

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM PESQUISA CLÍNICA

CLARA LUCY DE VASCONCELLOS FERROCO

CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO A LONGO PRAZO DE
AMOSTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS PARA APLICAÇÃO EM BIOBANCOS COM
FINS DE PESQUISA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Rio de Janeiro

2021

CLARA LUCY DE VASCONCELLOS FERROCO

CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO A LONGO PRAZO DE
AMOSTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS PARA APLICAÇÃO EM BIOBANCOS COM
FINS DE PESQUISA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica, na modalidade Profissional, do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica, sob a orientação do Dr. Thiago Silva Torres e do Dr. Claudio Gustavo Stefanoff.

Rio de Janeiro

2021

CLARA LUCY DE VASCONCELLOS FERROCO

CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO A LONGO PRAZO DE
AMOSTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS PARA APLICAÇÃO EM BIOBANCOS COM
FINS DE PESQUISA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica, na modalidade Profissional, do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica.

Orientador: Dr. Thiago Silva Torres

Coorientador: Dr. Claudio Gustavo Stefanoff

Aprovada em: 25/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Lara Esteves Coelho (Presidente)
INI/Fiocruz

Dr.^a Ivana Alana Freitas Brasileiro da Silveira
Bio-Manguinhos /Fiocruz

Dr.^a Luciane Almeida Amado Leon
IOC/Fiocruz

Dr. Paulo Roberto Gomes Takey (Suplente e Revisor)
Bio-Manguinhos /Fiocruz

Dedico este trabalho à minha saudosa avó Filomena, minha maior incentivadora, cuja presença foi essencial em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Oswaldo Cruz e Bio-Manguinhos, pela oportunidade de crescimento profissional;

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, pela realização do curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica;

À minha gestora, Dr.^a Maria de Lourdes de Sousa Maia, por todo incentivo e apoio para que eu pudesse ingressar nesse desafio;

Ao meu orientador, Dr. Thiago Silva Torres, por ter aceitado embarcar nessa jornada comigo e, sobretudo, por ter acreditado e confiado em mim desde o momento em que bati em sua porta pela primeira vez;

Ao meu coorientador, Dr. Claudio Gustavo Stefanoff, pela valiosa contribuição, essencial para a concretização deste projeto;

À equipe da Rede Fiocruz de Biobancos, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.

À equipe da Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos, especialmente ao Ricardo Brum, Deborah Araújo e Beatriz Rangel, que me deram todo suporte nos momentos em que mais precisei;

À minha família, por sempre me apoiarem em todas as etapas da minha vida, por acreditarem nos meus sonhos e me motivarem a seguir em frente.

À turma do MPPC 2019, pela parceria e contribuições. A caminhada foi mais prazerosa com a ajuda de vocês.

FERROCO, Clara. **Condições de conservação e armazenamento a longo prazo de amostras biológicas humanas para aplicação em biobancos com fins de pesquisa: uma revisão sistemática.** 2021. 67f. Dissertação [Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica] – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Rio de Janeiro, 2021.

RESUMO

Introdução: Amostras biológicas humanas são recursos valiosos, especialmente para a pesquisa translacional, na qual desempenham um papel importante tanto na compreensão da patogênese das doenças quanto no desenvolvimento de novos recursos diagnósticos e terapêuticos. Entretanto, os resultados das análises realizadas a partir desses recursos podem ser influenciados por variáveis pré-analíticas, ou seja, condições nas quais as amostras foram expostas durante a coleta, processamento e armazenamento. **Justificativa:** Conhecer as possibilidades de cenários que envolvem a conservação das amostras e seus respectivos biomarcadores, pode auxiliar na decisão de se incorporar amostras oriundas de biorrepositórios nos acervos dos biobancos, visto que estes devem assegurar a cessão de materiais biológicos de qualidade à comunidade científica. **Objetivos:** Sintetizar a literatura publicada em bases de dados indexadas, por meio de uma revisão sistemática, apresentando as condições de conservação e armazenamento a longo prazo de amostras biológicas, a fim de que sejam aplicadas em biobancos. **Metodologia:** Em consulta realizada ao Sistema Plataforma Brasil, foram identificados os dois principais materiais biológicos armazenados nos biobancos credenciados no território nacional (tecidos, sangue e derivados). Foi realizada uma busca eletrônica na literatura publicada até novembro de 2019 nas bases de dados *Web of Science*, *Pubmed*, Embase, LILACS e IBICS (BVS). Dois revisores independentes selecionaram e extraíram os dados sobre parâmetros pré-analíticos que podem influenciar na qualidade de amostras de tecido, sangue e derivados. **Resultados:** A síntese qualitativa incluiu 34 artigos, sendo 17 referentes a amostras de tecido e 17 a amostras de sangue e derivados, publicados entre 2002 e 2019. Para amostras de tecido, o uso da técnica de congelamento instantâneo (snap-frozen) e/ou uso de estabilizantes somados ao armazenamento em temperaturas ultrabaixas (-80 °C ou menos) por até 27 anos demonstraram ser medidas eficazes para manutenção da viabilidade da maioria dos ácidos nucleicos. Tempo de isquemia de até 70 minutos e ciclos de congelamento e descongelamento não interferiram na qualidade dos materiais avaliados. Para amostras de sangue, diferentes métodos de conservação foram avaliados. Manchas de sangue secas em papel de filtro conservadas em temperatura ambiente por até 26 anos, são viáveis para avaliação de marcadores genéticos. Amostras de sangue total conservadas em seus tubos primários contendo EDTA, ACD ou PAXgene®, sob diferentes temperaturas (ambiente até -80 °C) por até 19 anos apresentaram pequenas alterações nos alvos de interesse, principalmente nas amostras mantidas em EDTA a temperatura ambiente para avaliação de Cd, Mn, Pb, Se e Hg no sangue. Para amostras de soro e plasma, foram observadas pequenas alterações na dosagem de metabólitos e proteínas, associadas ao armazenamento por 2 e 17 anos, respectivamente, a -80 °C. Amostras de Buffy Coat e PBMC foram mantidas a -80 °C e em nitrogênio líquido, respectivamente. Ácidos nucleicos se mantiveram viáveis, bem como as células avaliadas em PBMC. **Conclusão:** Os achados apresentados neste estudo fornecem maior compreensão a respeito da influência de variáveis pré-analíticas na integridade de biomarcadores, permitindo que

