiological Profile of Lymphoid Leukemia in Brazil Region. (2017) 55:130–143.
23. Whiteley AE, Price TT, Cantelli G, Sipkins DA. Leukaemia: a model metastatic disease. *Nat Rev Cancer* (2021) 21:461–475. doi: 10.1038/s41568-021-00355-z
24. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, Hesselting P, Shin HY, Stiller CA, Bouzbid S, et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol* (2017) 18:719–731. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30186-9
25. INCA. *Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer*. (2022).
26. ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa | 2020 Incidência de Câncer no Brasil*. (2557). 88–100 p.
27. Chan KW. Acute Lymphoblastic Leukemia Biologic Features of ALL Morphologic and Cytochemical Classification. *Curr Probl Pediatr* (2002) 32:40–49.

28. Silva AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, Torres AS, Tarragô AM, Sampaio VS, Carvalho MPSS, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PLoS One* (2019) 14:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0221518
29. Ries L, Trama A, Nakata K, Gatta G, Botta L, Bleyer A. Cancer Incidence, Survival, and Mortality Among Adolescents and Young Adults. *Pediatric Oncology* (2017) 38:7–42. doi: 10.1007/978-3-319-33679-4_2
30. Mikosik A, Henc I, Ruckemann-Dziurdzińska K, Frckowiak JE, Płoszyńska A, Balcerska A, Bryl E, Witkowski JM. Increased μ -calpain activity in blasts of common B-precursor childhood acute lymphoblastic leukemia correlates with their lower susceptibility to apoptosis. *PLoS One* (2015) 10:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0136615
31. Rose-Inman H, Kuehl D. Acute Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* (2017) 31:1011–1028. doi: 10.1016/j.hoc.2017.08.006
32. American Cancer Society. Acute Lymphocytic Leukemia Early Detection, Diagnosis and Types. *American Cancer Society* (2018)1–21.
33. Brunning RD, Because •. Classification of Acute Leukemias. (2003) doi: 10.1053/s0740-2570(03)00031-5
34. Devitt KA, Oldaker T, Shah K, Illingworth A. Summary of validation considerations with real-life examples using both qualitative and semiquantitative flow cytometry assays. *Cytometry B Clin Cytom* (2023)1–18. doi: 10.1002/cyto.b.22123
35. Da Silva GC, Pilger DA, De Castro SM, Wagner SC. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *J Bras Patol Med Lab* (2006) 42:77–84. doi: 10.1590/S1676-24442006000200004
36. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia (Blood (2016) 127, 20 (2391-2405)). *Blood* (2016) 128:462–463. doi: 10.1182/blood-2016-06-721662
37. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, Bhagat G, Borges AM, Boyer D, Calaminici M, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* (2022) 36:1720–1748. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2
38. Porwit A, Béné MC. Multiparameter flow cytometry applications in the diagnosis of mixed phenotype acute leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* (2019) 96:183–194. doi: 10.1002/cyto.b.21783
39. Schroeder HW, Radbruch A, Berek C. *B-Cell Development and Differentiation*. Fifth Edit. Elsevier Ltd (2019). 107-118.e1 p. doi: 10.1016/B978-0-7020-6896-6.00007-7
40. Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics International* (2018) 60:4–12. doi: 10.1111/ped.13457

41. Caner Saygin, Joseph Cannova WS and LM. Measurable Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Techniques and Therapeutic Utility. *Clinical Advances in Hematology and Oncology* (2022) 20:419–421.
42. Kumar A, Taghi Khani A, Duault C, Aramburo S, Sanchez Ortiz A, Lee SJ, Chan A, McDonald T, Huang M, Lacayo NJ, et al. Intrinsic suppression of type I interferon production underlies the therapeutic efficacy of IL-15-producing natural killer cells in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Immunother Cancer* (2023) 11: doi: 10.1136/jitc-2022-006649
43. Pierro J, Hogan LE, Bhatla T, Carroll WL, Brook S. New Targeted Therapies for Relapsed Pediatric Lymphoblastic Leukemia. *HHS Public Access* (2018) 17:725–736. doi: 10.1080/14737140.2017.1347507.New
44. Magalhães-Gama F, Kerr MWA, De Araújo ND, Ibiapina HNS, Neves JCF, Hanna FSA, Xabregas LDA, Carvalho MPSS, Alves EB, Tarragô AM, et al. Imbalance of Chemokines and Cytokines in the Bone Marrow Microenvironment of Children with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Oncol* (2021) 2021: doi: 10.1155/2021/5530650
45. Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, Loh ML, Raetz EA, Salzer WL, Nachman JB, Carroll AJ, Heerema NA, Gastier-Foster JM, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: A report from Children’s Oncology Group study AALL0232. *Blood* (2015) 126:964–971. doi: 10.1182/blood-2015-03-633685
46. Laks D, Longhi F, Wagner MB, Garcia PCR. Avaliação da sobrevida de crianças com leucemia linfocítica aguda tratadas com o protocolo Berlim-Frankfurt-Munique. *J Pediatr (Rio J)* (2003) 79:149–158. doi: 10.1590/s0021-75572003000200010
47. Volejnikova J, Mejstrikova E, Valova T, Reznickova L, Hodonska L, Mihal V, Sterba J, Jabali Y, Prochazkova D, Blazek B, et al. Minimal residual disease in peripheral blood at day 15 identifies a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with superior prognosis. *Haematologica* (2011) 96:1815–1821. doi: 10.3324/haematol.2011.042937
48. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: An update. *Journal of Clinical Oncology* (2011) 29:551–565. doi: 10.1200/JCO.2010.30.7405
49. Ratei R, Basso G, Dworzak M, Gaipa G, Veltroni M, Rhein P, Biondi A, Schrappe M, Ludwig WD, Karawajew L. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 2009 23:3 (2008) 23:528–534. doi: 10.1038/leu.2008.324
50. Colby-Graham MF, Chordas C. The childhood leukemias. *J Pediatr Nurs* (2003) 18:87–95. doi: 10.1053/jpdn.2003.9
51. Biondi A, Conter V, Chandy M, Ewald P, Lucia de Martino Lee M, Radhakrishnan VS, Rotchanapanya W, Scanlan P, Patrick Smith O, Togo B, et al. Precursor B-

