

Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Residência Integrada Multiprofissional e em Área Profissional da Saúde  
Farmácia Análises Clínicas - Diagnóstico Especializado (Biologia Molecular)

Validação de marcadores moleculares de prognóstico em pacientes com  
Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B

Júlia Biz Willig

**Porto Alegre**  
**2021**

Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Residência Integrada Multiprofissional e em Área Profissional da Saúde  
Farmácia Análises Clínicas - Diagnóstico Especializado (Biologia Molecular)

Validação de marcadores moleculares de prognóstico em pacientes com  
Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B

Monografia apresentada ao Programa  
de Residência em Análises Clínicas  
como requisito parcial para conclusão  
da Residência em Área Profissional da  
Saúde - Análises Clínicas: Diagnóstico  
Especializado (Biologia Molecular).

Orientadora: Dra. Ana Paula Alegretti

Coorientador: Dr. Rodrigo Minuto Paiva

**Porto Alegre**

**2021**

### CIP - Catalogação na Publicação

Biz Willig, Julia  
Validação de marcadores moleculares de prognóstico  
em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo  
B / Julia Biz Willig. -- 2021.  
49 f.  
Orientadora: Ana Paula Alegretti.

Coorientador: Rodrigo Minuto Paiva.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de  
Clínicas de Porto Alegre, Residência Integrada  
Multiprofissional e em Área Profissional da Saúde -  
Farmácia/Análises Clínicas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Leucemia Linfoblástica Aguda. 2. Fusão  
Cromossomal. 3. qRT-PCR. 4. Prognóstico. 5.  
Tratamento. I. Alegretti, Ana Paula, orient. II.  
Minuto Paiva, Rodrigo, coorient. III. Título.

## Sumário

1. Introdução.....	4
2. Justificativa.....	7
3. Referencial Teórico.....	8
3.1 Leucemia Linfoblástica Aguda.....	8
3.2 Classificação Morfológica.....	8
3.3 Classificação da Organização Mundial da saúde (OMS).....	9
3.4 Translocações Cromossômicas.....	10
3.4.1 Translocação t(12;21)(p13;q22).....	10
3.4.2 Translocação t(4;11)(q21;q23).....	12
3.4.3 Translocação (1;19)(q23;p13).....	12
3.5 Estratificação Risco.....	14
3.6 Tratamento.....	15
4. Objetivos.....	16
4.1 Objetivos gerais.....	16
4.2 Objetivos específicos.....	16
5. Resultados – Artigo.....	17
6. Considerações Finais.....	36
7. Referências.....	37
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa.....	42
Anexo 2 – Autorização para uso de imagem da seção Referencial teórico..	48

## 1. Introdução

As leucemias agudas constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação descontrolada de um ou mais clones celulares na medula óssea com capacidade de invasão de tecidos adjacentes (INCA, 2002). Estes clones resultam de uma célula progenitora que sofreu uma série de alterações genéticas, conferindo vantagem proliferativa em relação à hematopoese normal. O aumento na proliferação desses clones leucêmicos afeta todas as linhagens celulares (leucocitária, eritróide e plaquetária), inibindo sua produção e impedindo a diferenciação celular (American Cancer Society, 2016). Dependendo da linhagem celular afetada, as leucemias agudas estão divididas em leucemia mieloide aguda (LMA), linfoblásticas aguda (LLA) ou leucemia de linhagem mista (INCA, 2002).

A LLA é uma neoplasia maligna de origem linfóide, caracterizada pelo acúmulo clonal de linfoblastos na medula óssea e supressão da hematopoese normal (DEEPA BHOJWANI, *et al.*, 2015). Embora a LLA possa ocorrer em qualquer faixa etária, esse tipo de leucemia é mais comum na infância, ocorrendo um pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade (STELIAROVA-FOUCHER *et al.*, 2017). As neoplasias linfoblásticas agudas também se classificam com base na linhagem celular afetada podendo ser de células B (LLA-B) ou T (LLA-T). Na infância, 85% dos casos são de linhagem do tipo B (KUHLEN; KLUSMANN; HOELL, 2019).

Em 1976, as leucemias agudas foram separadas em subtipos por um grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB), tomando por base critérios morfológicos e citoquímicos nas células do sangue periférico e aspirado ou biópsia de medula óssea (MO), definindo como leucemia aguda quando apresentavam mais de 30% de blastos na MO (BENNETT *et al.*, 1976). A partir do tamanho celular e pleomorfismo nuclear, as LLAs foram classificadas como L1, L2 e L3 (BENNETT *et al.*, 1976; FARIAS; CASTRO, 2004). Já em 1995, o grupo *European Group for Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)* propôs uma classificação para as LLAs de acordo com a expressão de antígenos celulares. Essa classificação toma por base apenas critérios imunofenotípicos (BENE *et al.*, 1995). Com o surgimento de novas técnicas de diagnósticos essa classificação foi revista pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que propôs uma nova classificação incluindo também informações sobre imunofenotipagem,

biologia molecular e citogenética, além de ser considerada a presença de 20% de blastos na MO como suficientes para o diagnóstico da doença (ARBER. D *et al.*, 2016).

Em relação a biologia molecular e citogenética, na LLA-B os principais transcritos identificados e utilizados na prática clínica são a translocação t(12;21)(p13;q22) (TEL-AML1) representando 20-25% dos casos, t(1;19)(q23;p13.3)(TCF3-PBX1) com 6-7% dos casos, t(9;22)/BCR-ABL com 3-5% dos casos e t(4;11)/MLL-AF4, a qual está presente em até 60% das crianças menores de 12 meses, e em apenas 3% dos adultos (MOORMAN *et al.*, 2010). Essas translocações cromossômicas em muitos casos dão origem a fusões gênicas que produzem RNAs mensageiros, na qual codificam proteínas com diferentes propriedades estruturais e funcionais. Essas proteínas podem ativar a transcrição diretamente sem a interação com outras proteínas.

