

Freqüência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas

The frequency of aberrant immunophenotypes in acute leukemias

Mariana Emerenciano¹, Yomaira Bossa¹, Crisiane W Zanrosso¹, Dora Maria Alencar², Mércia Mendes Campos¹, Jane Dobbin³, Kadma Carriço³,
Maria S Pombo de Oliveira¹

Resumo

As leucemias agudas (LA) são doenças heterogêneas, com características clínicas, morfológicas, imunológicas e moleculares distintas. Por meio destas particularidades, as leucemias são classificadas em seus diversos subtipos biológicos. Neste estudo, nós analisamos a freqüência de fenótipos aberrantes (FA) em pacientes com leucemias, provenientes de diferentes regiões do Brasil, com o objetivo de avaliar estes FAs nos estudos futuros sobre doença residual mínima. Análises por citometria de fluxo multiparamétrica permitem o conhecimento da diferenciação hematopoética normal, bem como o perfil da diferenciação nas leucemias. O painel original com anticorpos monoclonais (AcMo) consistiu de marcadores distribuídos em associações ou testes com simples marcações. Entre os casos leucêmicos analisados neste estudo, 8,33% correspondem a amostras cujos blastos expressam FA. A leucemia linfoblástica aguda (LLA) foi responsável por 46,67% dos casos com anomalia de fenótipo, enquanto a leucemia mielóide aguda (LMA) atendeu por 53,33% dos casos com FA. Entre os casos de LLA, o fenótipo mais freqüente foi CD10+/CD13+. Em relação a LMA, a expressão do CD7 foi predominante, principalmente entre os subtipos M0, M1 e M2, seguida do CD56+ e do CD19+. As análises nos indicaram pequenas diferenças nas freqüências de FAs nos diferentes estados brasileiros. No entanto, estas diferenças devem ser valorizadas na aplicação de painel de AcMo, nas pesquisas de doença residual mínima em nossa população.

Palavras-chave: Leucemia aguda; Imunofenotipagem; Doença residual mínima.

¹ - Divisão de Medicina Experimental - INCA, Rio de Janeiro.

² - Sociedade de Oncologia da Bahia e Hospital São Rafael, Salvador, Bahia.

³ - Serviço de Hematologia do Hospital do Câncer I - INCA, Rio de Janeiro.

Endereço para correspondência: M.S.P.O. - Instituto Nacional de Câncer - Coordenadoria de Pesquisa - Divisão de Medicina Experimental - Rua André Cavalcanti, 37- Centro. CEP: 20231-050. Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Abstract

Acute leukemias (AL) are biologically diverse diseases in terms of their cellular phenotypes and molecular features. According to these characteristics, AL may be classified into distinct subtypes that may help to uncover the etiopathological mechanisms involved. In this study, we determined the frequency of aberrant immunophenotypes among patients with AL who came from different Brazilian regions. We attempt than to provide new data about the subject and to consider about the possible interferences of the aberrant phenotypes on the disease outcome. Multi-parameter flow cytometric analyses allowed us to acquire antigens observed during normal hematopoiesis, which reflect the AL in their malignant form. The original panel with monoclonal antibodies (MoAb) included markers in dual color associations or simple forms. Among patient's samples with AL, 8.33% were due to blasts with aberrant antigen expression. According to this study, 46.67% of acute lymphoblastic leukemia (ALL) cases and 53.33% of acute myeloid leukemia (AML) cases have aberrant expression of a single antigen associated with another cell lineage, mostly CD13 in ALL (CD10+) and CD7 in AML (Mo-M2). In conclusion, the aberrant immunophenotypes frequencies determined among the AL cases did not present significant differences between the different Brazilian states. However, prospective studies are required to understand whether these markers modify the disease outcome in our patients and their value in the detection of minimal residual disease.

Key words: Acute leukemia; Immunophenotyping; Minimal residual disease.

INTRODUÇÃO

A leucemia aguda (LA) é uma doença bastante heterogênea de progresso rápido que afeta a maior parte das células hematopoéticas ainda não diferenciadas. Para o entendimento deste vasto grupo de entidades patológicas, são necessárias diferentes abordagens analíticas e associações de diversas modalidades de estudos. Os blastos leucêmicos na leucemia mielóide aguda (LMA) e na leucemia linfoblástica (LLA) expressam antígenos de diferenciação mielóide ou linfóide, respectivamente, com um padrão bem definido, e com critérios já bem estabelecidos¹.