curadores ponderem sobre a incorporação, em seus biobancos, de amostras que foram submetidas às condições avaliadas.

Palavras-chave: Amostras Biológicas; Biobanco; Biorrepositório; Controle de Qualidade.

FERROCO, Clara. **Condições de conservação e armazenamento a longo prazo de amostras biológicas humanas para aplicação em biobancos com fins de pesquisa: uma revisão sistemática.** 2021. 67f. Dissertação [Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica] – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Rio de Janeiro, 2021.

ABSTRACT

Introduction: Human biological samples are valuable resources, especially for translational research, in which they play an important role both in understanding the pathogenesis of diseases and in developing new diagnostic and therapeutic resources. However, the results of the analyses carried out using these resources can be influenced by pre-analytical variables, in other words, conditions in which the samples were exposed during collection, processing and storage. **Justification:** Knowing the possibilities of scenarios involving the samples conservation and their respective biomarkers can help in the decision to incorporate samples from biorepositories in the collections of biobanks, as they must ensure the transfer of quality biological materials to the scientific community. **Objectives:** To synthesize the literature published in indexed databases, through a systematic review, presenting the conditions of conservation and long-term storage of biological samples, so that they can be applied in biobanks. **Methods:** In a consultation carried out with the Plataforma Brasil System, the two main biological materials stored in accredited biobanks in the national territory (tissues, blood and derivatives) were identified. An electronic search was carried out in the literature published until November 2019 in the Web of Science, Pubmed, Embase, LILACS and IBICS (BVS) databases. Two reviewers independently selected and extracted data, in an Excel spreadsheet, on pre-analytical parameters that may influence the quality of tissue, blood and derivatives samples. **Findings:** The qualitative synthesis included 34 articles, 17 referring to tissue samples and 17 to blood samples and derivatives, published between 2002 and 2019. For tissue samples, the use of the instant freezing technique (snap-frozen) and/ or use of stabilizers in addition to storage at ultra-low temperatures (-80 °C or less) for up to 27 years have been shown to be effective measures to maintain the viability of most nucleic acids. Maximum ischemia time of 70 minutes and the occurrence of freezing and thawing cycles did not interfere in the quality of the materials evaluated. Blood stain samples dried on filter paper, kept at room temperature for up to 26 years, are viable for the evaluation of genetic markers. Whole blood samples preserved in their primary tubes containing EDTA, ACD or PAXgene®, under different temperatures (environment up to -80 °C) for up to 19 years showed small changes in the targets of interest, especially in samples kept in EDTA at room temperature for evaluation of Cd, Mn, Pb, Se and Hg in the blood. For plasma and serum samples, small changes in protein and metabolite dosage were observed, associated with storage for 17 and 2 years, respectively, at -80 °C. Buffy Coat and PBMC samples were kept at -80 °C and in liquid nitrogen, respectively. Nucleic acids remained viable, as well as cells evaluated in PBMC. **Conclusion:** The findings presented in this study provide a greater understanding of the influence of pre-analytical variables on the integrity of biomarkers, allowing biobank curators to consider the incorporation, into their biobanks, of samples that were subjected to the conditions evaluated.

Keywords: Biological Samples Biobank, Biorepository, Quality Control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1	Quantitativo de biobancos por tipo de material biológico armazenado	06
Figura 1	Estrutura organizacional da Rede Fiocruz de Biobancos (RFBB)	08
Figura 2	Influência de fatores pré-analíticos na qualidade das amostras	10
Figura 3	Fluxograma do processo de seleção dos estudos para revisão sistemática (PRISMA)	19

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais diferenças entre biobancos e biorrepositórios	05
Quadro 2	Diretrizes estratégicas da RFBB	07
Quadro 3	Parâmetros utilizados para extração de dados	16
Quadro 4	Resultados das buscas nas bases de dados	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados extraídos de acordo com parâmetros estabelecidos para amostras de tecido	23
Tabela 2	Dados extraídos de acordo com parâmetros estabelecidos para amostras de sangue	31