- cell acute lymphoblastic leukaemia—a global view. *Br J Haematol* (2022) 196:530–547. doi: 10.1111/bjh.17959
52. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling M V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how do we get there? *Blood* (2012) 120:1165–1174. doi: 10.1182/blood-2012-05-378943
 53. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* (2010) 2010:7–12. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.7
 54. Antônio ROJPBB. Mielograma e Imunofenotipagem por citometria de fluxo em hematologia. *Roco* (2019)
 55. Cherian S, Soma LA. How i diagnose minimal/measurable residual disease in b lymphoblastic leukemia/lymphoma by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* (2021) 155:38–54. doi: 10.1093/ajcp/aqaa242
 56. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic multicolor flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* (2017) 2017:5.4.1-5.4.38. doi: 10.1002/cpim.26
 57. Villas BH. Flow cytometry: an overview. *Cell Vis* (2018) 5:56–61. doi: 10.1007/978-94-017-0623-0_1
 58. Dai Q, Liu X, Yang H, Guo S, Wang Y, Peng L, Ye L, Chen L, Lai C, Chen Q, et al. No prognostic significance of immunophenotypic changes at the end of remission induction therapy in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* (2018) 68:57–61. doi: 10.1016/j.leukres.2018.03.001
 59. Ikoma-Colturato MRV, Beltrame MP, Furtado FM, Pimenta G, da Costa ES, Azambuja AP, Malvezzi M, Yamamoto M. Minimal residual disease assessment in acute lymphoblastic leukemia by 4-color flow cytometry: Recommendations from the MRD Working Group of the Brazilian Society of Bone Marrow Transplantation. *Hematol Transfus Cell Ther* (2021) 43:332–340. doi: 10.1016/j.htct.2020.09.148
 60. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, Sobral da Costa E, Kotrová M, Novakova M, Sonneveld E, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (2017) 129:347–357. doi: 10.1182/blood-2016-07-726307
 61. Dekker JD, Rhee C, Hu Z, Lee B-K, Lee J, Iyer VR, Ehrlich LIR, Georgiou G, 2^ HOT, Ippolito GC, et al. Lymphoid origin of a lineage of intrinsically activated plasmacytoid dendritic cell in mice and humans. *bioRxiv* (2018)310680.
 62. Almeida PSR, Saddi VA. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. *Rev Bras Hematol Hemoter* (2007) 29:382–386. doi: 10.1590/S1516-84842007000400012
 63. Correia RP, Bento LC, de Sousa FA, Barroso R de S, Campregher P V., Bacal NS. How I investigate minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol* (2021) 43:354–363. doi: 10.1111/ijlh.13463

64. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, Van Der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, Sobral da Costa E, Kotrová M, Novakova M, Sonneveld E, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (2017) 129:347–357. doi: 10.1182/blood-2016-07-726307
65. Gaipa G, Buracchi C, Biondi A. Flow cytometry for minimal residual disease testing in acute leukemia: opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn* (2018) 18:775–787. doi: 10.1080/14737159.2018.1504680
66. Annino L, Vegna ML, Camera A, Specchia G, Visani G, Fioritoni G, Ferrara F, Peta A, Ciolli S, Deplano W, et al. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): Long-term follow-up of the GIMEMA ALL 0288 randomized study. *Blood* (2002) 99:863–871. doi: 10.1182/blood.V99.3.863
67. Christiane Pott, Monika Brüggemann, Matthias Ritgen, Vincent HJ van der Velden, Jacques JM van Dongen MK. Detection in B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas Using Ig Gene Rearrangements and Chromosomal Translocations as Targets for Real-Time qPCR. *Methods in Molecular Biology* (2019) doi: 10.1007/978-1-4939-9151-8_9
68. Wright G, Watt E, Ingloft S, Brooks T, Bartram J, Adams SP. Clinical benefit of a high-throughput sequencing approach for minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* (2019) 66:1–7. doi: 10.1002/pbc.27787
69. Kim IS. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: Technical aspects and implications for clinical interpretation. *Blood Res* (2020) 55:19–26. doi: 10.5045/br.2020.S004
70. Pui C. Acute lymphoblastic leukemia in children. (2000)3–12.
71. Paganin M, Fabbri G, Conter V, Barisone E, Polato K, Cazzaniga G, Giraldi E, Fagioli F, Aricò M, Valsecchi MG, et al. Postinduction minimal residual disease monitoring by polymerase chain reaction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* (2014) 32:3553–3558. doi: 10.1200/JCO.2014.56.0698
72. Van Dongen JJM, Van Der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* (2015) 125:3996–4009. doi: z
73. Chen X, Wood BL. How do we measure MRD in ALL and how should measurements affect decisions. Re: Treatment and prognosis? *Best Pract Res Clin Haematol* (2017) 30:237–248. doi: 10.1016/j.beha.2017.07.002
74. Luskin MR, Murakami MA, Manalis SR, Weinstock DM. Targeting minimal residual disease: A path to cure? *Nat Rev Cancer* (2018) 18:255–263. doi: 10.1038/nrc.2017.125
75. Saygin C, Cannova J, Stock W, Muffly L. Measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia: methods and clinical context in adult patients. *Haematologica* (2022) 107:2783–2793. doi: 10.3324/haematol.2022.280638