A definição de fenótipos aberrantes está freqüentemente associada às leucemias identificadas com, i) co-expressão de marcadores que raramente ou nunca são encontrados simultaneamente na diferenciação hematopoética normal, ii) com a superexpressão de um marcador específico de linhagem celular, ou iii) com a ausência de um marcador, que configura assincronia maturativa da célula²⁻⁷.

Estudos imunológicos e moleculares mostram que muitas LAs podem apresentar características de mais de uma linhagem celular. Estas observações permitiram que fossem então descritas duas categorias de LA que demonstram 'infidelidade de linhagem', são elas: LLA com antígenos associados à linhagem mielóide (LLA My+) e LMA com antígenos associados à linhagem linfóide (LMA Ly+)⁸. O critério recomendado para a classificação destes subgrupos leucêmicos sugere

parâmetros que possibilitam a detecção da expressão antigênica ambígua (tabela 1). No entanto, é importante que se faça uma distinção entre leucemia bifenotípica aguda e os casos de LLA e LMA com expressão aberrante de marcadores de outras linhagens, devido às diferenças de condutas terapêuticas. Assim, é recomendável que ao estudar os casos com marcadores aberrantes, seja incluído o sistema de pontuação sugerido pelo grupo EGIL e a utilização de múltiplos AcMo com análise multiparamétrica através de citometria de fluxo (tabela 2).

Os mecanismos pelos quais ocorre a expressão de FA no desenvolvimento das LAs ainda permanecem obscuros, no entanto, já é possível estabelecer associações entre estas expressões incomuns e outras características biológicas da doença, como as associações com translocações cromossômicas e fatores prognósticos. Além disso, os imunofenótipos aberrantes são sabidamente instrumentos de grande importância na detecção de doença residual mínima (DRM).

Em muitos casos, existe associação entre FA e genes anômalos. Esta correlação pode ser exemplificada pela LLA pró-B, com gene AF4/MLL, que tipicamente apresenta os marcadores celulares CD19+, CD34+, TdT+, CD10- freqüentemente associados a CD15+ e/ou CD13, além de NG2¹. Nos casos de LLA com o gene TEL/AML1, o fenótipo apresentado é exclusivo para precursores de célula B, com o fenótipo CD19+, CD34+, TdT+ e CD10+. Estes casos como demonstrado por diferentes estudos, freqüentemente são positivos para os marcadores mielóides CD33 e/ou

CD13 (9-11). Os objetivos deste trabalho foram detectar os FAs, descrever suas freqüências em LAs, e correlacionar os resultados obtidos com dados demográficos e subtipos celulares.

Tabela 1 - Diferentes aspectos Imunofenotípicos das leucemias agudas com aberrações de fenótipo

LLA (M+) Células precursoras B ^a	LMA L+ ^a
<p>Células leucêmicas são:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. CD79a⁺ ou clg γ ⁺ ou CD19⁺ e CD22⁺ 2. CD3⁻ 3. MPO⁻ 4. CD13, CD15, CD33, CD65 ou CD 14+ 	<p>Células leucêmicas são:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. MPO⁺ ou no mínimo 2 outros marcadores como CD117+, CD33+ ou CD13+ 2. CD3⁻ 3. CD79a- 4. CD2, CD5, CD7, CD19, CD22 ou CD56+
LLA (M+) Linhagem T ^a	Leucemias com linhagens mistas ou Bifenotípicas ^b
<p>Células leucêmicas são:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. CD7⁺ e CD3⁺ (membrana/citoplasma) 2. CD79a⁻ 3. MPO⁻ <p>e expressam CD13, CD15, CD33, CD65 ou CD14</p>	<p>Células leucêmicas co-expressam:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. MPO e CD79a ou clg γ ou 2. MPO e CD3 ou 3. cCD3 e clg γ

a Todos os critérios devem estar em acordo.

b Quando os marcadores incidem na mesma célula blástica, trata-se de BAL, se em "pool" de células separadas, trata-se de leucemia bilineal ou mista. Modificado de Campana e cols., 2000.