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASCLIN	Assessoria Clínica
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COVID-19	Doença causada pelo SARS-CoV-2
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CPqLMD	Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane
DBS	Dried Blood Spots
DECIT	Departamento de Ciência e Tecnologia
DIN	DNA Integrity Number
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
FF	Fresh Frozen
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GT	Grupo de Trabalho
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBECS	Índice Bibliográfico Español em Ciencias de la Salud
IFF	Instituto Fernandes Figueira
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRR	Instituto René Rachou
ISBER	International Society for Biological and Environmental Repositories
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
MS	Ministério da Saúde
NCI	National Cancer Institute

NL	Nitrogênio Líquido
OCT	Optimal cutting temperature compound
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PBMC	Célula Mononuclear do Sangue Periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
QUORUM	Quality of Reporting of Meta-analyses
RFBB	Rede Fiocruz de Biobancos
RFPC	Rede Fiocruz de Pesquisa Clínica
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ácido Ribonucleico
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SF	Snap-frozen
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
STR	Repetições Curtas em Tandem
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VPPCB	Vice-Presidência de Pesquisas e Coleções Biológicas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Importância dos Biobancos de Material Biológico Humano para a Pesquisa Biomédica	1
1.2 Realidade dos Biobancos no Brasil.....	3
1.3 Biobancos na Fiocruz.....	6
1.4 Qualidade em Biobancos	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral:	12
3.2 Objetivos Específicos:	12
4. METODOLOGIA.....	13
4.1 Métodos:	13
4.2 Seleção dos estudos:	14
4.3 Aspectos éticos:	16
5. RESULTADOS	17
5.1 Seleção dos artigos:.....	17
5.2 Principais achados para amostras de tecido:	21
5.3 Principais achados para amostras de sangue e derivados:	28
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO A – Itens do checklist a serem incluídos no relato de revisão sistemática ou meta-análise.....	52
ANEXO B – Fluxograma com as diferentes fases de uma revisão sistemática	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância dos Biobancos de Material Biológico Humano para a Pesquisa Biomédica

A pesquisa biomédica está em constante avanço, principalmente no que tange a área molecular. Áreas como a genômica e proteômica, cuja aplicação contribui para o desenvolvimento da medicina personalizada, têm como principal característica o uso de biomarcadores para detecção de traços genéticos específicos, permitindo orientar abordagens para prevenção e tratamento de diferentes doenças (PINHO; SITNIK; MANGUEIRA, 2014; SERRANO DIAZ et al., 2016). Ou seja, terapias são selecionadas para o paciente de forma individualizada, com base nos níveis dos diferentes biomarcadores presentes no sangue ou nos tecidos do paciente (HEWITT, 2011).

A Medicina Personalizada é amparada pela Pesquisa Translacional, que compreende a aplicação dos conhecimentos adquiridos em bancada na prática médica, de forma específica, precisa e eficaz. A base de dados PubMed conceitua Pesquisa Translacional como “a aplicação das descobertas geradas por pesquisas de laboratório e estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de ensaios clínicos e outros estudos em seres humanos” (NCBI, 2012). De acordo com Serrano-Diaz et al (2016), a Pesquisa Translacional também pode ser inversa, quando se parte da observação de um grupo de pacientes, gerando novas hipóteses a serem comprovadas por meio de pesquisa laboratorial. Portanto, os recursos biológicos como sangue, tecidos, fluidos corporais e biomoléculas são matérias-primas essenciais para o desenvolvimento biotecnológico, para a Pesquisa Translacional e, conseqüentemente, para a Medicina Personalizada (VAN OMMEN et al., 2015).

Para o adequado desenvolvimento da Pesquisa Translacional é necessário que os pesquisadores tenham acesso, não só aos materiais biológicos, mas também às informações associadas. Além disso, é fundamental que as amostras tenham alta qualidade e quantitativo suficiente para realização de ensaios, sempre preservando os direitos dos voluntários e a garantia de sigilo e confidencialidade (SERRANO DIAZ et al., 2016).

Com a evolução das pesquisas envolvendo bioespécimes, procedimentos como coleta, processamento e armazenamento das amostras biológicas, antes vistos como simples técnicas, agora são reconhecidos por partes dos pesquisadores como etapas importantes na garantia da qualidade das amostras (VAUGHT, 2015), o que inclui a elaboração de procedimentos operacionais padrão e revisões regulares do controle de qualidade (VAUGHT, 2016).

Garantir que esses requisitos sejam cumpridos configuram um grande desafio para os pesquisadores. É nesse âmbito que os biobancos emergem como recursos fundamentais para pesquisas genéticas, biotecnológicas, estudos epidemiológicos e translacionais, desenvolvimento de biomarcadores para o diagnóstico precoce de doenças como câncer e doenças genéticas, terapias moleculares, além do desenvolvimento de alvos terapêuticos e descoberta de novos medicamentos para tratamentos personalizados (ARTENE et al., 2013; KANG et al., 2013).

A construção de coleções biológicas de qualidade nos biobancos requer a adoção de boas práticas e diretrizes específicas que permitam aplicar estratégias para a criação, gestão e até mesmo o encerramento de um biobanco. Várias organizações internacionais como, por exemplo, a *International Society for Biological and Environmental Repositories* (ISBER), *National Cancer Institute* (NCI), *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) e a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), produziram orientações sobre boas práticas em biobancos dirigidas à infraestrutura e manuseamento de amostras biológicas, recomendações sobre informática e gestão de dados, e recomendações sobre questões éticas, legais e sociais.