Existem diversas técnicas para auxiliar o diagnóstico molecular das LLAs, entretanto cada metodologia apresenta vantagens e desvantagens. A análise citogenética convencional é realizada através do estudo dos cromossomos que permite a identificação de algumas translocações e aberrações cromossômicas, contudo essa técnica requer tempo, experiência e necessita de um grande número de células em divisão aproximadamente 20-30 células estando principalmente na fase de metáfase (LAZARYAN *et al.*, 2019). Além disso, existem deleções ou rearranjos cromossômicos que não são detectados por esta técnica. Outro método diagnóstico é a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), na qual utiliza sondas hibridizadas que marcam os cromossomos em metáfase ou núcleo em interfase, sendo detectados por fluorocromos (KEBRIAEI; ANASTASI; LARSON, 2002). Essa técnica é mais rápida e mais sensível que a análise citogenética convencional, entretanto em casos de remissão requer um grande número de núcleos para análise, sendo de baixa sensibilidade quando comparada com outros métodos moleculares; além de custo elevado (HARRISON *et al.*, 2005). Já no campo da biologia molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) aparece como uma das principais técnicas moleculares aplicadas, bem como seu desdobramento em PCR digital, até técnicas mais recentes como o sequenciamento de última geração (NGS).

A PCR é uma técnica molecular sensível, específica e relativamente rápida, podendo disponibilizar resultados em horas. Sua sensibilidade advém da

capacidade de detectar uma única célula leucêmica entre  $10^5$  e  $10^6$  células normais, através da amplificação da região genômica alvo. Trata-se de uma reação específica por utilizar sequências de *primers* e sondas específicas para detecção de determinado alvo genético. Neste contexto, a possibilidade de detecção de translocações gênicas impactou na classificação molecular das leucemias e na conduta terapêutica (DEEPA BHOJWANI, *et al.*, 2015). As detecções de alterações gênicas, anteriormente não relatadas pelos métodos morfológicos, tornaram-se importantes na avaliação de risco. Anormalidades estruturais específicas como a t(9;22), t(1;19) e t(4;11) conferem um alto risco de recidiva. Por outro lado, a t(12;21) está associada a um prognóstico altamente favorável (MOORMAN *et al.*, 2010). Assim, os grupos de maior risco são tratados com esquemas quimioterápicos mais intensos, enquanto os grupos de baixo risco, com bom prognóstico, podem utilizar protocolos menos intensos (DEEPA BHOJWANI, *et al.*, 2015) Além do surgimento de terapias alvo específicas como a utilização dos inibidores de tirosina quinase, principalmente o mesilato de imatinibe, modificou drasticamente o tratamento de pacientes com a translocação t(9;22) melhorando a taxa de sobrevida em aproximadamente 10 anos (POLILLO *et al.*, 2015).

Neste sentido, o presente estudo propõe a padronização e validação de um ensaio molecular para determinação dos principais transcritos t(12;21)(p13;q22) (TEL-AML1), t(1;19)(q23;p13.3)(TCF3-PBX1) e t(4;11)/MLL-AF4 na LLA B, em amostras de pacientes atendidos no Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O transcrito t(9;22)/BCR-ABL p190 já encontra-se implementado na rotina laboratorial.

## **2. Justificativa**

Atualmente, os exames moleculares de diagnóstico e monitoramento dos pacientes com LLA B atendidos no HCPA são realizados em laboratórios externos à instituição, resultando em uma espera de aproximadamente 30 dias para obtenção dos resultados. Além disso, o transporte da amostra até o laboratório externo pode comprometer a qualidade do exame, pois o recomendado é processar o RNA, que é bastante instável, dentro de 24h.

A validação, padronização dos exames moleculares t(12;21)(p13;q22) (TEL-AML1), t(1;19)(q23;p13.3)[TCF3-PBX1] e t(4;11)/MLL-AF4 já preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), na Unidade de Diagnóstico Especializado do HCPA, visa diminuir o tempo de disponibilização dos resultados as equipes médicas, diminuir o custo do exame e garantir a qualidade da análise.



### **3. Referencial Teórico**

#### **3.1 Leucemia Linfoblástica Aguda**

A LLA é a neoplasia mais comum na infância, sendo estimado aproximadamente, 30 a 50 novos casos por milhão de crianças, e representa 25% a 30% de todas as malignidades infantis, com um pico de incidência entre 2 a 5 anos de idade. (INCA, 2018).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) a estimativa para o biênio 2020-2022 de novos casos de leucemias no Brasil, independentemente do tipo, é na ordem de 5.940 casos para homens e 4.890 casos para mulheres. Já para o Estado do Rio Grande do Sul, a taxa estimada é de 7,67 casos para cada 100 mil homens e 6,17 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2019). Nos Estados Unidos, aproximadamente 2500 a 3500 novos casos de LLA são diagnosticados em crianças, com uma incidência de aproximadamente 3,4 casos por 100 mil habitantes (WARD *et al.*, 2014).