Tabela 2 - Sistema de pontuação para a definição das leucemias bifenotípicas agudas

Pontos	Linhagem B	Linhagem T	Linhagem mielóide
2	CD79a cit IgM cit CD22	CD3 (c/m) anti-TCR α/β anti-TCR γ/δ	anti-MPO (anti-lisozima)
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CDw65
0,5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64 CD117

Fonte: EGIL, 1995.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS. Foram incluídas nesta análise, amostras de pacientes portadores de LA, procedentes de diversos estados brasileiros, sem restrição de idade, raça ou sexo e isentos de tratamento quimioterápico prévio. Amostras de medula óssea (MO) e/ou sangue

periférico (SP) de pacientes foram encaminhadas após exames clínicos, para fins diagnósticos no período de 2000-2003. As análises morfológicas iniciais foram realizadas pela coloração convencional por May-Grünwald-Giemsa (MGG) complementada pela técnica citoquímica (Negro de Sudan e PAS). Esta análise preliminar permitiu a distinção entre LLA e LMA.

SEPARAÇÃO CELULAR E IMUNOFENOTIPAGEM.

A etapa inicial consistia na separação celular para obtenção das células mononucleares, baseada em gradiente de centrifugação através de Ficoll-Hypaque-Hystopaque® (densidade 1077). Depois da retirada das células no anel de interfase do tubo contendo as células mononucleares, avaliava-se a viabilidade celular para então proceder a imunofenotipagem. As células mononucleares foram colocadas em tubos apropriados, para leitura no citômetro de fluxo, em concentração de 10⁶ células e incubadas durante 30 minutos com 10 µl dos anticorpos primários conjugados. As incubações foram feitas com duplas ou triplas associações de anticorpos monoclonais (AcMo) específicos marcados com diferentes fluorocromos (fluoresceína - FITC ou ficoeritrina - PE).

A aquisição e análise dos casos foi procedida em citômetro de fluxo, seja no Epics-Coulter® ou no FacScan®, Becton Dickinson, vigentes no setor, onde foram contadas 104 células por cada tubo. Para as análises citofluorimétricas foi utilizado um painel de AcMo capazes de reconhecer as seguintes moléculas de superfície: anti- CD45, CD14, CD15, CD34, CD117, CD19, CD10, CD20, CD7, CD3, CD2, CD4, CD5, CD8, CD1a, CD13, CD33, CD11b, TdT, aMPO, CD79a, CD61, CD42, CD38, HLA-DR, CD56, CD7.1, glicoforina-a, cIg e smIg. Os AcMo utilizados foram adquiridos por diversos fabricantes como Coulter, Immunotech, Becton-Dickson, Pharmigen e Dako. As marcações imunofenotípicas ao longo dos anos foram realizadas com os mesmos clones dos AcMo apesar de diferentes lotes de fabricação. No entanto, na mudança de lote eram realizados testes para avaliar a melhor concentração de uso para cada AcMo de forma a manter o mesmo nível da reação antígeno-anticorpo.

No estabelecimento dos critérios de positividade para cada AcMo, adotamos o valor mínimo de 20% das células analisadas. Os marcadores de células precursoras como aMPO, CD34 e TdT, por serem muito específicos

e sensíveis, foram considerados positivos quando os valores excederam em 10% das células analisadas. Nos casos em que havia baixa leucometria ou pouco material para estudo, a tipagem era feita por lise de hemáceas.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS. As análises estatísticas para avaliação de frequências e correlações foram realizadas utilizando o programa SPSS (Versão 11.0 para Windows). Foram considerados como significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

