

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Victória Caroline Hess

**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO RT-PCR EM TEMPO REAL PARA
INVESTIGAÇÃO DA FUSÃO PML-RARA DA T(15;17) EM PACIENTES COM
LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA EM TRATAMENTO.**

Florianópolis

2020

Victória Caroline Hess

**PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO RT-PCR EM TEMPO REAL PARA
INVESTIGAÇÃO DA FUSÃO PML-RARA DA T(15;17) EM PACIENTES COM
LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA EM TRATAMENTO.**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Farmacêutica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Santos da Silva

Coorientadora: Dr^a. Camila Matiollo

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hess, Victória Caroline

Padronização do método RT-PCR em tempo real para investigação da fusão PML-RAR? da t(15;17) em pacientes com leucemia promielocítica aguda em tratamento. / Victória Caroline Hess ; orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva, coorientadora, Camila Matiollo, 2020.

76 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. DRM. 3. Leucemia promielocítica aguda. 4. RT-PCR. I. Silva, Maria Cláudia Santos da . II. Matiollo, Camila. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Victória Caroline Hess

Padronização do método RT-PCR em tempo real para investigação da fusão PML-RAR α da t(15;17) em pacientes com leucemia promielocítica aguda em tratamento.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “farmacêutico” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 03 de agosto de 2020.

Prof.^a Dra. Mareni Rocha Farias
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Maria Cláudia Santos da Silva
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Camila Matiollo
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra Ana Carolina Rabello de Moraes
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra Flávia Martinello
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser, todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.”

(Paulo Beleki)

AGRADECIMENTOS

Existe uma frase de Madre Teresa de Calcutá, que diz: “Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. Isso me fez refletir sobre o quão valioso são as oportunidades que a vida nos dá e como devemos abraçá-las. Se hoje entrego meu trabalho e acrescento uma pequena gota a esse mar que é a ciência, foi graças a tantos outros que não mediram esforços para desbravá-lo.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela minha vida, por me permitir ter saúde, determinação e força para ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da minha jornada.

Agradeço a minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Maria Cláudia, por ter me aberto tantas portas e me dado a oportunidade de participar do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), pelo apoio, pela confiança, pela atenção, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade, pelas conversas e pelo amor que ela dedica ao seu trabalho.

Agradeço a minha coorientadora, Dr^ª Camila Matiollo, por me acolher no Laboratório de Biologia Molecular, por todos os ensinamentos ao longo desses anos, pela paciência, pela confiança, pela prestatividade, pelo apoio e por toda ajuda que me deu durante a realização desse trabalho. Obrigada por sempre me ouvir e por todo auxílio que tu me deste, não somente profissionalmente, mas também na vida pessoal, sempre me apoiando e aconselhando. Tudo o que aprendi me fizeram uma pessoa e profissional melhor. Sei que ganhei uma grande amiga.

Agradeço a minha banca, Dr^ª Ana Carolina Rabello de Moraes e Dr^ª Flávia Martinello, por aceitarem o convite, pela disponibilidade em avaliar o meu trabalho e pelas sugestões dadas no projeto de TCC.

Agradeço as minhas amigas e futuras colegas de profissão, Mariah, Paula, Amanda, Jéssica, Bruna e Regiane, que tornaram a minha caminhada mais leve e deram cor aos meus dias. Sem vocês esse percurso não seria tão fácil e bonito. Sou grata por tantos momentos bons ao lado de vocês.

Agradeço as minhas amigas de longa data, à Maria Eugênia que está ao meu lado há 22 anos, que sempre foi minha melhor amiga e que divide a vida comigo. Sem teu apoio essa jornada não seria nada fácil. Obrigada por sempre se fazer presente, não importando o lado do hemisfério que cada uma está. À Sara, que entrou na minha vida há pouco mais de 8 anos e que se tornou meu porto seguro. Por mais compromissada e corrida que a vida seja, sempre tira um tempo para uma conversa no final do dia. Obrigada por me fazer tão bem e ter me dado uma segunda família. À Ana Clara, que se tornou minha irmã desde o primeiro momento em que

nos encontramos, que sempre me mostrou o quanto a vida é engraçada e divertida. Tenho o prazer em dizer que a nossa amizade será sempre a mesma.

Agradeço aos amigos que o LOEH me deu, em especial à Lisandra, Laura, Mariana, Natália, Íris, Chandra, Carolina, Heloísa, Ketlyn e Christiane pelas experiências trocadas, por toda ajuda que me deram, pelas conversas e por tornar o ambiente mais leve e agradável. Vocês fizeram toda a diferença nessa jornada.

Agradeço à minha “irmã mais velha”, Alexsandra, que foi um grande presente na minha vida. Você foi fundamental nesse percurso. Acreditou em mim quando nem eu acreditava, sempre me encorajou a seguir meus sonhos e me deu força nos momentos mais difíceis. Queria que você soubesse o quanto faz a diferença na vida das pessoas e como teu futuro será brilhante. Nunca desista do que você sabe que nasceu para ser. De coração, eu serei eternamente grata por tudo.

Agradeço aos meus familiares que sempre estiveram por perto e se fizeram presente em tantos momentos bons, em especial, às minhas tias Maristela, Silvane, Salete e Enir, que me proporcionaram uma infância maravilhosa e cheia de amor. Às minhas avós Neli e Guida, por toda dedicação, amor e carinho que recebi, e por criarem duas pessoas sensacionais e tão humanas, que tenho orgulho em chamar de pais.

Agradeço finalmente as duas pessoas que mais merecem, meu pai Valentim, por ser sempre meu espelho de homem forte, batalhador e companheiro, por ser uma pessoa tão boa, que não mede esforços para ajudar o próximo, por ser tão simples e feliz com as pequenas conquistas. A cara de bravo pode até tentar enganar, mas o coração não engana. Tenho orgulho em poder te chamar de pai. À minha mãe Telma, que é o ser humano mais doce e amável que eu conheço, por ser meu conforto nas horas ruins, por ter o melhor abraço do mundo, por ter as melhores conversas e os melhores conselhos, por abdicar das coisas para sempre me dar o melhor. És uma mulher incrível, guerreira, amorosa e respeitosa, que sempre está disposta a ajudar. Obrigada por abraçar os meus sonhos, por viver eles comigo, por se orgulhar das minhas conquistas e por sempre ter uma palavra de conforto. O amor que sinto por ti é imensurável e tenho muito orgulho da pessoa que você é. Serei eternamente grata por tudo, eu amo vocês.

“Those who fall in love with practice without science are like a sailor who enters a ship without a helm or a compass, and who never can be certain whither he is going.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo de leucemia mieloide aguda (LMA) caracterizada pela presença da translocação entre os cromossomos 15 e 17, o que resulta na proteína de fusão PML-RAR α . O monitoramento dos transcritos PML-RAR α tornou-se um marcador de diagnóstico fundamental e requer métodos cada vez mais sensíveis para o acompanhamento da resposta terapêutica e a detecção precoce de eventuais recidivas nos pacientes em tratamento. Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica de RT-PCR em tempo real para a avaliação da fusão PML-RAR α da t(15;17) e comparar com os resultados obtidos na RT-PCR convencional. Durante a fase de padronização, foi observado que a RT-PCR em tempo real apresentou uma sensibilidade maior em relação a convencional para detecção de concentrações de transcritos igual a 10¹ cópias de PML-RAR α bcr1. Quinze amostras de pacientes foram usadas neste estudo, oito de pacientes PML-RAR α bcr1 e sete de PML-RAR α bcr3. Comparando-se os dois métodos com as amostras de pacientes, a RT-PCR em tempo real detectou o transcrito PML-RAR α bcr1 em quatro amostras, enquanto a RT-PCR convencional detectou o transcrito em apenas duas. Dessa forma, a concordância entre os testes foi moderada de acordo com o teste *kappa*. Também foi analisada a eficiência de duas transcriptases reversas, aquela que já vinha sendo utilizada na rotina da marca Promega e a da Qiagen (teste), e, foi observado que a transcriptase reversa utilizada como teste, apresentou maior eficiência do que aquela usada na rotina para a amplificação dos transcritos. Assim, foi observado que a qualidade da transcrição reversa é importante para a detecção de fusão PML-RAR α . Também foi observado que a RT-PCR em tempo real pode ser realizada em amostras extraídas pelo kit de extração de RNA atualmente usado na rotina (Promega) e a transcrição reversa pelo kit teste (Qiagen). Na avaliação dos custos, a RT-PCR convencional apresentou um custo significativamente menor do que a RT-PCR em tempo real. No entanto, o processamento de várias amostras simultaneamente diminuiu o custo da RT-PCR em tempo real. Nesse contexto, mesmo que o custo RT-PCR em tempo real qualitativa seja maior, esse método é mais sensível que a RT-PCR convencional e, por ser mais efetivo para a detecção precoce de recidivas na LPA, sugere-se o seu uso na rotina laboratorial.

Palavras-chave: LPA; DRM; Monitoramento terapêutico; RT-PCR; PML-RAR α .

ABSTRACT

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a subtype of acute myeloid leukemia (AML) characterized by the presence of translocation between chromosomes 15 and 17, which results in the PML-RAR α fusion protein. The monitoring of PML-RAR α transcripts has become a fundamental diagnostic marker and requires increasingly sensitive methods for monitoring therapeutic response and the early detection of possible relapses in patients during the treatment. Therefore, the objective of this work was to standardize the real-time RT-PCR technique for the evaluation of the PML-RAR α fusion of t(15;17) and compare it with the results obtained in conventional RT-PCR. During the standardization phase, it was observed that real-time RT-PCR showed a higher sensitivity compared to the conventional one for detecting concentrations of transcripts equal to 10¹ copies of PML-RAR α bcr1. Fifteen patient samples were used in this study, eight from PML-RAR α bcr1 patients and seven from PML-RAR α bcr3. Comparing the two methods with the patient samples, real-time RT-PCR detected the transcript PML-RAR α bcr1 in four samples, whereas conventional RT-PCR detected the transcript in only two. Thus, the agreement between tests was moderate according to the kappa test. The efficiency of two reverse transcriptases was also analyzed, the one that had already been used in the routine of the Promega brand and that of the Qiagen (test), and it was observed that the reverse transcriptase used as a test showed greater efficiency than that used in the routine in the amplification of transcripts. Thereby, it was observed that the quality of reverse transcription is important for the detection of PML-RAR α fusion. It was also observed that real-time RT-PCR can be performed on samples extracted by the RNA extraction kit currently used in routine (Promega) and reverse transcription by the test kit (Qiagen). When evaluating costs, conventional RT-PCR had a significantly lower cost than the real-time technique. However, if multiple samples were processed simultaneously, this reduces the cost of real-time RT-PCR. In this context, even though the cost of qualitative real-time RT-PCR is higher, this method is more sensitive than conventional RT-PCR and, because it is more effective for the early detection of recurrences in APL, its use in laboratory routine is suggested.

Keywords: APL; MRD; Therapeutic monitoring; RT-PCR; PML-RAR α .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis pontos de quebra nas regiões dos genes PML e RAR α da t(15;17)(q22;q12).	23
Figura 2 - Aspirado de MO contendo promielócitos característicos da LPA hipergranular. ...	25
Figura 3 - Aspirado de MO que mostra características morfológicas de LPA microgranular ou hipogranular.....	25
Figura 4 - Figura representativa de IMF por CF de paciente com LPA.....	27
Figura 5 - Cariótipo de paciente com a presença da t(15;17).....	28
Figura 6 - Representação esquemática da visualização da t(15;17) pela técnica de FISH.....	29
Figura 7- Diferenciação de promielócitos anormais induzida pelo ATRA.	31
Figura 8 - Gel de agarose corado com brometo de etídio de uma RT-PCR para PML-RAR α bcr3.....	34
Figura 9 - Representação esquemática de um gráfico de RT-PCR em tempo real.	35
Figura 10 - Representação esquemática dos tipos de sondas fluorescentes usadas na PCR em tempo real.....	36
Figura 11- Fluxograma dos métodos comparados.....	37
Figura 12 - Casuística do estudo.....	38
Figura 13 - Programação de temperaturas da RT-PCR em tempo real para detecção da fusão PML-RAR α	41
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio da RT-PCR convencional para PML-RAR α bcr1 e bcr3	44
Figura 15- RT- PCR em tempo real de concentrações conhecidas do transcrito PML-RAR α bcr1	45
Figura 16 - RT- PCR em tempo real de concentrações conhecidas do transcrito PML-RAR α bcr3	46
Figura 17 - Curva calculada a partir das cinco concentrações padrão de transcritos.....	47
Figura 18 - Fluxograma das etapas dos experimentos, variando os métodos utilizados na rotina com os métodos do teste.....	52
Figura 19 - Custo de cada teste de acordo com o número de amostras simultâneas.	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das Leucemias mieloides agudas (LMAs) e neoplasias mieloides relacionadas – OMS 2016	21
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparação da pré-mistura para transcrição reversa.	40
Tabela 2 - Preparação da pré-mistura para PCR em tempo real do PML-RAR α bcr1 ou bcr3.	40
Tabela 3 - Preparação da pré-mistura para PCR em tempo real para ABL.....	41
Tabela 4 - Características da casuística e resultados da IMF por CF e RT-PCR.	48
Tabela 5 - Concordância entre RT-PCR-convencional e em tempo real para a detecção do PML-RAR α	49
Tabela 6 - Características da casuística e resultados da RT-PCR com a extração de RNA da marca da rotina (Promega).	53
Tabela 7 - Características da casuística e resultados da RT-PCR com a extração de RNA da marca em teste (Qiagen).	54
Tabela 8 - Custo dos reagentes/insumos para cada teste de acordo com o número de amostras simultâneas	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	<i>Abelson leukemia vírus</i>
ATO	Trióxido de arsênico
ATRA	Ácido <i>all-trans-retinoico</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEPSH	Comitê de ética de pesquisa em seres humanos
CF	Citometria de fluxo
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CRABP	Cellular retinoic acid binding protein
CT	<i>Threshold cycle</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DRM	Doença residual mensurável
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
Ebserh	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FLT3	Tirosino-quinase 3 Fms-relacionado
FRET	Transferência de energia de ressonância por fluorescência
GIMEMA	Grupo italiano <i>Malattie EMatologiche dell'Adulto</i>
GLOBOCAN	<i>Global cancer observatory</i>
HU	Hospital universitário
IMF	Imunofenotipagem
INCA	Instituto nacional do câncer
LA	Leucemia aguda
LDH	Lactato desidrogenase
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda
MO	Medula óssea
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NPM	<i>Nucleophosmin</i>
NUMA	<i>Nuclear matrix-associated</i>

OMS	Organização mundial da saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PETHEMA	Programa espanhol de tratamento de hemopatias malignas do adulto
PLZF	<i>Promyelocytic leukemia zinc finger</i>
PML	Gene da leucemia promielocítica
RAR α	Receptor alfa do ácido retinoico
RC	Remissão completa
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RPE	Tampão de lavagem
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RW1	Tampão de lavagem
SAR	Síndrome do ácido retinoico
SP	Sangue periférico
STAT5b	<i>Signal transducer and activator of transcription 5b</i>
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TP	Tempo de protrombina
TT	Tempo de trombina
TTPA	Tempo parcial de tromboplastina
UFSC	Universidade federal de Santa Catarina
ULAC	Unidade de laboratórios de análises clínicas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivos Gerais	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	Leucemia Mieloide Aguda (LMA).....	20
3.2	Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)	22
3.2.1	Diagnóstico	24
3.2.1.1	<i>Apresentação Clínica</i>	24
3.2.1.2	<i>Diagnóstico laboratorial</i>	24
3.2.1.2.1	Morfologia Celular	24
3.2.1.2.2	Alterações em parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	25
3.2.1.2.3	Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	26
3.2.1.2.4	Alterações Genéticas	27
3.2.2	Prognóstico	30
3.2.3	Tratamento	30
3.2.4	Doença residual mensurável (DRM)	33
3.2.4.1	<i>Monitoramento molecular da DRM por RT-PCR</i>	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	População de estudo	37
4.2	RT-PCR em tempo real para a investigação da fusão PML-RAR α	39
4.2.1	Hemólise e Extração de RNAm	39
4.2.2	Transcrição reversa (RT)	39
4.2.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	40
4.2.4	Análise estatística	42
4.2.5	Cálculo dos custos dos testes	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Padronização da técnica de RT-PCR em tempo real para a avaliação da fusão PML-RAR α	43
5.2	Comparação entre os métodos de RT-PCR convencional, em tempo real e IMF por CF EM AMOSTRAS DE PACIENTES	48

5.3	Comparação entre os métodos de RT-PCR convencional e em tempo real variando os reagentes da extração, transcrição reversa e amplificação.....	49
5.4	Comparação dos custos dos reagentes usados na RT-PCR convencional e em tempo real	55
6	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.....	66
	APÊNDICE A – POP para a RT-PCR em tempo real conforme as normas do manual de qualidade ULAC	67

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a estimativa mundial realizada pela *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), no ano de 2018 foram identificados cerca de 437 mil novos casos de leucemias e notificadas mais de 300 mil mortes em decorrência dessa doença. Os casos aparecem em sua maioria nas populações de países asiáticos (48,7%) e acometem com maior frequência o sexo masculino (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, a leucemia é a décima neoplasia mais recorrente entre os homens e a décima segunda neoplasia mais encontrada entre as mulheres, estimando-se cerca de 10.800 novos casos a cada ano, o que resulta em 5,67 novos casos a cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

As leucemias agudas (LAs) são doenças caracterizadas pela expansão clonal de células imaturas do sistema hematopoiético, nas quais ocorre um bloqueio na diferenciação celular e a proliferação descontrolada de células progenitoras mieloides ou linfoides neoplásicas que se acumulam na medula óssea (MO), sangue periférico (SP) e/ou em outros tecidos (ARBER *et al.*, 2016; SWERDLOW *et al.*, 2017). De modo geral, essas anormalidades podem ocorrer em diferentes fases da diferenciação celular. Quando esse bloqueio é observado na diferenciação das células progenitoras do tronco mieloide, as leucemias são denominadas de leucemias mieloides, as quais podem ser definidas como agudas ou crônicas, de acordo com os progenitores mieloides afetados (HOFFBRAND *et al.*, 2013; SWERDLOW *et al.*, 2017). A proliferação anormal das células neoplásicas nas LAs perturba o processo de maturação de outras linhagens celulares normais e, por isso, esses indivíduos podem apresentar anemias, trombocitopenias e suscetibilidade a processos infecciosos (STEWART, WILD, 2014).

As leucemias mieloides agudas (LMAs) podem resultar de anormalidades genéticas. A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo de LMA caracterizado pela presença da translocação entre os cromossomos 15 e 17 a qual resulta na fusão do gene do receptor retinoico alfa (*RAR α*) com o gene da leucemia promielocítica (PML) (THOMAS, 2019). A identificação e a caracterização do gene PML-*RAR α* no início dos anos 90 teve alta relevância na prática clínica (ADAMS; NASSIRI, 2015; CICCONI; LO-COCO, 2016). A LPA, se não tratada rapidamente, é considerada uma das formas mais letais de LMA, pois apresenta grande tendência a coagulopatias, o que pode resultar em um curso fatal (THOMAS, 2019). De modo geral, o tratamento da LPA consiste em três fases: a indução de remissão, consolidação e manutenção. Conforme os protocolos terapêuticos, a investigação da doença residual

mensurável (DRM) deve ocorrer logo após a consolidação e durante a fase de manutenção (SCHUURHUIS *et al.*, 2018).