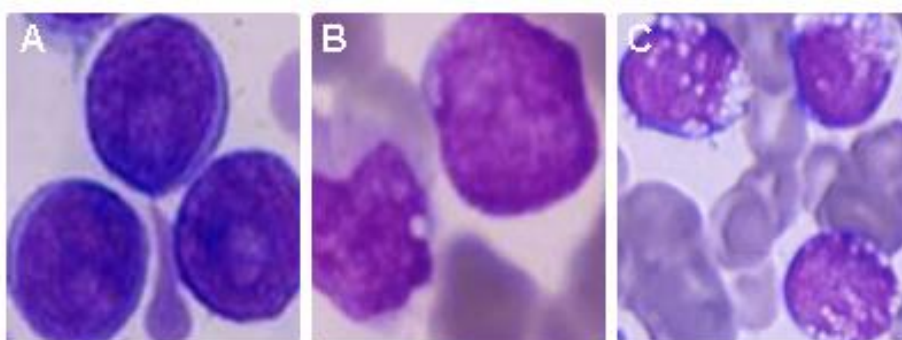
Atualmente, as leucemias agudas são classificadas de acordo com o aspecto citomorfológico, citoquímico, imunofenotípico, citogenético e genético-molecular (ARBER. D *et al.*, 2016). Antigamente a análise morfológica e citoquímica eram as principais metodologias utilizadas para o diagnóstico das leucemias, entretanto havia dificuldades na reprodutibilidade dos resultados e na padronização da técnica, mas com o advento da tecnologia outros parâmetros foram sendo pesquisados. Hoje em dia, estudos de imunofenotipagem por citometria de fluxo permitem a estratificação dos subtipos celulares, o que não era possível somente com a morfologia (ARBER. D *et al.*, 2016). Além disso, nos últimos anos, os estudos utilizando a biologia molecular vêm ajudando no diagnóstico da doença, com a estratificação dos grupos de risco, prognóstico e tratamento adequado para cada paciente (MOORMAN *et al.*, 2010).

#### **3.2 Classificação morfológica**

O estudo morfológico é um dos critérios para o diagnóstico das leucemias agudas. O diagnóstico é estabelecido quando o exame da medula óssea revela blastos acima de 20% da celularidade total (BENNETT *et al.*, 1976). Em 1976, o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) classificou as LLAs em três subtipos morfológicos, L1, L2 e L3, com base no diâmetro celular, forma do núcleo e

protuberância dos nucléolos, bem como quantidade e aspectos relativos do citoplasma (Figura 1):

- LLA-L1: células linfóides pequenas e homogêneas, cromatina nuclear fina, ausência de nucléolos, citoplasma escasso e núcleo regular.
- LLA-L2: células grandes e heterogêneas, cromatina nuclear frouxa, presença de nucléolos, citoplasma abundante e forma do núcleo irregular.
- LLA-L3: células linfóides grandes e homogêneas, com cromatina nuclear fina, nucléolos proeminentes, citoplasma fortemente basofílico e com presença de vacúolos.



**Figura 1.** Diferentes subtipos de células linfóides segundo a classificação do grupo Franco-Americano-Britânico. A) Leucemia Linfoblástica do tipo L1. B) Leucemia Linfoblástica do tipo L2. C) Leucemia Linfoblástica do tipo L3. (GAMAL ABDUL-HAMID, 2016).

### 3.3 Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)

Em 2016, a OMS juntamente com Associação Europeia de Hematopatologia e a Sociedade Europeia de Hematopatologia, atualizou a classificação de Tumores de Tecidos Linfóides e Hematopoéticos, no qual incorpora aspectos clínicos, morfologia, imunofenotipagem, citogenética e genética molecular para definir a importância clínica (Tabela 1) (ARBER D., *et al* 2016). Atualmente a LLA é subdividida em precursor B e precursor T. Além disso, a LLA do tipo B é subdividida em 9 tipos diferentes de subclassificação.

**Tabela 1.** Classificação da OMS da Leucemia Linfóide Aguda

Leucemia/Linfoma linfoblástico B
Leucemia/Linfoma linfoblástico B, sem outra especificação
Leucemia/Linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia linfoblástica de células B com t(9;22)(q34;q11.2) [BCR-ABL1]
Leucemia linfoblástica de células B com t(v;11q23)[rearranjo MLL]
Leucemia linfoblástica B com t(12;21)(p13;q22) [TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)]
Leucemia linfoblástica de células B com hiperdiploidia
Leucemia linfoblástica células B com hipodiploidia
Leucemia linfoblástica de células B com t(5; 14)(q31;q32) [IL3-IGH]
Leucemia linfoblástica de células B com t(1;19)(q23;p13.3)[TCF3-PBX1]
Leucemia/Linfoma linfoblástico T

Fonte: Adaptado de ARBER. D et al., 2016

### 3.4 Translocações cromossômicas

#### 3.4.1 Translocação t(12;21)(p13;q22)

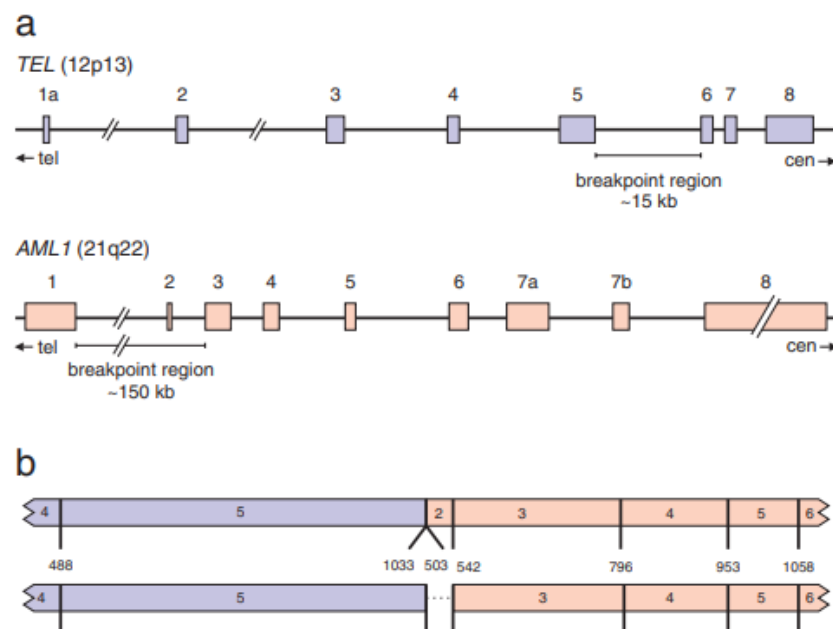
O gene TEL (Translocação-Ets-Leucemia), também chamado ETV6, consiste de oito éxons, na região 12p13 e codifica uma proteína de 57 kDa, de localização nuclear. É membro da família de fatores de transcrição, na qual é crucial para o estabelecimento da hematopoese de todas as linhagens celulares na medula óssea, tendo como função a repressão transcricional (GABERT et al., 2003) (Figura 2).

