

Jéssica Pires da Silva

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE DOENÇA
RESIDUAL MÍNIMA EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM
ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM PACIENTES ATENDIDOS NO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO (HU/UFSC)**

Florianópolis

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Jéssica Pires da Silva

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL
MÍNIMA EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM ALTERAÇÕES
CITOGENÉTICAS EM PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO (HU/UFSC)**

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 conclusão do Curso de Graduação em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia Santos da Silva

Co-orientadora: Camila Matiollo

Florianópolis

2018

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

SILVA, JESSICA PIRES DA SILVA

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO (HU/UFSC) / JESSICA PIRES DA SILVA SILVA ; orientador, MARIA CLAUDIA SANTOS DA SILVA SANTOS-SILVA, coorientador, CAMILA MATIOLLO MATIOLLO, 2018. 57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. LMAs. 3. Citometria de fluxo. 4. Imunofenotipagem. 5. RT-PCR;. I. SANTOS-SILVA, MARIA CLAUDIA SANTOS DA SILVA. II. MATIOLLO, CAMILA MATIOLLO. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

RESUMO

A leucemia mieloide aguda (LMA) surge a partir de uma alteração genética em um precursor comprometido com a linhagem mieloide, o qual se expande e pode adquirir mutações genéticas adicionais. Isso resulta em uma proliferação de células precursoras mieloides neoplásicas, o que ocasiona uma geração insuficiente de células normais como leucócitos, plaquetas e eritrócitos, o que afetará a defesa imunológica e homeostase do indivíduo. Uma grande quantidade de anormalidades citogenéticas recorrentes nas LMAs são conhecidas, por exemplo, t(15,17) /PML-RARA transcrito BCR3 que caracteriza a leucemia promielocítica aguda (LPA).

Segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), o diagnóstico da LMA é definido pela avaliação morfológica, imunofenotipagem (IMF), e avaliação genética (citogenética e biologia molecular) das células neoplásicas.

O tratamento nas leucemias em geral, têm como objetivo reduzir ou eliminar as células neoplásicas de forma que levem o paciente à remissão da doença. O monitoramento da eficácia do tratamento pode ser feito pela detecção de doença residual mínima (DRM). A pesquisa de DRM em LMA tem como objetivo identificar os pacientes que apresentam maior risco de recidiva e pior prognóstico, em que, a detecção de DRM após a primeira ou segunda indução, ou ao final do tratamento, onde, quando detectada em altas porcentagens, considera-se alto risco para recidiva da doença e pior prognóstico na avaliação da eficácia terapêutica. O monitoramento da DRM permite realizar o acompanhamento do tratamento dos pacientes e melhorar seus resultados, pois possibilita que alterações na terapia em uso sejam feitas conforme resposta ao tratamento. Por isso, a realização de métodos para pesquisa da DRM com alta sensibilidade e especificidade são essenciais para o monitoramento terapêutico, pois a partir deles é possível detectar uma recidiva com antecedência.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o resultado encontrado no teste de sensibilidade realizado pela transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) utilizada pelo Setor de Onco-hematologia do Laboratório de Análises do HU-UFSC não apresenta sensibilidade semelhante àquela referenciada na literatura, pela qual foi observado um valor máximo de detecção de 10^{-1} de células neoplásicas, o que corresponde a uma diluição de 10% de RNA do paciente. Por outro lado, os resultados analisados da IMF por citometria de fluxo (CF), mostram que o protocolo *Bulk Lysis* é sensível para detecção DRM em pacientes portadores de LMA, inclusive nos casos de LPA.

Esses resultados mostram a metodologia com melhor sensibilidade para detecção de DRM realizada no HU-UFSC, atualmente, é a IMF por CF. Para os exames moleculares, por ainda serem considerados padrão ouro de detecção de DRM em diagnósticos em que estão presentes, sugere-se investir em um método com maior sensibilidade como a transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCT).

Palavras chave: LMAs; Citometria de fluxo; Imunofenotipagem; RT-PCR; DRM; Avaliação de sensibilidade;

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) arises from a genetic change in a precursor committed to the myeloid lineage, which expands and may acquire additional genetic mutations. This results in a proliferation of neoplastic myeloid precursor cells, which causes insufficient generation of normal cells such as leukocytes, platelets and erythrocytes, which will affect the immune defense and homeostasis of the individual. A large amount of recurrent cytogenetic abnormalities in AMLs are known, for example, t (15,17)/PML-RARA transcript BCR3 which characterizes acute promyelocytic leukemia (APL).

According to World Health Organization (WHO) criteria, the diagnosis of AML is defined by morphological evaluation, immunophenotyping (IMF), and genetic (cytogenetic and molecular biology) evaluation of neoplastic cells.

Treatment in leukemias generally aims to reduce or eliminate neoplastic cells in a way that will lead the patient to remission of the disease. Monitoring of treatment efficacy can be done by detecting minimal residual disease (DRM). The aim of this study was to identify patients with a higher risk of relapse and worse prognosis, in which the detection of DRM after the first or second induction, or at the end of treatment, where, when detected in high percentages, it is considered a high risk for relapse of the disease and worse prognosis in the evaluation of therapeutic efficacy. DRM monitoring allows the monitoring of the treatment of patients and improve their results, as it allows changes in therapy in use to be made in response to treatment. Therefore, the realization of DRM research methods with high sensitivity and specificity are essential for the therapeutic monitoring, since from them it is possible to detect a relapse in advance.

The results obtained in the present work show that the sensitivity found in the sensitivity test performed by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) used by the Onco-hematology Sector of the HU-UFSC Analysis Laboratory does not present similar sensitivity to that referenced in the literature, where a maximum value of disease detection was found in 10^{-1} , corresponding to a 10% dilution of neoplastic RNA of the patient. On the other hand, the results analyzed from the IMF by flow cytometry (CF), show that the Bulk Lysis protocol is sensitive for DRM detection in patients with AML, even in cases of LPA.

With this, it is concluded that the methodology with the best sensitivity for detection of DRM performed in HU-UFSC, currently, is the IMF by CF. For the molecular tests, because they are still considered gold standard of DRM detection in diagnoses in which they are present, it is suggested to invest in improvement in the method used for one with more sensitivity as the reverse transcription followed by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCT).

Keywords: LMAs; Flow cytometry; Immunophenotyping; RT-PCR; DRM; Sensitivity assessment;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Teste de sensibilidade para detecção de PML/RARA transcrito bcr3 pelo método de RT-PCR Nested.	37
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Classificação das LMAs e neoplasias mieloides relacionadas – OMS 2017	9
Quadro 2- Painel de anticorpos para detecção de DRM em LPA.	15
Quadro 3- Recomendações do ELN para avaliação do DRM por IMF por CF e Biologia Molecular.....	16
Quadro 4- Marcadores de proteínas de superfície e citoplasmáticos triagem	24
Quadro 5 - Marcadores de proteínas de superfície e citoplasmáticos LMAs	24
Quadro 6- Sequência dos iniciadores para a pesquisa das translocações cromossômicas	27
Quadro 7- Tamanho esperado dos produtos de PCR para a pesquisa das translocações cromossômicas, segundo o par de iniciadores utilizado.....	28
Quadro 8- Análise de DRM de um caso de LPA com t(15,17).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantificação RNA da amostra.....	29
Tabela 2- Quantificação RNA controle normal e pool negativo	29
Tabela 3- Concentração ([]) de RNA das amostras por tubo	30
Tabela 4- Volume final utilizado no teste, com os volumes respectivos de RNAs.....	30
Tabela 5- Digestão com DNase da marca Promega	30
Tabela 6- Master Mix cDNA - Transcrição reversa	31
Tabela 7- Master Mix GAPDH	32
Tabela 8- Master MIX 1° RT-PCR	32
Tabela 9- Master MIX Nested-PCR	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1	LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS	7
2.2	CLASSIFICAÇÃO DAS LMAS	7
2.3	DIAGNÓSTICO DAS LMAS	9
2.4	IMF POR CITOMETRIA DE FLUXO	11
2.5	GENÉTICA MOLECULAR	12
2.6	TRATAMENTO DAS LMAS	12
2.7	DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA (DRM)	13
3	JUSTIFICATIVA	19
4	OBJETIVOS	21
4.1	OBJETIVO GERAL	21
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5	CASUÍSTICA E MÉTODOS	23
5.1	CASUÍSTICA	23
5.2	DIAGNÓSTICO E DETECÇÃO DE DRM POR IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	23
5.3	DETECÇÃO DE DRM POR NESTED RT-PCR QUALITATIVO	26
5.4	TESTE DE SENSIBILIDADE DA RT-PCR PARA t(15,17)/PML-RARA TRANSCRITO BCR3	28
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	49

1 INTRODUÇÃO

Uma estimativa mundial realizada pela GLOBOCAN em 2012 apontou cerca de 14 milhões de novos casos de câncer no mundo, com maior incidência nos países em desenvolvimento, onde são registrados aproximadamente 60% dos casos. Além disso, com relação à mortalidade, os países em desenvolvimento mostraram uma piora na estimativa na mortalidade, pois dos oito milhões de óbitos registrados em decorrência das neoplasias, 70% ocorreram nesses países (GLOBOCAN, 2012).

O câncer é um problema de saúde pública, e é a segunda causa mais frequente de morbidade e mortalidade dentro das doenças e agravos não transmissíveis. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que ocorrerão cerca de 600 mil casos novos de câncer para os anos de 2018 e 2019. Dos casos novos de leucemia, estima-se que 5.940 serão diagnosticados em homens e 4.860 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,75 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 casos novos para cada 100 mil mulheres, ocupando a nona e décima posições, respectivamente (INCA 2018).

As leucemias compreendem uma expansão clonal de células hematológicas que podem ocorrer em diferentes fases da diferenciação celular, onde classificam-se entre agudas e crônicas, e podem afetar precursores linfóides ou mielóides durante a hematopoese. As leucemias agudas são caracterizadas por uma expansão clonal de células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea (MO), no sangue periférico (SP) ou em outros tecidos. Essa expansão ocorre devido à proliferação descontrolada de uma célula progenitora neoplásica, na qual se observa a perda do controle dos mecanismos de regulação da sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, dando origem a clones idênticos (HOFFBRAND et al., 2008; SWERDLOW et al., 2017).

As leucemias apresentam diferenças quanto à patogênese, ao prognóstico e à resposta ao tratamento. As leucemias agudas, em geral, são mais agressivas e apresentam piores prognósticos e, se não tratadas adequadamente, podem levar o paciente a óbito em dias ou semanas. Por outro lado, nas leucemias crônicas, o curso clínico é mais brando e assim, são consideradas doenças menos agressivas e com melhor prognóstico (HOFFBRAND et al., 2008).

O diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA) é geralmente considerado quando são encontrados 20% ou mais de mieloblastos leucêmicos no SP ou na MO. Porém, nos casos em que a LMA está associada a anormalidades genéticas recorrentes, como, por exemplo, leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17)(q22,q12), LMA com t(8;21)(q22,q22) ou

LMA com $\text{inv}(16)(p13.1q22)$ ou $\text{t}(16;16)(p13.1;q22)$, o diagnóstico é feito independentemente da contagem de mieloblastos (WEINBERG et al., 2009; ARBER et al. 2016; SWERDLOW et al., 2017). Para o diagnóstico correto e preciso das leucemias agudas, deve-se considerar a análise da apresentação clínica do paciente e correlacioná-la com os resultados da morfologia, da citocímica, da (IMF) e das alterações genéticas das células neoplásicas (SWERDLOW et al., 2017).