A DRM é definida como uma pequena porção de células neoplásicas, que possuem um valor prognóstico importante nas leucemias, tendo em vista que, quando atingida a remissão hematológica completa, as células leucêmicas poderão permanecer na circulação em quantidades menores que o limite de detecção por microscopia (GRANDO; WAGNER., 2008). O monitoramento seriado da DRM é importante como uma ferramenta para orientar uma intervenção precoce afim de evitar recaídas (GRIMWADE; JOVANOVIC; HILLS, 2014). Vários métodos podem ser utilizados nessa avaliação, como é o caso da imunofenotipagem por citometria de fluxo (IMF-CF) e da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). No entanto, um estudo realizado recentemente na Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) mostrou que a RT-PCR convencional *in house* apresenta baixa sensibilidade para a detecção da DRM em LPA. Isso mostra a necessidade da implementação de métodos mais sensíveis para detecção da fusão PML-RAR α , como a RT-PCR em tempo real (SILVA, 2018). Além de apresentar maior sensibilidade, há outras vantagens em utilizar o método de RT-PCR em tempo real para o monitoramento de DRM, incluindo um menor tempo entre a coleta da amostra e a liberação do resultado e um menor risco de contaminação cruzada, uma vez que não é realizada a *Nested-PCR* (GRIMWADE; JOVANOVIC; HILLS, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Padronizar a técnica RT-PCR em tempo real para a investigação da fusão PML-RAR α da t(15;17)(q22;q12) em pacientes com LPA em tratamento no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os resultados obtidos na RT-PCR em tempo real com os obtidos na RT-PCR convencional, utilizada atualmente no Setor de Biologia Molecular da ULAC do HU;
- Analisar a sensibilidade dos métodos (citometria de fluxo e de biologia molecular) na detecção de DRM em pacientes em tratamento da LPA;
- Comparar e discutir as diferenças de custos entre os métodos RT-PCR convencional e em tempo real;
- Elaborar uma Instrução de Trabalho para a RT-PCR em tempo real conforme as normas do manual de qualidade da ULAC.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

As leucemias mieloides agudas (LMAs) formam um grupo heterogêneo de doenças clonais de células do tecido hematopoiético, caracterizadas pelo bloqueio da maturação celular e proliferação atípica das células progenitoras da linhagem mieloide (SILVA *et al.*, 2006; SWERDLOW *et al.*, 2017). Além da perda de capacidade de diferenciação, essas células neoplásicas mantêm a capacidade de proliferação devido à inibição de fatores apoptóticos. Isso resulta em uma proliferação exacerbada de uma população celular leucêmica monoclonal sem capacidade de diferenciação (LEATHE *et al.* 2008; SILVA *et al.*, 2006). Essa proliferação exacerbada do clone leucêmico prejudica ou impede a produção das células hematopoiéticas normais, como os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas, o que resulta no aparecimento de sinais e sintomas como anemia, infecções recorrentes e desordens hemorrágicas, respectivamente (FERRARA, 2004; SILVA *et al.*, 2006).

As LMAs estão entre os dez tipos de neoplasia mais frequentes no mundo e no Brasil (GLOBOCAN, 2018; INCA, 2018). Elas podem acometer todas as faixas etárias, no entanto, mais de 50% dos casos são comumente identificados em adultos acima dos 60 anos com tendência a aumentar com a progressão da idade (CHAUFFAILLE; YAMAMOTO, 2016; DESCHLER; LÜBBERT, 2006; HOFFBRAND *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2006). A taxa de mortalidade desses pacientes é alta e pode estar relacionada a fatores genéticos, subtipos de LMA com prognóstico desfavorável, comorbidades, idade do paciente, entre outros fatores (DESCHLER; LÜBBERT, 2006).

A estratificação dos subtipos de LMA em grupos de risco, baseada nas alterações genéticas recorrentes, melhoram a avaliação prognóstica, o que pode contribuir com a decisão terapêutica e aumento de sobrevida desses pacientes (LIMA *et al.*, 2016). A escolha da terapêutica mais adequada tornou-se possível com o desenvolvimento de muitos fármacos alvos genéticos específicos, como o ácido *all-trans* retinoico (ATRA), que age diretamente na proteína de fusão PML-RAR α ; os inibidores de tirosina cinase (ex. mesilato de imatinibe), que atuam na proteína de fusão BCR-ABL (FUNKE *et al.*, 2008; LOPES; ABREU, 2009;); e os inibidores do gene FLT3 (TESTA; LO-COCO, 2016). Assim, métodos para detecção dessas alterações genéticas se tornaram úteis para a detecção de DRM durante a monitoração do tratamento (GRANDO, WAGNER., 2008).

Nesse contexto, a categoria LMA com anormalidades genéticas recorrentes foi incluída na classificação da Organização Mundial da Saúde para LMAs em 2002. Essa classificação foi reavaliada em 2008 e 2017, e nessa categoria o número de alterações genéticas descritas nas LMAs aumentou (JAFFE *et al.*, 2002; SWERDLOW *et al.*, 2008; SWERDLOW *et al.*, 2017). Na classificação atual, de 2016, pode-se observar 11 alterações genéticas associadas a LMA, entre elas a leucemia promielocítica aguda com a t(15;17)(q22;q12) PML-RAR α (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação das Leucemias Mieloides Agudas (LMAs) e neoplasias mieloides relacionadas – OMS 2016

<p>Leucemia mieloide aguda com anormalidades genéticas recorrentes</p> <p>LMA t(8:21) (q22;q22): RUNX1-RUNX1T1</p> <p>LMA inv(16) (p13.1q22) ou t(16;16) (p13.1;q22); CBFβ-MYH11</p> <p>LPA com t(15,17)(q22;q12); PML-RARα</p> <p>LMA com t(9:11) (p21,3;q23,3):MLLT3-KMT2A</p> <p>LMA t(6:9) (p23;q34.1); DEK-NUP214</p> <p>LMA inv(3) (q21.3q26.2) ou t (3;3) (q21.3;q26.2); GATA2,MECOM</p> <p>LMA (megacarioblástica) t(1;22) (p13.3;q13.3); RBM15-MKL1</p> <p>Entidade provisória: LMA com BCR-ABL1</p> <p>LMA com mutação NPM1</p> <p>LMA com mutação CEBPA</p> <p>Entidade provisória: LMA com mutação RUNX1</p>
<p>Leucemia mieloide aguda com alterações relacionadas a mielodisplasia</p>
<p>Neoplasias mieloides relacionadas a terapias</p>
<p>Leucemias mieloides não especificadas (LMA NOS)</p> <p>LMA com diferenciação mínima</p> <p>LMA sem maturação</p> <p>LMA com maturação</p> <p>Leucemia mielomonocítica aguda</p> <p>Leucemia monoblástica/monocítica aguda</p> <p>Leucemia eritroide pura</p> <p>Leucemia megacarioblástica aguda</p> <p>Leucemia basofílica aguda</p> <p>Panmielose aguda com mielofibrose</p>
<p>Sarcoma mieloide</p>

Proliferações mieloides relacionadas à síndrome de Down
Mielopoesse anormal Transitória (TAM)
Leucemia Mieloide associada com Síndrome de Down
Neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica (NCDPB)

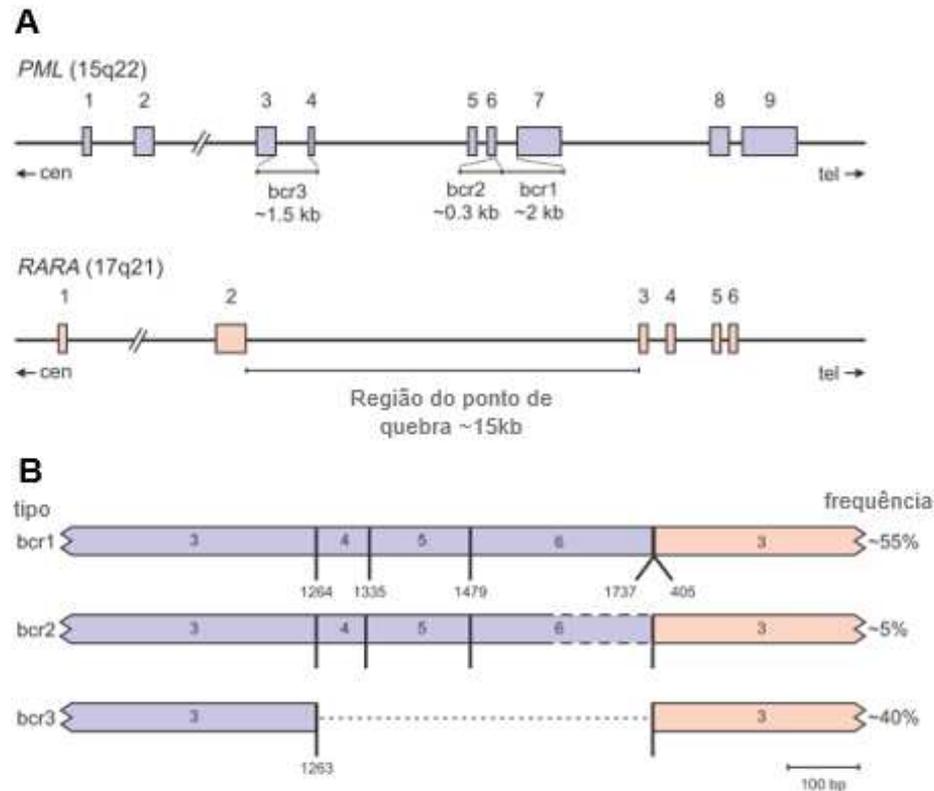
Fonte: Adaptado de ARBER *et al.* 2016.

3.2 LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA (LPA)

A LPA é uma doença de etiologia genética, pois está relacionada a translocações cromossômicas que alteram o locus $RAR\alpha$ (do inglês *Retinoic Acid Receptor Alfa*) presente no cromossomo 17 e que resultam em produtos de fusão com outros genes. Em cerca de 90% dos casos, essa fusão ocorre com o gene PML (do inglês *Promyelocytic Leukemia*) gerando a $t(15;17)(q22;q12)$. Outras fusões alternativas, em menor frequência, ocorrem com o gene *PLZF* (do inglês *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*) da $t(11;17)(q23;q21)$ ou, muito raramente, com o gene *NPM* (do inglês *Nucleophosmin*) da $t(5;17)(q35;q21)$, com o *NUMA* (do inglês *Nuclear Matrix-associated*) da $t(11;17)(q13;q21)$, e com os genes parceiros *STAT5b* (do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription 5B*) da $dup17(q11;q21)$. A anormalidade citogenética mais frequente, a PML- $RAR\alpha$, provém da $t(15;17)(q22;q12)$, na qual ocorre a fusão do gene PML oriundo do cromossomo 15q22 e do gene $RAR\alpha$ do cromossomo 17q12. Essa fusão forma um novo gene PML- $RAR\alpha$, o que resulta na síntese da proteína PML- $RAR\alpha$, considerada importante na gênese da LPA (GABERT *et al.*, 2003; HOFFBRAND *et al.*, 2013; SWERDLOW *et al.*, 2017; WANG & CHEN, 2008).

De acordo com os diferentes pontos de interrupção do PML e $RAR\alpha$, existem três isoformas do gene de fusão PML- $RAR\alpha$. Os pontos de interrupção de $RAR\alpha$ sempre ocorrem no íntron 2, com 17kb de comprimento. Por outro lado, três regiões do locus PML estão envolvidas nos pontos de interrupção da translocação $t(15;17)$, são eles o íntron 6 (bcr1; 55% dos casos), éxon 6 (bcr2; 5%) e íntron 3 (bcr3; 40%) (Figura 1). As três possíveis isoformas de proteínas PML- $RAR\alpha$, são denominadas longa (L ou bcr1), variante (V ou bcr2) e curta (S ou bcr3) (GABERT *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2019). Notavelmente, a isoforma bcr3 está associada a piores prognósticos, maior número de promielócitos leucêmicos e a uma morfologia da variante, ou seja, as células neoplásicas são hipogranulares (BRUNETTI *et al.*, 2017).

Figura 1 - Possíveis pontos de quebra nas regiões dos genes PML e RAR α da t(15;17)(q22;q12).



Legenda: (A) Diagrama esquemático da estrutura éxon/intron dos genes PML e RAR α envolvidos na t(15;17)(q22;q12). A orientação do centrômero (cen) e do telômero (tel), a numeração do éxon e as regiões relevantes do ponto de quebra são indicadas. As regiões de ponto de quebra bcr1 e bcr2 são justapostas ao íntron 6 e éxon 6, respectivamente. (B) Diagrama esquemático dos três tipos de transcritos de PML-RAR α relacionados às diferentes regiões de ponto de quebra de PML. O tamanho do transcrito bcr2 depende da posição do ponto de quebra no éxon 6 do gene PML. PML = gene da leucemia promielocítica; RAR α = gene do receptor alfa do ácido retinoico; cen = centrômero, tel = telômero, bp = pares de base.

Fonte: Adaptado de VAN DONGEN *et al.*, 1999.

A LPA tem sido caracterizada por um rápido curso fatal e alta incidência de morte por hemorragia precoce caso não haja tratamento adequado imediato. Assim, o diagnóstico deve ser tratado como um caso de emergência médica, sendo recomendado o início imediato do tratamento em casos de suspeita clínica acompanhada da morfologia celular sugestiva (COOMBS; TAVAKKOLI; TALLMAN, 2015; GRIMWADE; LO COCO, 2002).

3.2.1 Diagnóstico

3.2.1.1 Apresentação Clínica

Por ser um subtipo de LMA, a LPA apresenta sinais e sintomas muito semelhantes e característicos de LMA (BORROW *et al.*, 1992). Normalmente, os pacientes apresentam leucopenia e sintomas de pancitopenia, como: fadiga, dispneia, palidez, febre, anemia e petéquias espalhadas pelo corpo (ADAMS; NASSIRI, 2015). Também podem ser observados outros sintomas decorrentes da infiltração leucêmica em vários tecidos, como hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, alterações de pele, dores ósseas e problemas no sistema nervoso central, os quais podem produzir uma variedade de outros sintomas (CICCONI; LO-COCO, 2016; DAVID; MATHEWS, 2018).

A principal característica que distingue a LPA das demais LMAs é a sua predominância em adultos jovens que apresentam quadro clínico de leucopenia e coagulopatia. Esta se caracteriza por estados hemorrágicos com coagulação intravascular disseminada (CIVD), manifestação mais notória da doença (TALLMAN; ALTMAN, 2009; SAGRILLO *et al.*, 2005), devido à fibrinólise e proteólise inespecíficas que elevam o risco de morte (ÀDES *et al.*, 2006; WREDE *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2007). Dessa maneira, o diagnóstico precoce é imprescindível, pois existe um alto risco de CIVD e morte precoce (DAVID; MATHEWS, 2018).

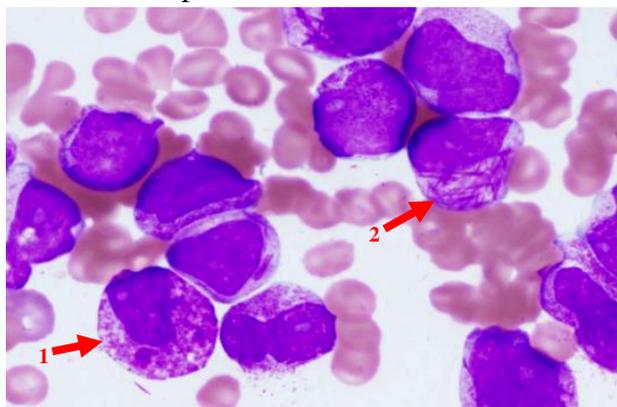
3.2.1.2 Diagnóstico laboratorial

3.2.1.2.1 Morfologia Celular

Em relação à morfologia celular, a LPA é dividida entre a forma clássica ou hipergranular, a forma hipogranular ou microgranular, e as demais formas variantes, como por exemplo a LPA com presença de monocitose (ADAMS; NASSIRI, 2015; ARBER *et al.*, 2016; NAEEM *et al.*, 2006).

Na forma hipergranular ou clássica, os promielócitos apresentam núcleo reniforme e excêntrico com abundantes granações azurófilas no citoplasma. A presença de múltiplos bastonetes de *Auer* no citoplasma desses promielócitos leucêmicos, os quais se dispõem em forma de feixes, denomina-se de "*Faggot cells*" (células com maços ou feixes) (Figura 2), os quais podem ser encontrados e identificados com frequência na LPA (HOFFBRAND *et al.*, 2013; SAGRILLO *et al.*, 2005; SWERDLOW *et al.*, 2017).

Figura 2 - Aspirado de MO contendo promielócitos característicos da LPA hipergranular.



Legenda: (1) Promielócitos com grânulos citoplasmáticos proeminentes; (2) *Faggot cells*.
Fonte: TALLMAN; ALTMAN, 2009.

É de suma importância lembrar que os abundantes grânulos azurófilos primários, apesar de fortemente sugestivo da LPA, não confirmam o diagnóstico, pois as células leucêmicas em outros subtipos de LMA podem apresentar grânulos proeminentes (TALLMAN; ALTMAN, 2009; SWERDLOW *et al.*, 2017).

Na forma hipogranular ou microgranular é mais evidente a visualização do contorno nuclear bilobado ou reniforme, devido à diminuição ou ausência das granulações primárias. Essa característica é importante pois os pacientes com a LPA microgranular ou hipogranular, apesar de não apresentarem as granulações evidentes na microscopia óptica (Figura 3), manifestam a mesma predisposição para hemorragias e CIVD que a forma de LPA hipergranular (TALLMAN; ALTMAN, 2009).

Figura 3 - Aspirado de MO que mostra características morfológicas de LPA microgranular ou hipogranular.



Fonte: TALLMAN; ALTAMN, 2009.

3.2.1.2.2 Alterações em parâmetros hematológicos e bioquímicos

Na maioria dos casos, os pacientes apresentam anemia normocrômica e normocítica, trombocitopenia severa (SILVA *et al.*, 2006) e distúrbios da coagulação. O tempo de

protrombina (TP), o tempo parcial de tromboplastina (TTPA) e o tempo de trombina (TT) estão prolongados, apresentam altas concentrações de produtos de degradação da fibrina e do D-dímero, e a diminuição das concentrações plasmáticas de fibrinogênio (DAVID; MATHEWS, 2018; KWAAN, WANG, BOGGIO, 2002).

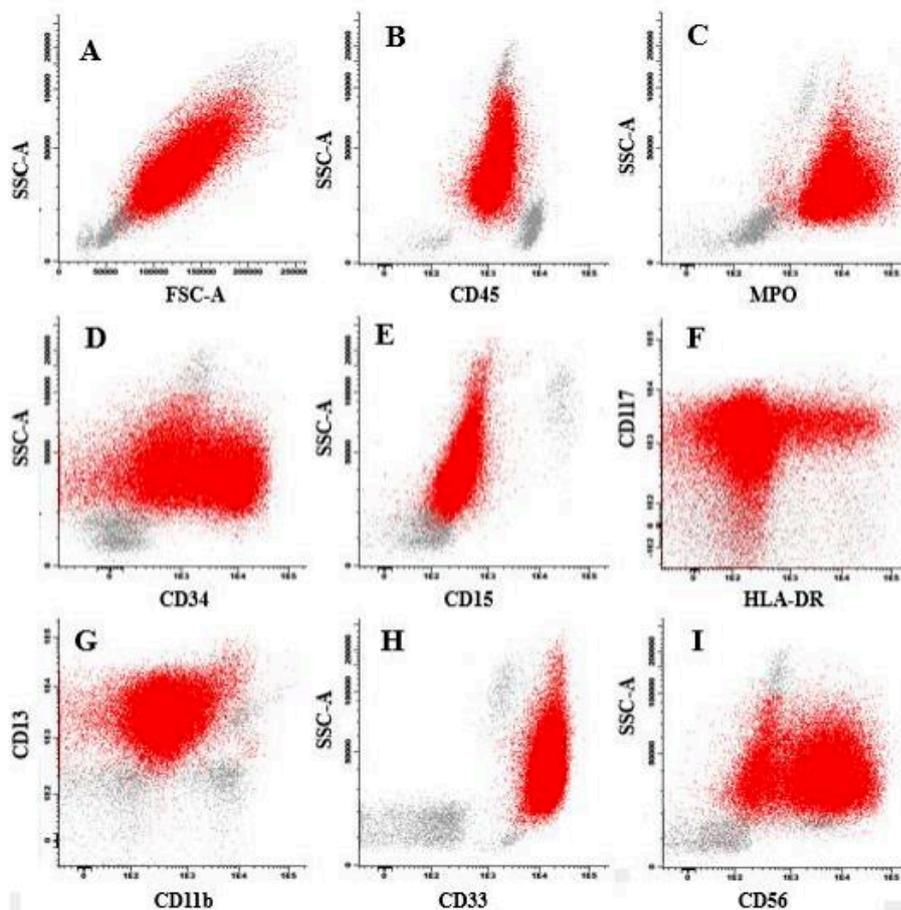
Em relação aos exames bioquímicos, os pacientes com LPA podem apresentar o aumento da lactato desidrogenase (LDH) sérica, o que pode ser explicado pelo fato da LDH ser uma enzima intracelular que é liberada pelas células no SP como consequência da citólise, a qual se eleva em decorrência da proliferação celular descontrolada, característica das LMAs (VARMA, VARMA, 2008).

3.2.1.2.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A imunofenotipagem (IMF) por citometria de fluxo (CF) das células leucêmicas permite o reconhecimento da linhagem e estágio de diferenciação do clone anormal. Além disso, traz informações a respeito das características prognósticas e dos fenótipos aberrantes importantes para a escolha da terapia e na monitorização da DRM (OELSCHLAEGEL *et al.*, 2009; PELLOSO *et al.*, 2003; SWERDLOW *et al.*, 2017).