Nos últimos trinta anos, a área de biobancos mudou de forma significativa, avançando em infraestrutura, tecnologia, informação e organização. O que começou como pequenos repositórios de amostras biológicas com poucos freezers vinculados principalmente a universidades e desenvolvidos para atender a necessidades de projetos específicos, evoluiu gradativamente para biobancos institucionais e governamentais, com uma estrutura complexa de gerenciamento, biobancos com fins comerciais, biobancos populacionais e biobancos virtuais, os quais não possuem amostras fisicamente armazenadas, mas oferecem serviços de localização e recuperação de amostras armazenadas em âmbito global ou nacional (DE SOUZA; GREENSPAN, 2013).

Devido ao reconhecimento da importância para as ciências médicas e biomédicas, a *Time Magazine* publicou, em 2009, uma listagem com dez ideias que estavam mudando o mundo, incluindo os biobancos na oitava posição. A publicação abordou os esforços dos Estados Unidos da América na estruturação e implementação do seu primeiro biobanco nacional e citou outros países que também haviam iniciado a construção de seus biobancos como, Grã-Bretanha, Canadá, Noruega e Suécia.

Em 2013, Kang *et al.* listaram os seis principais países de acordo com o número de biobancos estabelecidos, sendo eles Reino Unido (n = 15), Estados Unidos (n = 14), Suécia (n = 12), França (n = 9), Países Baixos (n = 8) e Itália (n = 8). Na ocasião, 70% dos biobancos do mundo estavam localizados na Europa e 60% eram patrocinados por institutos nacionais ou governamentais. Biobancos patrocinados por instituições sem fins lucrativos, universidades e hospitais compreendiam em torno de 17%.

Pode-se observar que a maioria dos biobancos estavam localizados em países de alta renda, mas esse cenário está mudando rapidamente, à medida que países de baixa e média renda estão desenvolvendo seus próprios biobancos (CHEN; PANG, 2015).

1.2 Realidade dos Biobancos no Brasil

Considerando o panorama internacional sobre harmonização de biobancos e o apelo da comunidade científica nacional, em 2009, o Ministério da Saúde (MS), por meio do Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), decidiu mobilizar-se a partir de uma discussão para a regulamentação do armazenamento e utilização de material biológico humano em pesquisas e a necessidade da constituição e funcionamento de biobancos adequados no país. Neste sentido, foi criado um grupo de trabalho com o objetivo de elaborar diretrizes nacionais para armazenamento e uso de material biológico humano para fins de pesquisa. Esse grupo foi composto por membros de instituições brasileiras que possuíam biobancos adequadamente constituídos, com *expertise* na operacionalização dos mesmos, especialistas em bioética, membros da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep). O Grupo de Trabalho teve como base disposições

internacionais e nacionais, como leis, declarações, normativas, resoluções e produções científicas relacionadas ao tema, tanto no aspecto ético quanto legal. Pode-se dizer que o Brasil foi um dos pioneiros na construção de uma diretriz nacional desta magnitude, principalmente quando comparamos com outros países da América Latina (MARODIN et al., 2013).

Como resultado desta iniciativa, o Conselho Nacional de Saúde (CNS) aprovou a Resolução CNS nº 441/2011, que estabelece as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas envolvendo armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores e o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 2201/11 que estabelece as diretrizes para biorrepositórios e biobancos de material biológico humano com finalidade de pesquisa.

De acordo com a Resolução CNS nº 441/2011 e a Portaria MS nº 2201/11 existe uma clara distinção entre biobanco e biorrepositório:

- Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais.
- Biorrepositório: coleção de material humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.

Por essas definições, pode-se observar que a principal diferença entre biobancos e biorrepositórios está na democratização do acesso das amostras biológicas à comunidade científica, uma vez que, no biobanco, elas são de responsabilidade e gerenciamento institucionais e não estão vinculadas a projetos de pesquisa específicos nem gerenciadas por um pesquisador responsável. Biorrepositórios e biobancos também se distinguem quanto ao tempo de armazenamento das amostras biológicas: enquanto nos biorrepositórios, o prazo de armazenamento das amostras é de acordo com o cronograma da pesquisa, podendo ser autorizado o armazenamento por até 10 anos, para os biobancos o prazo de armazenamento é indeterminado (BRASIL, 2011b).