O gene AML1, também conhecido como RUNX1 ou CBFA2, está localizado no cromossomo 21q22 e encontra-se expresso, normalmente, em todas as linhagens hematopoéticas, atuando na regulação da proliferação e diferenciação destas células (GREAVES; WIEMELS, 2003).

A fusão TEL/AML1, inibe a atividade de transcrição do gene AML1 normal. A proteína de fusão TEL/AML1 pode desregular a expressão do gene de regulação AML1 de forma o converter para um repressor transcricional. HIEBERT et al., 1996). Esse repressão transcricional é um dos mecanismos

patogênicos da LLA com a t(12;21) Além disso TEL/AML1 também causa a superexpressão do receptor de eritropoietina e ativação da sinalização a jusante de JAK-STAT (ZELENT; GREAVES; ENVER, 2004).

A translocação t(12;21)(p13;q22) é observada em cerca de 25% das crianças com leucemia da linhagem B, em comparação com aproximadamente 3% dos adultos (MOORMAN et al., 2010). A maior parte das crianças com t(12;21) apresentam imunofenótipo precursor de células B, principalmente da LLA-B comum ou pré-B e, raramente, da LLA pró-B (DIGIUSEPPE; WOOD, 2019). A presença dessa translocação confere ao paciente um excelente prognóstico com sobrevida geral de doença de 90% (PUI; ROBISON; LOOK, 2008).



**Figura 2.** Figura esquemática dos genes TEL e AML1. A) Representa a estrutura dos genes TEL e AML1, juntamente com os pontos de quebra. B) Produto gerado da translocação t(12;21)(p13;q22) (VAN DONGEN et al., 1999). Cópia autorizada pela revista *Leukemia*, número de licença 4976750326118 (anexo 2).

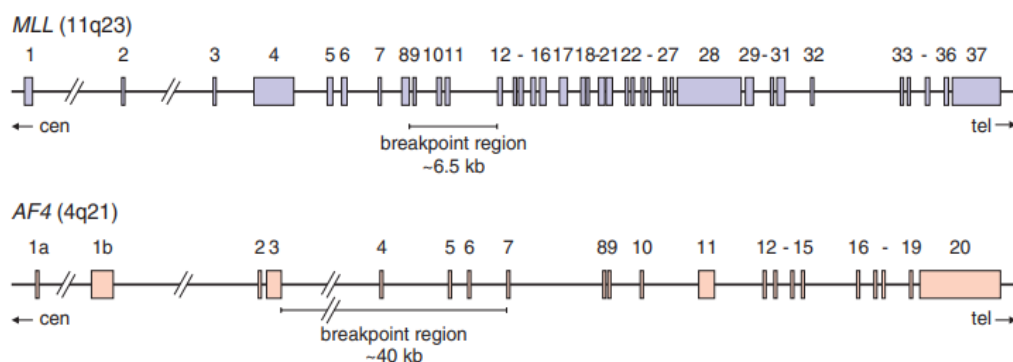
### 3.4.2 Translocação t(4;11)(q21;q23)

Os rearranjos envolvendo o gene leucemia de linhagem mista (MLL) na banda 11q23 representam a anormalidade cromossômica não randomizada mais comum encontrada em malignidades hematológicas, incluindo a LLA e LMA (MULLIGHAN et al., 2012). A translocação é encontrada principalmente em leucemias de lactentes (até 60% das crianças menores de 12 meses), enquanto

em crianças com idade maior de 1 ano, a incidência é muito inferior (2-3%) (MOORMAN et al., 2010). Pacientes que apresentam essa translocação tem um prognóstico ruim. Os achados típicos incluem uma taxa de remissão de 75%, mas uma sobrevida mediana livre de eventos de apenas sete meses em adultos e uma taxa de remissão completa de 88%, mas uma sobrevida mediana de 10 meses em crianças (CIMINO et al., 2000).

Na t(4;11) ocorre a fusão do gene KMT2A na banda do cromossomo 11q23.3 ao gene AFF1 (AF4) na banda do cromossomo 4q21.3, formando um KMT2A-AFF1 gene de fusão, que é transcrito em um mRNA quimérico (MULLIGHAN et al., 2012) (Figura 3).

Essas translocações envolvem o gene KMT2A. A proteína KMT2A é uma histona metiltransferase que se reúne em complexos proteicos que regulam a transcrição gênica via remodelação da cromatina (SUN et al., 1999). Os genes alvo dos complexos reguladores da transcrição KMT2A incluem os genes HOX e o gene IKZF1 (IKAROS), que têm um papel crítico no desenvolvimento e na hematopoese (SUN et al., 1999).



**Figura 3.** Figura esquemática dos genes MLL e AF4 (AFF1) e pontos de quebra. (VAN DONGEN et al., 1999). Cópia autorizada pela revista *Leukemia*, número de licença 4976750326118 (anexo 2).