Em relação à presença de marcadores de superfície celular, nos pacientes com LPA as células têm um padrão distinto quando comparado a outras LMAs. De modo resumido, as células neoplásicas apresentam expressão baixa ou ausente de HLA-DR (Figura 4F), de CD34 e das integrinas leucocitárias (CD11a, CD11b e CD18). No entanto, ocorre uma expressão forte e homogênea de CD33 (Figura 4H); e heterogênea de CD13. A expressão de CD117 é característica, embora algumas vezes pode apresentar-se um pouco mais fraca (SWERDLOW *et al.*, 2008). Há ausência da expressão de antígenos monocíticos, como CD14 (SAGRILLO *et al.*, 2005). Os marcadores de diferenciação granulocítica, CD15 (Figura 4E) e CD65, são negativos ou fracamente expressos, mesmo que seja comum a expressão de CD64. Em cerca de 20% dos casos de LPA, pode ocorrer a expressão de CD56 (Figura 4I), que tem sido associado a um mau prognóstico (VAN DONGEN *et al.*, 1999; SWERDLOW *et al.*, 2008). Também pode ocorrer a expressão aberrante do antígeno CD2 (marcação para linhagem linfóide T), que está presente em casos com a t(15;17)(q22;q12) (SWERDLOW *et al.*, 2017; YAMAMOTO, 2000).

Figura 4 - Figura representativa de IMF por CF de paciente com LPA.



Legenda: Neste caso específico de LPA, as células indicadas em vermelho apresentavam elevado SSC (complexidade interna) (Painel A), expressão de CD45 (Painel B), expressão forte de MPO (Painel C) e parcial de CD34 (Painel D). Ausência de expressão de CD15 (Painel E), expressão de CD117 (Painel F) e expressão fraca de HLA-DR (Painel F); expressão de CD13 (Painel G) e ausência de expressão de CD11b (Painel G); expressão forte e homogênea de CD33 (Painel H) e aberrante de CD56 (Painel I); IMF: Imunofenotipagem; CF: Citometria de fluxo.

Fonte: RIBEIRO, 2018.

Nos casos de LPA hipogranular ou do transcrito *bcr3* do gene de fusão *PML-RAR α* , observa-se com frequência a expressão de CD34 e CD2 em alguns promielócitos leucêmicos (ORAZI *et al.*, 2008). Dessa forma, como o diagnóstico morfológico da LPA hipogranular é difícil, os estudos imunofenotípicos são de extrema importância, uma vez que apresentam características imunofenotípicas muito semelhantes à LPA hipergranular (SWERDLOW *et al.*, 2017; YAMAMOTO, 2000).

3.2.1.2.4 Alterações Genéticas

A análise citogenética é realizada convencionalmente pela pesquisa microscópica dos cromossomos presentes nas células da medula óssea durante a metáfase, o cariótipo. Pode ser realizada com complemento de técnicas de hibridização *in situ*, como o método da hibridização

fluorescente *in situ* (FISH), sendo importante para confirmar a presença de rearranjos recorrentes (SILVA *et al.*, 2006).

O cariótipo (Figura 5) é realizado a partir de uma cultura de células da MO, que são incubadas de 24 a 48 horas. Ainda que altamente específica, essa análise citogenética é um método oneroso, que consome muito tempo e necessita de metáfases de boa qualidade para que sejam detectadas as translocações características da doença. Contudo, a citogenética é potencialmente útil para a identificação dos subtipos mais raros da LPA, incluindo aqueles com $t(11;17)(q23,q21)$, com $t(11;17)(q13,q21)$ e com $t(5;17)(q35,q21)$, que levam a fusões *PLZF-RAR α* , *NUMA-RAR α* e *NPM1-RAR α* , respectivamente (ADAMS; NASSIRI, 2015; RIBEIRO; REGO, 2006).

Figura 5 - Cariótipo de paciente com a presença da $t(15;17)$.

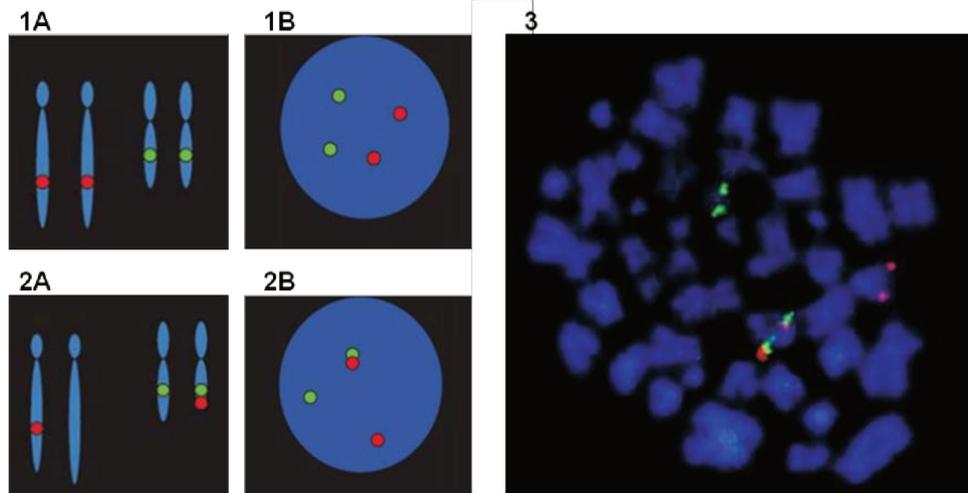


Legenda: As setas vermelhas indicam os locais da translocação entre os cromossomos 15 e 17.

Fonte: LEAL; KUMEDA; VELOSO, 2009.

Outro método utilizado é a FISH (do inglês *fluorescent in situ hybridization*) (JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008; LENGFELDER *et al.*, 2005). Esse método é altamente específico, sensível e mais rápido que o cariótipo para a detecção das translocações associadas com a LPA (Figura 6) (SANZ *et al.*, 2009; WREDE *et al.*, 2005).

Figura 6 - Representação esquemática da visualização da t(15;17) pela técnica de *FISH*.



Legenda: Em 1A e 1B representação esquemática de um cariótipo normal, no qual os genes PML (marcado pelo fluoróforo vermelho) e RAR α (marcado pelo fluoróforo verde) estão nos cromossomos 15 e 17, respectivamente.

Em 2A e 2B representação esquemática de um cariótipo da t(15;17) na qual há a fusão de ambos os genes, produzindo uma fluorescência com sinais coincidentes (verde/vermelho). Em 3 representação da metáfase de paciente portador da t(15;17), que pode ser observada a fusão dos genes PML e RAR α . FISH: *fluorescent in situ hybridization*.

Fonte: Adaptado de SAGRILLO *et al.*, 2005.

A RT-PCR (do inglês *reverse transcription - polymerase chain reaction*) para detecção do gene PML-RAR α é, na atualidade, o método mais utilizado no diagnóstico genético da LPA (LENGFELDER *et al.*, 2005; THOMAS, 2019). Para a realização da RT-PCR, é necessário que o RNA seja extraído de amostras recém coletadas de MO ou de SP. Além de apresentar alta especificidade e sensibilidade, o método é essencial na determinação do ponto de quebra do gene PML, estabelecendo assim, a meta para o monitoramento confiável da DRM (SANZ *et al.*, 2009). A RT-PCR convencional é útil para o diagnóstico, entretanto, sua sensibilidade é baixa para a monitorização do tratamento, ou seja, a DRM (SILVA, 2018). Outros métodos mais sensíveis são necessários para tal propósito, como a RT-PCR em tempo real (BRUNETTI *et al.*, 2017).

3.2.2 Prognóstico

O principal risco de morte para os pacientes com LPA está associado à coagulopatia, que combina episódios de CIVD e de fibrinólise, que são característicos dessa neoplasia (ADÈS *et al.*, 2010; STEFFENELLO-DURIGON *et al.*, 2020; KWAAN, WANG, BOGGIO, 2002).

A presença de algumas características biológicas dos promielócitos leucêmicos, anteriormente ao tratamento, foram associadas com um maior risco de recaída como, por exemplo, a LPA hipogranular, a expressão do CD2 e CD34, a duplicação *in tandem* do gene *FLT3* e a lenta ou incompleta diferenciação *in vitro* de blastos expostos ao ATRA. Todos os parâmetros, com exceção do último, estão correlacionados a leucometria aumentada (ADÈS *et al.*, 2006). Com isso, a contagem de leucócitos no momento do diagnóstico é utilizada para a classificação do grau de risco da doença, sendo que quanto maior o número, pior será o prognóstico (ADÈS *et al.*, 2006; BEITINJANEH *et al.*, 2010).

Nos pacientes com t(15;17)(q22;q12) tratados com ATRA, é esperada uma taxa de cura de aproximadamente 80% a 90% quando sobrevivem à indução e consolidação, alcançando a remissão completa (RC) (TALLMAN; ALTMAN, 2009), devendo atentar-se à septicemia secundária à mielossupressão, o que pode ser fatal (ADÈS *et al.*, 2010).

3.2.3 Tratamento

Atualmente, quando existe suspeita de um diagnóstico de LPA com base na apresentação clínica, morfologia e/ou imunofenotípica, dado o início abrupto frequente e o risco de eventos hemorrágicos graves, a doença deve ser tratada como uma emergência médica. Assim, é indicado o início precoce de ATRA (*all-trans-retinoico acid*), juntamente a terapia de suporte que leva à substituição agressiva de plaquetas, plasma fresco congelado e crioprecipitados, a fim de neutralizar a coagulopatia, enquanto o diagnóstico genético é estabelecido (CICCONI; LO-COCO, 2016; THOMAS, 2019).

Em geral, o tratamento da LPA é constituído em três fases: indução de remissão, consolidação e manutenção. As duas primeiras são realizadas com o ATRA e algum antracíclico (mitoxantrone, daunorrubicina ou idarrubicina) com escalonamento de dose e de intensidade, de acordo com a estratificação de risco. Em pacientes de alto risco, será associado aos ciclos de consolidação, doses intermediárias de citarabina (Ara-C), a fim de evitar o alto grau de recidiva (SANZ *et al.*, 2004). Após a terapia de indução e consolidação, a terapia de manutenção é realizada com a administração de ciclos de ATRA a cada três meses combinado ao metotrexato

semanalmente e a mercaptopurina diariamente em baixas doses via oral, durante 24 meses, com o objetivo de aumentar a sobrevida livre de doença (SANZ *et al.*, 2004; WATTS; TALLMAN, 2014). De acordo com os protocolos terapêuticos a investigação de DRM deve ser realizada após a consolidação e durante a manutenção (SCHUURHUIS *et al.*, 2018).

O ATRA revolucionou a terapia da LPA, pois em combinação com a quimioterapia, resultou em taxas de remissão completas maiores que 90% e taxas de remissão a longo prazo acima de 80%. O ATRA apresenta um mecanismo que age induzindo a diferenciação de promielócitos leucêmicos em granulócitos maduros (Figura 7), o que leva à sua avaliação como um agente único ou em combinação com a quimioterapia, primeiro em doenças recidivantes/refratárias e depois em pacientes recém-diagnosticados (COOMBS; TAVAKKOLI; TALLMAN, 2015).

Figura 7- Diferenciação de promielócitos anormais induzida pelo ATRA.



Legenda: Ao diagnóstico, observa-se na MO os promielócitos leucêmicos com a presença de bastonetes de *Auer* (seta). O ATRA induz a diferenciação dos promielócitos anormais, que ao longo do tratamento gradativamente passam a se maturar. No trigésimo dia de tratamento, os bastonetes de *Auer* (seta) são observados em neutrófilos circulantes no SP, indicando que essas células são derivadas de promielócitos leucêmicos.

Fonte: Adaptado de WANG; CHEN, 2008.

O tratamento contínuo com ATRA é caracterizado pela redução de sua concentração plasmática devido à depuração acelerada. Esses achados induziram os estudos subsequentes a combinar o ATRA com a quimioterapia, levando a baixas taxas de recaída. Inúmeros estudos foram conduzidos para explorar os benefícios potenciais da combinação de ATRA com a quimioterapia. Com a precoce adição de quimioterapia ao ATRA a incidência da síndrome do ácido retinoico (SAR) diminuiu. Por fim, estabeleceu-se a quimioterapia simultânea tendo como base o ATRA e a antraciclina (antraciclina mais citarabina ou uma antraciclina sozinha)

como protocolo padrão para indução de pacientes com LPA recém-diagnosticados (COOMBS; TAVAKKOLI; TALLMAN, 2015).

Pesquisadores franceses foram os primeiros a demonstrar que a administração simultânea de ATRA e quimioterapia proporcionou melhores resultados, quando em comparação com o protocolo sequencial. De acordo com essa abordagem, o Grupo Italiano *Malattie EMatologiche dell'Adulto* (GIMEMA) e o Programa Espanhol para Tratamento de Hemopatias Malignas do Adulto (PETHEMA) usaram apenas uma antraciclina (idarubicina) como quimioterapia, além do ATRA, simultaneamente, para indução de remissão, seguida por três ciclos de terapia de consolidação e manutenção. Essa abordagem foi chamada de AIDA e adotada em todo o mundo, tornando-se um dos protocolos mais utilizados (CICCONI; LO-COCO, 2016)

Além disso, a combinação de ATRA e trióxido de arsênio (ATO) apresentou-se muito eficaz e segura no tratamento de linha de frente e, no tratamento de pacientes com doença de baixo e médio risco, possivelmente, apresentando-se superior ao regime padrão baseado em ATRA e antraciclina (TESTA; LO-COCO, 2016). O uso do ATO, desde o início de 1990, apresentou melhora na evolução clínica desses pacientes, o que diminui a incidência de recaídas ou doença refratária (WANG; CHEN, 2008). O mecanismo de ação desse fármaco ocorre pela diferenciação parcial dos promielócitos neoplásicos, pela indução da apoptose dessas células e pela degradação da PML-RAR α (ARBUTHNOT; WILDE, 2006; THOMAS, 2019). Por isso, o tratamento com ATO mostra alta taxa de RC em pacientes reincidentes (OHNISHI, 2007; MOMENY *et al.*, 2009). De acordo com o estudo de Camacho e colaboradores (2000), foi relatada a incidência de leucocitose em 58% dos pacientes com LPA no início do tratamento com ATO e esse achado laboratorial foi revertido em todos os casos com a continuação da terapia. Associados a quimioterapia convencional, o ATRA e o ATO apresentam uma melhora notável no tratamento da LPA. Isso ocorre devido à capacidade única dos promielócitos leucêmicos se submeter à diferenciação quando exposto ao ATRA, e tanto a diferenciação quanto à apoptose com a exposição ao ATO (ADAMS; NASSIRI, 2015; PUC CETTI; RUTHARDT, 2004; TALLMAN; ALTMAN, 2009). Contudo, pode haver resistência a esses medicamentos, o que motiva novas pesquisas com diferentes agentes moleculares (THÉ; PANDOLFI; CHEN, 2017). Um exemplo disso é o tamibaroten, que mostrou eficácia terapêutica em pacientes resistentes ao tratamento com ATRA, com aumento da CRABP (do inglês *cellular retinoic acid binding protein*) em aproximadamente de 60% dos pacientes com recidiva de LPA, o que levou a RC (COOMBS; TAVAKKOLI; TALLMAN, 2015; OHNISHI, 2007).

3.2.4 Doença residual mensurável (DRM)

Ao final do tratamento, é considerado como remissão completa a presença menor que 5% de blastos leucêmicos na MO, sem evidências de células anormais no SP. A DRM, refere-se a essas células leucêmicas residuais no cenário de uma remissão morfológica (LEE; GRIGORIADIS; WESTERMAN, 2015) e pode ser definida como o limite mínimo de detecção da doença em pacientes pós-quimioterapia, com remissão morfológica completa. A DRM pode ser consequência da resistência farmacocinética, da resistência celular ou de fatores desconhecidos que podem afetar a eficácia do tratamento (BACHER *et al.*, 2011; WALTER *et al.*, 2011).

O maior objetivo da pesquisa da DRM é identificar pacientes com maior risco de recidiva e um mau prognóstico. A detecção rápida após as primeiras induções ou logo após o tratamento, está ligado a um alto risco de recidiva da doença e um mau prognóstico na avaliação da eficácia terapêutica. A definição dos grupos de maior risco se baseia no número de células neoplásicas observadas na DRM (DUARTE; SALES; VASCONCELOS, 2013). Em geral, essas células são indetectáveis por microscopia padrão, e para serem identificadas é necessário o uso de técnicas mais sensíveis, como o monitoramento de DRM pelo método de RT-PCR (BACHER *et al.*, 2011; LEE; GRIGORIADIS; WESTERMAN, 2015).

De acordo com Grimwade e Lo Coco (2002), o monitoramento rigoroso da DRM, associado a uma terapia preventiva no ponto de recaída molecular, tende a melhorar a sobrevida de pacientes com a presença do gene PML-RAR α de baixo risco. Com isso, a tecnologia de RT-PCR em tempo real apresenta grande melhoria no valor preditivo da avaliação da DRM.

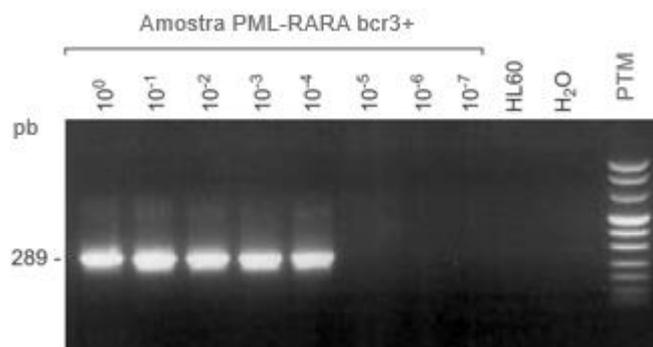
Contudo, o monitoramento da DRM também é utilizado como forma de determinar a abordagem do tratamento e está desempenhando um papel cada vez mais importante no manejo de pacientes com LPA. A detecção dessas células por RT-PCR em tempo real pode prever uma possível recaída iminente, permitindo assim, que seja iniciada precocemente a terapia de resgate. Esse monitoramento molecular, pode ajudar na racionalização da terapia, poupando assim, uma toxicidade desnecessária em pacientes que mantêm a remissão molecular (BACHER *et al.*, 2011; GRIMWADE; LO COCO, 2002).

3.2.4.1 Monitoramento molecular da DRM por RT-PCR

A RT-PCR convencional consiste em uma técnica na qual o procedimento possibilita a amplificação de regiões conhecidas do RNA por meio de uma reação *in vitro* (PALLOTTA;

RAMOS; RIBEIRO, 2000). A primeira parte da reação, a transcrição reversa, ocorre por uma reação enzimática que é catalisada pela enzima transcriptase reversa (RT). Nessa reação, o DNA complementar (cDNA) é sintetizado a partir do RNA mensageiro (mRNA) previamente extraído da amostra do paciente (PALLOTTA; RAMOS; RIBEIRO, 2000; VIEIRA, 2011;). O cDNA sintetizado é então utilizado como molde na reação seguinte (PCR), na qual oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) e a enzima DNA polimerase sintetizam milhares de cópias do fragmento do DNA a ser pesquisado (VAN DONGEN *et al.*, 1999). No método convencional, a amplificação da sequência alvo é revelada por eletroforese em gel de agarose, na presença de um corante capaz de se intercalar no DNA e gerar fluorescência sob exposição à luz ultravioleta, como o brometo de etídio (Figura 8). A realização da *Nested-PCR* apresenta vantagem de aumentar a especificidade e a eficiência da reação. Nessa reação, o segmento genômico será re-amplificado, porém ele acarreta o aumento do tempo de processo (VIEIRA, 2011). De maneira geral, a RT-PCR também apresenta a desvantagem de permitir a detecção dos produtos da reação apenas no final de todos os ciclos da reação, quando o DNA alvo se encontra amplificado em condições de saturação (SUAREZ, 2010).

Figura 8 - Gel de agarose corado com brometo de etídio de uma RT-PCR para PML-RAR α bcr3.



Legenda: pb = pares de bases; PTM = padrão de tamanho molecular; HL60 = linhagem de células humanas sem a fusão PML-RARA. RT: Transcrição reversa; PCR: Reação em cadeia da polimerase.

Fonte: Adaptado de VAN DONGEN *et al.*, 1999.

Assim como na RT-PCR convencional, a RT-PCR em tempo real utiliza o RNA mensageiro como ponto de partida, em que ele é transcrito em cDNA pela ação da transcriptase reversa (GABERT *et al.*, 2013; VIEIRA, 2011). Contudo, no método de RT-PCR em tempo real, a emissão e detecção de fluorescência ocorre durante a reação de PCR. A partir da intensidade de fluorescência emitida e das curvas de amplificação geradas, é traçado um *cut-off* horizontal, o qual corresponde à fluorescência específica mínima na altura (eixo y) da fase

exponencial de amplificação gênica e corresponde ao *threshold*, utilizado para calcular o *threshold cycle* (C_T) de cada amostra (ALMEIDA; SADDI, 2007). O C_T corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para o início da amplificação, ou seja, momento em que a fluorescência emitida ultrapassa a linha do *threshold* (Figura 9). Dessa forma, o C_T tem relação inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo presente amostra (GABERT *et al.*, 2003; VELDEN *et al.*, 2003).