Dependendo do subtipo de leucemia, o protocolo de tratamento envolve radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, transplante de medula óssea ou uma combinação dessas (GOL et al., 2001; BRAUNWALD et al., 2002). No entanto, apesar de apresentarem resposta ao tratamento, alguns pacientes podem apresentar recaídas e ir a óbito aproximadamente dois anos após atingirem a remissão (SHIPLEY & BUTERA, 2009). Essa situação pode ser prevenida, quando, no acompanhamento dos pacientes em tratamento, são utilizados métodos adequados para detecção de DRM. A DRM pode ser definida como o limite mínimo de detecção de doença, e quando detectada prematuramente, e/ou ainda durante o tratamento inicial, há possibilidade de trocas e remanejamentos de ações terapêuticas que podem auxiliar na improbabilidade de uma recidiva (MICHÁLEK & SMARDA, 2000).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

A LMA surge a partir de uma alteração genética em uma única célula-tronco pluripotente ou em um precursor comprometido com a linhagem mieloide, o qual se expande e pode adquirir mutações genéticas adicionais. Isso resulta em proliferação de células precursoras mieloides neoplásicas, o que ocasiona uma produção insuficiente de células normais como leucócitos, plaquetas e eritrócitos, o que afetará a defesa imunológica e homeostase do indivíduo. Os mieloblastos leucêmicos, apesar de perderem a capacidade de diferenciação, mantêm a capacidade de multiplicação, o que é característico em células neoplásicas. Além disso, a inibição dos fatores apoptóticos culmina em uma população monoclonal de células leucêmicas (SILVA et al., 2006; LEATHE et al. 2008).

As LMAs podem ocorrer em todas as faixas etárias, no entanto, são mais frequentes em adultos e a incidência aumenta com a idade (HOFFBRAND et. al. 2008), visto que mais de 50% dos casos ocorrem em indivíduos acima de 60 anos e há predomínio do gênero masculino (SILVA et al., 2006). Na infância, as LMAs representam de 15 a 20% dos casos de leucemias agudas e também cerca de 30% das mortes (LIMA et al., 2016). Essas neoplasias apresentam as menores taxas de sobrevivência entre todos os subtipos de leucemias (DESCHLER et al., 2006) e as principais causas de óbito, tanto em adultos quanto em crianças, são as infecções, episódios de sangramento e síndrome de lise tumoral devido ao comprometimento da linhagem mieloide pelas células neoplásicas.

Os principais fatores que afetam a taxa de mortalidade desses pacientes são aqueles resultantes da intensificação da terapia e da recidiva da doença. A melhora do prognóstico das LMAs foi possibilitada pela estratificação da doença em grupos de risco com base na avaliação genética, e na resposta precoce ao tratamento e na identificação da falha da fase de indução de quimioterapia (LIMA et al., 2016).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LMAS

A LMA é uma doença de etiologia de base genética, o que faz com que a identificação das alterações no ácido desoxirribonucléico (DNA) das células blásticas seja crucial para a escolha do tratamento mais adequado. Nesse sentido, há necessidade de classificar as doenças biologicamente semelhantes, para melhor compreender o processo de transformação leucêmica,

o prognóstico e a ação terapêutica (ARBER et al. 2016). Por conseguinte, surgiram as classificações das leucemias.

No final do ano de 2014, o *Clinical Advisory Committee* (CAC), composto por aproximadamente 100 patologistas, hematologistas, oncologistas e geneticistas de todo o mundo convocou uma reunião para propor revisões à quarta edição da classificação da OMS (2008). A revisão teve o objetivo de revisar as características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas, citogenéticas e de genética molecular, para definir novos padrões de diagnóstico de doenças que mostraram evidente importância clínica. Depois de oito anos de experiências, informações e estudos científicos e clínicos, uma revisão desses critérios para neoplasias hematopoiéticas e linfoides foi considerada necessária e oportuna (Quadro 1). Em relação a neoplasias mieloides e leucemias agudas, essa revisão foi influenciada por vários fatores, como a descoberta de características moleculares recentemente identificadas que produziram novas perspectivas sobre marcadores diagnósticos e prognósticos que fornecem novos esclarecimentos para a compreensão da patobiologia desses distúrbios (ARBER et al. 2016). Além disso, essa reunião apresentava o objetivo de melhorar a caracterização e a padronização de características morfológicas que auxiliassem na diferenciação de grupos de doenças, particularmente das neoplasias mieloproliferativas (NMPs) com a translocação BCR-ABL1, o que aumentou a confiabilidade e a reprodutibilidade dos diagnósticos. Por fim, uma série de estudos clínico-patológicos que validaram o postulado da OMS de uma abordagem integrada que inclui descobertas hematológicas, morfológicas, citogenéticas e genéticas moleculares (ARBER et al. 2016; SWERDLOW et al., 2017).

A OMS ainda utiliza a definição das características específicas das LMAs, concentrando-se em subgrupos citogenéticos e moleculares significativos. Uma grande quantidade de anormalidades citogenéticas recorrentes são conhecidas e, a maioria daquelas que não são formalmente reconhecidas pela classificação são raras. Por exemplo, para enfatizar o significado da fusão PML-RARA, resultar de rearranjos citogenéticos, complexos diferentes de t(15;17)(q24.1;q21.2), a LPA com essa fusão foi renomeado como LPA com PML-RARA (SWERDLOW et al., 2017).

Quadro 1- Classificação das LMAs e neoplasias mieloides relacionadas – OMS 2017

<p>LMA com anormalidades genéticas recorrentes</p> <p>LMA com t(8:21)(q22;q22): RUNX1-RUNX1T1</p> <p>LMA com inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16) ; CBFβ-MYH11</p> <p>LPA com PML-RARA</p> <p>LMA com t(9;11)(p22;q23):KMT2A-MLLT3</p> <p>LMA com t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214</p> <p>LMA com inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2); GATA 2, MECOM</p> <p>LMA (megacarioblástica) t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1</p> <p>LMA com BCR-ABL1</p> <p>LMA com mutação NPM1</p> <p>LMA com mutação CEBPA</p> <p>LMA com mutação RUNX1</p>
Leucemia mieloide aguda com alterações relacionadas à mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas a terapias (NM-T)
<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>
Sarcoma mieloide
<p>Proliferações mieloides relacionadas à síndrome de Down</p> <p>Mielopoese anormal Transitória (D-MAT)</p> <p>Leucemia Mieloide associada com Síndrome de Down (D-LMA)</p>

Fonte: SWERDLOW et al., 2017. Elaboração própria.

2.3 DIAGNÓSTICO DAS LMAS

Os pacientes com LMA apresentam com frequência manifestações clínicas como fadiga, fraqueza, sangramentos nasal ou gengival, púrpura, petéquias, linfonodomegalia, febre, perda de peso, desconforto abdominal, dores nos ossos e nas articulações, dores de cabeça, náuseas, vômitos, visão dupla e desorientação. Na análise laboratorial, o hemograma é o exame que permite a identificação de alterações morfológicas das células neoplásicas. Em geral, os valores de hemoglobina encontram-se abaixo dos valores de referência, sem aumento de reticulócitos e plaquetopenia (plaquetas $< 50.000/\text{mm}^3$). A contagem de leucócitos varia de inferior a $1.000 \text{ células}/\text{mm}^3$ a $200.000 \text{ células}/\text{mm}^3$, com contagem diferencial anormal e presença de neutropenia (SILVA et al., 2006; LEATHE et al, 2008; SWERDLOW et al., 2008).

No SP pode ser observada a presença de blastos, que podem ser provenientes de diferentes séries como granulocítica, monocítica, eritroide e megacariocítica (SILVA et al., 2006; LEATHE et al., 2008).

Os blastos leucêmicos apresentam morfologias diferentes dependendo da série afetada, mas, de forma geral, apresentam tamanho de 12 a 20 μm de diâmetro, cromatina reticular fina, podem apresentar nucléolos múltiplos, citoplasma com grânulos longos e fusiformes que se coram de vermelho pela coloração Wright-Giemsa, denominados bastonetes de Auer (patognomônicos da LMA). Além disso, na LPA pode-se observar a presença de *Faggot Cells* (célula com grande quantidade de bastonetes de Auer) (Figura 1), que não são frequentemente encontrados, porém é característico da LPA quando presente (HOFFBRAND et. al. 2008).

O diagnóstico de LMA pode ser confirmado por meio da avaliação do mielograma, o qual encontra-se geralmente hiper celular, com substituição das células hematopoiéticas normais por blastos leucêmicos (LEATHE et al, 2008). Segundo critérios da OMS, outros exames devem ser realizados para caracterizar essas células e estabelecer um diagnóstico mais específico do subtipo de LMA, como a citoquímica, a IMF, a citogenética e a biologia molecular (SWERDLOW et al., 2017).

Os exames citoquímicos e suas colorações utilizadas no diagnóstico e na classificação das leucemias podem ser aplicadas tanto em amostras de MO quanto de SP. As principais colorações são fosfatase alcalina; mieloperoxidase (MPO); *Sudan Black B* (SBB); naftol AS-D; cloroacetato esterase (CAE); esterases inespecíficas, como alfa-naftil acetato esterase (ANAE); reação do ácido periódico de Schiff (PAS) e fosfatase ácida, as quais auxiliam na confirmação da origem mieloide ou linfoide dos blastos leucêmicos (SILVA et al., 2006). MPO ou SBB positivos confirmam a natureza mieloide dos blastos e revelam os bastonetes de Auer em aproximadamente 65% dos casos. Essas colorações são específicas para as linhagens mieloides (SILVA et al., 2006; LEATHE et al., 2008).

2.4 IMF POR CITOMETRIA DE FLUXO

Atualmente, a análise multiparamétrica por CF é uma ferramenta de grande importância para o correto diagnóstico e classificação das LMAs, pois identifica com maior precisão a linhagem do blasto leucêmico, assim como seu grau de maturação e, portanto, o subtipo de LMA em questão. A IMF por CF, além de ser uma metodologia rápida, permite a obtenção simultânea de informações a respeito dos antígenos presentes na membrana ou no interior das células, do tamanho, da complexidade interna e da viabilidade celular. Essas informações permitem determinar o grau de diferenciação celular, verificar expressões antigênicas aberrantes e observar a presença ou não de clonalidade (VIDRIALES et al., 2003).

A determinação fenotípica dos blastos leucêmicos, que pode variar entre os pacientes, é útil para detectar a DRM. A pesquisa da DRM pode ser realizada durante ou após o tratamento, e auxilia tanto na avaliação da eficácia dos medicamentos escolhidos quanto na definição do prognóstico do paciente (BUENO et al, 2007). Uma das vantagens da IF por CF é a quantificação de DRM com certa rapidez (SANZ et al., 2009). Além disso, de acordo com informações do consórcio *EuroFlow*, a quantificação da DRM utilizando o método *Bulk Lysis* aumenta a sensibilidade de detecção para a identificação das células neoplásicas. A partir desse protocolo é possível concentrar um número grande de células (até cinco milhões) em um único tubo, o que aumenta a capacidade de identificação das células leucêmicas em relação às normais (KALINA, et al 2012; FLORES-MONTERO, et al 2017; THEUNISSEN, et al 2017).