### 3.4.3 Translocação (1;19)(q23;p13)

O gene E2A é constituído por 17 éxons e está localizado no núcleo, na região cromossômica 19p13.3 (GABERT et al., 2003) (Figura 4). Esse gene codifica duas proteínas: E12 e E47 que são membros da família de fatores de transcrição *basic helix-loop-helix* (bHLH). Estes fatores de transcrição estão envolvidos no processo de diferenciação e crescimento celular. Essas proteínas

são expressas em muitos tipos celulares e parecem ser essenciais à hematopoese de células normais da linhagem B (MULLIGHAN et al., 2012). O gene PBX1 está localizado no núcleo, na região 1q23, associado às proteínas HOX, cuja função é ligar-se a sequências específicas do DNA para a regulação da transcrição (HARRISON, 2001). A proteína de fusão E2A/PBX é oncogênica e afeta a diferenciação celular (HUNGER et al., 1998).

A t(1;19)(q23;p13), é a segunda translocação mais comum na LLA da infância, relatada, primeiramente, em alguns casos de LLA pré-B (HUNGER et al., 1998). Este subtipo de leucemia difere na origem morfológica e prognosticamente do subtipo de LLA comum, representando aproximadamente 25% das LLA pré-B da infância e 5-6% do adulto (MOORMAN et al., 2010).

A presença dessa translocação correlaciona com características clínicas de alto risco, tais como leucocitose, níveis elevados de LDH e envolvimento no sistema nervoso central. Desse modo, essa translocação está associada com pior prognóstico e alto risco de recidiva (PUI; ROBISON; LOOK, 2008).

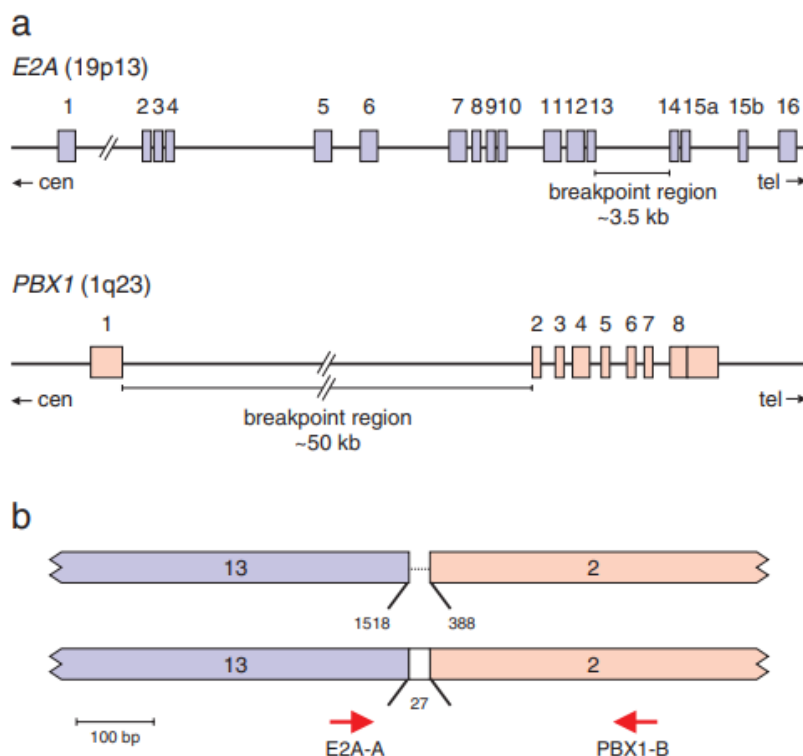


Figura 4. Figura esquemática dos genes E2A e PBX1. A) Representa a estrutura dos genes E2A e PBX1, juntamente com os pontos de quebra. B) Produto gerado da translocação t(1;19)(q23;p13), (VAN DONGEN et al., 1999). Cópia autorizada pela revista *Leukemia*, número de licença 4976750326118 (anexo 2).

### 3.5 Estratificação de Risco

Atualmente, os protocolos de tratamento para LLA são baseados na estratificação de risco com objetivo de reduzir a toxicidade do tratamento com os quimioterápicos em pacientes classificados de baixo risco. Já em pacientes de alto risco são indicadas terapias mais agressivas (LOH *et al.*, 2006). Essa estratificação auxiliou a melhorar a taxa de sobrevida das crianças com LLA. Independente do grupo de estudo, características laboratoriais têm sido correlacionadas com o prognóstico, como contagem inicial de leucócitos no sangue periférico, idade, gênero, expressão imunológica da doença, alterações cromossômicas específicas, morfologia da FAB, organomegalia e linfadenopatias e contagem de plaquetas (SCHULTZ *et al.*, 2007; STEVENS *et al.*, 2008).

Os pacientes são divididos em 4 grupos de risco após a correlação dos fatores clínicos e biológicos iniciais (STEPHEN P. HUNGER, 2013):

- Baixo Risco: Criança com idade favorável (entre 1-10 anos), baixa contagem de leucócitos ( $<10.000/\mu\text{L}$ ) e alterações citogenéticas favoráveis como hiperdiploidia ou presença de rearranjo TEL/AML (ETV6-RUNX1), com uma resposta rápida ao tratamento inicial apresentam melhor prognóstico
- Risco padrão: Criança com idade favorável, baixa contagem de leucócitos, mas sem alterações citogenéticas favoráveis, são consideradas como risco padrão de LLA.
- Alto risco: Pacientes com idade superior a 10 anos, pacientes com alterações citogenéticas desfavoráveis, como translocação t(1;19)/E2A-PBX1 e doença residual mínima (DRM) maior que 0,01% após o 28º e 36º dia da terapia de indução são considerados alto risco.
- Risco muito alto: crianças que apresentam hipodiploidia extrema (44 ou menos cromossomo), t(9;22) rearranjo BCR-ABL, t(4;11) rearranjo KMT2A (MLL) ou amplificação do iAMP21 (amplificação intracromossômica do cromossomo 21).