Figura 9 - Representação esquemática de um gráfico de RT-PCR em tempo real.

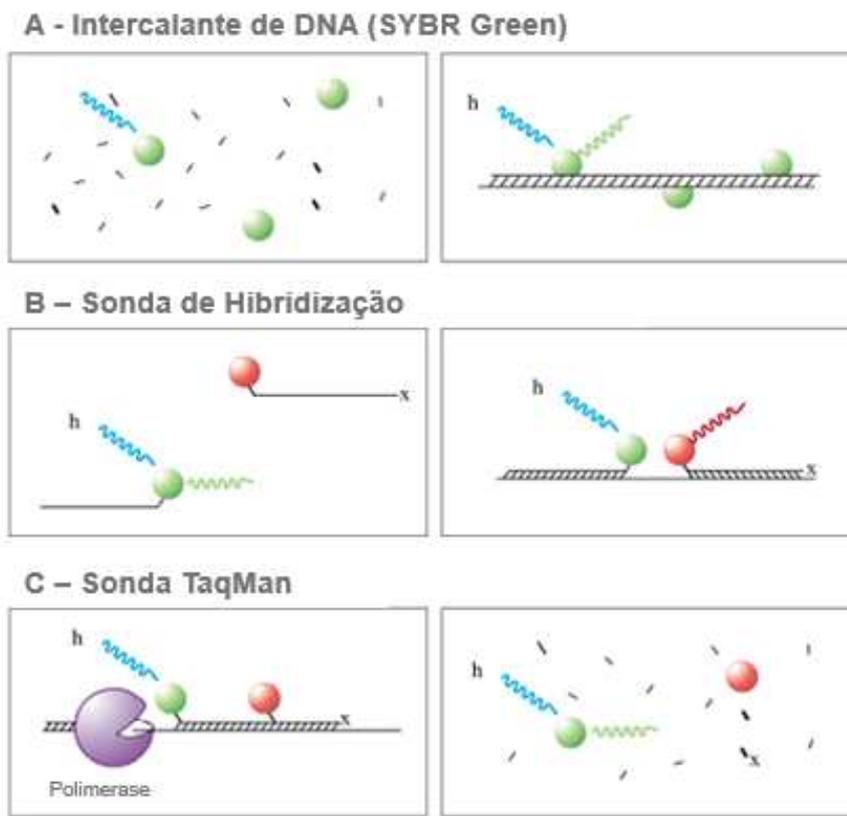


Legenda: C_T = ciclo *threshold*, número de ciclos de necessários para o início da amplificação. Linha tracejada corresponde ao *threshold*. RT: transcrição reversa; PCR: reação em cadeia da polimerase.

Fonte: Adaptado de <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>.

Existem três principais sistemas de detecção da fluorescência disponíveis: intercalantes de DNA, sondas de hibridização e sondas de hidrólise (Figura 10) (MULLER *et al.*, 2007; VELDEN *et al.*, 2003;). O intercalante de DNA mais conhecido é o *SYBR® Green*, o qual se liga ao DNA dupla fita dos produtos da reação e emite fluorescência. Apesar do baixo custo, a falta de especificidade do *SYBR® Green I* faz com que possíveis amplificações inespecíficas e dímeros de iniciadores possam interferir na quantificação dos produtos da reação. As sondas de hibridização envolvem a justaposição de duas sondas específicas, sendo uma marcada com o fluorocromo doador na extremidade 3' e a outra sonda com o fluorocromo acceptor na extremidade 5'. Como as sondas se justapõem, ocorre a transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET) e a fluorescência pode ser detectada. Já as sondas de hidrólise, como a *TaqMan®*, anelam especificamente na região interna do segmento a ser amplificado entre dois iniciadores e exploram a atividade exonuclease 5'– 3' da enzima *Taq* polimerase (GABERT *et al.*, 2003; SUAREZ, 2010).

Figura 10 - Representação esquemática dos tipos de sondas fluorescentes usadas na PCR em tempo real.



Legenda: O painel A mostra o *SYBR[®] Green*, um corante de ligação ao sulco menor do DNA dupla fita e proporciona um aumento na sua fluorescência mais de cem vezes. No painel B um exemplo de sondas de hibridização, sendo que são projetadas duas sondas que hibridam lado a lado no produto de PCR. A extremidade 3' da sonda a montante é ligada à fluoresceína (em verde), que atua como um doador de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). Já a extremidade 5' da sonda a jusante é ligada a um corante aceitador (em vermelho). Assim, o sinal FRET é visto apenas quando ocorrem dois eventos específicos de hibridação. No painel C a sonda *TaqMan*, a qual emite seu sinal de fluorescência após sua hidrólise pela atividade de exonuclease 5'a 3' da polimerase. PCR: reação em cadeia da polimerase.

Fonte: Adaptado de <http://dyes.gene-quantification.info/>

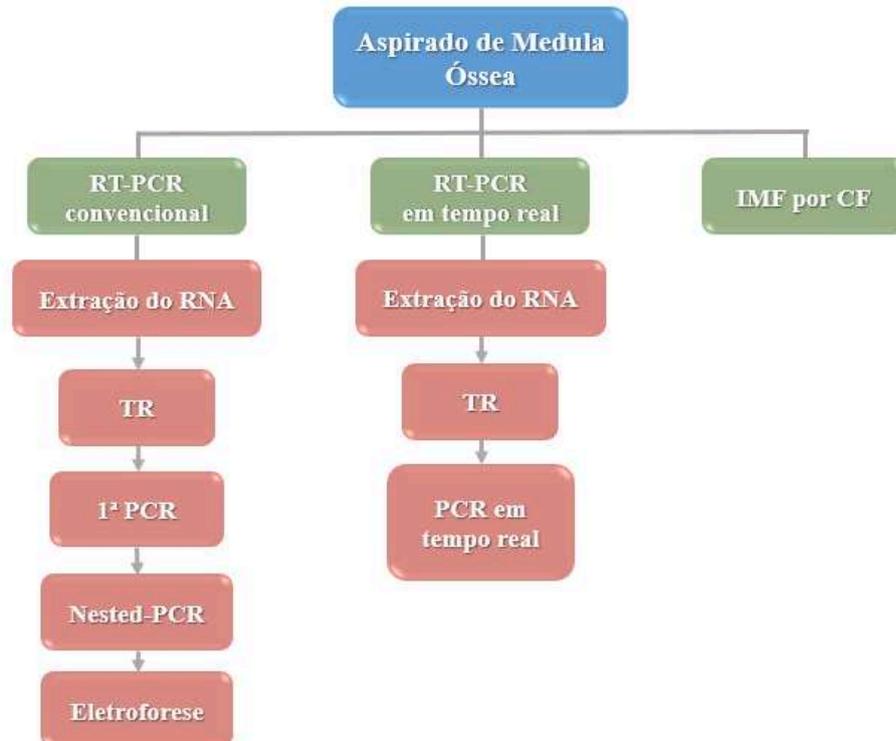
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos neste estudo pacientes acima de 18 anos com diagnóstico prévio de LPA com fusão PML-RAR α da t(15;17), que estavam na fase de manutenção da quimioterapia, que aceitaram assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (CEPSH-UFSC 61598816.7.0000.0121/2017 (Anexo A), e com volume de amostra suficiente para os exames de rotina e para a pesquisa da fusão PML-RAR α por RT-PCR em tempo real.

Os testes de RT-PCR convencional e imunofenotipagem por citometria de fluxo foram realizados na ULAC e os resultados foram usados neste trabalho para comparar ao método de RT-PCR em tempo real aqui proposto (Figura 11).

Figura 11- Fluxograma dos métodos comparados.



Legenda: RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, RNA: ácido ribonucleico, TR: transcrição reversa, PCR: reação em cadeia da polimerase, IMF: imunofenotipagem; CF: citometria de fluxo.

Durante o período do estudo, 60 amostras para pesquisa da fusão PML-RAR α foram recebidas pela ULAC/HU/EBSERH/UFSC. Dessas, 18 foram excluídas por serem provenientes de pacientes com suspeita de LPA e não acompanhamento, que era o objetivo diagnóstico deste estudo. Das 42 amostras provenientes de pacientes em acompanhamento da quimioterapia, 25 amostras foram excluídas do estudo por apresentarem volume suficiente somente para os exames de rotina e duas do mesmo paciente por apresentarem o ponto de quebra PML-RAR α bcr2, não contemplado neste estudo. Assim, 15 amostras de aspirado de medula óssea foram usadas para a comparação dos métodos. Dessas, oito eram de pacientes com PML-RAR α bcr1 e sete bcr3 ao diagnóstico (Figura 12).

Figura 12- Casuística do estudo



4.2 RT-PCR EM TEMPO REAL PARA A INVESTIGAÇÃO DA FUSÃO PML-RARA

4.2.1 Hemólise e extração de RNAm

Para a extração de RNAm foi utilizado o kit *RNeasy® Midi* (Ref. 75144, Qiagen), posteriormente nomeado como kit de extração teste. Para cada volume de aspirado de medula óssea foram adicionados cinco volumes de tampão de lise eritrocitária (hemólise). A mistura foi incubada por 15 minutos em gelo e centrifugada a 400 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, preservando o sedimento de leucócitos, ao qual foram acrescentados dois volumes de tampão de lise eritrocitária. A mistura foi centrifugada a 400 x g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi removido e descartado. O sedimento de leucócitos foi ressuspenso e lisado com tampão de lise e agitação vigorosa. A esse lisado foi adicionado o mesmo volume de etanol 70% com agitação vigorosa. A amostra foi transferida para uma coluna *RNeasy Midi*, a qual possui uma membrana filtrante de sílica gel, acoplada a um tubo de 15 mL. A coluna com a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 3000 x g. O filtrado foi descartado e foram adicionados 4 mL de tampão de lavagem (RW1). A coluna foi centrifugada por 5 minutos a 3000 x g e o filtrado foi descartado. A coluna passou por duas lavagens com 2,5 mL de tampão de lavagem (RPE), a primeira centrifugação foi de 2 minutos e a segunda por 5 minutos a 3000 x g. Para eluição do RNAm, a coluna foi transferida para um novo tubo de coleta de 15 mL e foi adicionado o volume adequado de água livre de RNase diretamente sobre a membrana de sílica gel, a qual permaneceu em repouso durante 1 minuto. Em seguida, a coluna foi centrifugada por 3 minutos a 3000 x g e o RNAm eluído foi armazenado a -20°C até a síntese do cDNA.

4.2.2 Transcrição reversa (RT)

Para esse procedimento, foi utilizado o Kit *Ipsogen RT* (Ref. 679913, Qiagen), posteriormente nomeado como TR teste. Dessa forma, 10 µL de RNA foram incubados por 5 minutos a 65°C. Logo após esse tempo, o RNA das amostras foi centrifugado brevemente e mantido em gelo. Uma pré-mistura (Master MIX) para a transcrição reversa foi preparada conforme mostra a Tabela 1:

Tabela 1 - Preparação da pré-mistura para transcrição reversa.

Reagentes (concentração estoque)	Concentração final	Volume por reação (uL)
Tampão da transcriptase reversa (5x)	1x	5,0
dNTPs (10 mM)	0,8 mM	2,0
Random nonomêros (100 µM)	21 µM	5,25
Inibidor de RNase (40 U/µL)	0,8 U/µL	0,5
DTT (25M)	0,1M	1,25
Transcriptase reversa (200 U/µL)	8 U/µL	1,0
Volume Final	-	15,0

Fonte: Autora, 2019.

Foi adicionado 15 µL dessa pré-mistura a cada amostra de RNA. Como controle negativo, foi usado água livre de RNase. Cada mistura foi homogeneizada, centrifugada brevemente e incubada por 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C, 5 minutos a 85°C para inativação, e 5 minutos a 4°C. Ao final da transcrição reversa, as amostras foram centrifugadas brevemente e o cDNA foi armazenado a -20°C até a realização da PCR em tempo real.

4.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Devido ao perfil dos pacientes atendidos no HU-UFSC, foram testados os kits de detecção PML-RAR α bcr1 e bcr3 da marca *Ipsogen*, (Ref. 672123 e 672313, Qiagen), os quais serão posteriormente nomeados como PCR teste. As misturas para a detecção do PML-RAR α bcr1 ou bcr3 foram preparadas de acordo com o número de amostras processadas conforme o protocolo da Tabela 2:

Tabela 2 - Preparação da pré-mistura para PCR em tempo real do PML-RAR α bcr1 ou bcr3.

Reagentes	Volume por reação (uL)
Água livre de nucleases	6,5
Master Mix da PCR (2x)	12,5
Mistura de iniciadores e sondas PML-RAR α bcr1/bcr3 (25x)	1,0
Volume Final	20,0

Fonte: Autora, 2019.

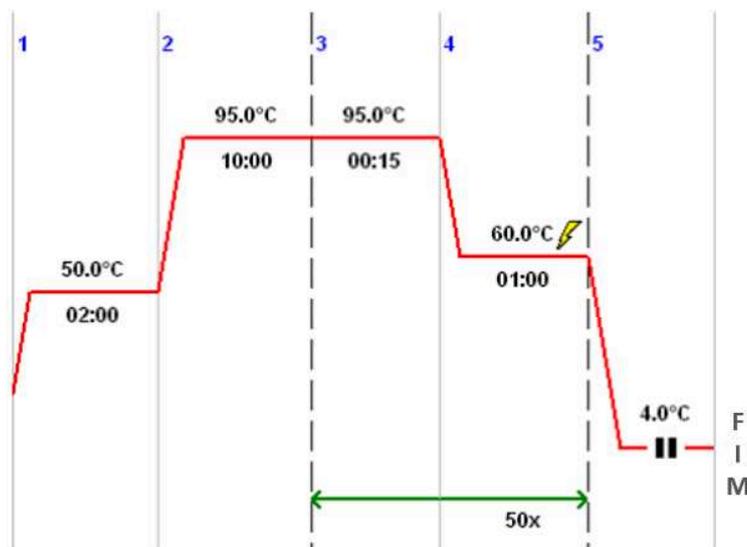
Outra mistura para a detecção do gene constitutivo ABL foi preparada de acordo com o número de amostras processadas conforme o protocolo da Tabela 3:

Tabela 3 - Preparação da pré-mistura para PCR em tempo real para ABL.

Reagentes	VOLUME por reação (uL)
Água livre de nucleases	6,5
Master Mix da PCR (2x)	12,5
Mistura de iniciadores e sondas ABL (25x)	1,0
Volume Final	20,0

Fonte: Autora, 2019.

Foram transferidos 20 μ L dessas misturas para cada tubo contendo 5 μ L do produto obtido na transcrição reversa (cDNA). A mistura foi homogeneizada suavemente, centrifugada brevemente e incubada em termociclador *MasterCycle RealPlex 4* (Eppendorf®) conforme programação de temperaturas sugeridas pelo fabricante dos kits *Ipsogen* (Figura 13). A detecção da amplificação do material genético foi realizada em tempo real pela detecção de fluorescência do fluoróforo FAM.

Figura 13 - Programação de temperaturas da RT-PCR em tempo real para detecção da fusão PML-RAR α .

Fonte: Autora, 2020.

O método de RT-PCR convencional, foi realizado de acordo com o procedimento operacional padrão RT BML 5.5 001, o qual é utilizado atualmente no setor de Biologia Molecular da ULAC/HU/EBSERH. Tendo em vista que foram realizadas todas as etapas do método, conforme a rotina do laboratório e com reagentes e insumos obtidos pelo pregão vigente.

4.2.4 Análise estatística

O teste *Kappa* foi utilizado para determinar a concordância da detecção de PML-RAR α entre os ensaios RT-PCR convencional e em tempo real. Os valores de *Kappa* determinados por Altman (1991) foram adotados como referência: concordância pobre foi atribuída para valores de *Kappa* entre (0,00-0,20), concordância razoável para valores entre (0,21 a 0,40), concordância moderada para valores entre (0,41-0,60), boa concordância para valores (0,61- 0,80) e concordância excelente para valores entre (0,81-1,00). O programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences software*, versão 23.0, EUA) foi utilizado para a realização do teste *Kappa*.

4.2.5 Cálculo dos custos dos testes

Os custos dos testes foram calculados com base nos preços dos reagentes e insumos (ponteiras e microtubos) utilizados obtidos no pregão vigente para os reagentes da rotina, e de notas fiscais para os reagentes obtidos com verbas de pesquisa. Os reagentes utilizados na rotina do laboratório foram: kit de extração de RNA (Ref. Z3100, Promega), kit de transcrição reversa (Ref. A5001, Promega), Taq DNA polimerase GoTaq® (Ref. M5005, Promega). Os reagentes obtidos com verbas de pesquisa (Teste) foram: kit de extração de RNA RNeasy® Midi (Ref. 75144, Qiagen), kit de transcrição reversa Ipsogen RT (Ref. 679913, Qiagen), kit de detecção PML-RAR α bcr1 Ipsogen (Ref. 672123, Qiagen), e kit de detecção PML-RAR α bcr3 Ipsogen (Ref. 672313, Qiagen) e GoTaq® Probe qPCR (Ref. A6101, Promega). A quantidade de cada reagente para cada teste foi calculada com base nos protocolos dos testes. Também foram considerados os custos com os reagentes necessários para os controles e com a curva de calibração para o teste quantitativo. Além disso, o custo com o número de amostras analisadas (uma, duas, três, quatro ou cinco) simultaneamente foi calculado. Os cálculos foram realizados em planilha do *software Microsoft Office Excel*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

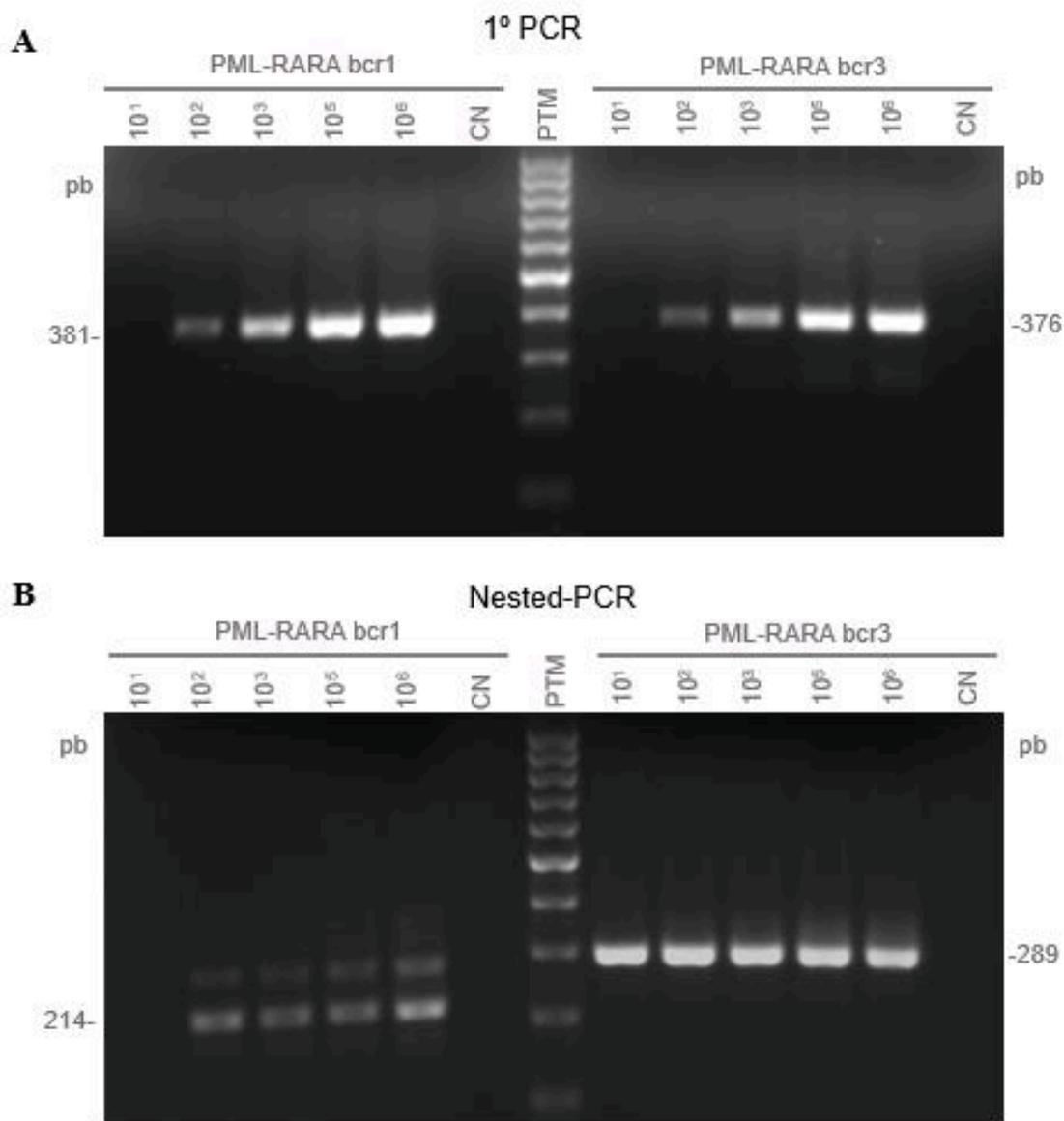
5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA A AVALIAÇÃO DA FUSÃO PML-RARA

Cinco concentrações de cópias de PML-RAR α já conhecidas, provenientes do kit teste, foram utilizadas para comparar os métodos de RT-PCR convencional, atualmente utilizado na rotina (Promega) e em tempo real, método teste (Qiagen). A Figura 14 apresenta o resultado da eletroforese em gel de agarose da RT-PCR convencional. Esse método, atualmente usado na rotina do Laboratório de Biologia Molecular da ULAC/HU/EBSERH, detectou concentrações de 10^2 a 10^6 cópias de PML-RAR α bcr1 e bcr3, porém não detectou 10^1 cópias dos transcritos na primeira PCR (Figura 14A). Por outro lado, a *Nested*-PCR aumentou a sensibilidade do teste para PML-RAR α bcr3, pois detectou todas as concentrações dos transcritos. Já a *Nested*-PCR para PML-RAR α bcr1 apresentou os mesmos resultados da primeira PCR, ou seja, detectou o transcrito nas reações com 10^2 a 10^6 cópias de PML-RAR α bcr1, porém não detectou na reação com 10^1 cópias (Figura 14B).