Na avaliação imunofenotípica os antígenos de superfície e/ou intracelulares, como o CD33, o CD13, a MPO e o CD117 auxiliam na identificação das células mieloides. Além disso, é possível avaliar de marcadores pan leucocitários, como o CD45 que em algumas neoplasias pode expressar-se de forma aberrante., e os marcadores de imaturidade (frequentemente encontrados em blastos), como o Desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT), CD34, CD38 e o HLA-DR (DUARTE; SALES; VASCONCELOS, 2013).

Outros marcadores também são utilizados para avaliar linhagens específicas da série mieloide, como o CD35 e o CD64 (monócitos), o CD71 (eritrócitos) e o CD16 (neutrófilos) (CHAUFFAILLE, et al 2008; SWERDLOW et al., 2017). Como relatado anteriormente, cada paciente pode apresentar blastos leucêmicos com um fenótipo particular ou aberrante, denominado imunofenótipos associados à leucemia (LAIPs). Por isso, na avaliação da DRM, além dos marcadores gerais devem ser analisados os marcadores específicos presentes ao diagnóstico (LEE; GRIGORIADIS; WESTERMAN, 2015).

Como vantagens a IMF por CF é uma metodologia rápida, de análise multiparamétrica, que pode analisar uma grande quantidade das células neoplásicas simultaneamente. Por outro lado, o fenótipo aberrante encontrado no momento do diagnóstico pode mudar ao longo da quimioterapia, o que deve ser levado em consideração ao se pesquisar a DRM. Além disso, algumas LMAs podem não apresentar LAIPs, sendo assim, é difícil a diferenciação de células progenitoras normais presentes na amostra. Ainda como desvantagem, pode-se citar a dificuldade em avaliar amostras leucopênicas em função do tratamento (LEE; GRIGORIADIS; WESTERMAN, 2015).

2.5 GENÉTICA MOLECULAR

Outra análise recomendada pela OMS para o diagnóstico de LMA é a genética molecular, a qual se fundamenta na análise do DNA por meio de métodos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), ou na análise do ácido ribonucleico (RNA) por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR), e, também por RT-PCR quantitativo (RT-qPCR). A finalidade da análise de genética molecular pode ser o estabelecimento da clonalidade, pela detecção da recombinação de genes, ou a identificação de uma recombinação molecular característica de um determinado tipo de LMA (KERN et al., 2005; SILVA et al., 2006).

A RT-qPCR utiliza iniciadores específicos para detectar sequências de RNA mensageiro de translocações cromossômicas ou rearranjos de genes detectáveis com frequência nas células neoplásicas e indetectáveis em células normais (SAMETTI et al., 2001). Esse método altamente sensível é capaz de detectar uma célula mutada entre 10^5 a 10^6 células normais (TOBAL et al., 1996). A principal vantagem encontrada nesse método é a alta sensibilidade em detectar a doença, pela ampliação do gene com alteração genética. Porém, uma desvantagem é que há LMAs sem alterações genéticas. Esse método também é utilizado para analisar DRM. Quando a positividade para PCR atinge mais de 10^{-4} células leucêmicas, em amostras em remissão morfológica, significa fator preditivo de recaída clínica dentro de vários meses. Por outro lado, pacientes com PCR negativa após remissão também podem ter recaídas. Assim, a negatividade da PCR é uma condição necessária para considerar um paciente em remissão molecular, mas não significa que o mesmo vai apresentar remissão prolongada (MICHÁLEK; SMARDA, 2000).

2.6 TRATAMENTO DAS LMAS

O tratamento da LMA é normalmente dividido em duas fases: indução e consolidação (terapia pós-remissão). Para alguns tipos de LMA, existe ainda uma terceira fase, a manutenção. A indução é a primeira fase do tratamento, que tem o objetivo de eliminar do SP as células neoplásicas e reduzir seu número na MO. Na consolidação, a quimioterapia administrada ocorre após o paciente se recuperar da indução, com o objetivo de eliminar as células leucêmicas remanescentes. Finalmente, a manutenção consiste em administrar uma baixa dose de quimioterapia durante meses ou anos após a consolidação. Os fármacos quimioterápicos utilizados com mais frequência no tratamento da LMA são: a citarabina e as antraciclina (daunomicina, daunorrubicina, idarubicina e mitoxantrona). Outros fármacos quimioterápicos que também podem ser utilizados no tratamento da LMA incluem cladribina, fludarabina, topotecano, etoposídeo, 6-tioguanina (6-TG), hidroxíureia, corticosteroides, como a prednisona ou dexametasona, metotrexato, 6-mercaptopurina (6-MP), azacitidina e decitabina (ABRALE 2016). Além disso, a detecção de alguma alteração genética pode direcionar o tratamento para alguns fármacos específicos, como, por exemplo, o ácido transretinoico (ATRA) e o trióxido de arsênio (ATO) para a LMA com t(15,17), que associadas com uma antraciclina, podem levar o paciente à remissão em mais de 90% dos casos (CHAUFFAILLE; BORRI; MARTINS, 2004).

O transplante de medula óssea (TMO), também denominado de transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH), pode ser uma alternativa de tratamento, o qual depende de uma análise criteriosa das características da doença, o quadro do paciente, a idade, disponibilidade de doador compatível e os possíveis riscos relacionados ao procedimento (ABRALE 2016; SELMECZI et al., 2014).

2.7 DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA (DRM)

Após o tratamento das LMAs, considera-se como remissão morfológica quando o paciente apresenta menos de 5% de blastos na MO e o hemograma não evidencia mais células anormais (LEE; GRIGORIADIS; WESTERMAN, 2015). Dessa forma, podemos definir DRM como o limite mínimo de detecção de doença em pacientes em remissão clínica completa, quando avaliados pelos métodos disponíveis. A DRM ocorre, após a poliquimioterapia, e pode ser consequência da resistência celular, resistência farmacocinética, além de fatores desconhecidos que afetam a eficácia do tratamento da leucemia (BACHER et al., 2011; WALTER et al., 2011).

A pesquisa de DRM na LMA tem como objetivo identificar os pacientes que apresentam maior risco de recidiva e pior prognóstico. A detecção de DRM após a primeira ou

segunda indução, ou ao final de tratamento é considerado como paciente de alto risco para recidiva da doença e pior prognóstico na avaliação da eficácia terapêutica (DUARTE; SALES; VASCONCELOS, 2013).

Os grupos de risco de recidiva são definidos conforme de acordo com o número de células neoplásicas observadas na DRM. A persistência de DRM maior que 0,1% na MO após consolidação do tratamento, indica maior risco de recidiva. Além disso, indica menor tempo de sobrevida livre de eventos (DUARTE; SALES; VASCONCELOS, 2013).

Segundo Dongen et al., 1999, a sensibilidade da RT-PCR é de $10^{-4}/10^{-5}$ (uma célula leucêmica entre $10^4/10^5$ células, enquanto que pela a IMF por CF a sensibilidade é de $10^{-3}/10^{-4}$. Porém vários grupos vêm trabalhando na melhoria dessa sensibilidade, seja pela combinação de marcadores mais frequentes, formando painéis de anticorpos monoclonais que possibilitem a identificação das células leucêmicas ou introduzindo novas estratégias para aumentar o número de células a serem analisadas, como o protocolo *bulk lysis*, no qual é possível aumentar o número de células a serem analisadas nas amostras, pelo menos, um milhão de células nucleadas para cada tubo de DRM e permite a aquisição de até 5×10^6 células (MICHÁLEK & SMARDA, 2000; GINER et al., 2002; VIDRIALES et al., 2003; VAN DONGEN et al., 2012; SCHUURHUIS, et al., 2018).

A estratégia para detecção de DRM por IMF por CF deve ser associada ao reconhecimento dos padrões normais e anormais de expressão de antígenos das células nas diversas linhagens hematopoiéticas, além de caracterizar os LAIPs (SWERDLOW et al., 2017). Os fenótipos anormais merecem atenção especial e caracterizam-se por assincronismos de expressão antigênica, superexpressão de antígenos, perda de expressão de antígenos de linhagem específicos, expressões anômalas de marcadores linfoides T e B (GINER et al., 2002; DUARTE; SALES; VASCONCELOS, 2013). Portanto, a escolha dos anticorpos a serem utilizados devem ser baseados no perfil fenotípico da leucemia e considerando os LAIPs observados no momento do diagnóstico. Por exemplo, nos casos de LMA com alterações citogenéticas recorrentes apresentam fenótipos característico, a escolha do painel de anticorpos para detecção da DRM pode ser baseado nesses fenótipo, como segue: na LMA com t(8,21); RUNX1-RUNX1T1, pode-se observar expressão aumentada de CD34 com expressão de HLA-DR, MPO, CD19, CD79a com fraca expressão de CD33. Além disso, há sinais de diferenciação granulocítica com subpopulação de células que expressam CD15 e/ou CD65. Observa-se também assincronismo de maturação com expressão de CD34 em conjunto com CD15. E ainda apresenta TdT com baixa intensidade de expressão (DUARTE; SALES; VASCONCELOS, 2013); na LMA com inv(16), apresenta características morfológicas de Leucemia

mielomonocítica Aguda, com variável porcentagem de eosinófilos que podem apresentar maturação aumentada. O imunofenótipo associado a esta leucemia se caracteriza por um aumento na expressão de CD34 e CD117 com populações com diferenciação granulocítica apresentando expressão positiva de CD13, CD15, CD65 e MPO. Além disso, apresenta população com características monocíticas expressando CD4, CD11b, CD14, CD36 e CD64 (SWERDLOW et al., 2017); e na LPA t(15,17) PML/RARA apresenta imunofenótipo com expressam positiva de CD13, CD33, CD117 e MPO e perda da expressão do CD15, com expressão fraca de CD64. Além disso, não expressam CD34, HLA-DR e CD11b. O CD56 quando positivo, associado ao sugere sobrevida global reduzida, ou seja, representa pior prognóstico ao paciente (SWERDLOW et al., 2017). Nesse sentido o Setor de Onco-hematologia da Divisão de Análises Clínicas (DACL) HU/UFSC utiliza na rotina a combinação dos marcadores em dois tubos como mostra o Quadro 2 para a detecção da LPA com t(15;17) por IMF por CF. Porém, para as outras LMA a investigação depende do imunofenótipo no momento do diagnóstico, como citado acima.

Quadro 2- Painel de anticorpos para detecção de DRM em LPA.

FITC	PE	PercP-Cy5.5	Pe-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
CD8	CD56	CD34	CD19	CD3	CD38	CD20/CD4	CD45
CD15	CD33	CD34	CD117	CD11b	CD14	HLA-DR	CD45

Fonte: Padronização EUROFLOW (ano). Elaboração própria.

A IMF por CF e a PCR têm sido considerados métodos eficientes para a pesquisa de DRM. A PCR apresenta maior sensibilidade que os demais métodos utilizados para monitoramento da doença, porém sua aplicabilidade é limitada em 30% a 50% dos casos, nos quais as alterações moleculares são detectadas. Outra limitação é que algumas mutações gênicas nas LMAs são instáveis, o que dificulta a identificação de DRM (DUARTE; SALES; VASCONCELOS, 2013).