76. Cazé MO, Bueno D, Santos MEF Dos. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. *Rev HCPA & Fac Med Univ Fed Rio Gd do Sul* (2010) 30:5–12.
77. Künz T, Hauswirth AW, Hetzenauer G, Rudzki J, Nachbaur D, Steiner N. Changing Landscape in the Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Cancers (Basel)* (2022) 14: doi: 10.3390/cancers14174290
78. Cheng SH, Lau KM, Li CK, Chan NPH, Ip RKL, Cheng CK, Lee V, Shing MMK, Leung AWK, Ha SY, et al. Minimal Residual Disease-Based Risk Stratification in Chinese Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Flow Cytometry and Plasma DNA Quantitative Polymerase Chain Reaction. *PLoS One* (2013) 8: doi: 10.1371/journal.pone.0069467
79. Quiroz E, Aldoss I, Pullarkat V, Rego E, Marcucci G, Douer D. The emerging story of acute lymphoblastic leukemia among the Latin American population – biological and clinical implications. *Blood Rev* (2019) 33:98–105. doi: 10.1016/j.blre.2018.08.002
80. Ikoma-Colturato MRV, Beltrame MP, Furtado FM, Pimenta G, da Costa ES, Azambuja AP, Malvezzi M, Yamamoto M. Minimal residual disease assessment in acute lymphoblastic leukemia by 4-color flow cytometry: Recommendations from the MRD Working Group of the Brazilian Society of Bone Marrow Transplantation. *Hematol Transfus Cell Ther* (2021) 43:332–340. doi: 10.1016/j.htct.2020.09.148
81. Lúcio P, Parreira A, van den Beemd M, van Lochem E, van Wering E, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. (1999). 419–427 p. <http://www.stockton-press.co.uk/leu>
82. Depince-Berger AE, Aanei C, Iobagiu C, Jeraiby M, Lambert C. New tools in cytometry. *Morphologie* (2016) 100:199–209. doi: 10.1016/j.morpho.2016.05.001
83. Fuda F, Chen W. Minimal/Measurable Residual Disease Detection in Acute Leukemias by Multiparameter Flow Cytometry. *Curr Hematol Malig Rep* (2018) 13:455–466. doi: 10.1007/s11899-018-0479-1
84. Weng XQ, Shen Y, Sheng Y, Chen B, Wang JH, Li JM, Mi JQ, Chen QS, Zhu YM, Jiang CL, et al. Prognostic significance of monitoring leukemia-associated immunophenotypes by eight-color flow cytometry in adult B-acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J* (2013) 3: doi: 10.1038/bcj.2013.31
85. Coustan-Smith E, Campana D. Immunologic minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: A comparative approach to molecular testing. *Best Pract Res Clin Haematol* (2010) 23:347–358. doi: 10.1016/j.beha.2010.07.007
86. Luria D, Rosenthal E, Steinberg D, Kodman Y, Safanaiev M, Amariglio N, Avigad S, Stark B, Izraeli S. Prospective comparison of two flow cytometry methodologies for monitoring minimal residual disease in a multicenter treatment protocol of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* (2010) 78:365–371. doi: 10.1002/cyto.b.20532

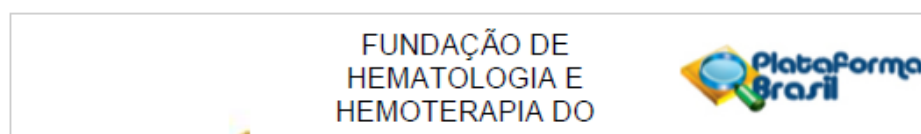
87. Chen W, Luu HS. Immunophenotyping by multiparameter flow cytometry. *Methods in Molecular Biology* (2017) 1633:51–73. doi: 10.1007/978-1-4939-7142-8_4
88. Felice MS, Zubizarreta PA, Alfaro EM, Sackmann-Muriel F. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Value of Initial Peripheral Blast Count in Good Responders to Prednisone. (2001).
89. Lauten M, Möricke A, Beier R, Zimmermann M, Stanulla M, Meissner B, Odenwald E, Attarbaschi A, Niemeyer C, Niggli F, et al. Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: Differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia. *Haematologica* (2012) 97:1048–1056. doi: 10.3324/haematol.2011.047613