De acordo com Rothstein (2005), os biobancos representam um novo paradigma para a pesquisa biomédica, uma vez que em pesquisas tradicionais o material biológico humano é armazenado por um único pesquisador ou um grupo

estabelecido de pesquisadores. Além disso, a obtenção e uso das amostras são bem definidos para projetos de pesquisa específicos e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) deve, obrigatoriamente, ser obtido de cada participante de pesquisa a cada projeto submetido que preveja o uso das amostras. Em contrapartida, os biobancos têm o propósito de atender a diversos protocolos de pesquisa futuros, em diferentes áreas científicas e o modelo de consentimento visa ser mais abrangente. De acordo com a regulação vigente no Brasil, o TCLE para a autorização de armazenamento de material biológico humano em biobanco deve apresentar ao voluntário a possibilidade de optar em ser contatado ou não para novo consentimento a cada pesquisa futura que utilizar suas amostras armazenadas. Independentemente do tipo de armazenamento, o material biológico pertence ao voluntário (participante de pesquisa ou participante do biobanco). O Quadro 1 ilustra as principais diferenças entre biobancos e biorrepositórios:

Quadro 1 - Principais diferenças entre biobancos e biorrepositórios

	Biobanco	Biorrepositório
Responsabilidade pelo Armazenamento	Institucional	Institucional
Responsabilidade pelo Gerenciamento	Institucional	Pesquisador
Utilização do Material Biológico	Utilização em pesquisas futuras aprovadas pelo Sistema CEP/Conep	Exclusivo para os fins previstos no protocolo de pesquisa específico previamente aprovado pelo Sistema CEP/Conep
Tempo de armazenamento	Indeterminado	Deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até 10 anos
Documentação para análise ética	Protocolo de desenvolvimento e seus anexos	Regulamento do Biorrepositório incluído no projeto de pesquisa específico
Consentimento	Deve conter 02 opções, excludentes entre si, quanto ao uso do material armazenado a cada pesquisa: necessidade de novo consentimento ou dispensa de novo consentimento a cada nova pesquisa	Deve-se ter um TCLE específico para cada pesquisa

Segundo dados da Conep, até o mês de setembro de 2019, quando a consulta para definição das matrizes biológicas que seriam incluídas nesta revisão sistemática foi realizada, 57 biobancos, de diferentes tipos de materiais biológicos (gráfico 1), estavam credenciados no território nacional e com maior concentração da região sudeste (70%; n=40). Nova consulta feita em julho de 2021 mostrou que o panorama permanecia inalterado, provavelmente por falta de atualização. Entretanto, esta é a fonte oficial de informações.

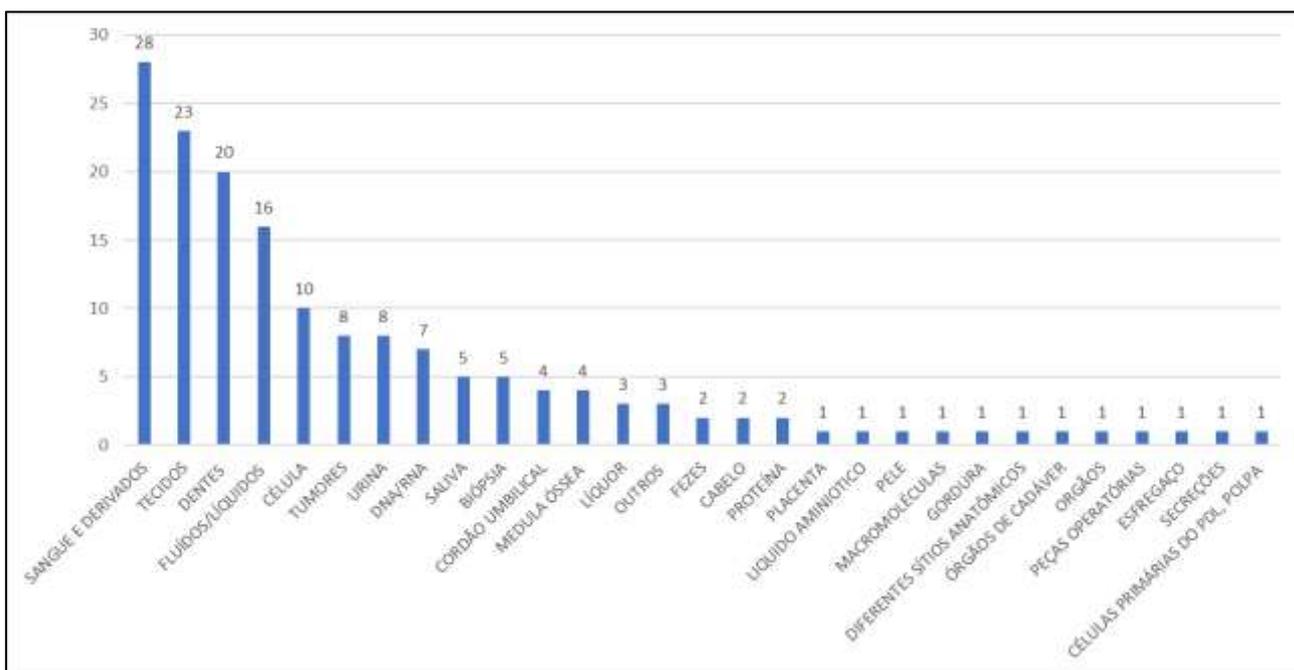


Gráfico 1: Quantitativo de biobancos por tipo de material armazenado.
Fonte: adaptado do sistema Plataforma Brasil (CONEP, 2019).