No entanto, apesar de a DRM possa ser avaliada multi parametricamente por IMF por CF e por protocolos moleculares, até o momento, essas abordagens não foram padronizadas

qualitativa ou quantitativamente, tornando o seu uso na prática clínica desafiador (SCHUURHUIS et al., 2018).

No dia 5 de abril de 2018, a *European Leukemia Net* (ELN) publicou um consenso na tentativa de padronizar a pesquisa de DRM em LMAs. Nesse consenso, são relatados numerosos estudos que investigaram o valor da DRM na LMA e demonstraram consistentemente que a negatividade da DRM tem valor prognóstico para avaliação do tratamento. Atualmente, dois métodos são amplamente aplicados, a CF multiparâmetros, e a RT-qPCR, e novas tecnologias, incluindo PCR digital e sequenciamento de próxima geração (NGS) estão em progresso. Cada metodologia difere na proporção de pacientes a quem pode ser aplicada e em sua sensibilidade para detectar DRM (SCHUURHUIS et al., 2018). O estudo apresenta recomendações para os procedimentos para IMF por CF e RT-qPCR (Quadro 3).

Quadro 3- Recomendações do ELN para avaliação do DRM por IMF por CF e Biologia Molecular

Citometria de Fluxo	
1	Utilizar os seguintes marcadores em um painel DRM: CD7, CD11, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR (esqueleto: CD45, CD34, CD117, CD13, CD33, espalhamento direto / dispersão lateral) Se necessário, adicione um “tubo monocítico” Contendo: CD64 / CD11b / CD14 / CD4 / CD34 / HLA-DR / CD33 / CD45.
2	Integre a abordagem clássica de LAIP. Para rastrear todas as aberrações (além do diagnóstico, incluindo aberrações pós-diagnóstico recém-formadas), aplique um painel completo tanto no diagnóstico como no acompanhamento.
3	Aspirar 5-10 mL de MO e usar o primeiro puxão para avaliação da DRM. Atualmente, SP, com seu menor conteúdo de DRM, não deve ser usado para avaliação de DRM. Retire o menor volume desejável de MO porque a contaminação com SP aumenta com o volume da MO.
4	Estimativa da contaminação com SP, especialmente quando um primeiro <i>pool</i> de MO era impossível.

<p>5</p> <p>6</p> <p>7</p> <p>8</p> <p>9</p>	<p>Use 500.000 a 1 milhão de leucócitos; Utilizar a expressão aberrante mais forte disponível e relacione-a com os CD45+ .</p> <p>Para definir o grupo de pacientes “DRM-negativo” e “DRM-positivo”, um ponto de corte de 0,1% é recomendado.</p> <p>Se encontrado 0,1% de doença, relatar isso como "DRM-positivo, 0,1%, pode ser consistente com leucemia residual."</p> <p>Se aplicável, o comentário "este nível não foi clinicamente validado" deve ser adicionado.</p> <p>Em um ambiente multicêntrico, o transporte e armazenamento de MO total à temperatura ambiente por um período de 3 dias são aceitáveis.</p> <p>Estudos de centro único sem experiência extensa em IF por CF são fortemente desencorajados.</p>
<p>Biologia Molecular</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p>	<p>A análise de DRM molecular é indiferente ao anticoagulante usado durante a amostragem de células, e assim tanto a heparina quanto o EDTA podem ser usados como anticoagulantes.</p> <p>Aspirar 5-10 mL de MO, e use o primeiro aspirado de MO para avaliação molecular de DRM.</p> <p>A expressão de WT1 não deve ser usada como marcador de DRM, a menos que nenhum outro marcador de DRM esteja disponível no paciente.</p> <p>Não use mutações no FLT3-ITD, FLT3-TKD, NRAS, KRAS, DNMT3A, ASXL1, IDH1, IDH2, MLL-PTD e níveis de expressão de EVI1 como marcadores únicos de DRM. No entanto, estes marcadores podem ser úteis quando usados em combinação com um segundo marcador de DRM.</p>

5	<p>Nós definimos a progressão molecular em pacientes com persistência molecular como um aumento dos números de cópias de DRM maior ou igual a 1 log10 entre quaisquer duas amostras DRM positivas.</p>
6	<p>Definimos recidiva molecular como um aumento do nível de DRM maior ou igual a 1 log10 entre duas amostras positivas para DRM em um paciente que foi previamente testado como DRM negativo.</p> <p>A conversão de DRM negativo em positivo em SP ou MO deve ser confirmada quatro semanas após a coleta da amostra inicial em uma segunda amostra de MO e SP. Se a DRM aumentar nas amostras de acompanhamento em 1 log10 ou mais, a recidiva molecular deve ser diagnosticada.</p>

Fonte: Adaptado de SCHUURHUIS et al., 2018

3 JUSTIFICATIVA

O monitoramento da DRM permite realizar o acompanhamento do paciente e melhorar o resultado do tratamento, pois possibilita que alterações na terapia em uso sejam feitas conforme a necessidade. O prognóstico da doença e a possibilidade de recidiva dependem da capacidade do método utilizado para identificar a quantidade de células leucêmicas que permanecem viáveis após a remissão completa da doença, após diferentes ciclos de terapia. Por isso, a realização de métodos para pesquisa da DRM com alta sensibilidade e especificidade são essenciais.

A utilização do protocolo *Bulk Lysis* aumenta significativamente a sensibilidade da análise de DRM por CF, pois a partir dele é possível avaliar um número grande de células o que aumenta a sensibilidade tornando-a semelhante ou igual a uma RT-qPCR. Esse método foi padronizado no setor de Onco-hematologia da Divisão de Análises Clínicas (DACL) do HU-UFSC no final de 2015, e desde então, vem mostrando bons resultados, porém ainda não foi comparado aqueles obtidos por Nested RT-PCR, a qual apresenta sensibilidade variável. Sendo assim, existe a necessidade de se compará-los para verificar a sensibilidade dos métodos utilizados no setor.

A necessidade da realização deste trabalho ocorreu a partir de exames que apresentavam resultados divergentes de um paciente com LPA. Resultados divergentes foram encontrados em exames realizados no setor de Onco-hematologia do HU-UFSC (IMF por CF e a Nested RT-PCR) e em outro hospital (RT-qPCR). A obtenção de resultados diferentes entre os dois exames moleculares trouxe curiosidade e demonstrou a importância de avaliar esses dados.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de DRM por meio de IMF por CF e RT-PCR em casos de LMA com alterações citogenéticas recorrentes (LMA com t(8:21) (q22;q22) RUNX1-RUNX1T1, LMA com inv(16) (p13.1q22) RUNX1-RUNX1T1 e LPA com t(15,17)(q22;q12) PML-RARA) nos pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os casos de pacientes portadores de LMA com t(8:21) (q22;q22) RUNX1-RUNX1T1, LMA com inv(16) (p13.1q22) RUNX1-RUNX1T1 e LPA com t(15,17)(q22;q12) PML-RARA em acompanhamento no HU-UFSC;
- Analisar a presença de DRM detectadas por meio de IMF por CF e por RT-PCR em amostras coletadas no mesmo momento dos pacientes com LMA incluídos no estudo;
- Coletar informações clínicas e laboratoriais do prontuário de pacientes diagnosticados com LMA com alterações genéticas recorrentes atendido no Hospital Universitário Professor Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina para análise de DRM;
- Investigar a sensibilidade dos métodos (IMF por CF e RT-PCR) na detecção de DRM;
- Identificar qual a metodologia mais sensível utilizada no Setor de Onco-hematologia da Divisão de Análises Clínicas (DACL) do HU-UFSC para a detecção de DRM.

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

Para análise de DRM foram utilizadas informações contidas nos prontuários de 21 pacientes diagnosticados como portadores de LMA com t(8:21) (q22;q22) RUNX1-RUNX1T1, LMA com inv(16) (p13.1q22) RUNX1-RUNX1T1 e LPA com t(15,17)(q22;q12) PML-RARA atendidos e tratados no HU/UFSC, cujo diagnóstico e/ou monitoramento da DRM tenha ocorrido entre janeiro de 2016 a abril de 2018. Esses prontuários estavam disponíveis no Serviço de Prontuário do Paciente (SPP) no próprio Hospital Universitário. Os resultados dos exames laboratoriais no momento do diagnóstico foram obtidos do sistema de informações da DACL do HU/UFSC.

Para a análise de sensibilidade da RT-PCR para investigação da alteração genética t(15,17)(q22;q12) foi utilizada a amostra de um paciente.

O trabalho foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (CAAE: 61598816.7.0000.0121), cujo certificado está no Anexo A.

5.2 DIAGNÓSTICO E DETECÇÃO DE DRM POR IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

A detecção de DRM por IMF por CF foi realizada pelo Setor de Onco-hematologia da DACL do HU/UFSC, conforme procedimento operacional padrão (POP) desse Setor. Os resultados utilizados para a análise dos casos foram obtidos no sistema de informação do DACL/HU-UFSC, e o procedimento de processamento das amostras e análise será descrito para melhor compreensão do método.

O Setor de Onco-hematologia da DACL/HU/UFSC faz a investigação da DRM baseado nas características imunofenotípicas das células neoplásicas no momento do diagnóstico. Assim, os marcadores utilizados são semelhantes aqueles utilizado nos painéis de diagnóstico, como segue.

A investigação do diagnóstico inicia com um tubo de triagem (Quadro 4), o qual tem o objetivo de detectar a presença de células neoplásicas pela expressão de antígenos específicos e para direcionar o painel a ser estudado.

Quadro 4- Marcadores de proteínas de superfície e citoplasmáticos triagem

FITC	PE	PercP-Cy5.5	Pe-Cy7	APC	APC-H7	V450 (PB)	V500 (PO)
CD8	CD56	CD34	CD19	CD3	CD38	CD20/CD4	CD45
MPO cito	CD79a cito	CD34	CD19	CD7	CD3	CD3 cito	CD45

Fonte: Padronização EUROFLOW (ano). Elaboração própria

Após a triagem, se sugestivo de LMA, realiza-se novos tubos com marcadores para investigar o subtipo dessa neoplasia (Quadro 5).

Quadro 5 - Marcadores de proteínas de superfície e citoplasmáticos LMAs

FITC	PE	PercP-Cy5.5	Pe-Cy7	APC	APC-H7	V450 (PB)	V500(PO)
CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10	HLA-DR	CD45
CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e (IREM)	CD14	HLA-DR	CD45
CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71	HLA-DR	CD45
TDT cito	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19	HLA-DR	CD45
CD15	7.1 (NG2)	CD34	CD117	CD22	CD38	HLA-DR	CD45
CD42a/CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4	HLA-DR	CD45

CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9	HLA-DR	CD45
------	------	------	-------	-------	-----	--------	------

Fonte: Padronização EUROFLOW . Elaboração própria.

A partir dos marcadores mostrados no Quadro 5 é que são definidos os marcadores mais importantes para a detecção de DRM, como, por exemplo, a expressão de antígenos aberrantes.