9. APÊNDICES

9.1 Apêndice 01: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HEMOAM

Este projeto faz parte de um projeto maior denominado Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com leucemia

linfoblástica aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica

Pesquisador: Allyson Guimarães da Costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51257921.2.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.982.395

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional, do tipo longitudinal, retrospectivo e prospectivo para avaliação dos componentes celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com LLA, durante a terapia de indução da remissão e terapia de consolidação da remissão dos protocolos de tratamento. As amostras serão coletadas na Fundação HEMOAM, durante os procedimentos de rotina dos pacientes. As coletas ocorrerão em 4 momentos da quimioterapia de remissão, referidos como: diagnóstico (D0), dia 15 da terapia de indução da remissão (D15), final da terapia de indução da remissão (D35) e no dia 84 da terapia de consolidação da remissão (D84) dos protocolos de tratamento, sendo coletados 2 mL de MO e 3mL de SP em tubos com sistema a vácuo, contendo anticoagulante EDTA (Ethylenediaminetetraacetic) pela Equipe Médica da Fundação HEMOAM. Serão incluídas no estudo 158 amostras de DNA e plasma de pacientes com LLA criopreservadas e 203 amostras de DNA e plasma de doadores de sangue. A identificação de biomarcadores imunológicos como instrumento preditivo de prognóstico e resposta terapêutica fornecerá meios para identificar os pacientes que apresentarão uma boa resposta à quimioterapia ou a ausência dela, indicando neste último caso, a necessidade de intervenções terapêuticas alternativas ou mais assertivas de maneira antecipada, diminuindo a duração da exposição a terapias ineficazes e potencialmente tóxicas, o que proporcionará melhores resultados e maior qualidade de vida aos pacientes.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
 Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.982.395

Instituição e Infraestrutura	utura_coparticipante_FIOCRUZ_Minas.pdf	09:05:04	da Costa	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	30/08/2021 08:57:08	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	30/08/2021 08:56:55	Allyson Guimarães da Costa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não


MANAUS, 17 de Setembro de 2021

Assinado por:

SONIA REJANE DE SENNA FRANTZ
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (82)3655-0114 Fax: (82)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

9.2 Apêndice 02: Protocolo *Bulk Lyse* do Consórcio EuroFlow

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 <p>BCM-LLA</p>	<p>AIS BIOMARCADORES CELULARES E MOLECULARES NA LLA</p>	
	<p>Procedimento para Aumento de Leucócitos (Bulk Lise)</p>	<p>N° POP:</p>
		<p>Revisão:</p> <p>Data:</p>

1. Objetivo

Realizar a lise das hemácias com o intuito de aumentar o número dos leucócitos para a realização da análise de DRM por meio de citometria de fluxo.

2. Responsabilidade

Alunos de Mestrado, Doutorado e alunos de Iniciação Científica envolvidos nas pesquisas do Projeto BCM-LLA que tem domínio do procedimento.

3. Siglas

DRM = Doença Residual Mensurável

BCM = Biomarcadores Celular e Molecular

LLA = Leucemia Linfoblástica Aguda

4. Preparo da amostra

4.1 Bulky Lysis para DRM de LLA B – Protocolo EUROFLOW (Tubo Falcon 50ml)

- 4.1.1 Fazer a diluição do Pharmalyse 1:10 em tubo Falcon de 50ml (45ml de água de injeção) + (5ml de Pharmalyse);
- 4.1.2 Adicionar 2ml da amostra e homogeneizar. Deixar incubando 15 minutos;
- 4.1.3 Centrifugar 10min 2.300rpm. Verter o sobrenadante;

- 4.1.4 Adicionar PBS-W aproximadamente 10ml homogeneizar o pellet delicadamente, não utilizar vórtex, e terminar de preencher o volume do tubo de 50ml com o PBS-W, homogeneizar novamente;
- 4.1.5 Centrifugar 5min em 2.300rpm. Verter o sobrenadante;
- 4.1.6 Adicionar 2ml de PBS-W homogeneizar o pellet delicadamente, não utilizar vórtex, e transferir para o tubo de citometria e com mais 2ml lavar novamente o tubo Falcon de 50ml e juntar ao tubo de citometria;
- 4.1.8 Centrifugar 5min em 1.700rpm. Verter e ressuspender com 1.000ul de PBS-W. Pronto para pipetar.

5. Armazenamento de amostras

1. O tempo de armazenamento das amostras biológicas é de 1 semana em temperatura ambiente na estante destinada a essa finalidade. Amostras já processadas armazenadas em geladeira por 24 horas;
2. As lâminas coradas devem ser eternizadas com Entellan e cobertas com lamínula. O tempo de armazenamento das lâminas referentes às amostras biológicas processadas é de no mínimo 5 anos em temperatura ambiente no armário destinado a essa finalidade.

6. Observações

- Se celularidade alta, ressuspender para 400uL. Caso necessário adicionar mais PBS para leitura aos tubos.
- É comum a formação de grumos de células após a lise. Antes da leitura remover com o auxílio de pipeta.

- Antes da leitura é necessário realizar a limpeza diária do citômetro;

- Abrir um novo experimento e adquirir o máximo de eventos possíveis (até a amostra esgotar).