1.3 Biobancos na Fiocruz

A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), instituição vinculada ao Ministério da Saúde, possui a missão de “produzir, disseminar e compartilhar conhecimentos e tecnologias voltados para o fortalecimento e a consolidação do Sistema Único de Saúde (SUS) e que contribuam para a promoção da saúde e da qualidade de vida da população brasileira” (FIOCRUZ, 2019). Diante desse cenário, muitas são as linhas de pesquisa que envolvem o armazenamento de espécimes biológicos de alto interesse acadêmico-científico. Por esse motivo, a fim de atender ao disposto na Resolução CNS 441/11 e Portaria MS 2201/11, em 2014 a Fiocruz constituiu, por meio

da Rede Fiocruz de Pesquisa Clínica (RFPC) e pela Portaria da Presidência da Fiocruz nº 1228/2014, o primeiro grupo de trabalho (GT) com o objetivo de reunir profissionais de diferentes unidades técnico científicas da instituição para o estudo do tema. Participaram do GT representantes do Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz Bahia), Instituto René Rachou (IRR - Fiocruz Minas), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane (CPqLMD), Fiocruz Rondônia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Instituto Aggeu Magalhães (CPqAM) e Instituto Fernandes Figueira (IFF).

O GT, instituído pela Portaria da Presidência da Fiocruz nº 1228/2014, teve como objetivos mapear o panorama situacional das amostras biológicas armazenadas em todas as unidades e escritórios da Fiocruz, elaborar diretrizes para a constituição de biobancos da Fiocruz e constituir o biobanco modelo junto à Conep.

A Rede Fiocruz de Biobancos (RFBB) foi formalmente criada em 2015, por meio da Portaria da Presidência da Fiocruz nº 744/2015, vinculada à Vice-Presidência de Pesquisas e Coleções Biológicas (VPPCB). Um segundo GT (FIOCRUZ, 2015) foi constituído com a participação de representantes das unidades técnico científicas da Fiocruz, com o objetivo de elaborar o regimento interno e construir as diretrizes de funcionamento da RFBB, bem como a missão e visão da rede (Quadro 2):

Quadro 2 - Diretrizes estratégicas da RFBB

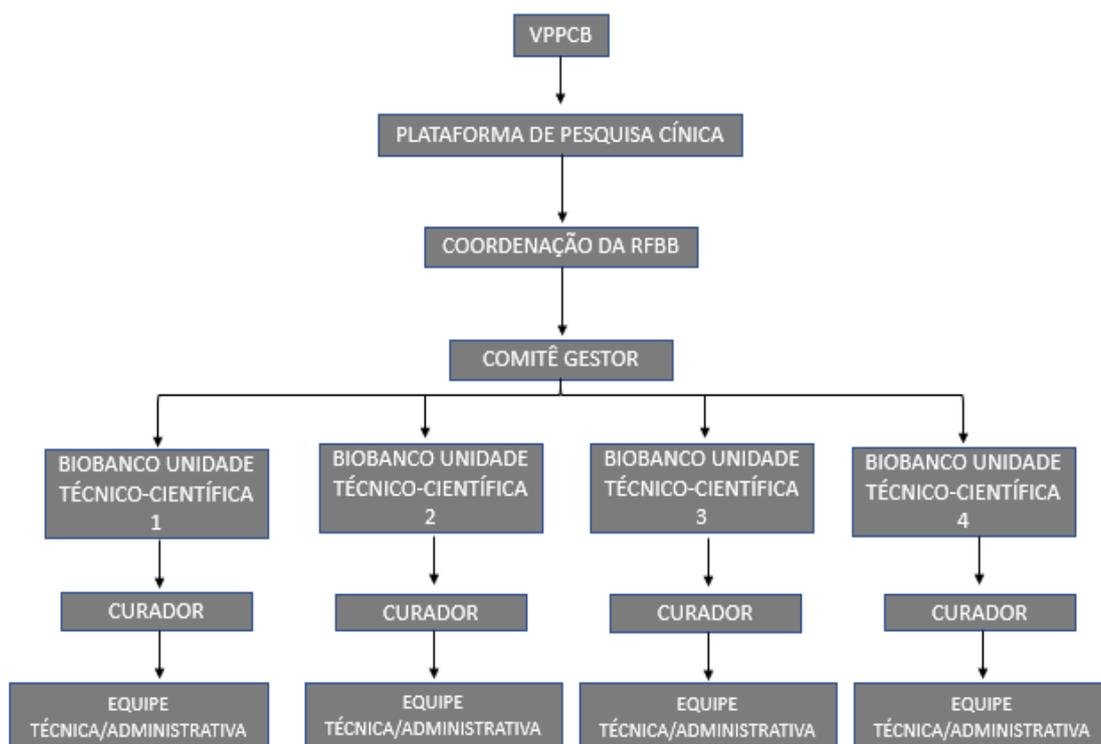
Missão	Promover uma rede colaborativa de serviço público formada por biobancos das Unidades Técnico-Científicas da Fiocruz provendo à comunidade científica acesso a materiais biológicos humanos, bem como dos dados a eles associados, atendendo, com qualidade, às necessidades atuais e, principalmente, às necessidades futuras da pesquisa no Brasil, em conformidade com os preceitos éticos e regulatórios vigentes.
Visão	Ser modelo de excelência em gestão de biobancos, zelar pelos direitos dos participantes de pesquisa e facilitar a geração de conhecimento com foco na saúde pública.