### 3.6 Tratamento

Os principais protocolos de tratamento para LLA-B são o Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância (GBTLI) e Associação Italiana Hematologia Oncologia Pediátrica (AIEOP), os quais consistem em 3 principais fases. A fase de indução tem como objetivo a obtenção da remissão completa, na qual é definida como a erradicação das células leucêmicas detectáveis tanto na medula óssea como no sangue periférico (KATO; MANABE, 2018). A terapia de indução geralmente envolve a administração semanal de vincristina por três a quatro semanas, corticosteróides diários (prednisona, prednisolona ou dexametasona), asparaginase, podendo ser associado a antraciclina (CHIARETTI; JABBOUR; HOELZER, 2018).

Após terapia de indução, terapia de consolidação subsequente começa a erradicar células leucêmicas residuais. Várias combinações citotóxicas e doses elevadas ou crescentes são utilizadas e apresentam uma duração de quatro a oito meses (HAGOP M. KANTARJIAN, MD, et al, 2015). Os principais agentes quimioterápicos são: citarabina, metotrexato, antraciclina (daunorrubicina, doxorubicina), agentes alquilantes (ciclofosfamida, ifosfamida) e epipodofilotoxinas (etoposídeo, etofosfamida) (DEEPA BHOJWANI, MDA,C, JUN J. YANG, PHDB,C, AND CHING-HON PUI, 2015).

A terapia de manutenção é administrada após a terapia de consolidação e normalmente dura de 1 a 2 anos. 6-Mercaptopurina diária (6-MP) e metotrexato semanal é uma combinação padrão, e algumas terapias de manutenção são intensificadas com vincristina e prednisona, principalmente para pacientes do grupo de alto risco (KATO; MANABE, 2018).



## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivos gerais**

Realizar a padronização, validação dos principais transcritos de importância prognóstica t(12;21)(p13;q22) (TEL-AML1), t(1;19)(q23;p13.3) e t(4;11)/MLL-AF4 em pacientes com leucemia linfoblástica aguda, através da técnica *in house* qualitativa de PCR em tempo real associada à transcriptase reversa (RT-qPCR).

### **4.2 Objetivos específicos:**

- a) Definir as sequências genômicas para detecção dos principais transcritos (12;21)(p13;q22) (TEL-AML1), t(1;19)(q23;p13.3) e t(4;11)/MLL-AF4) através de ensaio de RT-qPCR;
- b) Construir uma curva de eficiência das reações de PCR para cada um dos transcritos;
- c) Determinar os limites de detecção do ensaio de PCR para cada um dos transcritos estudados;
- d) Identificar as três principais translocações cromossômicas de significado prognóstico pela técnica de RT-qPCR no grupo de estudo.











































## **6. Considerações Finais**

A identificação das principais translocações cromossômicas de prognóstico em pacientes com LLA-B possui grande impacto no manejo clínico do paciente, por esse motivo é de extrema relevância que novas técnicas de identificação sejam desenvolvidas de forma que possa ser executá-las dentro de uma rotina laboratorial hospitalar. O estudo destas alterações, juntamente com BCR-ABL p190 já implementado na rotina laboratorial, determinam não só o prognóstico, como também a estratificação dos diferentes grupos de risco. A identificação dessas anormalidades permite a escolha de terapias direcionadas para cada grupo. Pacientes que apresentam risco alto necessitam de escolhas de terapias mais intensas, do que pacientes que apresentam risco baixo. Sabemos que para um ensaio de validação necessita de um tamanho amostral maior que o utilizado, entretanto este estudo possibilitou a implementação de análises de translocação cromossômica em nossa instituição, permitindo terapias cada vez mais individualizadas, independência institucional e garantia de atendimento de qualidade.

## 7. Referências

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts 2016. Atlanta: American cancer.

ARBER, Daniel A. WHO Classification 2016. **Blood**, [s. l.], v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 2016. Disponível em: <<http://www.ukm.my/geografia>>

BENE, M. C. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. **Leukemia**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 2147–2148, 1995.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 451–458, 1976.

CIMINO, Giuseppe et al. A prospective study of residual-disease monitoring of the ALL1/AF4 transcript in patients with t(4; 11) acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 96–101, 2000.

CHIARETTI, Sabina; JABBOUR, Elias; HOELZER, Dieter. “Society of Hematologic Oncology (SOHO) State of the Art Updates and Next Questions” Treatment of ALL. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 301–310, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.03.014>>

DEEPA BHOJWANI, MDA,C, JUN J. YANG, PHDB,C, AND CHING-HON PUI, MD. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatr Clin North Am**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 47–60, 2015.

DIGIUSEPPE, Joseph A.; WOOD, Brent L. Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, [s. l.], 2019.

FARIAS, Mariela Granero; CASTRO, Simone Martins De. Diagnóstico

laboratorial das leucemias linfóides agudas. **J Bras Patol Med Lab**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 91–98, 2004.

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, 2003.

GAMAL ABDUL-HAMID. Classification of Acute Leukemia. [s. l.], n. tourism, p. 13, 2016. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>>

GREAVES, Mel F.; WIEMELS, Joe. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 639–649, 2003.

HAGOP M. KANTARJIAN, MD, DEBORAH THOMAS, MD, FARHAD RAVANDI, MD, STEFAN FADERL, MD, ELIAS JABBOUR, MD, GUILLERMO GARCIA-MANERO, MD, SHERRY PIERCE, RN, JIANQUIN SHAN, PHD, JORGE CORTES, MD, AND SUSAN O'BRIEN, MD. Defining the Course and Prognosis of Adults With Acute Lymphocytic Leukemia in First Salvage After Induction Failure or Short First Remission Duration. [s. l.], v. 116, n. 24, p. 5568–5574, 2015.