7. Estabilidade e conservação dos reagentes

- Água estéril: manter a temperatura ambiente;
- Syto: conservado congelado de -5°C a -20°C até a data de validade do rótulo;

- Anticorpos monoclonais, solução de Lysing Solution 10x e Solução Pharm Lyse-lysing Bufter 10X: conservados refrigerados de 2°C a 8°C até a data de validade do rótulo;
- Solução de Lysing Solution 1X: manter em frasco âmbar ou protegido com papel alumínio por até 24 horas a temperatura ambiente;
- Solução de Pharm Lyse – Lysing Bfter 1X: manter em frasco âmbar ou protegido com papel alumínio por até 24 horas a temperatura ambiente.
- Avaliar a concentração da amostra antes de qualquer manipulação. Para obter uma sensibilidade esperada de 106.
- Serão necessárias no mínimo 10 x 10⁶ células nucleadas para serem fenotipadas em cada tubo de DRM.


	Número de células nucleadas
Número de células iniciais	10 x 10 ⁶ = 10.000.000
Objetivo para marcar após BL	10 x 10 ⁶ = 10.000.000
Objetivo para análise	5 x 10 ⁶ = 5.000.000

- Para exame de DRM de LLA B, colocar amostra suficiente para adquirir no mínimo 5.000.000 eventos em cada tubo, ou seja, seguir tabela abaixo ou fazer a Bulky Lise em amostras com menos que 20.000/ uL.

• Número de Leucócitos	• Amostra DRM
• < 20.000/uL	• Bulky Lise
• 30.000 a 49.000/uL	• 300 uL
• 51.000 a 69.000/uL	• 200uL
• 70.000 a 110.000/uL	• 100 uL
• 120.000 a 200.000/ uL	• 50 uL
• > 200.000// uL	• Calcular (menos volume)

- Material com menos de 1mL INCUBAR a amostra TOTAL, dividindo entre dois tubos, reservar 100ul para alguma possível repetição/ampliação.

9.3 Apêndice 03: Protocolo de Imunofenotipagem Celular para DRM

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 <p>BCM-LLA</p>	<p>AIS BIOMARCADORES CELULARES E MOLECULARES NA LLA</p>	
	<p>IMUNOFENOTIPAGEM CELULAR DE CÉLULAS B PARA DRM</p>	<p>Nº POP: 003</p>
		<p>Revisão: Data:</p>

OBJETIVO

Realizar a Imunofenotipagem de populações de Células B para análise de DRM; em amostras de Medula Óssea (MO) e Sangue Periférico (SP) (Sangue Total – EDTA) em pacientes com LLA-B.

RESPONSABILIDADE

Alunos de Mestrado e Doutorado (Biomédicos, Enfermeiros e Farmacêuticos), e alunos de Iniciação Científica envolvidos nas pesquisas do Projeto DRM.

ETAPA I – DILUIÇÃO DA AMOSTRA DESEJADA

$$C1.V1=C2.V2.$$

EX: 279.000 de Leucócitos

$$C1.V1=C2.V2$$

15.000 Leucócito desejado

$$279.V1= 15.2000$$

2ml de PBS – Volume final.

$$V1 = 107 (\mu\text{l de MO para } 1.893\mu\text{l de PBS}).$$

CONSIDERAÇÕES GERAIS

4.1 Antes de iniciar o procedimento no Laboratório Multidisciplinar, o executor deverá colocar os EPIs adequados como jaleco e luvas e estar usando sapato fechado adequado;

4.2 Separar e limpar com gaze e álcool 70%, 4 tubos de citometria por amostra de MO SP, totalizando 8 tubos de citometria por paciente;

4.3 Orientações sobre diluição de amostra:

Até 15.000 Leucócitos: **100µl sem diluição;**

Acima de 15.000 Leucócitos: realizar diluição e utilizar **100µl;**

4.4 A temperatura da Centrífuga deve estar entre 22 24°C;

4.5 **Painel** de Marcação para o **D0, D15 e D35:**

TUBOS	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7
1	CD20	CD66c/CD123	CD34	CD19	CD45	CD10
2	CD38	CD73/CD304	CD34	CD19	CD45	CD20
3	CD38	CD81	CD34	CD19	CD45	CD10

ETAPA II – MARCAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE

5.1 Identificar o tubo de citometria com: iniciais do paciente; tipo de amostra (MO e SP); e respectivos anticorpos monoclonais obedecendo a sequência dos fluorocromos nos tubos 1,2 e3 (FITC, PE, PerCP, PE-Cy7, APC e APC-H7);

5.2 Distribuir em cada tubo os anticorpos monoclonais (seguindo o painel destinado ao intervalo do tratamento correspondente: (D8, D15, D35 e D84), trocando a ponteira a cada anticorpo pipetado nos tubos.

ATENÇÃO: A partir desta etapa o ambiente do laboratório conter pouca iluminação.

5.3 Adicionar no fundo de cada tubo **a quantidade de amostra que foi calculada** e, logo em seguida, homogeneizar no vórtex;

5.4 Incubar por 20 minutos à Temperatura Ambiente (TA) e ao abrigo de luz;

5.5 Ao final da incubação, adicionar **2mL de Solução de Lise** com as amostras no vórtex;

ATENÇÃO: Nesta etapa é necessário utilizar óculos de proteção.