O procedimento para a marcação das amostras segue o mesmo procedimento realizados para o diagnóstico. Brevemente, foi utilizado 100µL de amostra biológica cujo protocolo de marcação estava de acordo com as informações constantes na bula dos fabricantes dos reagentes. Os anticorpos monoclonais utilizados no estudo eram conjugados aos fluorocromos: isotiocianato de fluoroceína (FITC), ficoeritrina (PE), complexo proteína piridina de clorofila (PerCP), complexo proteína piridina de clorofila cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), ficoeritrina cianina 7 (Pe-Cy7), alofocianina (APC), alofocianina cianina 7 (APC-Cy7), alofocianina-Hilite 7 (APC-H7), Pacific Blue (PB), Pacific Orange (PO). Dependendo do local de expressão do antígeno na célula foi utilizada a marcação direta ou indireta desses antígenos.

Para a detecção dos antígenos presentes na membrana celular foi utilizada a marcação direta, na qual os anticorpos monoclonais foram incubados com as amostras por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, os eritrócitos foram lisados com a solução lisante (BD FACS Lysing Solution diluída 1/10) e incubados novamente a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por mais 10 minutos. Depois desse período, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 300g e o sobrenadante foi desprezado. Depois, o pellet foi suspenso com solução salina (PBS) (Laborelin, Brasil) para ajustar a suspensão celular em 1×10^6 células/500µL e a aquisição foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS Canto II (Becton Dickinson- BD, San Jose, USA).

Nos casos em que a expressão do antígeno ocorre no citoplasma ou núcleo, foi utilizada a marcação indireta. O protocolo foi semelhante, no entanto, primeiramente as células foram fixadas, e, posteriormente permeabilizadas para que os anticorpos conseguissem atingir os sítios de ligação localizados no interior das células. Para isso, foi utilizado o kit de fixação e permeabilização (ADG Van Der Grub Bio Research GmbH).

Após a marcação das amostras, as mesmas foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACS Canto II (Becton Dickinson- BD, San Jose, USA) utilizando-se o programa BD FACS

Diva versão 6.1.2 (BD, San Jose, USA) e a análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa Infinicyt versão 1.7.1 (Cytognos, Salamanca, Espanha).

Para a detecção de DRM, a marcação dos tubos foi realizada de forma semelhante ao diagnóstico, utilizando os tubos de triagem e o tubo de LAIPs do momento do diagnóstico, porém foi utilizada uma estratégia para concentração de células nas amostras de medula óssea e sangue periférico, no tubo do LAIPs, e que, dessa forma, atinja a sensibilidade de 10^{-5} células (EUROFLOW, 2014). Esse protocolo, chamado bulk lysis, baseia-se no princípio da lise das hemácias presentes na amostra com a utilização da solução de cloreto de amônia, que mantém a integridade dos leucócitos a fim de alcançar a sensibilidade proposta (10^{-5}). E, dessa forma, é realizada a marcação do pellet de leucócitos para cada tubo de DRM e permite a aquisição de até 5×10^6 células por tubo. O protocolo foi realizado conforme EUROFLOW (EUROFLOW, 2014)

5.3 DETECÇÃO DE DRM POR NESTED RT-PCR QUALITATIVO

A pesquisa das translocações cromossômicas (LMA com t(8:21) (q22;q22) RUNX1-RUNX1T1, LMA com inv(16) (p13.1q22) RUNX1-RUNX1T1 e LPA com t(15,17)(q22;q12) PML-RARA) foi realizada utilizando-se a técnica de RT-PCR seguida por *nested* PCR, conforme POP utilizado no Setor de Onco-hematologia da DACL/UH/UFSC.

Os *iniciadores* (Quadro 6) e as condições da PCR utilizadas para a pesquisa das translocações cromossômicas foram as descritas conforme BIOMED-1 (VAN DONGEN et al., 1999).

Quadro 6- Sequência dos iniciadores para a pesquisa das translocações cromossômicas

Translocações	Iniciadores	Sequência
t(8;21)(q22;q22)	AML1-A	5'-CTACCGCAGCCATGAAGAACC-3'
	ETO-B	5'-AGAGGAAGGCCCATTTGCTGAA-3'
	AML1-C	5'-ATGACCTCAGGTTTGTGGTGG-3'
	ETO-D	5'-TGAAGTGGTTCTTGGAGCTCCT-3'
	AML1-E5'	5'-TGGCTGGCAATGATGAAAACACTACT-3'
t(15;17)(q22;q21)	PML-A1	5'-CAGTGTAAGCCTTCTCCATCA-3'
	PML-A2	5'-CTGCTGGAGGCTGTGGAC-3'
	RARA-B	5'-GCTTGTAGATGOGGGGTAGA-3'
	PML-C1	5'-TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG-3'
	PML-C2	5'-AGCGGACTACGAGGAGAT-3'
	RARA-D	5'-CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT-3'
	RARA-E3'	5'-GCCCACTTCAAAGCACTTCT-3'
inv(16)(p13;q22)	CBFB-A	5'-GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG-3'
	MYH11-B1	5'-TGAAGCAACTCCTGGGTGTC-3'
	MYH11-B2	5'-TCCCTCTCTCCTCAITCTGCTC-3'
	CBFB-C	5'-GGGCTGTCTGGAGTTTGAIG-3'
	MYH11-D1	5'-TCCCTGTGACGCTCTCAACT-3'
	MYH11-D2	5'-CTTGAGCGCCTGCAITGTT-3'
	CBFB-E5'	5'-CAGGGAGAACAGCGACAACA-3'

Fonte: VAN DONGEN et al. (1999).

Para as primeiras PCRs de todas as translocações cromossômicas, foram utilizados os iniciadores codificados como A (senso) e B (antisenso). Para evitar resultados falso positivos, simultaneamente, foi realizada uma PCR confirmatória com os iniciadores C (senso) e E3' (antisenso), com exceção da t(8;21)(q22;q22) e da inv(16)(p13;q22), nas quais os iniciadores confirmatórios utilizados foram os codificados como E5' (senso) e D (antisenso). Nas nested PCRs foram utilizados os iniciadores codificados com C (senso) e D (antisenso).

Brevemente, as reações foram preparadas com um volume final de 50 µL. A solução mãe da PCR foi constituída de 2 µL de cDNA, 5 µL de tampão 10X concentrado para Taq DNA polimerase (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,4 µL de dNTP mix (100 mM de cada), 1 µL de iniciador senso e antisenso (10 µM cada), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água ultra-pura q.s.p para 50 µL. As reações de nested PCR foram

realizadas sob as mesmas condições, porém ao invés de DNA genômico foi utilizado como molde 1 μ L do produto de amplificação dos iniciadores A e B da primeira PCR.

As condições de reação incluíram a desnaturação inicial a 95 °C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, pareamento a 65 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. O produto das PCRs foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% a 100 volts por 30 minutos e corado com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas em transiluminador sob luz UV de 320 nm. O tamanho dos fragmentos foi estimado, por comparação, com o marcador de tamanho molecular 50 pb (Quadro 7).

Quadro 7- Tamanho esperado dos produtos de PCR para a pesquisa das translocações cromossômicas, segundo o par de iniciadores utilizado

t(8;21)(q22;q22)								
Par de <i>primers</i> e Tamanho do Produto de PCR (pb)								
	A \leftrightarrow B	C \leftrightarrow D	A \leftrightarrow B + C \leftrightarrow D		E5' \leftrightarrow D			
	395	260	260		338			
t(15;17)(q22;q21)								
Par de <i>primers</i> e Tamanho do Produto de PCR (pb)								
Ponto de quebra	A1 \leftrightarrow B	A2 \leftrightarrow B	C1 \leftrightarrow D	C2 \leftrightarrow D	A1 \leftrightarrow B + C1 \leftrightarrow D	A2 \leftrightarrow B + C2 \leftrightarrow D	C1 \leftrightarrow E3'	C2 \leftrightarrow E3'
bcr1	381	NA	214	NA	214	NA	470	NA
bcr2	345*	NA	178*	NA	178*	NA	434*	NA
bcr3	NA	376	NA	289	NA	289	NA	545
inv(16)(p13;q22)								
Par de <i>primers</i> e Tamanho do Produto de PCR (pb)								
Ponto de quebra	A \leftrightarrow B1	A \leftrightarrow B2	C \leftrightarrow D1	C \leftrightarrow D2	A \leftrightarrow B1 + C \leftrightarrow D1	A \leftrightarrow B2 + C \leftrightarrow D2	E5' \leftrightarrow D1	E5' \leftrightarrow D2
Tipo A	NA	418	NA	271	NA	271	NA	417
Tipo B	NA	630	NA	483	NA	483	NA	679
Tipo C	NA	811	NA	664	NA	664	NA	810
Tipo D	338	NA	155	NA	155	NA	301	NA
Tipo E	545	NA	362	NA	362	NA	508	NA
Tipo F	NA	322	NA	175	NA	175	NA	321
Tipo G	242	NA	59	NA	59	NA	205	NA
Tipo H	344	NA	161	NA	161	NA	307	NA
Tipo I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tipo J	NA	1033	NA	886	NA	886	NA	1032

pb – Pares de base; NA – não aplicável. *O tamanho do produto é variável devido a variabilidade dos pontos de quebra do éxon 6 no gene *PML*.

Fonte: VAN DONGEN et al., 1999.

5.4 TESTE DE SENSIBILIDADE DA RT-PCR PARA t(15,17)/PML-RARA TRANSCRITO BCR3

Com o objetivo de investigar a sensibilidade da RT-PCR para detecção da fusão PML/RARA bcr3, foi avaliada a detecção dessa alteração em diferentes concentrações de RNA de amostra de paciente com essa alteração genética. Para isso, concentrações conhecidas de RNA do paciente, foram diluídas em um pool negativo de RNA de uma amostra normal. Para isso, duas amostras de SP foram coletadas, um do paciente, que apresentava 90% de blastos em SP, e outro de um indivíduo sem mutação, e rapidamente foi extraído o RNA das amostras, o qual foi extraído de acordo com o POP do Setor de Onco-hematologia da DACL/HU/UFSC (Tabelas 1 e 2). Esse procedimento foi importante para calcular a quantidade de RNA do paciente a ser utilizado no *pool* negativo (RNA de uma amostra normal), e, dessa forma calcular as concentrações do teste.

Tabela 1- Quantificação RNA da amostra

RNA da amostra	[] RNA ng/ul
	17.6
Extração duplicata 1	
	22.4
Extração duplicata 2	
Média	20

Tabela 2- Quantificação RNA controle normal e pool negativo

Constituição		
<i>pool</i> negativo	[] RNA ng/ul	Volume em ul
RNA normal	12.4	45ul
RNA sem	21.6	10ul
mutação		
RNA sem	44.8	15ul
mutação		
[] <i>pool</i> negativo final	20.657	70ul

As concentrações conhecidas de RNA da amostra foram calculadas em porcentagem para obtenção de valores de RNA dessa amostra em 90%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001%, (Tabela 3) e combinadas com RNA do pool negativo (Tabela 4), de modo que fossem obtidas as proporções conhecidas e que simulassem uma amostra semelhante de um paciente com DRM

(proporção entre RNAs de células normais e de pacientes), para que fossem comparáveis com outros métodos, variando de 10^{-1} a 10^{-5} ng/ul.