Fonte: Regimento Interno da Rede Fiocruz de Biobancos (FIOCRUZ, 2017)

A RFBB foi idealizada como uma instância de cooperação e gestão dos biobancos institucionais da Fiocruz, promovendo o estabelecimento de biobancos estruturados em rede a fim de dar suporte a projetos de pesquisa que sejam de interesse da saúde pública, a facilitação do acesso ao maior número de pesquisadores aos biobancos institucionais e a disponibilização de um acervo de material biológico humano diversificado e de boa qualidade.

A RFBB é coordenada por um Comitê Gestor (instituído por meio da Portaria da Presidência nº 434/2017), um colegiado independente, de caráter consultivo e deliberativo, sem conflito de interesses e responsável pela gestão e políticas dos biobancos da Fiocruz. O Comitê Gestor é constituído por curadores de cada biobanco das unidades técnico-científicas da Fiocruz, além de dois representantes do Fórum de Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz, um coordenador geral e três representantes indicados pela Rede Fiocruz de Pesquisa Clínica (RFPC). A coordenação geral da RFBB cabe a um assessor, representante da VPPCB (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura Organizacional da RFBB



Fonte: Adaptado do Regimento Interno da Rede Fiocruz de Biobancos (FIOCRUZ, 2017)

Atualmente, a RFBB possui três biobancos credenciados no sistema CEP/Conep, dentre eles o biobanco proposto por Bio-Manguinhos (Registro CONEP B-070), que foi o primeiro a obter aprovação, em 08 de junho de 2018, e que atualmente armazena amostras de sangue total, soro e plasma provenientes de estudos clínicos coordenados pela Assessoria Clínica (Asclin). Devido à atual pandemia de covid-19, e em atendimento a uma demanda institucional, o biobanco de Bio-Manguinhos estruturou sua logística operacional e sua infraestrutura para armazenar, também, materiais oriundos de coletas de swab/aspirado de nasofaringe e orofaringe para detecção do SARS-CoV-2 (meio de transporte viral, material sobrenadante e/ou ácidos nucleicos purificados).

O biobanco do IOC (Registro CONEP B-086) recebeu aprovação do seu protocolo de desenvolvimento em 06 de abril de 2020, para guarda de amostras de hanseníase, hepatites virais e, mais recentemente, amostras oriundas de casos de covid-19. Em dezembro de 2020, o biobanco do Instituto René Rachou obteve seu credenciamento para armazenamento de amostras biológicas oriundas de casos suspeitos de leishmaniose e covid-19.

Outras duas Unidades Técnicas da Fiocruz estão em fase de elaboração de documentos regulatórios e adequação de infraestrutura física e técnica para a implementação dos biobancos institucionais que se somarão à RFBB: Centro de Pesquisas do Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz Bahia - e Fiocruz Rondônia.