5.6 Incubar por 10 minutos à TA e ao abrigo de luz;

5.7 Adicionar **2mL da Solução de PBS 1X;**

5.8 Em seguida, centrifugar as amostras a 1700 rpm / 5 minutos;

5.9 Desprezar o sobrenadante por inversão e deixar escorrer o excesso em papel absorvente;

5.10 Repetir as etapas 5.7, 5.8 e 5.9.

5.11 Ressuspender a amostra em **350 µl de PBS 1X** para aquisição no citômetro.

10. ANEXOS

10.1 Resumos publicados em anais de eventos 2022-2024

1. **CATÃO C. L.**; CARDOSO, E. C.; GARCIA, N.P.; GAMA, F.M.; TARRAGO, A.M.; MARIE, A.M.A.; FRAIJI, N.A.; PAULA, E.V.; COSTA, A.G.; SILVA NETO, P.V. Avaliação Imunofenotípica de Monócitos Periféricos em Pacientes com Anemia Falciforme em Crise Vaso-Oclusiva e em Estado de Convalescença. In: Anais do Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2022. São Paulo-SP, 2022.
2. PESSOA, U.H.S.; SANTOS, F.A.; SOUSA, I.V.; **CATÃO C.L.**; TORRES, A.S.; ABRAHIM, C.M.M.; MARIE, A.M.A.; PASSOS, L.N.M.; MARTINS FILHO, O.A.; COSTA, A.G. Prevalência do Vírus Linfotrófico de Célula T Humana Tipo 1 e 2 em Doadores de Sangue em um Hemocentro de Referência do Amazonas. In: Anais do Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2022, São Paulo-SP, 2022.
3. **CATÃO C.L.**; SILVA, F.S.; MAGALHAES-GAMA, F.; BARROS, M.S.; MORAES, J.S.; OLIVEIRA, E.Y.C.; OLIVEIRA, R.C.; ARAUJO, N.D.; PASSOS, L.N.M.; COSTA, A.G. Sensitivity of Measurable Residual Disease Detection Technique in Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Anais do 7th International Symposium on Immunology and Hematology, Manaus-AM, 2022.
4. SOUSA, I.V.; **CATÃO, C.L.S.**; GUEDINI, J.G.S.; MOARES, J.S.; OLIVEIRA, E.Y.C.; SILVA, S.J.A.O.; SANTOS, V.G.R.; OLIVEIRA, B.S.; MAGALHAES-GAMA, F.; COSTA, A.G. Evaluation of Immunophenotypic Markers by Flow Cytometry for Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia Subtypes in Amazonas State, Brazil. In: Anais do 7th International Symposium on Immunology and Hematology, 2022, Manaus-AM, 2022.
5. MOARES, J.S.; GAMA, F.M.; NEVES, J.C.F.; FREITAS, I.C.; GUEDINI, J.G.S.; SEIXAS, K.; **CATÃO, C.L.S.**; SILVA, F.S.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS FILHO, O.A.; COSTA, A.G. Avaliação do Perfil de Células da Imunidade Inata em Pacientes com Malária em um Município da Amazônia Brasileira. In: Anais do Host pathogen Interaction Meeting III, Rio de Janeiro-RJ, 2023.

6. GUEDINI, J.G.S.; GAMA, F.M.; NEVES, J.C.F.; FREITAS, I.C.; MOARES, J.S.; SEIXAS, K.; **CATÃO, C.L.S.**; ARAUJO, N.D.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MALHEIRO, A.; MARTINS FILHO, O.A.; COSTA, A.G. Avaliação do Perfil de Células da Imunidade Adaptativa em Pacientes com Malária em um Município da Amazônia Brasileira. In: Anais do Host pathogen Interaction Meeting III, Rio de Janeiro-RJ, 2023.
7. **CATÃO, C.L.S.**; GAMA, F.M.; CARVALHO, M.P.S.S.; NEVES, J.C.F.; SILVA, F.S.; MOARES, J.S.; OLIVEIRA, E.Y.C.; ARAUJO, N.D.; MALHEIRO, A.; MARTINS FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; COSTA, A.G. Performance of Immunological Cells and Molecules as Potential Biomarkers of Therapeutic Response in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Anais do XLVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, Ouro Preto-MG, 2023.
8. GAMA, F.M.; CARVALHO, M.P.S.S.; NEVES, J.C.F.; SILVA, F.S.; **CATÃO, C.L.S.**; FREITAS, I.C.; GUEDINI, J.G.S.; ARAUJO, N.D.; MALHEIRO, A.; MARTINS FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; COSTA, A.G. Systemic Immunological Profile from Children with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in the Brazilian Amazon. In: Anais do XLVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, Ouro Preto-MG, 2023.
9. SILVA, F.S.; GAMA, F.M.; CARVALHO, M.P.S.S.; NEVES, J.C.F.; **CATÃO, C.L.S.**; BARROS, M.S.; ALVES, F.S.; ARAUJO, N.D.; MALHEIRO, A.; MARTINS FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; COSTA, A.G. Treg Cells and IL-10 Profile in Peripheral Blood Samples of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Undergoing Induction Therapy. In: Anais do XLVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, Ouro Preto-MG, 2023.
10. **CATÃO, C.L.S.**; SANTOS, F.A.; PESSOA, U.H.S.; SOUSA, I.V.; SOUZA, G.L.; ARAUJO, N.D.; ABRAHIM, C.M.M.; PASSOS, L.N.M.; PONTES, G.S.; ARAUJO, M.S.S.; MARTINS FILHO, O.A.; COSTA, A.G. Seroprevalence of HTLV-1/2 in blood donation candidates screened at the Amazonas state blood center. In: Anais do XVI Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil, 2023, João Pessoa-PB, 2023.