As Figuras 15 e 16 apresentam os resultados da RT-PCR em tempo real das cinco concentrações de transcritos PML-RAR α bcr1 e bcr3, respectivamente. Todas as concentrações foram detectadas pelo teste, cujos C_T foram inferiores a 40. A partir dos C_T obtidos na reação em tempo real, foram elaboradas curvas de calibração que poderiam ser usadas caso as dosagens fossem quantitativas. Conforme orientações do fabricante do kit, como os padrões são diluições em dez vezes, a inclinação teórica da curva é -3,3. Uma inclinação entre -3,0 e -3,9 é aceitável desde que R^2 seja $>0,95$. Já, um valor para $R^2 >0,98$ é desejável para resultados precisos. Ambas as reações apresentaram inclinação e R^2 dentro do preconizado pelo fabricante, sendo a inclinação da reação para PML-RAR α bcr1 foi de -3,2806 ($R^2 = 0,9924$) (Figura 17A) e para PML-RAR α bcr3 foi de -3,3531 ($R^2 = 0,9999$) (Figura 17B).

Em seguida, um POP para o teste RT-PCR em tempo real para PML-RAR α foi desenvolvido com base no modelo atualmente utilizado pela ULAC/HU/EBSERH/UFSC e padronizado para todos os hospitais da rede Ebserh (Apêndice A).

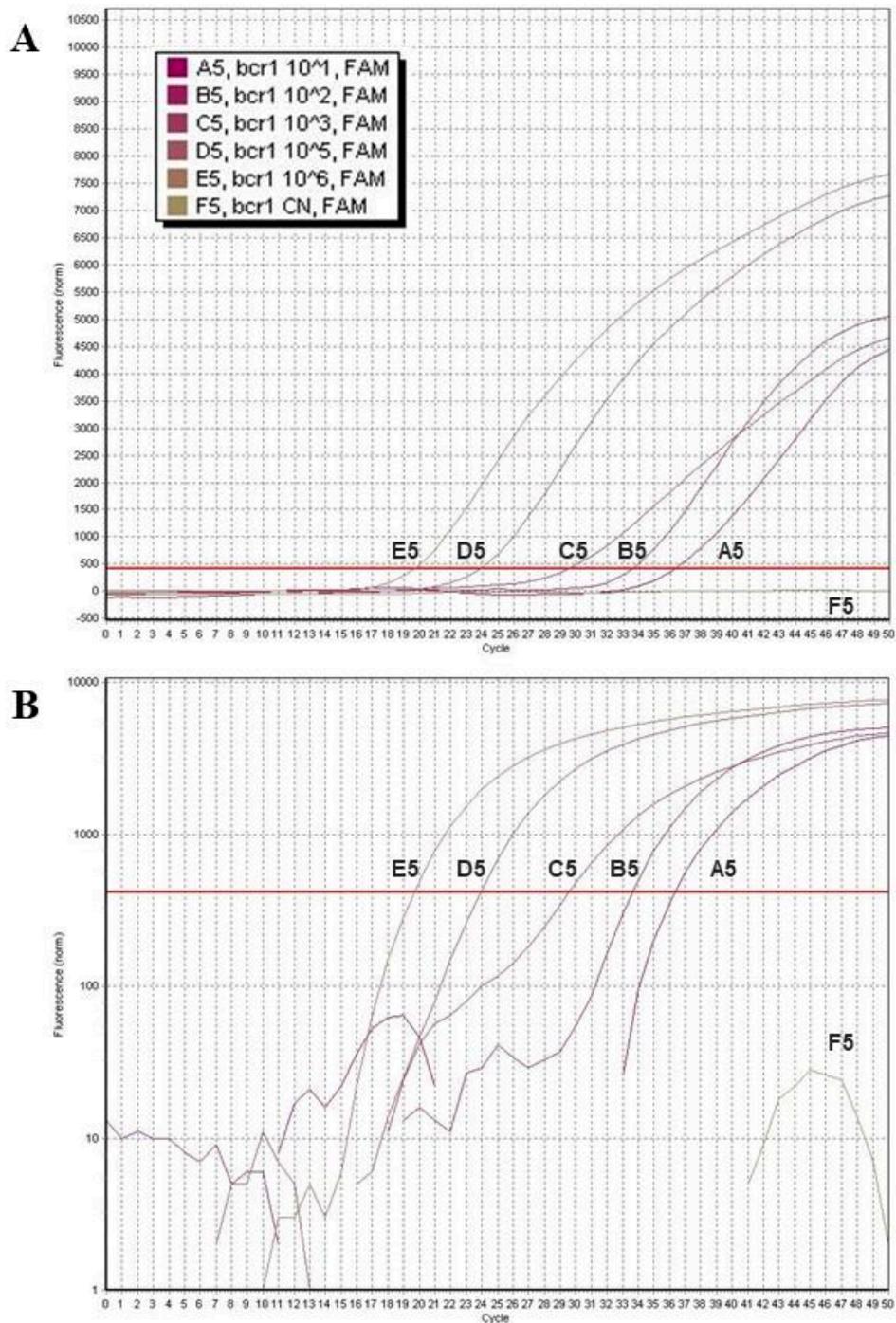
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio da RT-PCR convencional para PML-RAR α bcr1 e bcr3.



Legenda: Paineis A e B = eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio da 1^a PCR para PML- RAR α bcr1 (esquerda) e bcr3 (direita). Paineis A e B = eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio da *Nested-PCR* para PML- RAR α bcr1 (esquerda) e bcr3 (direita). Concentrações de transcritos: 10¹, 10², 10³, 10⁵ e 10⁶ cópias de PML-RAR α bcr1 e bcr3. CN = controle negativo, PTM = padrão de tamanho molecular de 100 pares de bases; pb = pares de bases.

Fonte: A autora.

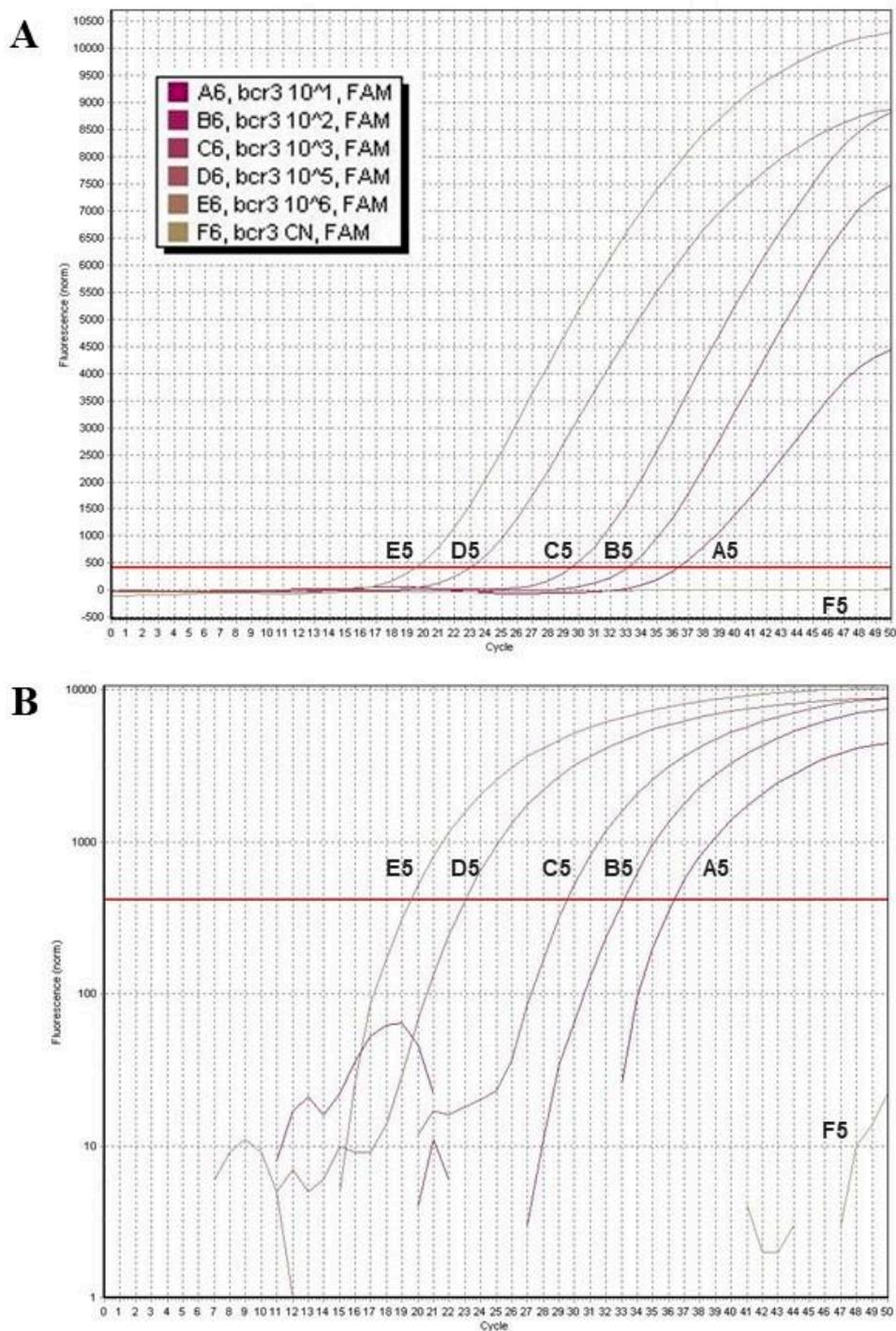
Figura 15 - RT-PCR em tempo real de concentrações conhecidas do transcrito PML-RAR α bcr1.



Legenda: A5: 10¹ cópias de PML-RAR α bcr1, B5: 10² cópias de PML-RAR α bcr1, C5: 10³ cópias de PML-RAR α bcr1, D5: 10⁵ cópias de PML-RAR α bcr1, E5: 10⁶ cópias de PML-RAR α bcr1 e F5: controle negativo.
 Painel A: apresentação dos dados conforme intensidade de fluorescência (eixo y) e número de ciclos (eixo x).
 Painel B: apresentação conforme fluorescência normalizada (eixo y) e número de ciclos (eixo x).

Fonte: A autora.

Figura 16 - RT-PCR em tempo real de concentrações conhecidas do transcrito PML-RAR α bcr3.



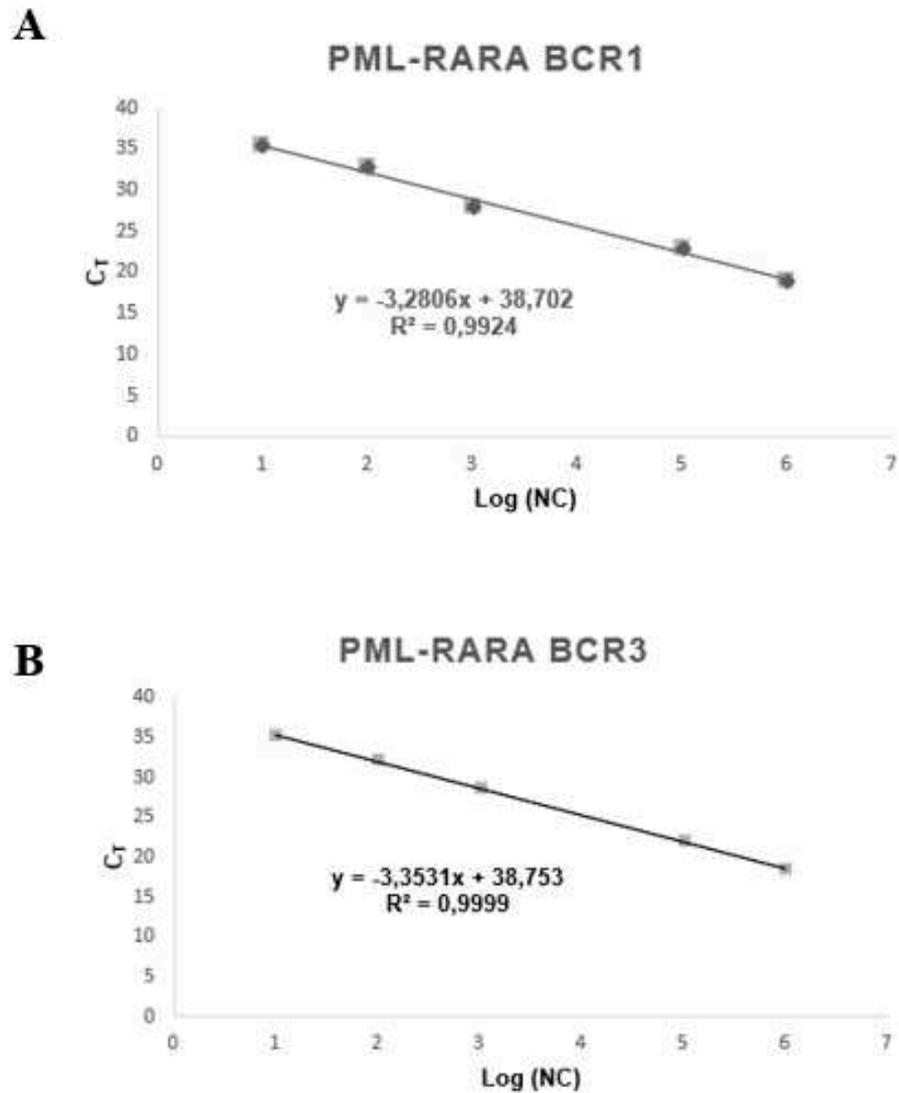
Legenda: A5: 10¹ cópias de PML-RAR α bcr3, B5: 10² cópias de PML-RAR α bcr3, C5: 10³ cópias de PML-RAR α bcr3, D5: 10⁵ cópias de PML-RAR α bcr3, E5: 10⁶ cópias de PML-RAR α bcr3 e F5: controle negativo.

Painel A: apresentação dos dados conforme intensidade de fluorescência (eixo y) e número de ciclos (eixo x).

Painel B: apresentação conforme fluorescência normalizada (eixo y) e número de ciclos (eixo x).

Fonte: A autora.

Figura 17 - Curva calculada a partir das cinco concentrações padrão de transcritos PML-RAR α .



Legenda: C_T = ciclo *threshold*; NC = número de cópias. Uma curva de regressão linear ($y = ax + b$) foi calculada para cada gene sendo a equação e coeficiente de determinação (R^2) apresentados no gráfico. Painel A: concentrações conhecidas de PML-RAR α bcr1 sendo a apresentação dos dados conforme ciclo *threshold* (eixo y) e logaritmo do número de cópias (eixo x). Painel B: concentrações conhecidas de PML-RAR α bcr3 sendo a apresentação dos dados conforme ciclo *threshold* (eixo y) e logaritmo do número de cópias (eixo x).

Fonte: A autora.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE RT-PCR CONVENCIONAL, EM TEMPO REAL E IMF POR CF EM AMOSTRAS DE PACIENTES

As características e os resultados de exames de rotina (IMF por CF e RT-PCR convencional) e da RT-PCR em tempo real das amostras incluídas no estudo podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Características da casuística e resultados da IMF por CF e RT-PCR.

Código	Transcrito diagnóstico	Volume (mL) ¹	IMF por CF (%) ²	RT-PCR convencional	RT-PCR em tempo real
PML 499	bcr1	2,0	-	Não detectado	Não detectado
PML 500	bcr3	3,0	-	Não detectado	Não detectado
PML 501	bcr1	3,0	-	Não detectado	Não detectado
PML 502	bcr3	2,0	0,02	Não detectado	Não detectado
PML 504	bcr1	2,0	1,20	Detectado (N)	Detectado (C_T 30)
PML 508	bcr1	2,0	-	Não detectado	Não detectado
PML 510	bcr3	2,5	0,00035	Não detectado	Não detectado
PML 513	bcr3	1,5	0,0002	Não detectado	Não detectado
PML 540	bcr1	4,0	0,001	Não detectado	Detectado (C_T 38)
PML 541	bcr3	4,0	0,0004	Não detectado	Não detectado
PML 542	bcr1	4,0	0,0004	Não detectado	Não detectado
PML 543	bcr1	4,0	0,0008	Não detectado	Detectado (C_T 38)
PML 544	bcr1	0,2 ³	-	Detectado (N)	Detectado (C_T 36)
PML 557	bcr3	1,7	-	Não detectado	Não detectado
PML 558	bcr3	1,7	-	Não detectado	Não detectado

Legenda: IMF: imunofenotipagem; CF: citometria de fluxo; RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase; Ct: ciclo *threshold*; N: *Nested*-PCR. ¹: volume de amostra usado para extração e RT-PCR em tempo real; ²: porcentagem de células com fenótipo semelhante ao encontrado no diagnóstico; ³: amostra de concentrado de células progenitoras hematopoiéticas.

Como pode ser observado na Tabela 4, das 15 amostras incluídas no estudo, oito eram provenientes de pacientes com PML-RAR α bcr1 ao diagnóstico e sete de PML-RAR α bcr3. Os volumes de aspirado de medula óssea disponíveis para a extração teste variaram de 1,5 a 4,0 mL. Uma das amostras era um concentrado de células progenitoras hematopoiéticas e, por apresentar uma leucometria muito alta, optou-se por utilizar um volume menor na extração (0,2 mL). Oito amostras das 15 apresentavam solicitação de IMF por CF além da solicitação da RT-PCR convencional. Dessas, seis não apresentaram células com fenótipo semelhante ao encontrado no diagnóstico, assim o resultado foi liberado como inferior ao limite de detecção do exame. Duas amostras apresentaram células com fenótipo semelhante ao encontrado no diagnóstico, a amostra PML 502 com 0,02% de células e a amostra PML 504

com 1,2% (recidiva da doença). Duas amostras apresentaram PML-RAR α detectado na RT-PCR convencional, porém ambas foram detectadas somente na *Nested*-PCR (N). Uma delas apresentou 1,2% de células com fenótipo semelhante ao encontrado no diagnóstico na IMF por CF e a outra era o concentrado de células progenitoras mieloides. As mesmas amostras também foram detectadas na RT-PCR em tempo real (C_T 30 e 36). Contudo, a RT-PCR em tempo real também detectou o PML-RAR α em outras duas amostras que não havia sido detectado no método convencional. Ambas apresentaram C_T elevados de 38, o que confirma a menor quantidade de transcritos em relação às que foram detectadas em ambos os métodos. É importante salientar que essas duas amostras que tiveram o PML-RAR α detectado somente na RT-PCR em tempo real não apresentaram células com fenótipo semelhante ao encontrado no diagnóstico na IMF por CF (<0,001 e <0,0008) (Tabela 4).

O grau de concordância entre a RT-PCR pelo método convencional e em tempo real foi estimado pelo teste *kappa*. A concordância entre os testes foi moderada, com *kappa* igual a $0,595 \pm 0,244$; $p = 0,012$ (Tabela 5). No entanto, devido ao reduzido número de amostras, não foi possível o cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo.