Tabela 3- Concentração ([]) de RNA das amostras por tubo

[] RNA doente por tubo	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5	TUBO 6
Células doentes %	90%	10%	1%	0.1%	0.01%	0.001%
10 [^]	0	-1	-2	-3	-4	-5
[] RNA ng/ul	20					

Tabela 4- Volume final utilizado no teste, com os volumes respectivos de RNAs

Volume no teste	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3*	TUBO 4*	TUBO 5*	TUBO 6*
RNA doente (ul)	8	1	1	1	1	1
Pool negativo (ul)	0	8	9	9	9	9
Células doentes %	90%	10%	1%	0.1%	0.01%	0.001%
Volume total (ul)	9 ul					

*Feito a partir de diluição seriada

Para a obtenção de uma concentração de 90% de RNA de paciente, uma amostra de SP de um paciente em recidiva foi utilizada no ensaio. Isso além de ter possibilitado a concentração necessária para realização do ensaio, também conferiu segurança e confiabilidade ao teste, por se tratar de um paciente já diagnosticado com LPA com t(15,17).

Depois das concentrações calculadas e diluídas as amostras, foram realizados os cálculos dos reagentes necessários para realização da amplificação da translocação em pesquisa. O primeiro passo após a extração do RNA é a digestão com DNase. Para isso calculou-se a quantidade de reagentes necessários de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5- Digestão com DNase da marca Promega

MM Digestão	Volume para 1 amostra	Volumes utilizados no teste: 8
Tampão 10x	1,0 µL	8 µL
DNase	1,0 µL	8 µL
Total	2,0 µL	16 µL

As soluções foram homogenizadas e incubadas a 56^oC por 30 min. Para parar a reação, acrescentou-se 1,0µl de *Stop solution* (EDTA) e colocou-se os tubos no termociclador, 15 min a 65^oC, programa DNase ou dig-dna. Depois de 65^oC /15 min (termociclador), incubou-se em banho de gelo por 5 min, e depois a 25^oC por 5 min.

Enquanto a digestão com DNAase era incubado, foi iniciada a preparação do Transcrição Reversa da PCR, conforme Tabela 6.

Tabela 6- Master Mix cDNA - Transcrição reversa

Reagentes MM	Volume para 1 amostra	Volumes utilizados no teste: 8
H2O.DEPC 0,1%	5,5 µL	44,0 µL
Tampão para cDNA 5X	5,0 µL	40 µL
DTT (0,1M)	2,0 µL	16,0 µL
Random Hexâmeros (100ng/µL)	1,0 µL	8,0 µL
dNTP mix (100mM)	0,5 µL	4,0 µL
Inibidor de RNase (40U/ µL)	0,5 µL	4,0 µL
Transcriptase reversa (200U/ µL)	0,5 µL	4,0 µL
Volume Final	15,0 µL	120,0 µL

Depois das soluções misturadas para Master Mix cDNA , foram incubadas a 25^oC por 5 min, após esse período adicionou-se 15µL dessa solução em cada tubo de amostra/controles negativos. As amostras/controles negativos foram submetidas a um spin. Colocou-se as amostras e controles no termociclador com a seguinte programação: 25^oC/5 min; 50^oC/60 min; 90^oC/ 5 min. Depois foi colocada no banho de gelo por 5 min. As amostras de cDNA foram congeladas -20^oC até o momento da realização do RT-PCR.

Depois as amostras de cDNA foram pela amplificação do gene constitutivo GAPDH (Tabela 7).

Tabela 7- Master Mix GAPDH

Reagente	Volume para 1 amostra	Volumes utilizados no teste: 10
H2O. PCR	30,25µL	302,5 µL
Tampão para PCR 5X	10,0 µL	100 µL
MgCl₂ (25mM)	5,0 µL	50 µL
GAPDH senso (10mM)	1,0 µL	10 µL
GAPDH anti-senso (10mM)	1,0 µL	10 µL
dNTP mix (100mM)	0,5 µL	5µ L
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0,25 µL	2,5 µL
Volume Final	48,0 µL	480 µL

Para confirmação do gene constitutivo as amostras foram colocadas no termociclador com a programação específico para os iniciadores como segue: 95,0 °C – 30 s; 94,0 °C – 30 s; 65,0 °C – 1 min; 72,0 °C – 1 min; 40 ciclos ;72,0 °C – 10 min ; Hold 4,0 °C ou 16,0 °C

O master mix da primeira PCR foi preparado conforme Tabela 8.

Tabela 8- Master MIX 1° RT-PCR

Reagente	Volume para 1 amostra	Volumes utilizados no teste: 10
H2O. PCR	37,8 µL	378 µL
Tampão para PCR 5X	10,0 µL	100 µL
MgCl₂ (25mM)	5,0 µL	50 µL
Iniciador senso (10mM)	1,0 µL	10 µL
Iniciador anti-senso (10mM)	1,0 µL	10 µL
dNTP mix (100mM)	0,5 µL	5 µL
Taq DNA polymerase (5U/µL)	0,2 µL	2 µL
Volume Final	48,0 µL	978 µL

Na capela de fluxo laminar foi acrescentado 2,0 µL de cada cDNA aos tubos e homogeneizados, os tubos foram identificados como controle positivo e negativos. As amostras foram submetidas a um spin e colocadas no termociclador com a programação específica para os iniciadores: 95,0 °C – 30 s; 94,0 °C – 30 s; 65,0 °C – 1 min; 72,0 °C – 1 min; 40 ciclos ;72,0 °C – 10 min ; Hold 4,0 °C ou 16,0 °C

Depois os ensaios foram confirmados por um método mais sensível, o Nested PCR, o qual foi preparado de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9- Master MIX Nested-PCR

Reagente	Volume para 1 amostra	Volumes utilizados no teste: 10
H2O. PCR	39,3 µL	393 µL
Tampão para PCR 5X	10,0 µL	100 µL
MgCl₂ (25mM)	4,0 µL	40 µL
Iniciador senso (10mM) (C1 ou C2)	1,0 µL	10 µL
Iniciador anti-senso D (10mM)	1,0 µL	10 µL
dNTP mix (100mM)	0,5 µL	5 µL
Taq DNA polymerase (5U/µL)	0,2 µL	2 µL
Volume Final	49,0 µL	490 µL

Na sequência, os tubos do primeiro PCR foram abertos com um papel filtro para minimizar o risco de contaminação com amplicons. As amostras foram passadas dos tubos da Mix (A1+B) para Mix (C1+D) e dos tubos da Mix (A2+B) para Mix (C2+D). Os tubos de Mix (C1+E3) e (C2 +E3) não são analisados no Nested-PCR. Depois as amostras foram submetidas a um spin e foram colocadas no termociclador com a programação específica para os iniciadores: 95,0 °C – 30 s; 94,0 °C – 30 s; 65,0 °C – 1 min; 72,0 °C – 1 min; 40 ciclos ;72,0 °C – 10 min ; Hold 4,0 °C ou 16,0 °C.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A LMA é uma doença heterogênea e molecularmente complexa com fenótipos variáveis. Sua complexidade genômica, que contribui para sua resposta variável à terapia, é considerada a razão subjacente para desfecho subótimo em pacientes com LMA (PUI et al., 2011). Apesar da eficiência dos protocolos atuais de tratamento permitirem a remissão completa da doença (BRAUNWALD et al., 2002), a maioria dos pacientes recidivam e morrem dois anos após atingirem a remissão (SHIPLEY & BUTERA, 2009). Essa situação pode ser prevenida, quando no acompanhamento dos pacientes em tratamento são utilizados métodos adequados para detecção de DRM (MIGUEL et al., 1997; MICHÁLEK & SMARDA, 2000).

Após o tratamento das LMAs, considera-se remissão morfológica quando o paciente apresenta menos de 5% de blastos na MO e o hemograma não evidencia mais células anormais. Entretanto, na circulação sanguínea ainda podem restar 10^{10} células leucêmicas, ou seja, o paciente apresenta DRM (CAMPANA et al., 1995). Sendo assim, há necessidade de métodos mais sensíveis para detectar DRM, como a IF por CF e a investigação de alterações genéticas por biologia molecular. A análise imunofenotípica tem alta sensibilidade para detectar DRM (com o avanço tecnológico, a implantação da *Next Generation Flow*, a sensibilidade aumenta para 1 célula em $10^5 - 10^6$ células), especialmente nos casos de leucemia associada a fenótipos aberrantes. A detecção de DRM por biologia molecular é ainda mais sensível que a IF por CF, a partir dessa metodologia é possível detectar células leucêmicas numa proporção de 1: 10^7 (MAWALI, et al., 2009; KÖHNKE et al., 2014; SCHUURHUIS, et al., 2018).

Algumas estratégias têm sido utilizadas para aumentar a sensibilidade dessas metodologias, como a utilização do protocolo *bulk lysis*, o qual permite a concentração de células nas amostras de MO, e dessa forma, aumenta a sensibilidade da IMF para 10^{-5} células (SCHUURHUIS, et al., 2018).

Nesse sentido, o Setor de Onco-hematologia da DACL/HU/UFSC implantou esse protocolo, porém não comparou a sensibilidade desse método com a biologia molecular.

Assim, foram analisados os resultados da investigação de DRM por imunofenotipagem e por RT-PCR qualitativo de 21 pacientes, onde 17 são portadores de LPA com as alterações genéticas t(15,17)(q22;q12) PML-RARA, três pacientes são portadores de LMA com t(8:21)(q22;q22) RUNX1-RUNX1T1, e um paciente é portador de LMA com inv(16)(p13.1q22) RUNX1-RUNX1T1, e que ainda seguiam tratamento e monitoramento no HU-UFSC de 2016 a 2018. Como visto, do total de pacientes analisados aproximadamente 81% dos casos eram portadores de LPA com t(15,17).