11. SANTOS, F.A.; PESSOA, U.H.S.; **CATÃO, C.L.S.**; MARTINS, J.P.; MOURAO, E.M.V.; VALLINOTO, A.C.R.; PONTES, G.S.; ARAUJO, M.S.S.; MARTINS FILHO, O.A.; COSTA, A.G. Evaluation of the accuracy of the chemiluminescence assay compared to western blot in blood donation candidates at the Amazonas state blood center. In: Anais do XVI Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil, 2023, João Pessoa-PB, 2023.
12. SOUSA, I.V.; OLIVEIRA, B.S.; OLIVEIRA, E.Y.C.; GUEDINI, J.G.S.; SANTOS, V.G.R.; **CATÃO, C.L.S.**; GAMA, F.M.; COSTA, A.G. Epidemiologia dos Casos de Leucemia Linfóide Aguda no Estado do Amazonas: Avaliação dos fatores preditores de comorbidades infecciosas e óbitos. In: Anais do 7º Congresso Pan-Amazônico de Oncologia, Manaus-AM, 2023.
13. OLIVEIRA, E.Y.C.; **CATÃO, C.L.S.**; SOUSA, I.V.; GAMA, F.M.; OLIVEIRA, R.C.; ARAUJO, N.D.; COSTA, A.G. Monitoramento precoce da Doença Residual Mensurável na Leucemia Linfoblástica Aguda de células B. In: Anais do 7º Congresso Pan-Amazônico de Oncologia, Manaus-AM, 2023.
14. OLIVEIRA, E.Y.C.; **CATÃO, C.L.S.**; OLIVEIRA, R.C.; CRESPO NETO, J.A.; SANTOS, L.S.; SOUSA, I.V.; ARAUJO, N.D.; NEVES, J.C.F.; GAMA, F.M.; COSTA, A.G. Influence of Measurable Residual Disease Under Clinical and Biological Aspects in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Anais do 8th International Symposium on Immunology and Hematology, 2024, Manaus-AM, 2024.
15. SANTOS, F.A.; PIO, F.S.; SOUSA, I.V.; **CATÃO, C.L.S.**; PESSOA, U.H.S.; FAVACHO, C.M.; VITOR-SILVA, S.; PASSOS, L.N.M.; PONTES, G.S.; COSTA, A.G. Characterization of the Sociodemographic and Epidemiological Profile of People Living with HTLV-2 Treated at the Blood Center of the Northern Brazilian State of Amazonas. In: Anais do 8th International Symposium on Immunology and Hematology, 2024, Manaus-AM, 2024.
16. PIO, F.S.; SOUSA, I.V.; PESSOA, U.H.S.; **CATÃO, C.L.S.**; SANTOS, F.A.; FAVACHO, C.M.; VITOR-SILVA, S.; PASSOS, L.N.M.; COSTA, A.G. Intrafamilial Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Virus: Systematic Review. In: Anais do 8th International Symposium on Immunology and Hematology, 2024, Manaus-AM, 2024.

17. FREITAS, I.C.; PESSOA, U.H.S.; OLIVEIRA, E.Y.C.; SANTOS, F.A.; **CATÃO, C.L.S.**; GAMA, F.M.; ABREU, R.S.; TARRAGO, A.M.; ARAUJO, N.D.; COSTA, A.G. Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATL) caused by Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) in Patient cared for at Blood Center of the Northern Brazilian, State of Amazonas: A Case Report. In: Anais do 8th International Symposium on Immunology and Hematology, 2024, Manaus-AM, 2024.
18. CRESPO NETO, J.A.; OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA, E.Y.C.; **CATÃO, C.L.S.**; PEREIRA, D.S.; GONCALVES, L.G.M.; SILVA, J.L.S.; FARIA, J.A.Q.A.; PONTES, G.S.; COSTA, A.G. Pharmacological and Anticancer Potential of Curcumin: Updates of Studies Associated Leukemia. In: Anais do 8th International Symposium on Immunology and Hematology, 2024, Manaus-AM, 2024.

10.2 Artigos publicados em Revistas Internacionais 2022-2024

1. Magalhães-Gama F, Alves-Hanna FS, Araújo ND, Barros MS, Silva FS, **Catão CLS**, Moraes JS, Freitas IC, Tarragô AM, Malheiro A, Teixeira-Carvalho A, Costa AG. The Yin-Yang of myeloid cells in the leukemic microenvironment: Immunological role and clinical implications. *Front Immunol.* 2022 Dec 1;13:1071188. doi: 10.3389/fimmu.2022.1071188. PMID: 36532078; PMCID: PMC9751477.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Shenghui Zhang,
First Affiliated Hospital of Wenzhou
Medical University, China

REVIEWED BY
Heiko Bruns,
University Hospital Erlangen, Germany
ANM Nazmul Khan,
University at Buffalo, United States