Tabela 5 - Concordância entre RT-PCR-convencional e em tempo real para a detecção do PML-RAR α .

	RT-PCR em tempo real		Total	Concordância*
	Não detectado	Detectado		
RT-PCR convencional	11	4	15	Moderada
Não detectado	84,6% (11)	50,0% 2	100,0% (13)	
Detectado	0,0% (0)	50,0% 2	100,0% (2)	

***Kappa = 0,595 \pm 0,244; p = 0,012**

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE RT-PCR CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL VARIANDO OS REAGENTES DA EXTRAÇÃO, TRANSCRIÇÃO REVERSA E AMPLIFICAÇÃO.

Como a RT-PCR em tempo real apresentou duas amostras positivas (15%) que não haviam sido detectadas no método convencional, optou-se por investigar qual das três etapas do teste (extração do RNA, transcrição reversa ou detecção) é a mais importante para o aumento do limite de detecção. Para isso, cada uma dessas três etapas foi separada em dois testes, o primeiro usando os reagentes atualmente padronizados na rotina do hospital e o segundo com

os reagentes usados neste estudo (teste) conforme o fluxograma da Figura 18. Os resultados com amostras extraídas com o kit de extração de RNA da rotina podem ser observados na Tabela 6 e os resultados com amostras extraídas com kit de extração teste na Tabela 7.

Conforme pode ser observado na Tabela 6, as amostras que foram extraídas com o kit de extração de RNA e submetidas a transcrição reversa com a enzima da rotina apresentaram os mesmos resultados nas RT-PCR convencional e em tempo real. Dessas, duas amostras foram positivas, PML 504 e PML 544. Ambas as amostras foram positivas somente na *Nested*-PCR do teste convencional e apresentaram C_T elevados, de 36 e 37 na reação em tempo real. Já quando o mesmo RNA extraído com o kit da rotina foi submetido a transcrição reversa com a enzima utilizada no método teste, o número de amostras positivas aumentou para três com a PCR convencional (PML 504, PML 543 e PML 544) e quatro com a em tempo real (PML 504, PML 540, PML 543 e PML 544) (Tabela 4). O transcrito *bcr1* das amostras PML 504 e PML 544 foram detectados com a transcrição reversa da rotina somente na *Nested*-PCR, entretanto, com a enzima teste foram detectadas já na primeira PCR. O transcrito da amostra PML 540, que não havia sido detectada com a transcrição reversa utilizada na rotina, foi detectado somente na *Nested*-PCR com a transcrição reversa teste. Na amplificação do transcrito em tempo real, as amostras PML 504 e PML 544 – que apresentaram C_T de 36 e 37 com a transcrição reversa utilizada na rotina – apresentaram C_T menores com a transcrição reversa teste, 29 e 32, respectivamente. As amostras PML 540 e PML 543, cujos transcritos não foram detectados com a transcrição reversa da enzima utilizada na rotina, foram detectadas com a transcrição reversa teste e apresentaram C_T de 37 e 34, respectivamente.

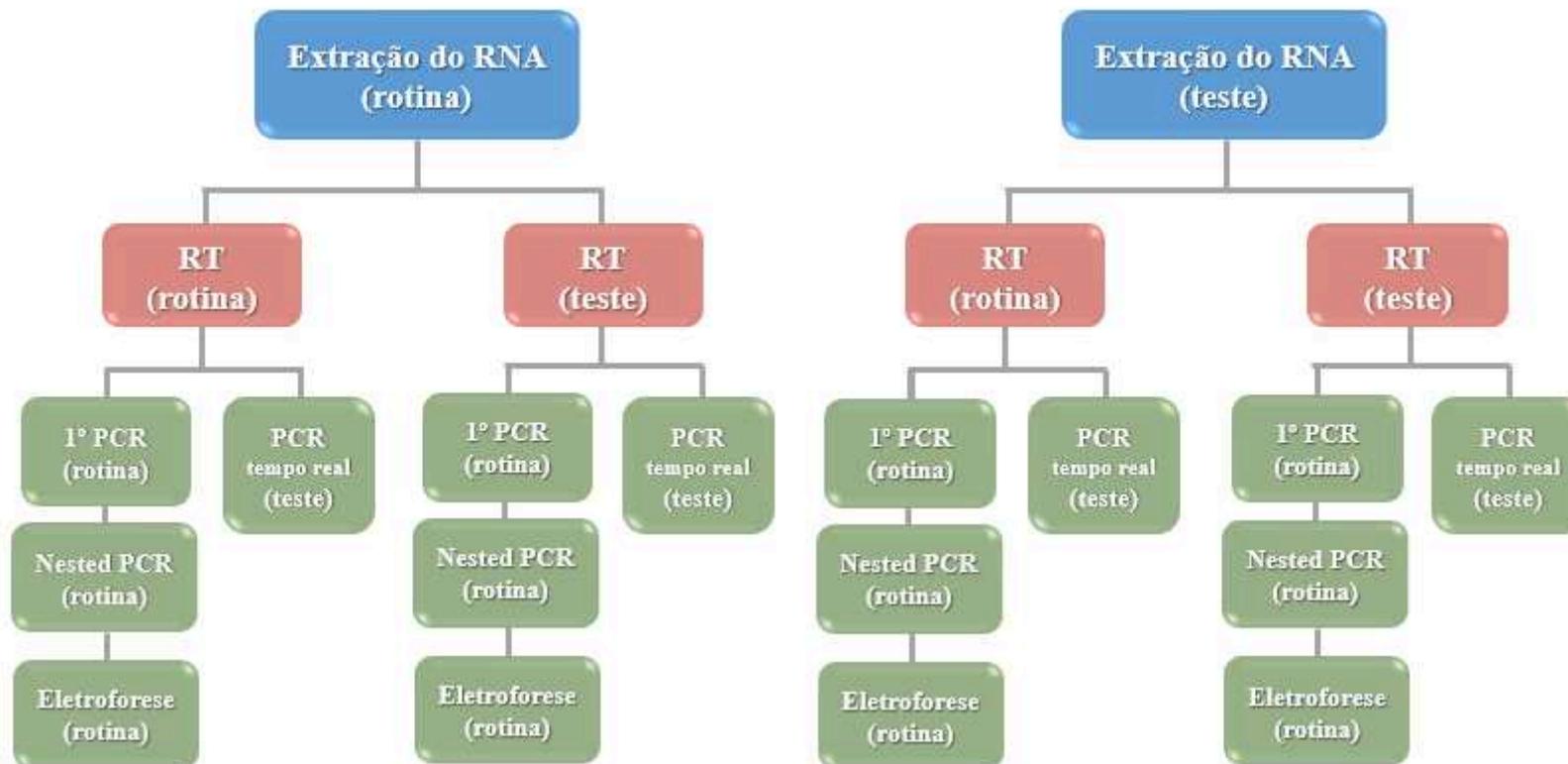
Um perfil semelhante pode ser observado com as amostras em que o RNA foi extraído com o kit teste da Qiagen. Conforme pode ser observado na Tabela 7, as amostras que foram submetidas a transcrição reversa com a enzima da rotina, Promega, apresentaram os mesmos resultados nas RT-PCR convencional e em tempo real, sendo que em duas amostras foram detectados os transcritos, PML 504 e PML 544. Enquanto na PML 504, o transcrito foi detectado desde a primeira PCR. Na PML 544 foi detectada somente na *Nested*-PCR do teste convencional. Essas amostras apresentaram C_T 31 e 39, respectivamente, na reação em tempo real. Já quando o mesmo RNA extraído com o kit teste foi submetido a transcrição reversa com a enzima teste, o número de amostras positivas para o transcrito aumentou para duas com a PCR convencional (PML 504 e PML 544) e quatro para a em tempo real (PML 504, PML 540, PML 543 e PML 544). Assim, como na transcrição reversa utilizada na rotina, na transcrição reversa utilizando a enzima teste o transcrito da amostra PML 504 foi detectada desde a primeira PCR e a PML 544 foi detectada somente na *Nested*-PCR. Na amplificação em tempo real, as

amostras PML 504 e PML 544 – que apresentaram C_T de 31 e 39 com a transcrição reversa da rotina – apresentaram C_T menores com a transcrição reversa teste, 30 e 36, respectivamente. As amostras PML 540 e PML 543, cujos transcritos não foram detectados com a transcrição reversa da rotina, foram detectados com a transcrição reversa teste e apresentaram C_T de 38.

Curiosamente, as amostras PML 540 e PML 543, nas quais os transcritos foram detectados nos ensaios com a transcrição reversa teste e amplificação em tempo real e não haviam sido detectadas na RT-PCR convencional, também não foram detectadas na IMF por CF, e o limite de detecção de cada uma foi 0,001 e 0,0008 %, respectivamente. Por outro lado, a amostra PML 502 apresentou 0,02% de células com fenótipo semelhante ao diagnóstico na IMF por CF e o transcrito PML-RAR α não foi detectado em nenhum dos oito testes de RT-PCR.

Quando os reagentes de extração, transcrição reversa e amplificação foram separados entre rotina e teste, pode-se observar que a maior diferença entre os resultados foi devido a qualidade da transcriptase reversa. Assim a qualidade da transcrição reversa é importante para melhor detecção do gene de fusão PML-RAR α nos pacientes em quimioterapia. Sendo que o maior número de resultados detectados, foram obtidos quando se utilizou a extração da rotina ou a extração teste, a transcrição reversa teste e a amplificação em tempo real.

Figura 18 - Fluxograma das etapas dos experimentos, variando os métodos utilizados na rotina com os métodos do teste.



Legenda: RNA: Ácido ribonucleico, RT: transcrição reversa, PCR: reação em cadeia da polimerase.

Tabela 6 - Características da casuística e resultados da RT-PCR com a extração de RNA da marca da rotina (Promega).

Código	Transcrito diagnóstico	Volume (mL) ¹	IMF por CF (%) ²	Extração RNA - Rotina			
				TR - Rotina		TR - Teste	
				PCR convencional	PCR em tempo real	PCR convencional	PCR em tempo real
PML 499	bcr1	2,0	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 500	bcr3	3,0	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 501	bcr1	3,0	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 502	bcr3	2,0	0,02	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 504	bcr1	2,0	1,20	Detectado (N)	Detectado (C_T 36)	Detectado (1)	Detectado (C_T 29)
PML 508	bcr1	2,0	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 510	bcr3	2,5	0,00035	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 513	bcr3	1,5	0,0002	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 540	bcr1	4,0	0,001	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Detectado (C_T 37)
PML 541	bcr3	4,0	0,0004	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 542	bcr1	4,0	0,0004	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 543	bcr1	4,0	0,0008	Não detectado	Não detectado	Detectado (N)	Detectado (C_T 34)
PML 544	bcr1	0,2 ³	-	Detectado (N)	Detectado (C_T 37)	Detectado (1)	Detectado (C_T 32)
PML 557	bcr3	1,7	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 558	bcr3	1,7	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado

Legenda: IMF: imunofenotipagem; CF: citometria de fluxo; RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase; C_T: ciclo *threshold*; N: *Nested-PCR*. ¹: volume de amostra usado para extração e RT-PCR em tempo real; ²: porcentagem de células com fenótipo semelhante ao encontrado no diagnóstico; ³: amostra de concentrado de células progenitoras hematopoiéticas.

Tabela 7 - Características da casuística e resultados da RT-PCR com a extração de RNA da marca em teste (Qiagen).

Código	Transcrito diagnóstico	Volume (mL) ¹	IMF por CF (%) ²	Extração RNA - Teste			
				TR - Rotina		TR - Teste	
				PCR convencional	PCR em tempo real	PCR convencional	PCR em tempo real
PML 499	bcr1	2,0	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 500	bcr3	3,0	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 501	bcr1	3,0	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 502	bcr3	2,0	0,02	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 504	bcr1	2,0	1,20	Detectado (1)	Detectado (C_T 31)	Detectado (1)	Detectado (C_T 30)
PML 508	bcr1	2,0	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 510	bcr3	2,5	0,00035	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 513	bcr3	1,5	0,0002	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 540	bcr1	4,0	0,001	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Detectado (C_T 38)
PML 541	bcr3	4,0	0,0004	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 542	bcr1	4,0	0,0004	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 543	bcr1	4,0	0,0008	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Detectado (C_T 38)
PML 544	bcr1	0,2 ³	-	Detectado (N)	Detectado (C_T 39)	Detectado (N)	Detectado (C_T 36)
PML 557	bcr3	1,7	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
PML 558	bcr3	1,7	-	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado

Legenda: IMF: imunofenotipagem; CF: citometria de fluxo; RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase; C_T: ciclo *threshold*; N: *Nested*-PCR. ¹: volume de amostra usado para extração e RT-PCR em tempo real; ²: porcentagem de células com fenótipo semelhante ao encontrado no diagnóstico; ³: amostra de concentrado de células progenitoras hematopoiéticas.

5.4 COMPARAÇÃO DOS CUSTOS DOS REAGENTES USADOS NA RT-PCR CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL

Na Tabela 8, podem ser observados os custos dos testes com base nos preços dos reagentes/insumos e nas quantidades usadas. Foram calculados os custos da RT-PCR convencional (utilizado atualmente na rotina ULAC/HU/EBSERH) e das RT-PCR em tempo real (método a ser implantado na ULAC/HU/EBSERH). Também foi calculado o custo dessa última reação caso ela fosse realizada com curvas de calibração para liberação do resultado de maneira quantitativa. Como a cada rodada do exame deve ser adicionado pelos menos três controles, e uma curva de calibração no caso do teste quantitativo, foram calculados também os valores caso fossem analisados de uma a cinco amostras simultaneamente.

Tabela 8 - Custo dos reagentes/insumos para cada teste de acordo com o número de amostras simultâneas

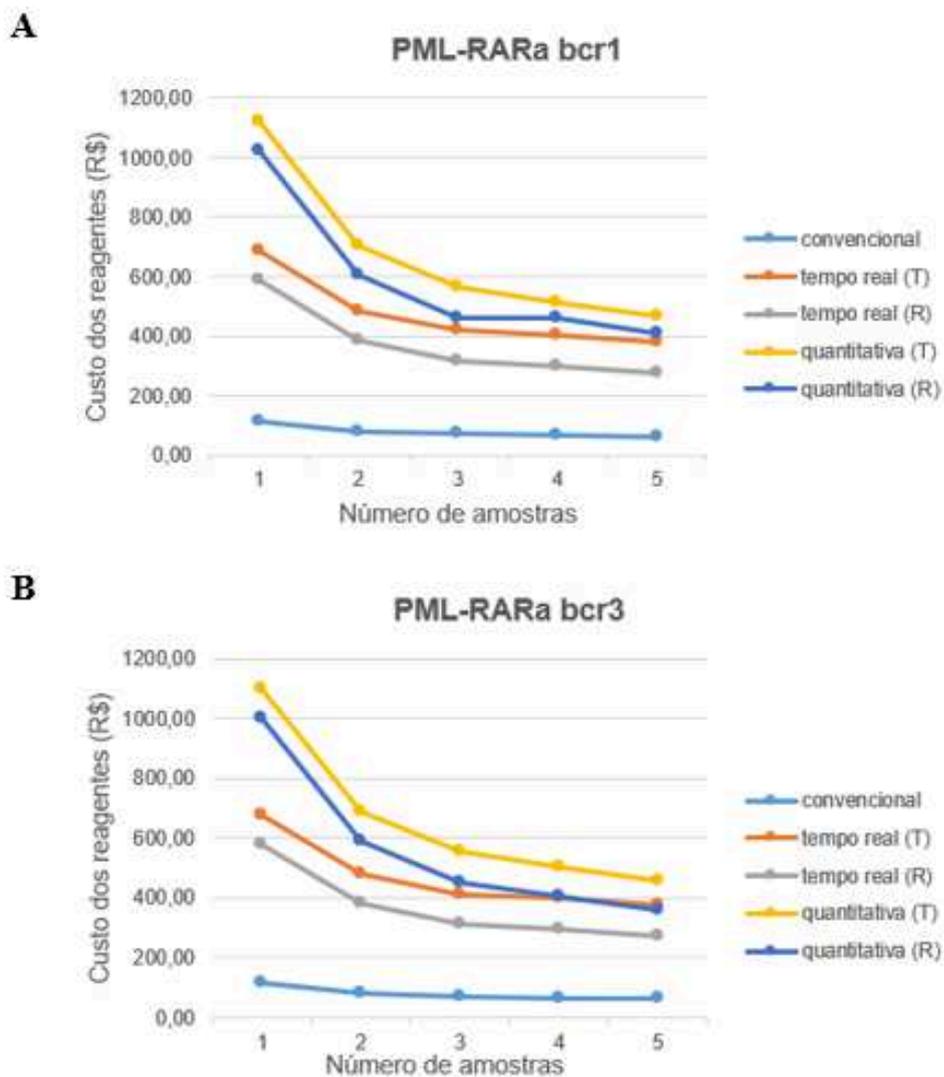
Teste	Transcritos	Custo dos reagentes/insumos de acordo com o número de amostras simultâneas (R\$)				
		1	2	3	4	5
A) RT-PCR convencional	bcr1 e bcr3	116,50	81,91	71,17	65,26	62,22
B) RT-PCR tempo real (extração teste)	bcr1	688,00	485,78	418,37	402,21	378,48
	bcr3	677,75	479,37	413,24	397,72	374,37
C) RT-PCR tempo real (extração rotina)	bcr1	587,81	385,59	318,18	302,02	278,29
	bcr3	577,56	379,18	313,05	297,53	274,18
D) RT-qPCR tempo real (extração teste)	bcr1	1123,31	703,43	563,47	511,03	465,54
	bcr3	1100,23	690,61	554,07	503,34	458,87
E) RT-qPCR tempo real (extração rotina)	bcr1	1023,12	603,24	463,28	463,28	410,84
	bcr3	1000,04	590,42	453,88	403,15	358,68

Conforme esperado, a RT-PCR convencional, apesar de possuir mais etapas e maior tempo de processamento, apresenta um custo consideravelmente menor que a técnica em tempo real. É importante salientar que os custos aqui analisados não levaram em consideração o tempo de processamento, o qual refletiria nos custos com salário de servidores e da infraestrutura do laboratório. A técnica de RT-PCR em tempo real apresentou um custo maior, porém, apesar da amostragem ter sido pequena, mostra uma maior sensibilidade, pois os transcritos foram detectados em um número maior de amostras, o que beneficia o monitoramento de pacientes em quimioterapia. A técnica com menor limite de detecção é útil no monitoramento dos pacientes com risco de recidiva da doença (CHENDAMARAI *et al.*, 2012). A RT-PCR em tempo real quantitativa possuiu o mesmo limite de detecção que sua versão qualitativa,

diferindo somente na presença de uma curva de calibração, o que permite a liberação do resultado em número de cópias ou número de cópias normalizada (em relação ao gene de referência). A RT-PCR quantitativa já é usada há alguns anos no monitoramento dos transcritos BCR-ABL da leucemia mieloide crônica (HUGHES *et al.*, 2006). O RT-PCR em tempo real qualitativo é incapaz de distinguir entre as quantidades decrescentes e crescentes de transcritos específicos, o que forneceria informações relevantes para o acompanhamento, diferente do método de RT-PCR em tempo real quantitativo. A possível quantificação da DRM oferece uma oportunidade para melhorar significativamente o prognóstico e desempenha um papel importante como parâmetro de estratificação para orientar a terapia adaptada ao risco. Contudo, não há essa recomendação para o monitoramento quantitativo dos transcritos PML-RAR α da LPA, sendo que o método qualitativo ainda é o preconizado (CICCONI *et al.*, 2018).

Como pode ser observado na Figura 19, quanto maior o número de amostras processadas simultaneamente, menor o custo para cada teste, pois os gastos com controles são diluídos entre os pacientes. O mesmo pode ser observado para o teste em tempo real quantitativo, que além de diluir os gastos com controles, também diminuiu com os testes gastos com as curvas de calibração. Assim, o custo pode chegar muito próximo ao teste qualitativo. Isso é útil em laboratórios com grandes rotinas onde várias amostras podem ser processadas ao mesmo tempo. Contudo, em laboratórios com uma rotina menor, o processamento simultâneo de várias amostras acarretaria um tempo de liberação do resultado superior a uma semana.

Figura 19 - Custo de cada teste de acordo com o número de amostras simultâneas.



Legenda: T = reagente teste (Qiagen); R = reagente da rotina (Promega).

6 CONCLUSÕES

Comparando-se a RT-PCR convencional e em tempo real, os resultados mostram:

- Uma concordância moderada entre a RT-PCR convencional e em tempo real.
- A RT-PCR em tempo real é mais sensível que a convencional para a detecção de concentrações iguais ou abaixo de 10^1 cópias de PML-RAR α bcr1.