HARRISON, Christine J. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Blood Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 49–59, 2001.

HIEBERT, S. W. et al. The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 1349–1355, 1996.

HUNGER, Stephen P. et al. E2A-PBX1 chimeric transcript status at end of consolidation is not predictive of treatment outcome in childhood acute

lymphoblastic leukemias with a t(1;19)(q23;p13): A pediatric oncology group study. **Blood**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 1021–1028, 1998.

INCA. Leucemia Linfóide Aguda em Adultos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 313–315, 2002.

INCA. **Estimativa 2019 - Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2019/sobre-as-estimativas.asp>. Acesso em 04 de dezembro de 2020.

KATO, Motohiro; MANABE, Atsushi. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatrics International**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 4–12, 2018.

KEBRIAEI, Partow; ANASTASI, John; LARSON, Richard A. Acute lymphoblastic leukaemia: Diagnosis and classification. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 597–621, 2002

KUHLEN, Michaela; KLUSMANN, Jan-Henning; HOELL, Jessica I. Molecular Approaches to Treating Pediatric Leukemias. **Frontiers in Pediatrics**, [s. l.], v. 7, n. September, p. 1–12, 2019.

LAZARYAN, Aleksandr et al. Impact of cytogenetic abnormalities on outcomes of adult Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation : a study by the Acute Leukemia Working Committee of the Center for International Blood an.

LHERMITTE, L. et al. Automated database-guided expert-supervised orientation for immunophenotypic diagnosis and classification of acute leukemia. **Leukemia**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 874–881, 2018.

LOH, Mignon L. et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. **Blood**, [s. l.], v. 107, n. 11, p. 4508–4513, 2006.



MOORMAN, Anthony V. et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 429–438, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70066-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70066-8)>

MULLIGHAN, Charles G. et al. Molecular genetics of BCP-ALL. **The Journal of clinical Investigation**, [s. l.], v. 122, n. 7, p. 3407–3415, 2012.

MULLEGAMA, Sureni V. et al. Nucleic acid extraction from human biological samples. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 1897, p. 359–383, 2019.

POLILLO, Marialuisa et al. Pharmacogenetics of BCR/ABL inhibitors in chronic myeloid leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 22811–22829, 2015.

PUI, Ching Hon; ROBISON, Leslie L.; LOOK, A. Thomas. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, [s. l.], v. 371, n. 9617, p. 1030–1043, 2008.

STEVENS, MCG et al. The British Childhood Cancer Survivor Study: Objectives, methods, population structure, response rates and initial descriptive information. **Pediatric blood & cancer**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 1018–1025, 2008.

STELIAROVA-FOUCHER, Eva et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 719–731, 2017.

SCHULTZ, Kirk R. et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). **Blood**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 926–935, 2007.

SUN, Lei et al. Expression of dominant-negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 680–685, 1999.

VAN DONGEN, J. J. M. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1901–1928, 1999.

ZELEN, Arthur; GREAVES, Mel; ENVER, Tariq. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Oncogene**, [s. l.], v. 23, n. 24, p. 4275–4283, 2004.

WARD, Elizabeth et al. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 83–103, 2014.

## ANEXO 1

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL  
HCPA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Validação da técnica molecular para identificação de marcadores prognósticos em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B

**Pesquisador:** Ana Paula Alegretti

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 25380610.9.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.781.885

#### Apresentação do Projeto:

Neste projeto os autores pretendem realizar a validação de técnica molecular por PCR para identificar marcadores de Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B (LLA B). Neste sentido, o estudo realizará a padronização e validação de um ensaio molecular para determinação dos principais transcritos t(12;21)(p13;q22) (TEL-AML1), t(1;19)(q23;p13.3)[TCF3-PBX1] e t(4;11)MLL-AF4 na LLA B, em amostras de pacientes atendidos no Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Serão avaliadas amostra de sangue periférico e/ou sangue de medula óssea de pacientes internados com diagnóstico de LLA B. O período das coletas estará compreendido entre janeiro de 2020 a dezembro de 2020, caracterizando um estudo transversal até que se obtenham pelo menos 27 amostras positivas. O material utilizado será o mesmo já coletado para a rotina diagnóstica. Segundo os autores atualmente, os exames moleculares de diagnóstico e monitoramento dos pacientes com LLA B atendidos no HCPA são realizados em laboratórios externos, resultando em uma espera de aproximadamente 30 dias para obtenção dos resultados, o que justifica a padronização do método na instituição.

O projeto está claro, bem desenhado e possui relevância. Apresenta cálculo amostral, os termos de uso de dados e material biológico.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL  
HCPA



Continuação do Parecer: 3.791.895

**Objetivo da Pesquisa:**

**Geral**

Realizar a padronização, validação dos principais transcritos de importância prognóstica t(12;21)(p13;q22) (TEL-AML1), t(1;19)(q23;p13.3), t(4;11)MLL-AF4 em pacientes com leucemia linfoblástica aguda, através da técnica in house qualitativa de PCR em tempo real associada à transcriptase reversa (RT-qPCR).

**Específicos**

- Definir as sequências genômicas para detecção dos principais transcritos (12;21)(p13;q22) (TEL-AML1), t(1;19)(q23;p13.3), t(4;11)MLL-AF4 através de ensaio de RT-qPCR;
- Determinar a concentração de uso dos primers e sondas adequada para cada transcrito pesquisado;
- Construir uma curva de eficiência das reações para cada um dos transcritos pela técnica in house;
- Determinar os limites de detecção para cada um dos transcritos estudados pela técnica in house;
- Comparação dos resultados obtidos através de sequenciamento do produto de amplificação;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos**

Os riscos do estudo, os participantes poderão sofrer o desconforto da coleta de sangue periférico e/ou medula óssea (de acordo com critério clínico), porém salienta-se que está coleta já é realizada para a realização dos exames de rotina.