*CORRESPONDENCE
Allyson Guimarães Costa
allyson.gui.costa@gmail.com

†These authors have contributed
equally to this work

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to

The Yin-Yang of myeloid cells in the leukemic microenvironment: Immunological role and clinical implications

Fábio Magalhães-Gama^{1,2,3†}, Fabíola Silva Alves-Hanna^{1,4†},
Nilberto Dias Araújo^{1,4}, Mateus Souza Barros^{1,4},
Flavio Souza Silva^{1,4}, Claudio Lucas Santos Catão^{1,5},
Júlia Santos Moraes¹, Izabela Cabral Freitas¹,
Andréa Monteiro Tarragô^{1,4,5}, Adriana Malheiro^{1,4,5},
Andréa Teixeira-Carvalho^{1,2,3}
and Allyson Guimarães Costa^{1,2,4,5,6*}

2. Carvalho MPSS, Magalhães-Gama F, Loiola BP, Neves JCF, Araújo ND, Silva FS, **Catão CLS**, Alves EB, Pimentel JPD, Barbosa MNS, Fraiji NA, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Costa AG, Malheiro A. Systemic immunological profile of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia: performance of cell populations and soluble mediators as serum biomarkers. *Front Oncol.* 2023 Dec 1;13:1290505. doi: 10.3389/fonc.2023.1290505. PMID: 38107068; PMCID: PMC10722195.



OPEN ACCESS


EDITED BY

Juan Manuel Mejia-Arangure,
Universidad Nacional Autónoma de
México, México

REVIEWED BY

Elisa Dorantes,
Federico Gómez Children's Hospital,
México
Dalia Ramírez-Ramírez,
Biomedical Research Center of East
(CIBIOR), México
JC Balandrán,
Albert Einstein College of Medicine,
United States

*CORRESPONDENCE

Allyson Guimarães Costa
 allyson.gui.costa@gmail.com

†These authors have contributed equally to
this work

†These authors share senior authorship

RECEIVED 07 September 2023

ACCEPTED 08 November 2023

PUBLISHED 01 December 2023

Systemic immunological profile of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia: performance of cell populations and soluble mediators as serum biomarkers

Maria Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho^{1,2†},
Fábio Magalhães-Gama^{1,3†}, Bruna Pires Loiola¹,
Juliana Costa Ferreira Neves⁴, Nilberto Dias Araújo^{1,2,5},
Flavio Souza Silva^{1,5}, Claudio Lucas Santos Catão^{1,2},
Eliana Brasil Alves^{1,6}, João Paulo Diniz Pimentel¹,
Maria Nazaré Saunier Barbosa¹, Nelson Abraham Fraiji^{1,2},
Andréa Teixeira-Carvalho^{2,3†}, Olindo Assis Martins-Filho^{2,3†},
Allyson Guimarães Costa^{1,2,4,5,7*†} and Adriana Malheiro^{1,2,5†}

3. Santos FA, **Catão CLS**, Martins JP, Pessoa UHS, Sousa IV, Melo JS, Souza GL, Araújo ND, Magalhães-Gama F, Abraham CMM, Mourão EMV, Peruhype-Magalhães V, Coelho-Dos-Reis JGA, Teixeira-Carvalho A, Vallinoto ACR, Pontes GS, Araújo MSS, Martins-Filho OA, Costa AG. Performance of immunological assays for universal and differential diagnosis of HTLV-1/2 infection in candidates for blood donations from the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2024 Jul 5;19(7):e0298710. doi: 10.1371/journal.pone.0298710. PMID: 38968331; PMCID: PMC11226060.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Performance of immunological assays for universal and differential diagnosis of HTLV-1/2 infection in candidates for blood donations from the Brazilian Amazon

Felipe Araujo Santos^{1,2,3}, Cláudio Lucas Santos Catão^{1,2}, Júlia Pereira Martins^{4,5}, Uzamôr Henrique Soares Pessoa², Isabelle Vasconcelos Sousa^{2,6}, Jean Silva Melo^{3,7}, Gláucia Lima Souza^{1,2}, Nilberto Dias Araújo^{1,2,3}, Fábio Magalhães-Gama^{2,4,5}, Cláudia Maria de Moura Abraham², Emmily Myrella Vasconcelos Mourão⁷, Vanessa Peruhype-Magalhães⁵, Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis^{5,8}, Andréa Teixeira-Carvalho^{4,5}, Antonio Carlos Rosário Vallinoto^{9,10}, Gemilson Soares Pontes^{1,3,7}, Márcio Sobreira Silva Araújo^{4,5}, Olindo Assis Martins-Filho^{1,4,5}, Allyson Guimarães Costa^{1,2,3,6*}



OPEN ACCESS

Citation: Santos FA, Catão CLS, Martins JP, Pessoa UHS, Sousa IV, Melo JS, et al. (2024) Performance of immunological assays for universal and differential diagnosis of HTLV-1/2 infection in candidates for blood donations from the Brazilian Amazon. *PLoS ONE* 19(7): e0298710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298710>

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil, 2 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil, 3 Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, UFAM, Manaus, Brazil, 4 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou—Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brazil, 5 Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou—FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, Brazil, 6 Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil, 7 Laboratório de Virologia, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Manaus, Brazil, 8 Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, 9 Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes infecciosos e Parasitários, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil, 10 Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

* allyson.gui.costa@gmail.com