No período de estudo, foram encaminhadas 720 amostras de MO e/ou SP para estudos imunofenotípicos que obtiveram diagnóstico de LA. Passaram pelo critério de elegibilidade os casos de LLA de células precursoras B ou T, ou LMA. A tabela 3 representa uma avaliação global dos 720 casos entre os quais foram encontradas as 60 amostras com FA, ou seja, 8,3% dos casos de LAs entre janeiro de 2000 a novembro de 2003. As LMAs foram responsáveis pela maioria dos casos com aberrações entre os anos de 2000-2002, enquanto em 2003, as aberrações imunofenotípicas foram mais encontradas em LLA. Analisando os subtipos separadamente, não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos de LLA e LMA ($p=0,45$) nos 28 casos de LLA e 32 de LMA com expressões aberrantes, o que em termos percentuais significa 46,67% e 53,33%, respectivamente. A distribuição dos pacientes com FA, por idade, sexo e procedência é mostrada na tabela 4. A faixa etária é significativamente associada ($p=0,001$) aos casos entre 2-16 anos de idade, onde se concentraram 85,71% dos FAs. A diferença entre os sexos foi uma variável expressiva apenas nos casos com LMA, em que os indivíduos do sexo masculino somaram quase o dobro dos casos dos do sexo feminino ($p=0,00$). Análises com correlações regionais interestaduais, demonstraram uma tendência de aumento de expressão de CD56 em LMAs ($p=0,02$). Analisando a frequência de todos estes subtipos

Tabela 3 - Sumário da distribuição da amostragem total

ANO	LLA				LMA			
	Total		Aberrantes		Total		Aberrantes	
	n	%	n	%	n	%	n	%
2000	88	69,84	6	42,86	38	30,16	8	57,14
2001	175	66,54	7	38,89	88	33,46	11	61,11
2002	128	69,19	5	35,71	57	30,81	9	64,29
2003	104	71,23	10	71,43	42	28,77	4	28,57
Sub-Totais	495	68,75	28	46,67	225	31,25	32	53,33

Tabela 4 - Características de idade, sexo e procedência dos pacientes com aberração fenotípica

		LLA		LMA		TOTAL		
		n	%	n	%	n	%	
Faixa de idade	Lactentes (<2 a)	1	3,57%	3	9,37%	4	6,67%	p=0,001
	Crianças (2-16a)	24	85,71%	15	46,88%	39	65%	
	Adultos	3	10,71%	14	43,75%	17	28,33%	
	Média	8,36		26,35		17,35		
Sexo	Feminino	12	42,86%	11	34,38%	23	38,33%	p=0,001
	Masculino	16	57,14%	21	65,62%	37	61,67%	
Procedência	Nordeste*	16	57,14%	19	59,37%	35	58,63%	
	Sudeste**	12	10,71%	13	40,63%	25	41,67%	

*Bahia, Paraíba e Pernambuco; **Minas Gerais e Rio de Janeiro

de LLA e LMA, ficou constatado que a LLA (CD10+), contribuiu com o maior número (31,67%) de amostras com imunofenótipos aberrantes. A tabela 5 explicita os resultados numéricos referentes aos subtipos das leucemias com FA. As aberrações de fenótipo encontradas foram devidas a expressão dos antígenos CD13, CD15 e CD33 nos casos de LLA, e a expressão dos antígenos CD7, CD19 e CD56 nos casos de LMA. A expressão do marcador linfóide CD7 em LMA foi a mais frequentemente encontrada (25%), seguida da expressão do CD13 (31,67%) em LLA do tipo comum e (13,33%) em LLA-T. A figura 1 exemplifica dois casos de FA, de acordo com os histogramas pela citometria de fluxo.

Tabela 5 - Distribuição dos casos quanto à aberração imunofenotípica em LLA e LMA

Diagnóstico	Marcador aberrante	n	%
LLA	CD13	14	23,33
LLA	CD15	3	5
LLA	CD33	11	18,33
LMA	CD7	20	33,34
LMA	CD19	5	8,33
LMA	CD56	7	11,67
TOTAL LMA		60	100

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a ocorrência de fenótipos aberrantes em LA é um fenômeno freqüente,

observado em 8,33% dos casos. Esta freqüência se assemelha aos resultados encontrados por Saxena e cols. 1998¹² que relataram a freqüência de 10% de marcadores aberrantes em estudo realizado com 60 casos e Bradstock e cols. que mostraram que, entre 568 casos de leucemias agudas, 9,6% expressavam FA e entre as LMAs 56% apresentavam marcadores linfóides². Não existe predomínio de freqüências entre LLA ou LMA na nossa série de casos analisados consecutivamente e com o mesmo protocolo de testes, nos levando a acreditar que nosso resultado é bem representativo quanto ao perfil das LAs na nossa população. Khalidi e cols. encontraram em 48,1% de FA nos casos de LMA-Ly+ e 45,6% de LLA-My+^{13,14}.