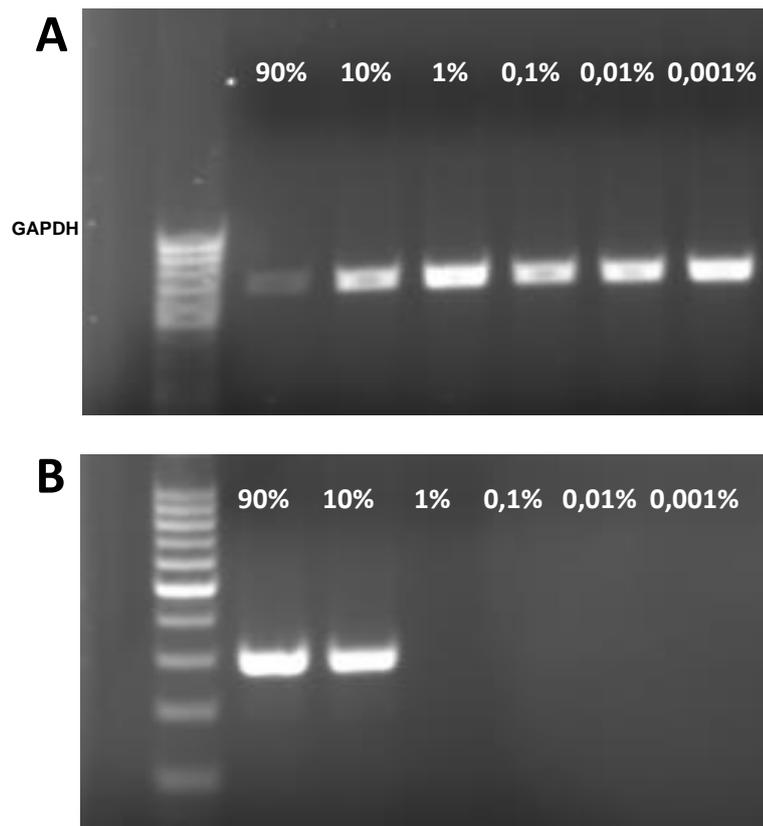
Segundo a literatura, mais de 95% dos pacientes com LPA apresentam a t(15;17), a qual dá origem à fusão do gene PML com o gene RARA do receptor do ácido retinoico, que é importante na diferenciação celular. A LPA é o primeiro modelo de doença genética adquirida tratada com um fármaco específico, o ATRA, o qual é capaz de induzir a diferenciação terminal seguida de apoptose das células leucêmicas (JÁCOMO et al., 2008; LEATHE et al. 2008; SWERDLOW et al, 2017). No acompanhamento do tratamento por avaliação morfológica, a presença de menos de 5% de blastos na medula óssea, considera-se que o paciente está em remissão completa. O diagnóstico e o prognóstico da recidiva dependem da sensibilidade dos métodos de diagnóstico de identificar pequenas quantidades de células tumorais que ainda se mantêm viáveis após a remissão completa (BUENO et al., 2007; SCHUURHUIS et al., 2012). Como visto anteriormente, atualmente, os métodos mais sensíveis utilizados são a IMF por CF e a RT-PCR. Assim, a detecção de DRM na LPA por IMF por CF é realizada pela identificação da expressão ou ausência de antígenos nos promielócitos leucêmicos presentes no momento do diagnóstico, os quais são distintos dos normais. Porém, a frequente mudança no imunfenótipo na LPA causada pelo ATRA, pode dificultar a análise; por isso, é necessário investigar múltiplos fenótipos para que não haja confusão entre células normais e patológicas (GRIMWADE et al., 2010; VIDRIALES et al., 2003). Com o intuito de minimizar essa dificuldade, vários grupos têm estudado a combinação de marcadores mais frequentes, formando painéis de anticorpos monoclonais, possibilitando a identificação de uma célula leucêmica em 10.000 normais (MICHÁLEK & SMARDA, 2000; GINER et al., 2002; VIDRIALES et al., 2003; VAN DONGEN et al., 2012).

Para comparação entre a IMF e a RT-PCR, foram avaliados 37 exames para pesquisa de DRM em amostras de aspirado de MO, as quais foram enviadas simultaneamente para pesquisa pelos dois métodos de análise. Dos 37 exames analisados, em quatro deles observou-se a presença de DRM maior ou igual a 0,1% pela IMF, porém na RT-PCR não foi observado a presença de banda compatível com a doença. Nos casos restantes a IMF detectou a presença de DRM menor que 0,1% ou não detectado DRM. E na RT-PCR, nos mesmos casos, não foi observado a presença de banda compatível com a doença. De acordo com o consenso europeu publicado em 2018, a DRM detectável, mas menor que 0,1%, pode estar consistente com resíduo ou DRM, porém o significado clínico é indeterminado (SCHUURHUIS et al., 2018).

De acordo com Schuurhuis et al (2018), o teste molecular deve ser capaz de detectar a presença de 0,1% DRM (1 em 1000 células). Como pode ser observado na Figura 1, Painéis A e B, foi possível detectar bandas compatíveis com a fusão PML/RARA transcrito bcr3 pelo método de RT-PCR *Nested* até a diluição 10%, o que corresponde a uma sensibilidade de 10⁻

¹. Esses dados divergem da literatura, segundo Van Dongen et al. (1999), a sensibilidade da RT-PCR é de $10^{-4}/10^{-5}$ (uma célula leucêmica entre $10^4/10^5$ normais). Assim, pode-se concluir que é possível a detecção de células neoplásicas em amostras que contêm 10% ou mais de células neoplásicas, o que caracterizaria recidiva, e não DRM. Como pode ser observado, a RT-PCR não foi capaz de detectar DRM em amostras contendo 1% e 0,1% de células neoplásicas, valores detectados pela IMF por CF. Todos os testes de RT-PCR, inclusive o que avalia a sensibilidade do método, foram realizados de forma padronizada, utilizando-se o mesmo protocolo, reagentes e equipamentos utilizados na rotina do Setor. Dessa forma, pode-se concluir que o método utilizado atualmente no HU-UFSC para detecção de DRM de LPA com a t(15,17) deve ser reavaliado a fim de aumentar a sensibilidade visando à identificação da presença de populações pequenas da doença e prevenção de recidivas.

Figura 1- Teste de sensibilidade para detecção de PML/RARA transcrito bcr3 pelo método de RT-PCR Nested.



Painel A: Revelação em gel de agarose da RT-PCR para GAPDH nas concentrações estudadas. A amplificação do gene constitutivo confirma a viabilidade da amostra, assim como o correto procedimento de extração de RNA e síntese de cDNA; **Painel B:** Revelação em gel de agarose da RT-PCR de diferentes proporções do gene PML/RARA transcrito bcr3. A detecção foi detectada somente até a proporção de 10% de células.

Esses resultados mostram a necessidade de se realizar o teste de sensibilidade para as outras alterações genéticas analisadas neste trabalho. Para tentar avaliar o motivo da baixa

sensibilidade encontrada, procurou-se entender as variações da RT-PCR, seu procedimento e reagentes envolvidos.

A RT-PCR pode ser executada em um só tubo “one-step RT-PCR” com mistura de todos os componentes necessários às duas reações ou em dois passos “two-step RT-PCR”, na qual duas reações são realizadas em tubos separados. No primeiro caso há a vantagem do menor número de manipulações com menor probabilidade de contaminações, pois o tubo não é aberto entre a síntese de cDNA e a amplificação possui maior sensibilidade, pois é realizada com todo o cDNA sintetizado. Na RT-PCR em dois passos há maior possibilidade de manipulação das reações para otimização e possibilidade de executar PCR multiplex com amplificação de mais de um produto de amplificação (DESCHLER, et al.; 2015). O método utilizado no HU-UFSC é o two-step RT-PCR. Em um estudo realizado por Tozato et al. (2016) na validação de kits para métodos para detecção de RNA viral, três kits de one-step RT- qPCR foram testados e apresentaram pouca diferença entre a composição dos materiais, a diferença encontrada entre os kits foi a temperatura no processo de clivagem. Assim, um dos kits, o que apresentou melhor desempenho, foi testado de duas formas, one-step RT- qPCR (A) e o outra one-step RT- qPCR seguido por NestedPCR (B). Neste estudo observaram que o método com melhor especificidade e sensibilidade foi o one-step RT- qPCR (A), pois era realizado com iniciadores específicos, enquanto o B, seguido por nested, era realizado com iniciadores inespecíficos. Nesse estudo, a sensibilidade foi avaliada por diluições seriadas e mensuradas pelos dois métodos, A e B, o RNA extraído das amostras em pesquisas foram detectadas até as diluições com concentrações até 10^{-3} e 10^{-2} entre o método A e B respectivamente (TOZATO et al., 2016)

A realização de Nested no RT-PCR melhora a especificidade e a eficiência da reação, na qual o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo sequências localizadas fora dela, e depois, utilizando esse primeiro produto, a amplificação da sequência-alvo (VIEIRA, 2018). No estudo de Tozato et al. (2016), o Nested quando combinado com one-step RT- qPCR com iniciadores específicos, aumentou em 25% a detecção do RNA viral em pesquisa nas amostras, em comparação com a utilização do one-step RT- qPCR convencional. Contudo, no método utilizado no HU-UFSC, mesmo utilizando o Nested PCR em conjunto com a RT-PCR, a sensibilidade se manteve baixa, até 10^{-1} (Figura 2)

A sensibilidade do método para detecção de DRM parece ser extensivo também as outras alterações moleculares, pois na análise de uma DRM de um caso de LMA com inv(16) o RT-PCR seguido de *Nested*, a banda compatível foi observada somente no momento do diagnóstico, porém foi detectada pela IMF por CF, 0.2% células com fenótipo semelhante ao diagnóstico (dados não mostrados). O mesmo ocorreu com um caso de LMA com t(8;21), o

RT-PCR seguido de *Nested* não foi capaz de detectar 0.01% células observadas pela IMF por CF. Não foi utilizado nenhum método estatístico para essa comparação devido ao baixo número de casos. Esses resultados mostram a necessidade de mais estudos para aumentar a sensibilidade do exame. Além disso, é necessária também a realização do teste de sensibilidade para as outras alterações genéticas pesquisadas.

Os dados analisados neste trabalho mostram que a IMF por CF é um método sensível para detectar a DRM nas LMAs, especialmente na LPA, pois na análise de DRM de um caso de LPA com t(15,17) o RT-PCR seguido de *Nested*, a banda compatível foi observada somente no momento do diagnóstico e na recidiva da doença, onde as porcentagens de células doentes encontravam-se aumentadas, como pode ser visto no Quadro 8. A sensibilidade da IMF por CF pode ser justificada pela introdução do *bulk lises* no protocolo para detecção de DRM por esse método. E ainda, validou a sensibilidade descrita de 10^{-4} a 10^{-5} , teoricamente semelhante à sensibilidade descrita para o protocolo de RT-PCR.

Quadro 8- Análise de DRM de um caso de LPA com t(15,17)

Data	Indicação	Material	Resultado Quanti.IMF por CF HU-UFSC	Resultado Quali. RT-PCR HU-UFSC	Resultado Quanti. RT-qPCR / RP
21/04/16	Diagnóstico	MO	93.4% de células compatíveis com LPA microgranular	Presença de banda	*
16/05/16	Avaliação pós QT	MO	0.02% DRM	Não realizado	*
02/08/16	LPA - Avaliar remissão	MO	0.01% DRM	Ausência de banda	*
08/11/16	LPA em maturação	MO	Sem DRM	Ausência de banda	*
25/04/17	LPA avaliar DRM	MO	0.02% DRM	Ausência de banda	Presença de banda
15/09/17	LPA avaliar DRM	MO	0.2% DRM	Ausência de banda	*
17/01/18	LPA recidivada- Leucocitose	MO	Recidiva de LPA- 96% de células com fenótipo semelhante ao diagnóstico	Presença de banda	*
19/02/18	LPA recidiva - Avaliar infiltração em SNC	Líquor	LPA 25% de células com fenótipo semelhante ao diagnóstico	Não realizado	*
21/02/18	Outras células em líquido	Líquor	LPA 14% de células com fenótipo semelhante ao diagnóstico	Presença de banda	*
16/03/18	LPA - Avaliação controle infiltração	Líquor	LPA 14% de células com fenótipo semelhante ao diagnóstico	Presença de banda	*
13/04/18	LPA - Avaliação controle infiltração	Líquor	Sem alterações fenotípicas	Não realizado	*

Legenda: Quanti. = Método de análise Quantitativo / Quali. = Método de análise Qualitativo

RP = Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

Nos últimos anos, qPCR tornou-se a principal ferramenta para a detecção e quantificação de ácidos nucleicos devido ao aumento de kits comerciais habilitados por laboratórios de diagnóstico e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para implementação da PCR em tempo real. Nesse método, foi demonstrado que a reação de transcrição reversa depende principalmente da etapa molecular inicial (a transcrição reversa), da escolha dos reagentes da mistura principal, da qualidade das enzimas, da concentração dos componentes da mistura de reação, como iniciadores, sondas e da metodologia utilizada, os quais podem impactar a sensibilidade dos resultados (TOZATO et al., 2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados encontrados neste trabalho pode-se concluir que os métodos para detecção de DRM em LMAs com alterações genéticas, realizados no HU-UFSC, apresentaram divergências entre seus resultados.