- Comparando-se a RT-PCR convencional e em tempo real com 15 amostras de PML-RAR α , a RT-PCR em tempo real detectou o transcrito em quatro amostras, enquanto a RT-PCR detectou em duas, sendo que a concordância entre os testes foi moderada pelo teste *kappa*.

- Em relação a transcrição reversa, aquela utilizada como teste (Qiagen) foi mais eficiente do que a utilizada convencionalmente na rotina (Promega). Assim, observou-se que a qualidade da transcrição reversa é importante para melhor detecção do gene de fusão PML-RAR α nos pacientes em quimioterapia.

- A RT-PCR convencional apresentou um custo menor do que a em tempo real, porém não é a mais sensível.

- A RT-PCR em tempo real quantitativa apresenta um custo consideravelmente mais elevado que a mesma técnica qualitativa quando um ou dois pacientes são analisados simultaneamente. Esse custo pode diminuir conforme aumenta o número de amostras processadas, e chegar próximo ao custo da qualitativa, quando cinco ou mais amostras forem analisadas simultaneamente.

Nesse contexto, a melhor alternativa para substituição da RT-PCR convencional é a RT-PCR em tempo real qualitativa. Essa pode ser realizada por amostras extraídas pelo kit de extração de RNA atualmente usado na rotina (mais barato que o teste) e a transcrição reversa pelo kit teste. Vale ressaltar que o processamento simultâneo de várias amostras diminui o custo do teste e deve ser considerado sempre que não prejudique o tempo de liberação do laudo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.; NASSIRI, M. Acute Promyelocytic Leukemia: A Review and Discussion of Variant Translocations. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 139, n. 10, p.1308-1313, out. 2015.
- ADÈS L.; CHEVRET S.; RAFFOUX E.; DE BOTTON S.; GUERCI A.; PIGNEUX A. Is cytarabine useful in the treatment of acute promyelocytic leukemia? Results of a randomized trial from the European Acute Promyelocytic Leukemia Group. **Journal of Clinical Oncology**, Maisons-Laffitte, v. 24, n. 36, p. 5703–5710, dec. 2006.
- ALMEIDA, P. S. R.; SADDI, V. A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p.382-386, abr. 2007.
- ALTMAN, D.G. (1991). **Practical Statistics for Medical Research**. London: Chapman & Hall, p.404.
- ARBER, D.A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 127, n. 20, p.2391-2405, 11 abr. 2016.
- ARBUTHNOT, C.; WILDE J. T. Haemostatic problems in acute promyelocytic leukaemia. **Blood Reviews**, Washington, v. 20, p. 289–297, nov. 2006.
- BACHER, U.; HAFERLACH, T.; FEHSE, B.; SCHNITTGER, S.; KRÖGER, N. Minimal Residual Disease Diagnostics and Chimerism in the Post-Transplant Period in Acute Myeloid Leukemia. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 11, p. 310-319, 2011.
- BEITINJANEH, A.; JANG, S.; ROUKOZ, H.; MAJHAIL, N. S. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia: A systematic review. **Leukemia Research**, Seattle, v. 34, n. 7, p. 831-836, jul. 2010.
- BORROW, J.; GODDARD, A. D.; GIBBONS, B.; KATZ, F.; SWIRSKY, D.; FIORETOS, T.; DUBE, I.; WINFIELD, D. A.; KINGSTON, J.; HAGEMEIJER, A. Diagnosis of acute promyelocytic leukaemia by RT-PCR: detection of pml-rara and rara-pml fusion transcripts.: detection of PML-RARA and RARA-PML fusion transcripts. **British Journal of Haematology**, [s.l.], v. 82, n. 3, p. 529-540, nov. 1992.
- BRUNETTI, C.; ANELLI, L.; ZAGARIA, A.; MINERVINI, A.; MINERVINI, C. F.; CASIERI, P.; COCCARO, N.; CUMBO, C.; TOTA, G.; IMPERA, L. Droplet Digital PCR Is a Reliable Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukemia. **The Journal Of Molecular Diagnostics**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 437-444, maio 2017.
- CAMACHO, L. H.; SOIGNET, S. L.; CHANEL, S.; HO, R.; HELLER, G.; SCHEINBERG, D. A.; ELLISON, R.; WARRELL, R. P. Leukocytosis and the Retinoic Acid Syndrome in Patients With Acute Promyelocytic Leukemia Treated With

Arsenic Trioxide. **Journal of Clinical Oncology**, Maisons-Laffitte, v. 18, n. 13, p. 2620-2625, jul. 2000.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F.; YAMAMOTO, M. Classificação das Leucemias Agudas.: Citologia, Citoquímica, Imunofenotipagem, Citogenética e Genética Molecular. In: CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. F. (Org.). **Diagnósticos em hematologia**. São Paulo: Monale, 2016. Cap. 38. p. 335-342.

CHENDAMARAI, E.; BALASUBRAMANIAN, P.; GEORGE, B.; VISWABANDYA, A.; ABRAHAM, A.; AHMED, R.; ALEX, A. A.; GANESAN, S.; LAKSHMI, K. M.; SITARAM, U. Role of minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide in frontline therapy. **Blood**, [s.l.], v. 119, n. 15, p. 3413-3419, 12 abr. 2012.

CICCONI, L.; FENAUX, P.; KANTARJIAN, H.; TALLMAN, M.; SANZ, M. A.; LO-COCO, F. Molecular remission as a therapeutic objective in acute promyelocytic leukemia. **Leukemia**, [s.l.], v. 32, n. 8, p. 1671-1678, 19 jul. 2018.

CICCONI, L.; LO-COCO, F. Current management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. **Annals Of Oncology**, [s.l.], v. 27, n. 8, p.1474-1481, ago. 2016.

COOMBS, C C; TAVAKKOLI, M; TALLMAN, M S. Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. **Blood Cancer Journal**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.304-304, abr. 2015.

DAVID, S.; MATHEWS, V. Mechanisms and management of coagulopathy in acute promyelocytic leukemia. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 164, p. 82-88, abr. 2018.

DESCHLER, B.; LÜBBERT, M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. **Cancer**, [s.l.], v. 107, n. 9, p.2099-2107, 2006.

DUARTE, A. J. S.; SALES, M. M.; VASCONSELOS, D. M. Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa. São Paulo: **Atheneu**, 2013. 610 p.

FERRARA, F. Unanswered questions in acute myeloid leukaemia. **The Lancet Oncology**, Maryland Heights, v.5, p. 443-450, jul. 2004.

FUNKE, V.M. *et al.* O tratamento da Leucemia Mielóide Crônica com mesilato de imatinibe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 30, p.1-3, abr. 2008.

GABERT, J; *et al.* Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. **Leukemia**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.2318-2357, 9 out. 2003.

GLOBOCAN. **Leukaemia**. 2018. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/36-Leukaemia-fact-sheet.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2020.

GRANDO, A.C.; WAGNER, S.C. Avaliação laboratorial da doença residual mínima na leucemia mielóide crônica por Real-Time PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.433-440, dez. 2008.

GRIMWADE, D.; JOVANOVIC, J. V.; HILLS, R. K. Can we say farewell to monitoring minimal residual disease in acute promyelocytic leukaemia? **Best Practice & Research Clinical Haematology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 53-61, mar. 2014.

GRIMWADE, D.; LOCOCO, F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia.: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, [s.l.], v. 16, n. 10, p. 1959-1973, out. 2002.

HOFFBRAND, V.A. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HUGHES, T. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting bcr-abl transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. **Blood**, [s.l.], v. 108, n. 1, p. 28-37, 1 jul. 2006.

INCA. **Estatísticas de câncer**. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 10 mai 2020.

JÁCOMO, R. H.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; REGO, E. M. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.82-89, fev. 2008.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W., WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **International Agency for Research on Cancer**. Lion: IARC Press, 352p, 2002.

KANTARJIAN, H. M.; KEATING, M. J.; WALTERS, R. S.; SMITH, T. L.; MCCREDIE, K. B.; FREIREICH, E. J. Role of maintenance chemotherapy in acute promyelocytic leukemia. **Cancer**, [s.l.], v. 59, n. 7, p. 1258-1263, 1 abr. 1987.

KWAAN, H. C.; WANG, J.; BOGGIO, N. L. Abnormalities in Hemostasis in Acute Promyelocytic Leukemia. **Hematological Oncology**, Hoboken, v. 20, p. 33–41, oct. 2002.

LEAL, A.M.; KUMEDA, C. A.; VELLOSO, E. D. R. P.. Características genéticas da leucemia promielocítica aguda de novo. **Rev. Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.31, n.6, p. 454-462, dez. 2009.

LEATHE, L.H.; POON, B.B. Acute Leukemia. In: **DIPIRO, J. T. et al.** Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach. 7. ed. New York: The Mcgrow-hill Company, 2008. Cap. 137. p. 2259-2280.

LEE, D.; GRIGORIADIS, G.; WESTERMAN, D. The role of multiparametric flow cytometry in the detection of minimal residual disease in acute leukaemia. **Pathology**, [s.l.], v. 47, n. 7, p. 609-621, dez. 2015.

LENGFELDER, E.; SAUSSELE, S.; WEISSER, A.; BÜCHNER, T.; HEHLMANN, R. Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, New York, v. 56, p. 261–274, dec. 2005.

LIMA, M.C., *et al.* Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 92, n. 3, p.283-289, maio 2016. Elsevier BV.

LOPES, N. R.; ABREU, M. T. C. L. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.449-453, 2009.

MULLER, M. C. *et al.* An international study to standardize the detection and quantitation of BCR-ABL transcripts from stabilized peripheral blood preparations by quantitative RT-PCR. **Haematologica**, [s.l.], v. 92, n. 7, p.970-973, 1 jul. 2007.

NAEEM, M.; HARRISON, K.; BARTON, K.; NAND, S.; ALKAN, S. A unique case of acute promyelocytic leukemia showing monocytic differentiation after ATRA (all-trans retinoic acid) therapy. **Eur J Haematol**, Copenhagen, v.76, n. 2, p.164–166, 2006.

OELSCHLAEGEL, U.; MOHR, B.; SCHAICH, M.; SCHÄKEL, U.; KROSCHINSKY, F.; ILLMER, T.; EHNINGER, G.; THIEDE, C. HLA-DR^{neg} Patients Without Acute Promyelocytic Leukemia Show Distinct Immunophenotypic, Genetic, Molecular, and Cytomorphologic Characteristics Compared to Acute Promyelocytic Leukemia. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, Hoboken, v. 76, n. 5, p. 321–327, mar. 2009.

OHNISHI, K. PML-RAR α inhibitors (ATRA, tamibaroten, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia. **Int J Clin Oncol**, Tokyo, v. 12, n. 5, p. 313-317, oct. 2007.

ORAZI, A.; BENNETT, J. M.; GERMING, U.; BRUNNING, R. D.; BAIN, B. J.; THIELE, J.. Chronic Myelomonocytic Leukemia. In **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Ed. SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. 4 ed., WHO Press, Geneva, 2008.

OSWALD, N.. **What Is a Cq (Ct) Value?** 2015. Disponível em: <https://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/>.. Acesso em: 04 abril. 2020.

PALLOTTA, R.; RAMOS, E.; RIBEIRO, M. R.. Metodologia diagnóstica e tratamento da recaída após transplante de medula óssea em paciente com leucemia promielocítica aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 22, n. 3, dez. 2000.

PELLOSO, L. A. F.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F.; GHANAME, F. S.; YAMAMOTO, M.; BAHIA, D. M. M.; KERBAUY, J. Cariótipo em LMA: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 150-155, abr.-jun. 2003.

PUC CETTI, E.; RUTHARDT, M. Acute promyelocytic leukemia: PML/RAR α and the leukemic stem cell. **Leukemia**, Paris, v. 18, p. 1169–1175, apr. 2004.

RASMUSSEN, R.. **Dyes & Fluorescence detection chemistry in qPCR**: quantification on the lightcycler instrument. Quantification on the LightCycler Instrument. 2015. Disponível em: <http://dyes.gene-quantification.info/>. Acesso em: 05 abr. 2020.

RIBEIRO A. A. B.. A importância de exames laboratoriais no diagnóstico e monitoramento da leucemia promielocítica aguda com PML-RARA: relato de um caso raro. Monografia. **Florianópolis**: 2018.

RIBEIRO R, REGO R. Management of APL in developing countries: epidemiology, challenges and opportunities for international collaboration. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.**, p. 162-168, 2006.

SAGRILLO, M. R.; CARDOSO, S. H.; SILVA, L. R. J.; GRAÇA, C. H. N.; FERREIRA, E.; HAMERSCHLAK, N.; GUERRA, J. C. C.; BACAL, N. S.; ANDRADE, J. A. D.; BOROVNIK, C. L. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.1-7, jun. 2005.

SANZ, M. A.; MARTÍN, G.; GONZALEZ, M.; LEÓN, A.; RAYÓN, C.; RIVAS, C.; COLOMER, D.; AMUTIO, E.; CAPOTE, F. J.; MILONE, G. A.; SERNA J.; ROMÁN, J.; BARRAGÁN, E.; BERGUA, J.; ESCODA, L.; PARODY, R.; NEGRI, S.; CALASANZ, M. J.; BOLUFER, P. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. **Blood**, Washington, v. 103, n. 4, p. 1237-1243, feb. 2004.

SANZ, M. A.; GRIMWADE, D.; TALLMAN, M. S.; LOWENBERG, B.; FENAUX, P.; ESTEY, E. H.; NAOE, T.; LENGFELDER, E.; BÜCHNER, T.; DÖHNER, H.; BURNETT, A. K.; LO-COCO, F. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, Washington, v. 113, n. 9, p. 1875-1891, feb. 2009

SCHUURHUIS, G. J. *et al.* Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European Leukemia Net MRD Working Party. **Blood**, [s.l.], v. 131, n. 12, p.1275-1291, 22 mar. 2018.

SILVA, G. C.; PILGER, D. A.; CASTRO, S. M.; WAGNER, S. C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.77-82, abr. 2006.

SILVA, J. P. Avaliação de metodologias para detecção de doença residual mínima em leucemia mieloide aguda com alterações citogenéticas em pacientes atendidos no hospital universitário (hu/ufsc). Monografia. **Florianópolis**: 2018. 57 p.

STEFFENELLO-DURIGON, G.; BIGOLIN, A.; MORAES, A. C. R.; RUDOLF-OLIVEIRA, R. C.; MORAL, J. A. G.; SANTOS-SILVA, M. C.. Follow-up and outcome of the twelve-year experience in adult patients with acute promyelocytic leukemia. **Hematology, Transfusion And Cell Therapy**, [s.l.], “Online ahead of print”, jan. 2020.

STEWART, B. W.; WILD, C. P., editors. **World Cancer Report** 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014.

SUAREZ, E. R. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 67, p. 7-19, nov. 2010.

SWERDLOW, S. H. *et al.* WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **International Agency for Research on Cancer**. 2th Edition., 2008.

SWERDLOW, S.H. *et al.* WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **International Agency for Research on Cancer**. 4th Edition. Lyon, 2017. 2v.

TALLMAN, M. S.; ALTMAN, J. K. How I treat acute promyelocytic leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 114, n. 25, p.5126-5135, 10 dez. 2009.

TAKESHITA, A.; SHINJO, K.; NAITO, K.; MATSUI, H.; SAHARA, N.; SHIGENO, K.; SUZUMURA, T.; HORII, T.; SHIRAI, N.; MAEKAWA, M.; YADA, Y.; TESHIMA, H.; TAKEUCHI, J.; OHNISHI, K.; OHNO, R. Two Patients with All-trans Retinoic Acid–Resistant Acute Promyelocytic Leukemia Treated Successfully with Gemtuzumab Ozogamicin as a Single Agent. **International Journal of Hematology**, Hoboken, v. 82, n. 5, p. 445-448, dec. 2005.

TESTA, U.; LO-COCO, F. Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia: strategies to define high-risk patients. **Annals Of Hematology**, [s.l.], v. 95, n. 5, p.673-680, 26 fev. 2016.

THÉ, H.; PANDOLFI, P. P.; CHEN, Z. Acute Promyelocytic Leukemia: a paradigm for oncoprotein-targeted cure. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 32, n. 5, p. 552-560, nov. 2017.

THOMAS, X. Acute Promyelocytic Leukemia: A History over 60 Years—From the Most Malignant to the most Curable Form of Acute Leukemia. **Oncology and Therapy**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.33-65, 5 fev. 2019.

VAN DONGEN, J. *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. **Leukemia**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.1901-1928, dez. 1999.

VARMA, N.; VARMA, S. Proliferativa indices, cytogenetics, immunophenotype and other prognostic parameters in myelodysplastic syndromes. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v. 51(1), p. 97-101, 2008.

VELDEN, V. H. J. van Der *et al.* Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leukemia**, Rotterdam, v. 17, p.1013-1034, fev. 2003.

VIEIRA, D. P.. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. São Paulo: 2011. Disponível em:
<http://www.imt.usp.br/wpcontent/uploads/proto/protocolos/aula2.pdf>.

WALTER, R. B.; GOOLEY, T. A.; WOOD, B. L.; MILANO, F.; FANG, M.; SORROR, M. L.; ESTEY, E. H.; SALTER, A. I.; LANSVERK, E.; CHIEN, J. W.. Impact of Pretransplantation Minimal Residual Disease, As Detected by Multiparametric Flow Cytometry, on Outcome of Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 29, n. 9, p. 1190-1197, 20 mar. 2011.

WANG, Z-Y.; CHEN, Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. **Blood**, 111: 2505–2515, 2008.

WATTS, J. M.; TALLMAN, M. S.. Acute promyelocytic leukemia: what is the new standard of care?. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 28, n. 5, p. 205-212, set. 2014.

WREDE, J. E.; SUNDRAM, U.; KOHLER, S.; CHERRY, A. M.; ARBER, D. A.; GEORGE, T. I. Fluorescence in situ hybridization investigation of cutaneous lesions in acute promyelocytic leukemia. **Modern Pathology**, Indianapolis, v. 18, n. 12, p. 1569–1576, dec. 2005.

WU, Q.; ZHANG, R.; FU, Y.; ZHANG, J.; CHEN, K.; LI, J. External quality assessment for PML-RAR α detection in acute promyelocytic leukemia: findings and summary.: Findings and summary. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 1-7, 26 maio 2019.

YAMAMOTO, M. Imunofenotipagem em leucemias mieloides agudas. **Revista brasileira de Hematologia e hemoterapia.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 169-174, 2000.

ZHOU, G.; ZHANG, J.; WANG, Z.; CHEN, S.; CHEN, Z. Treatment of acute promyelocytic leukaemia with all-trans retinoic acid and arsenic trioxide: a paradigm of synergistic molecular targeting therapy. **Phil. Trans. R. Soc. B**, London, v. 362, n. 1482, p. 959–971, jun. 2007.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Investigação e análise dos pacientes com diagnóstico de doenças onco-hematológicas no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC).

Pesquisador: Giovanna Steffenello Durigon

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 61598816.7.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.376.974

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa de Giovanna Steffenello Durigon e colaboradores, que pretendem investigar e analisar os casos onco-hematológicos atendidos no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), para demonstrar o perfil dos pacientes. A metodologia constará de um estudo observacional, retrospectivo e/ou prospectivo, de caráter qualitativo e/ou quantitativo, por meio de análise de prontuários, análise clínica e laboratorial do paciente. Serão incluídos pacientes atendidos no HU/UFSC e aqueles com presença de doenças onco-hematológicas. Estão previstos 500 participantes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar e analisar os casos onco-hematológicos atendidos no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), para demonstrar o perfil dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Muito adequada. Os pesquisadores informam que haverá o risco de possíveis constrangimentos ao paciente e sobre a remota, involuntária e não intencional quebra de sigilo, que será tratada nos termos da lei.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Tinzade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

APÊNDICE A – POP para a RT-PCR em tempo real conforme as normas do manual de qualidade ULAC.

		UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO			
Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA		POP.ULAC.BML.001 - Página 1 de 10		
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RAR α		Emissão: 05/06/2020	Próxima revisão:	
			Versão: 01		

1. OBJETIVO(S)

Estabelecer regras para a RT-PCR em tempo real para PML-RAR α da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em conformidade com o MA.SGQ.002 MANUAL DE DIRETRIZES E REQUISITOS DO PROGRAMA E SELO EBSERH DE QUALIDADE, e com o item 5.5 do MANUAL PARA ACREDITAÇÃO DO SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE DE LABORATÓRIOS CLÍNICOS DO SISTEMA NACIONAL DE ACREDITAÇÃO – DICO/SBAC aplicado à norma brasileira ABNT NBR ISO 15189:2015 – LABORATÓRIOS CLÍNICOS – REQUISITOS DE QUALIDADE E COMPETÊNCIA, versão vigente.

2. MATERIAL

- Vide subitem 3.7, deste POP.