O fator idade parece influenciar as proporções de FA, ou seja, na faixa etária em que a LLA é mais comum, são também mais comuns os casos aberrantes e vice-versa. LLA de células precursoras B em casos pediátricos obteve uma freqüência maior de expressão de antígenos mielóides do que os casos de adultos¹⁴. Este perfil se traduz em maior aplicabilidade de testes para doença residual mínima nas crianças. Em relação a gêneros, a leucemia é uma doença que, de fato, acomete o sexo masculino com maior freqüência do que o sexo feminino, portanto era esperado na nossa série de casos, que maior freqüência de FA fosse encontrada entre os homens^{12,15}. Colocando em foco as aberrações imunofenotípicas propriamente ditas, com 33,34% dos casos, a LMA/CD7+ ocupou o primeiro lugar, seguida de 23,33% dos casos de LLA/CD13+. Nosso dado é semelhante aos de Bradstock e cols. (2), que relatam a expressão do CD7 em 28,4% de seus casos de LA, porém, difere expressivamente do estudo de Khalid e cols.¹³, que encontraram como marcador aberrante mais freqüente

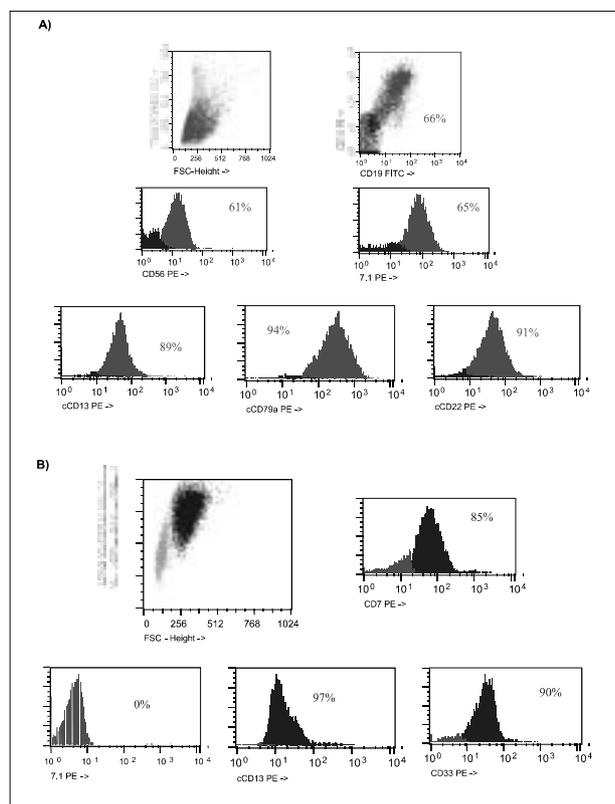


Figura 1 - Histogramas representativos da análise pela citometria de fluxo. A) Amostra de MO de LLA/CD13+. B) Amostra de MO de LMA/CD7+.

o CD20, deixando o CD7 com a segunda posição. A expressão do CD7 em LMA está associada à presença de antígenos imaturos (CD34, HLA-DR, TdT) e, aos rearranjos do gene receptor do antígeno de diferenciação de linhagens T e B (TCR e IgH). É possível que isto explique sua origem em estágios bastante indiferenciados no desenvolvimento da célula mieloblástica¹². Esta explicação é também plausível de acordo com nossos resultados, pois os casos LMA/CD7+ se concentraram em sua maioria entre os subtipos M0 e M2.

Os valores prognósticos dos FAs são parcialmente conhecidos e muitas vezes discordantes na literatura. Enquanto um estudo pediátrico de LLA My+ sugere que este imunofenótipo não tem significância prognóstica independente¹⁶, a expressão de CD15 é característica de LLA-B com a translocação t(4;11), sabidamente um grupo relacionado a um prognóstico ruim¹⁷. Para isto, estudos prospectivos usando protocolos de tratamento seriam necessários para estabelecer se os pacientes com FA teriam o curso da doença diferenciado. No entanto, como em vários subtipos das LAs existe forte correlação com o genótipo, esta grande diversidade de marcadores relatados no presente estudo, poderá ser consequência da já referida heterogeneidade biológica

da origem celular e das alterações moleculares associadas encontradas nas LAs.