Por outro lado, a IMF por CF demonstrou ser um método sensível e compatível com o descrito no protocolo *Bulk lysis*, é capaz de atingir uma sensibilidade para detecção de DRM de 10^{-4} a 10^{-5} . A detecção é ainda melhor quando há presença de LAIPs de diagnóstico com o caso descrito de LPA.

Diante dos dados apresentados, sugere-se realizar mais estudos e pesquisa para melhorar a sensibilidade da RT-PCR. Uma possibilidade é a substituição do método RT-PCR para RT-qPCR no Setor de Onco-hematologia da DAHL/HU/UFSC. Como o HU-UFSC é uma Instituição pública, a viabilidade da implantação de um novo método deve ser analisada por meio da discussão de planos de custo benefício e capital disponível em conjunto com os médicos, analistas, chefia do laboratório e direção do hospital.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. American Society of Hematology.
- AL-MAWALI, Adhra; GILLIS, David; LEWIS, Ian. The Role of Multiparameter Flow Cytometry for Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. **American Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 131, n. 1, p.16-26, 18 dez. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1309/ajcp5tsd3dzxflcx>.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA, **ABRALE**. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br/lma/tratamento>> Acesso em: 13/10/2017
- BAIN, Barbara J. **Diagnostico Em Leucemias**. 2. ed. São Paulo: Revinter, 2003. 173 p.
- BACHER, Ulrike et al. 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. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2011.16>.
- BALTAR & OKANO. Laboratório de epidemiologia e estatística. Disponível em: <<http://www.lee.dante.br/pesquisa/kappa>> Acesso em: 31/10/2017
- BASSI, Sarah Cristina; REGO, Eduardo Magalhães. Molecular basis for the diagnosis and treatment of acute promyelocytic leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.134-139, 2012. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH).
- BUENO, A. B.; FRIZON, K.; SILVA, M. C. S. **Avaliação de Doença Residual Mínima em Leucemias Agudas: Revisão da Literatura e Análise de Dois Casos**. Doença residual mínima nas leucemias e Métodos de detecção de doença residual mínima. 43 fls. Hematologia Clínica – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC-Brasil. 2007.
- CAMPANA, Dario; PUI, Ching-hon. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. **Blood**, Washington, Dc, v. 6, n. 85, p.1416-1434, 1 mar. 1995.
- CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. F.; YAMAMOTO, Mihoko. 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.

CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. F.; BORRI, Daniela; MARTINS, Sergio L. R.. Leucemia mielóide aguda t(8;21): frequência em pacientes brasileiros. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [s.l.], v. 26, n. 2, p.99-103, 14 nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842004000200006>.

DESCHLER, Barbara; LÜBBERT, Michael. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*, [s.l.], v. 107, n. 9, p.2099-2107, 2006. Wiley-Blackwell. DIVISÃO DE ANÁLISES CLÍNICAS - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO. **POP RT 5.5 BML-001**. Extração de RNA e RT-PCR para t(15;17), t(9;22), t(8;21) e inv(16). Florianópolis, 2015. Edição 01. Revisão 02.

DIVISÃO DE ANÁLISES CLÍNICAS - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO. **POP RT 5.5 ONCO-005**. Processamento e Marcação de Amostras para Pesquisa de Doença Residual Mínima (DRM). Florianópolis, 2015. Edição 01. Revisão 02.

DUARTE, Alberto José da Silva; SALES, Maria Mirtes; VASCONSELOS, Dewton de Moraes. **Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa**. São Paulo: Atheneu, 2013. 610 p.

EUROFLOW. **EuroFlow Standard Operating Protocol (SOP) for Bulky Lysis for MRD panels**: Version 1.1.6. 6. ed. Leiden: Cytognos, 2014.

FALCÃO, Roberto P.; DALMAZZO, Leandro Felipe F.. O valor da imunofenotipagem para o diagnóstico do Mieloma Múltiplo e na avaliação da doença residual mínima. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [s.l.], v. 29, n. 1, p.3-9, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842007000100003>.

FLORES-MONTERO, J *et al.* Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*, [s.l.], v. 31, n. 10, p.2094-2103, 20 jan. 2017. Springer Nature.

GINER, F J O; A ORFAO,. Aplicación de la citometría de flujo al diagnóstico y seguimiento inmunofenotípico de las leucemias agudas. *Med Clin (barc)*, Barcelona, v. 118, n. 118, p.423-434, 1 jan. 2002.

GLOBOCAN. GLOBOCAN. (Org.). **International Agency for Research on Cancer**. 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 05 out. 2017.

GOL, J *et al.* Potentiated antitumor effectiveness of combined chemo-immunotherapy with Interleukin-12 and 5-fluor. *Leukemia*, Varsóvia, v. 15, p.613-620, jan. 2001. Nature Publishing Group.

GRIMWADE, David; VYAS, Paresh; FREEMAN, Sylvie. Assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Current Opinion In Oncology*, [s.l.], v. 22, n. 6, p.656-663, nov. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/cco.0b013e32833ed831>.

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

HOURIGAN, Christopher S.; KARP, Judith E.. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nature Reviews Clinical Oncology*, [s.l.], v. 10, n. 8, p.460-471, 25 jun. 2013. Springer Nature.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Ministério da Saúde (Org.). **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 03 março. 2018.

JÁCOMO, Rafael Henriques; FIGUEIREDO-PONTES, Lorena Lobo de; REGO, Eduardo Magalhães. 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. Elsevier BV.

KALINA, T *et al.* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. **Leukemia**, [s.l.], v. 26, n. 9, p.1986-2010, set. 2012. Springer Nature.

KERN, Wolfgang *et al.* Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. **Cancer**, [s.l.], v. 112, n. 1, p.4-16, 2007. Wiley-Blackwell.

KÖHNKE, T *et al.* Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse. **Leukemia**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.377-386, 10 jun. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.186>.

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

LEE, Denise; GRIGORIADIS, George; WESTERMAN, David. 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. Elsevier BV.

LIMA, M. Cardoso de *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.

MICHÁLEK, J; SMARDA, J. REVIEW DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA. **Scripta Medica (brno)**. Masaryk, p. 223-228. out. 2000.

SAMETTI, Selina *et al.* Clinical relevance of minimal residual disease monitoring in mature B-cell disorders: role of qualitative and quantitative PCR-based strategies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.3-13, abr. 2001. Elsevier BV.

SANZ, M. A. *et al.* Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, [s.l.], v. 113, n. 9, p.1875-1891, 23 set. 2008. American Society of Hematology.

SELMECZI, Anna *et al.* Treatment of acute myeloid leukemia – a single center experience (2007–2013). **Orvosi Hetilap**, [s.l.], v. 155, n. 17, p.653-658, abr. 2014. Akademiai Kiado Zrt.. <http://dx.doi.org/10.1556/oh.2014.29884>.

SHIPLEY, Joshua L.; BUTERA, James N.. Acute myelogenous leukemia. **Experimental Hematology**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.649-658, jun. 2009. Elsevier BV.

SILVA, Grazielle C. da *et al.* Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.77-84, abr. 2006. FapUNIFESP (SciELO).

SCHUURHUIS, Gerrit J. et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. **Blood**, [s.l.], v. 131, n. 12, p.1275-1291, 12 jan. 2018. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2017-09-801498>.

SWERDLOW, S. H. *et al.* WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **International Agency for Research on Cancer**. 4th Edition. Lyon, 2008.

SWERDLOW, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, [s.l.], v. 127, n. 20, p.2375-2390, 15 mar. 2016. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>.

SWERDLOW, S.h. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4. ed. Lyon: Who, 2017. 2 v.

THEUNISSEN, Prisca *et al.* Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 129, n. 3, p.347-357, 30 nov. 2016. American Society of Hematology.

TOBAL, Khalid; YIN, John A. Liu. Monitoring of Minimal Residual Disease by Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for AML1-MTGS Transcripts in AML-M2 With t(8;21). **Blood Journal**. Manchester, p. 3704-3709. 15 nov. 1996.

TOZATO, Claudia de Camargo et al. Canine distemper virus detection by different methods of One-Step RT-qPCR. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 46, n. 9, p.1601-1606, 17 maio 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150932>

VAN DONGEN, Jjm 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. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2401592>.

VIDRIALES, M. B *et al.* Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.599-612, dez. 2003. Elsevier BV.

VIEIRA, Daniel Perez. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. São Paulo: Aula 2, 2018. 11 slides, color. Disponível em: <<http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula2.pdf>>. Acesso em: 19 maio 2018.

WALTER, Roland B. et al. 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. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2010.31.8121>.

WEINBERG, O. K.; SEETHARAM, M.; REN, L.; SEO, K.; MA, L.; MERKER, J. D.; GOTLIB, J.; ZEHNDER, J. L.; ARBER, D. A. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. **Blood**, v.113, p.1906-8, 2009.

ZHOU, Yi; WOOD, Brent L.. Methods of Detection of Measurable Residual Disease in AML. **Current Hematologic Malignancy Reports**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.557-567, 2 nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11899-017-0419-5>.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

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 Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-4094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.376.974

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem considerações adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto vem assinada pela pesquisadora responsável e pela chefe do serviço de hematologia do HU. É apresentada uma declaração de anuência do diretor geral do HU informando que tomou conhecimento da pesquisa e que cumprirá as exigências da res. 466/12 e complementares. É apresentado o questionário que será aplicado aos participantes. O cronograma prevê que a coleta de dados ocorrerá entre fevereiro de 2017 e fevereiro de 2027, esclarecendo que somente começará a coleta de dados após a aprovação pelo CEP/SH. O orçamento informa custos de R\$ 50,00, com financiamento próprio. O TCLE está muito bem redigido e atende essencialmente a todas as exigências da res. 466/12.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata a presente tramitação de emenda comunicando a adição "de mais participantes para desenvolvimento do trabalho", que este comitê interpretou como inclusão de pesquisadores, uma vez que não houve alteração no número de participantes a serem abordados pela pesquisa no formulário da PB.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_100844_5_E1.pdf	03/10/2017 12:23:10		Acelto
Outros	resposta_as_pendencias_.pdf.pdf	07/08/2017 12:35:52	Giovanna Steffenello Durigon	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_projeto_hemato_.pdf.pdf	04/01/2017 21:33:44	Giovanna Steffenello Durigon	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_hemato_.pdf.pdf	04/01/2017 21:33:26	Giovanna Steffenello Durigon	Acelto
Declaração de Instituição e	declaracaoInstituicao.pdf	01/11/2016 08:26:35	Giovanna Steffenello Durigon	Acelto

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-8094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.378.974

Infraestrutura	declaracaoinstituicao.pdf	01/11/2016 08:26:35	Giovanna Steffenello Durligon	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	01/11/2016 08:25:42	Giovanna Steffenello Durligon	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 11 de Novembro de 2017

Assinado por:
Ylmar Correa Neto
(Coordenador)

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