3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

3.1 Campo de aplicação

Aplicado no monitoramento molecular dos transcritos PML-RAR α bcr1 e bcr3 da t(15;17)(q22;q12) em amostras de aspirado de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LPA e em fase de manutenção da quimioterapia.

3.2 Siglas

- cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
- CIQ – Controle interno de qualidade
- CSB: Cabine de segurança biológica
- CT: Ciclo threshold
- EPI: Equipamento de proteção individual
- LPA: Leucemia promielocítica aguda
- RNA m : Ácido ribonucleico mensageiro
- PCR: Reação em cadeia da polimerase
- PML: Gene da leucemia promielocítica
- POP: Procedimento/Rotina
- RAR α : Receptor alfa do ácido retinoico
- RPE: Tampão de lavagem (Qiagen)
- RT-PCR: Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
- RW1: Tampão de lavagem
- SAH: Sistema de Administração Hospitalar
- ULAC: Unidade de Laboratório de Análises Clínicas

3.3 Terminologia e Definições

- Amostra do paciente: Parte do material biológico de origem humana utilizada para análises laboratoriais.
- Amostra controle: Material usado com a finalidade principal de monitorar a estabilidade e a reprodutibilidade de um sistema analítico nas condições de uso na rotina.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.BML.001 - Página 2 de 10	
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RARα	Emissão: 05/06/2020 Versão: 01	Próxima revisão:

- **Biossegurança:** Condição de segurança alcançada por um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal e o meio ambiente.
- **Cabine de Segurança Biológica (Capela de Fluxo Laminar):** Equipamento de insuflamento e exaustão completa de ar para proteção do produto, pessoal e ambiental.
- **Controle da Qualidade:** Técnicas e atividades operacionais utilizadas para monitorar o cumprimento dos requisitos da qualidade especificados.
- **Controle Interno da Qualidade – CIQ:** Procedimentos conduzidos em associação com o exame de amostras de pacientes para avaliar se o sistema analítico está operando dentro dos limites de tolerância pré-definidos.
- **Ciclo threshold (C_T):** O C_T corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para o início da amplificação, ou seja, momento em que a fluorescência emitida ultrapassa a linha do threshold. Dessa forma, o C_T tem relação inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo presente amostra.
- **RT-PCR (Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real:** Técnica de Biologia Molecular que permite replicação *in vitro* do DNA. Quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas e detectadas em tempo real por fluorescência, o que permite a detecção rápida e fiável dos marcadores genéticos de doenças infecciosas e genética.
- **Produto para diagnóstico de uso "in vitro":** Reagentes, padrões, calibradores, controles, materiais, artigos e instrumentos, junto com as instruções para seu uso, que contribuem para realizar uma determinação qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa de uma amostra biológica e que não estejam destinados a cumprir função anatômica, física ou terapêutica alguma, que não sejam ingeridos, injetados ou inoculados em seres humanos e que são utilizados unicamente para provar informação sobre amostras obtidas do organismo humano.
- **Vórtex mixer:** Equipamento comumente utilizado em laboratórios para misturar, de maneira rápida e vigorosa, pequenas quantidades de líquidos, através de movimentos circulares rápidos.

3.4 Princípio do método

A RT-PCR em tempo real utiliza o mRNA como ponto de partida, a partir do qual será sintetizado/transcrito o cDNA pela ação da transcriptase reversa. No RT-PCR em tempo real, a amplificação do material genético emite fluorescência, a qual é detectada durante a reação de PCR. A partir da intensidade de fluorescência emitida e das curvas de amplificação geradas é traçado um *cut-off* horizontal, o qual corresponde à fluorescência específica mínima na altura (eixo γ) da fase exponencial de amplificação gênica e corresponde ao threshold, utilizado para calcular o ciclo *threshold* (C_T) de cada amostra. Dessa forma, é possível detectar a presença do RNAm da fusão PML-RAR α bcr1 e bcr3 da t(15;17)(q22;q12) em amostras de aspirado de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LPA para avaliação da quimioterapia.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.BML.001 - Página 3 de 10	
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RARα	Emissão: 05/06/2020	Próxima revisão:
		Versão: 01	

3.5 Principais aplicações clínicas

Mais de 95% dos pacientes com Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) apresentam a t(15;17) que dá origem à fusão do gene *PML* com o gene *RAR α* do receptor do ácido retinoico, importante na diferenciação celular. Nesses pacientes a presença da fusão PML-RAR α por RT-PCR está relacionada à eficácia do tratamento com ácido trans-retinoico (ATRA). Em pacientes em tratamento, a reincidência do PML/RARA é forte indicativo de recidiva. Pacientes com resultados negativos apresentam maior probabilidade de estarem curados, sendo que este resultado deve ser avaliado em conjunto com a imunofenotipagem de MO para monitoramento da DRM. Dessa forma o exame é utilizado para o monitoramento molecular dos transcritos PML-RAR α bcr1 e bcr3 da t(15;17)(q22;q12) em amostras de aspirado de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LPA e em fase de manutenção da quimioterapia com o intuito de avaliar a resposta ao tratamento e detectar recidivas da doença.

3.6 Amostra biológica

Aspirado de medula óssea coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA.

A amostra deve ser coletada pelo médico hematologista e enviada ao laboratório, a temperatura ambiente, em até 3 horas após a coleta.

As amostras são recebidas de segunda a sexta-feira das 7:00 às 16:00 horas. Horários diferentes devem ser autorizados pelo setor técnico diante disponibilidade do responsável pelo processamento.

3.7 Padrões, calibradores, reagentes e insumos

- Kit RNeasy® Midi da Qiagen, para extração do RNAm
- Kit ipsogen RT da Qiagen
- Tampão de lise eritrocitária
- Etanol 70% grau Biologia Molecular
- Pipetas e ponteiras com filtro e livres de nucleases
- Tubos cônicos de 50 mL estéreis
- Tubos cônicos de 15 mL estéreis
- Estantes para tubos de 15 e 50 mL
- Cronômetro
- Caneta para tubos
- Descarte para resíduo biológico
- EPI (jaleco e luvas descartáveis)
- Gelo

3.8 Equipamentos

- Cabine de Segurança Biológica (CBS)
- Vórtex Mixer
- Refrigerador
- Microcentrífuga
- MasterCycle RealPlex 4 (Eppendorf®)

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.BML.001 - Página 4 de 10	
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RARα	Emissão: 05/06/2020 Versão: 01	Próxima revisão:

3.9 Procedimento detalhado

3.9.1 Recebimento da amostra

A rejeição de amostras deve ser minimizada pelo laboratório. Entretanto, as seguintes situações devem ser consideradas inaceitáveis:

- Os dados de identificação do paciente estiverem incompletos;
- Amostras com volume inferior a 2 mL;
- Amostras coaguladas.

Nos setores de Recepção e Triagem:

As amostras devem ser cadastradas no Sistema de Administração Hospitalar (SAH) de acordo com os seguintes códigos/nomes/sinonímias:

Código do exame	Nome	Sinonímias
PMLRARA	RT-PCR em tempo real para PML-RARA	RT-PCR para PML-RAR α RT-PCR para LPA RT-PCR para t(15;17)

No setor técnico:

- Conferir se o tipo de amostra para o exame foi cadastrado corretamente no sistema do laboratório;
- Rastrear o recebimento da amostra no setor no SAH da ULAC (conforme POP.ULAC.005 - RASTREABILIDADE NO SISTEMA DE ADMINISTRAÇÃO HOSPITALAR);
- Clicar em "Setor técnico", "Recebimento de material a examinar";
- Digitar o código de barras da etiqueta (ex. 170077117010);
- Clicar em OK, digitar a senha do profissional que está recebendo a amostra, gravar e fechar;
- Processar a amostra em até três horas após a coleta.

3.9.2 Extração do RNAm

Para a extração de RNAm utilizar o kit RNeasy® Midi.

- Para cada volume de aspirado de medula óssea adicionar cinco volumes de tampão de lise eritrocitária (hemólise) em um tubo de 50 mL (ex.; 2 mL de amostra e 10 mL de tampão; 4 mL de amostra e 20 mL de tampão);
- Incubar a mistura por 15 minutos em gelo;
- Centrifugar a 400 x g por 10 minutos a 4°C;
- Descartar o sobrenadante, preservando o sedimento de leucócitos;
- Adicionar dois volumes de tampão de lise eritrocitária e ressuspender os leucócitos;
- Centrifugar a 400 x g por 10 minutos a 4°C;
- Remover e descartar o sobrenadante;
- Ressuspender o sedimento de leucócitos com 2 mL de tampão de lise;
- Misturar a amostra com um agitador de vórtex durante 10 segundos;
- Adicionar 2 mL de etanol 70%;
- Misturar a amostra vigorosamente durante 10 segundos;

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.BML.001 - Página 5 de 10	
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RARα	Emissão: 05/06/2020 Versão: 01	Próxima revisão:

- Transferir a amostra para uma coluna RNeasy Midi com membrana filtrante de sílica gel, acoplada a um tubo de 15 mL;
- Centrifugar a coluna com a amostra por 5 minutos a 3000 x g;
- Descartar o filtrado e acrescentar 4 mL de tampão de lavagem (RW1);
- Centrifugar a amostra por 5 minutos a 3000 x g e descartar novamente o filtrado;
- Acrescentar 2,5 mL de tampão de lavagem (RPE);
- Centrifugar por 2 minutos a 3000 x g e descartar o filtrado;
- Acrescentar novamente 2,5 mL de tampão de lavagem (RPE);
- Centrifugar por 5 minutos a 3000 x g e descartar o filtrado;
- Transferir a coluna para um novo tubo de coleta de 15 mL;
- Adicionar 100 μ L de água livre de nuclease diretamente sobre a membrana de sílica gel;
- Incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto;
- Centrifugar o tubo por três minutos a 3000 x g para eluir o RNAm;
- Armazenar a -20°C até a síntese do cDNA;

3.9.3 Transcrição Reversa (RT)

Para esse procedimento, utilizar o Kit Ipsogen RT:

- Incubar 10 μ L de RNA por cinco minutos a 65°C;
- Após a incubação, centrifugar brevemente e manter em gelo por 5 minutos;
- Preparar uma pré-mistura (Master Mix), para a transcrição reversa de acordo com o número de amostras, conforme a tabela 1:

Tabela 1 - Preparação da pré-mistura para transcrição reversa.

Reagentes	Concentração final	Volume por reação (μ L)
Tampão da transcriptase reversa (5x)	1x	5,0
dNTPs (10 mM)	0,8 mM	2,0
Random nonomêros (100 μ M)	21 μ M	5,25
Inibidor de RNase (40 U/ μ L)	0,8 U/ μ L	0,5
DTT (25M)	0,1M	1,25
Transcriptase reversa (200 U/ μ L)	8 U/ μ L	1,0
Volume Final	-	15,0

- Adicionar 15 μ L dessa pré-mistura a cada amostra de RNA;
- Utilizar água livre de nuclease como controle negativo;
- Homogeneizar e centrifugar brevemente todas as amostras;
- Levar ao termociclador e incubar por: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C, 5 minutos a 85°C para inativação, e 5 minutos a 4°C;
- Ao final, centrifugar brevemente as amostras e armazenar o cDNA a -20°C até a realização da PCR em tempo real.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.BML.001 - Página 6 de 10	
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RAR α	Emissão: 05/06/2020 Versão: 01	Próxima revisão:

3.9.4 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

- Preparar uma pré-mistura (Master Mix) de acordo com o número de amostras acrescido de três controles, conforme a tabela 2:

Tabela 2 - Preparação da pré-mistura para PCR em tempo real.

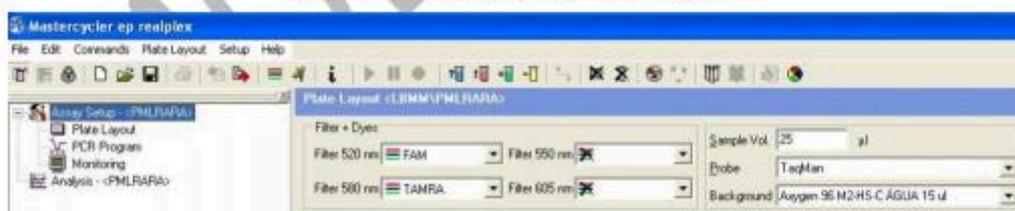
Reagentes	Volume por reação (uL)
Água livre de nucleases	6,5
Master Mix da PCR (2x)	12,5
Mistura de iniciadores e sondas (25x)	1,0
Volume Final	20,0

- Transferir 20 μ L dessa pré-mistura para casa tubo;
- Acrescentar 5 μ L do produto obtido na transcrição reversa (cDNA);
- Homogeneizar suavemente e centrifugar brevemente;
- Incubar em termociclador MasterCycle RealPlex 4 (Eppendorf[®]) conforme programação de temperaturas sugeridas pelo fabricante do kit.

3.9.5. Preparo do MasterCycle RealPlex 4

- Ligar o equipamento MasterCycle RealPlex 4 e, em seguida, ligar o computador;
- Esperar a luz do equipamento mudar de laranja para verde;
- Abrir o software com um duplo clique no ícone RealPlex e aguardar carregar na tela do computador;
- Iniciar a sessão no software do sistema utilizando o nome de login "LBMM" e senha "ufsc";
- Para criar um teste, dar duplo clique no ícone "arquivo" e selecionar o template "PML-RARA";
- Clicar em "Assay Setup", conferir as seguintes configurações específicas do teste (figura 1);

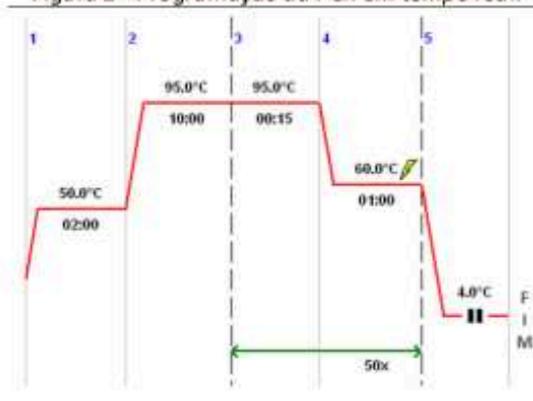
Figura 1- Configurações específicas do teste



- Em seguida, clicar em "Plate Layout", para identificar as amostras;
- Clicar em "PCR Program" e conferir as temperaturas e ciclos da reação;

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.BML.001 - Página 7 de 10	
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RARα	Emissão: 05/06/2020	Próxima revisão:
		Versão: 01	

Figura 2 - Programação da PCR em tempo real.



- Distribuir as amostras no equipamento conforme o layout criado para identificação;
- Clicar no triângulo verde presente na barra de tarefas superior para começar o teste.
- Nota: A detecção da amplificação do material genético é realizada em tempo real pela detecção de fluorescência do fluoróforo FAM.

3.9.6 Descarte da amostra e reagentes

- Material biológico: Descartar em lixeira específica com saco transparente de autoclave.
- Frascos de tampões usados: Descartar em lixeira específica com saco laranja.
- Restos de tampão: Descartar em frasco de resíduo químico com identificação dos reagentes.
- Demais materiais: Devem ser descartados em lixeira de resíduo comum ou de material reciclável, quando for o caso.

3.10 Cálculos (quando aplicável)

Não se aplica.

3.11 Controles da qualidade interno e externo

A cada rodada de testes devem ser adicionados três controles: (1) paciente negativo, (2) paciente positivo e (3) controle sem material genético.

Para cada amostra deve ser testada um controle interno, o gene ABL, que é constitutivamente expresso nos leucócitos.

3.12 Valores de referência (quando houver)

Valor de referência: PML-RAR α não detectado.

3.13 Interpretação

A partir da intensidade de fluorescência emitida e das curvas de amplificação geradas, é traçado um *cut-off* horizontal que corresponde à fluorescência específica mínima na altura (eixo y) da fase exponencial de amplificação gênica e corresponde ao threshold, que é utilizado para calcular o ciclo threshold (C_T) de cada amostra (figura 3). O C_T corresponde ao número

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.BML.001 - Página 8 de 10	
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RARα	Emissão: 05/06/2020	Próxima revisão:
		Versão: 01	

de ciclos de PCR necessários para o início da amplificação, ou seja, momento em que a fluorescência emitida ultrapassa a linha do threshold. Dessa forma, o C_T tem relação inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo presente amostra.

Figura 3 - Representação esquemática de um gráfico de RT-PCR em tempo real.



Os resultados são relatados de forma qualitativa como:

- Detectado: genes ABL e PML-RAR α com $C_t \leq 40$;
- Não detectado: gene ABL com $C_t < 40$ e PML-RAR α sem amplificação $C_t > 40$;
- Inconclusivo: genes ABL e PML-RAR α sem amplificação.

3.14 Valores críticos (quando houver)

A detecção do PML-RAR α deve ser relatada ao médico solicitante no momento da liberação do laudo, conforme POP.ULAC.008 COMUNICAÇÃO DE RESULTADOS CRÍTICOS DE LABORATÓRIO, e seu relato registrado em FOR.ULAC.002 COMUNICAÇÃO DE RESULTADO CRÍTICO.

3.15 Linearidade e limites de detecção (quando aplicável)

Foram testadas 5 concentrações de cópias de PML-RAR α , sendo que a reação detectou de 106 a 101 cópias.

Por se tratar de um método ainda qualitativo, não foi estipulada a linearidade do teste.

4. CONTROLE DE REGISTROS

Identificação do registro	FOR.ULAC.002 COMUNICAÇÃO DE RESULTADO CRÍTICO
Responsável pela coleta	Gestão da Qualidade
Responsável pelo acesso	Gestão da Qualidade
Local do arquivamento	Pasta digital
Forma de armazenamento	Digital
Tempo de guarda	5 anos



Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.BML.001 - Página 9 de 10	
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RARα	Emissão: 05/06/2020 Versão: 01	Próxima revisão:

5. REFERÊNCIAS

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS. Manual para acreditação do sistema de gestão da qualidade de laboratórios clínicos do sistema nacional de acreditação – DICQ. 7ª Edição, 2019.

ABNT NBR ISO 15189:2015 – LABORATÓRIOS CLÍNICOS – REQUISITOS DE QUALIDADE E COMPETÊNCIA.

EBSERH – HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO. MA.SGQ.002 Manual de diretrizes e requisitos do programa e selo EBSERH de qualidade. Versão 1, 2020.

EBSERH – HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO. NO.SGQVS.001 Norma operacional – elaboração e controle de documentos institucionais. Versão 2, 2019.

EBSERH - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO. UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS. REL.ULAC.001 Elaboração e Controle de Documentos. Versão 1, 2020.

EBSERH - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO. UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS. POP.ULAC.008 Comunicação de resultados críticos de laboratório. Versão 1, 2020.

EBSERH - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO. UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS. POP.ULAC.005 -Rastreabilidade no Sistema de Administração Hospitalar. Versão 1, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre o “Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos” Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 13 out. 2005.

ANDRIOLO, A. et al. Amostras para diagnóstico molecular. In: Gestão da Fase Pré-Analítica: Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, 2010.

BOROVIK, C.L.; TAJARA, E.H.; ROCHA, J.C.; FARAH, L.M.S.; NACCACHE, N.F.; NETTO, N.F.M.; JOFFE, R. Guia de boas práticas laboratoriais em citogenética e genética molecular humana. Sociedade Brasileira de Genética.

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, Norma PALC: versão 2016.

Technical Manual – GoTaq® Probe qPCR Master Mix: Instructions for Use of Products (A6101 and A6102). Disponível em: <http://ulab360.com/files/prod/manuals/201407/17/541495001.pdf>. Acesso em: 03/10/2019.

Technical Manual – Ipsogen® FusionQuant® Handbook (670013, 670113, 670213, 670313, 670413, 670513, 672113, 672213, 672313, 675013, 675113, 676013, 670115). Qiagen, Hilden, Germany.

Technical Manual – Ipsogen® RT Handbook (679913). Qiagen, Hilden, Germany.

Technical Manual – RNeasy® Midi/Maxi Handbook (75144). Qiagen, Hilden, Germany.



Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.ULAC.BML.001 - Página 10 de 10	
Título do Documento	RT-PCR em tempo real para PML-RARα	Emissão: 05/06/2020 Versão: 01	Próxima revisão:

6. HISTÓRICO DE REVISÃO

VERSÃO	DATA	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO
1	05/06/2020	Sem alterações/documento inicial

Elaboração/Revisão Victória Caroline Hess – Graduação em Farmácia Camila Matiollo – Biologia Molecular ULAC	Data: 29/05/2020
Análise Clarice Iomara Silva – Gestão da Qualidade ULAC	Data: 04/06/2020
Validação Clarice Iomara Silva – Gestão da Qualidade ULAC	Data: 04/06/2020
Aprovação Alessandro Rafael Beseke – Chefe da ULAC	Data: 05/06/2020