**Benefícios**

Embora a pesquisa não proporcione benefícios imediatos ao participante, os resultados e a participação no estudo poderão contribuir para que o conhecimento das relações entre as variáveis laboratoriais hematológicas possa ser utilizado como medida de antecipação do prognóstico do paciente bem como contribuir para um melhor manejo da doença. Considerando a complexidade atendida no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e o atendimento prestado ser voltado ao Sistema Único de Saúde (SUS), este trabalho trará um reflexo muito positivo à assistência ao paciente.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de projeto de conclusão da Residência Integrada Multiprofissional em Saúde onde os

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL  
HCPA



Continuação do Parecer: 3.791.895

autores pretendem validar uma técnica de diagnóstico molecular por PCR para identificação de marcadores prognósticos em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B. Será realizada a padronização e validação de um ensaio molecular para determinação dos principais transcritos t(12;21)(p13;q22) (TELAML1), t(1;19)(q23;p13.3)[TCF3-PBX1] e t(4;11)/MLLAF4 na LLA B, em amostras de pacientes atendidos no Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para tanto serão utilizadas um total de 27 amostras de sangue periférico e/ou biópsia de medula óssea já coletados na rotina. Segundo os autores atualmente, os exames moleculares de diagnóstico e monitoramento dos pacientes com LLA B atendidos no HCPA são realizados em laboratórios externos, resultando em uma espera de aproximadamente 30 dias para obtenção dos resultados, o que justifica a padronização do método na instituição.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os autores apresentam TCUD e termo de uso de material biológico. Pedem dispensa de TCLE justificando: "Esse estudo não prevê coleta adicional de material biológico, utilizando o mesmo material da rotina de análise dos pacientes. Desta forma, solicitas-se dispensa do TCLE, já que os pacientes não estarão expostos a nenhum risco adicional".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.724.362 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 05/12/2019. Não apresenta novas pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto de 08/11/2019 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- Este projeto está aprovado para utilização de material biológico de 27 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE  
 CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
 DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
 DO RIO GRANDE DO SUL**



HCPA

Continuação do Parecer: 3.791.895

d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1460432.pdf	05/12/2019 18:23:20		Aceito
Outros	resposta_ao_parecer.docx	05/12/2019 18:21:39	Julia Biz Willig	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOTOTCRHCPA_novo.pdf	08/11/2019 09:52:48	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	DelegacaodeFuncoes.pdf	30/10/2019 22:12:23	Julia Biz Willig	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	30/10/2019 22:07:37	Julia Biz Willig	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	30/10/2019 22:07:18	Julia Biz Willig	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	30/10/2019 22:00:17	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAOEDADOSINSTITUCIONAIS_Luana.pdf	30/10/2019 21:58:41	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAOEDADOSINSTITUCIONAIS_Mariana.pdf	30/10/2019 21:58:03	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAOEDADOSINSTITUCIONAIS_Diego.pdf	30/10/2019 21:57:10	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAOEDADOSINSTITUCIONAIS_Ana.pdf	30/10/2019 21:56:46	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAOEDADOSINSTITUCIONAIS_Rodrigo.pdf	30/10/2019 21:56:21	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAOEDADOSINSTITUCIONAIS_Julia.pdf	30/10/2019 21:55:57	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAOEDADOS_Luana.pdf	30/10/2019 21:54:58	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAOEDADOS_Luana.pdf	30/10/2019	Julia Biz Willig	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
 Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL  
HCPA



Continuação do Parecer: 3.781.885

Outros	ACAODEDADOS_Mariela.pdf	21:54:37	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEDADOS_Diogo.pdf	30/10/2019 21:54:18	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEDADOSAna.pdf	30/10/2019 21:53:55	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEDADOS_Rodrigo.pdf	30/10/2019 21:52:03	Julia Biz Willig	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEDADOS_Julia.pdf	30/10/2019 21:51:46	Julia Biz Willig	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEMATERIALBIOLOGICO_Luana.pdf	30/10/2019 21:50:32	Julia Biz Willig	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEMATERIALBIOLOGICO_Mariela.pdf	30/10/2019 21:50:18	Julia Biz Willig	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEMATERIALBIOLOGICO_Diogo.pdf	30/10/2019 21:50:00	Julia Biz Willig	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEMATERIALBIOLOGICO_Ana.pdf	30/10/2019 21:49:16	Julia Biz Willig	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEMATERIALBIOLOGICO_Rodrigo.pdf	30/10/2019 21:49:00	Julia Biz Willig	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMODECOMPROMISSOPARAUTILIZACAODEMATERIALBIOLOGICO_Julia.pdf	30/10/2019 21:48:39	Julia Biz Willig	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
 Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL &  
HCPA



Continuação do Parecer: 3.781.885

**Necessita Apreciação da CONEP:**  
Não

PORTO ALEGRE, 18 de Dezembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Têmis Maria Félix**  
**(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

Página 08 de 08



## ANEXO 2

**Thank you for your order!**

Dear Miss. Julia Willig,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.


**Order Summary**

Licensee: Miss. Julia Willig  
Order Date: Dec 28, 2020  
Order Number: 4976750326118  
Publication: Leukemia  
Title: Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease  
Type of Use: Thesis/Dissertation  
Order Total: 0.00 USD

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,  
Copyright Clearance Center

Tel: +1-855-239-3415 / +1-978-646-2777  
customerservice@copyright.com  
<https://www.copyright.com/rightslink>

 **Copyright Clearance Center** **RightsLink®**