Embora seja óbvio que o genótipo esteja refletido no imunofenótipo das leucemias, ainda não é absoluta a concordância na grande maioria dos casos¹. Algumas hipóteses já foram elaboradas para esclarecer a etiopatogênese das leucemias, entre elas, as que se referem as translocações do gene MLL. Em LLA, o gene AF4 no cromossomo 4q21 é o gene que mais frequentemente funde-se com o gene MLL. O gene MLL/AF4 aparece em aproximadamente 50% dos casos de LLA em crianças com até seis meses de idade¹⁹. Por outro lado, MLL/AF9 é mais freqüente em leucemia mielóide aguda (LMA); e MLL/ENL pode ser encontrado em LLA e LMA nas mesmas proporções¹. As LLA de células precursoras B com BCR/ABL, são tipicamente CD19, CD22, TdT, CD13 e/ou CD33 positivos¹.

Pouco se sabe sobre a relação destas características imunofenotípicas anômalas e seus genótipos correspondentes em LAs. Em outras circunstâncias, a anormalidade dos fenótipos patológicos reflete assincronismos maturativos; um exemplo claro disso é uma célula B CD19+ que ainda expressa o CD10, característico de imaturidade, porém já apresentando CD20 intensamente, como uma célula madura. Portanto, estas expressões aberrantes abordadas neste estudo, podem ser utilizadas na detecção de DRM e na avaliação prognóstica associada a outros marcadores biológicos¹⁹.

REFERÊNCIAS

1. Hrusak O, MacDonald AP. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*. 2002;16:1233-58.
2. Bradstock KF, Kirk J, Grimsley PG, Kabral A, Hughes WG. Unusual immunophenotypes in acute leukaemias: incidence and clinical correlations. *Br J Haematol*. 1989;72:512-8.
3. Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 1990;76:163-71.
4. Drexler HG, Thiel E, Ludwig WD. Acute myeloid leukemias expressing lymphoid-associated antigens: diagnostic incidence and prognostic significance. *Leukemia*. 1993;7:489-98.
5. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, Lopez-Berges MC, Valverde B, Gonzalez M, et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol*. 1995;70:189-94.
6. Reading CL, Estey EH, Huh YO, Claxton DF, Sanchez G, Tertappen LW, et al. Expression of unusual immunophenotype combinations in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1993;81:3083-90.

7. Terstappen LW, Konemann S, Safford M, Loken MR, Zurlutter K, Buchner T, et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part 1. Significance of light scattering properties. *Leukemia*. 1991;5:315-21.
8. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Methods*. 2000;243:59-75.
9. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Associazione Italiana Ematologica Oncologia Pediatrica and the Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. Blood*. 1997;90:571-7.
10. Baruchel A, Cayuela JM, Ballerini P, Landman-Parker J, Cezard V, Firat H, et al. The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias express TEL-AML1 fusion transcripts. *Br J Haematol*. 1997;99:101-6.
11. Borowitz MJ, Rubnitz J, Nash M, Pullen DJ, Camitta B. Surface antigen phenotype can predict TEL-AML1 rearrangement in childhood B-precursor ALL: a Pediatric Oncology Group Study. *Leukemia*. 1998;12:1764-70.
12. Saxena A, Sheridan DP, Card RT, McPeck AM, Mewdell CC, Skinnider LF. Biologic and clinical significance of CD7 expression in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 1998;58:278-84.
13. Khalidi HS, Medeiros LJ, Chang KL, Brynes RK, Slovak ML, Alber DA. The immunophenotype of adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, FAB classification, and karyotypic abnormalities. *Am J Clin Pathol*. 1998;109:211-20.
14. Khalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, Brynes RK, Slovak ML, Murata-Collins JL, et al. Acute lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, FAB classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. *Am J Clin Pathol*. 1999;111:467-76.
15. Sandler DP, Ross JÁ. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol*. 1997;24(1):3-16.
16. Pui CH, Behm FG, Singh B, Rivera GK, Schell MJ, Roberts WM, et al. Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. *Blood*. 1990;75:198-202.
17. Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, Liu Q, Crist WM, Downing JR, et al. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood*. 1996;87:2870-7.
18. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, et al. Fusion of the TEL gene on 12p 13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4917-21.
19. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96(8):2691-6.