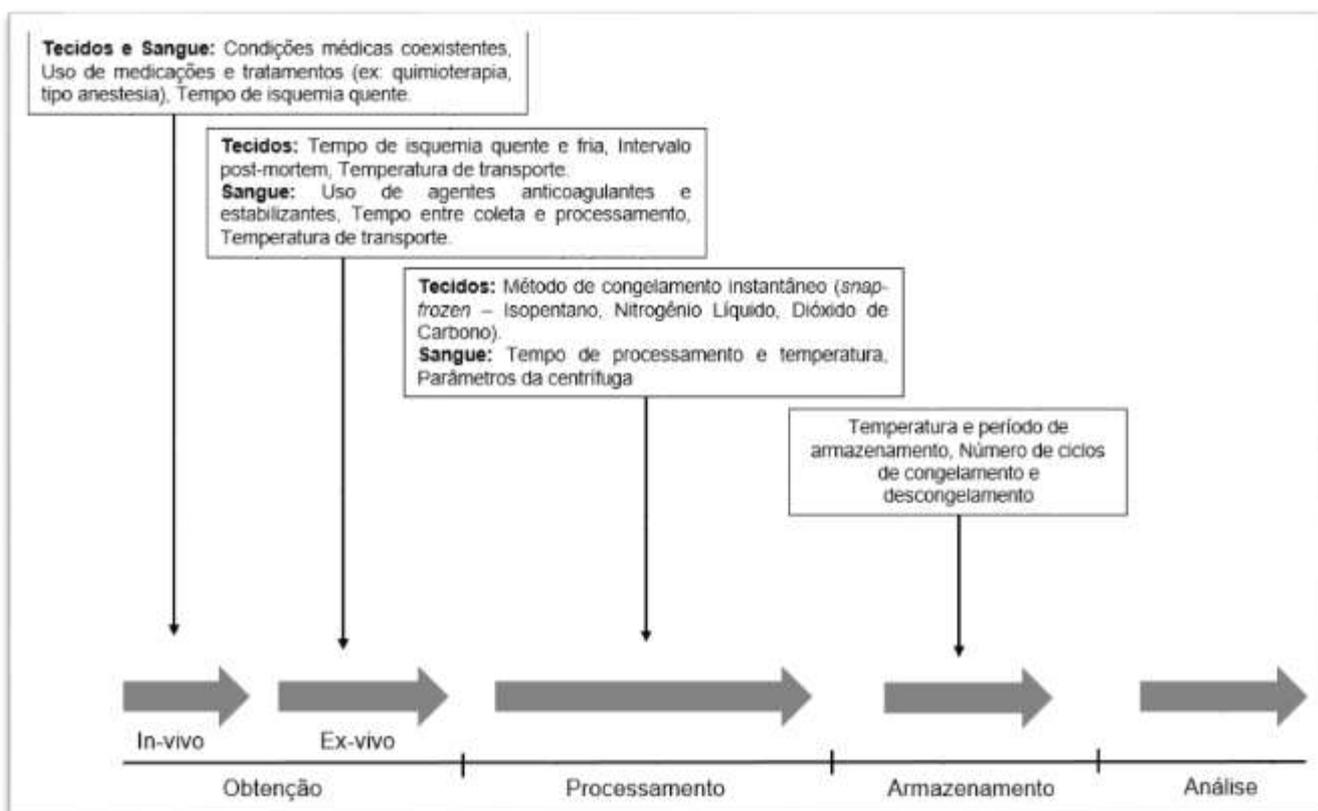
1.4 Qualidade em Biobancos

Amostras biológicas humanas são recursos valiosos, especialmente para a pesquisa translacional, na qual desempenham um papel importante tanto na compreensão da patogênese das doenças quanto no desenvolvimento de novos recursos diagnósticos e terapêuticos (LINDNER et al., 2019). Entretanto, os resultados das análises realizadas a partir desses recursos podem ser influenciados por variáveis pré-analíticas, ou seja, condições nas quais as amostras foram expostas durante a coleta, processamento e armazenamento (SPRUESSEL et al., 2004) (figura 2). De todas as etapas percorridas pelas amostras biológicas, a pré-analítica é a que

concentra a maior ocorrência de erros, podendo chegar a 80% dos achados (SZECSI; ØDUM, 2009).

Elementos relacionados a variáveis pré-analíticas tais como, tipo de tubo utilizado na coleta, intervalo e temperatura entre coleta e processamento, tempos de isquemia quente e fria (para tecidos sólidos), método de coleta, tempo até o armazenamento a longo prazo e tipo de armazenamento, uso de agentes estabilizantes, dentre outros, devem seguir estritos padrões de qualidade, ser conhecidos e registrados a fim de preservar ao máximo as características biológicas, além de garantir gerenciamento e rastreabilidade dos espécimes armazenados em biobanco (BETSOU et al., 2010; YÜZBAŞIOĞLU; ÖZGÜÇ, 2013). A caracterização acurada de amostras disponibilizadas a um biobanco impacta diretamente na autenticidade e na integridade do material e, conseqüentemente, nos resultados obtidos (BETSOU, 2017).

Figura 2 - Influência de fatores pré-analíticos na qualidade do material biológico



Fonte: Adaptado de Yong, Dry, Shabihkhani (2014).

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com a Resolução CNS 441/2011 e a Portaria MS 2201/2011, os materiais biológicos humanos armazenados em biorrepositórios podem ser transferidos formalmente para outro biorrepositório ou para um biobanco ao final do período de realização das pesquisas, mediante aprovação do Sistema CEP/Conep.

Em consonância com a regulação vigente, dentre os instrumentos operacionais propostos pela RFBB, os biobancos podem incrementar seus acervos por meio da transferência definitiva de material biológico humano armazenados em biorrepositórios atrelados a projetos de pesquisa, desde que atendam determinados critérios de qualidade estabelecidos pelo próprio biobanco (Art. 30º do Regimento Interno da RFBB).

Considerando a possibilidade de transferência de amostras de um biorrepositório para um biobanco, conhecer a diversidade de cenários que envolvem a conservação das amostras e seus respectivos biomarcadores pode auxiliar na avaliação e decisão de se incorporar amostras oriundas de biorrepositórios nos acervos dos biobancos, visto que estes devem assegurar a cessão de materiais biológicos de qualidade à comunidade científica para que os resultados obtidos a partir das amostras avaliadas tenham acurácia e consistência.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Sintetizar a literatura publicada em bases de dados indexadas por meio de uma revisão sistemática, apresentando as condições de conservação e armazenamento a longo prazo de amostras biológicas, a fim de que sejam aplicadas em biobancos.

3.2 Objetivos Específicos:

- Mapear e selecionar os principais tipos amostras biológicas que fazem parte do escopo dos biobancos credenciados no Brasil para a realização de buscas nas bases de dados.

- Estabelecer os principais parâmetros pré-analíticos a partir dos artigos selecionados para revisão sistemática.

- Verificar a viabilidade dos biomarcadores submetidos às diferentes condições pré-analíticas avaliadas.

4. METODOLOGIA

4.1 Métodos:

A metodologia escolhida para atingir os objetivos propostos foi a revisão sistemática da literatura. Esta estratégia consiste na “revisão de uma pergunta claramente formulada que usa métodos sistemáticos e explícitos para identificar, selecionar e avaliar criticamente pesquisas relevantes, coletar e analisar os dados dos estudos que são incluídos na revisão” (MOHER et al., 2009).

Durante muito tempo, os relatos de meta-análises eram realizados seguindo um guia de recomendações chamado QUORUM (*Q*Uality *O*f *R*eporting *O*f *M*eta-*a*nalyses). A fim de abranger tanto as meta-análises quanto as revisões sistemáticas sem emprego de métodos estatísticos, em 2005 o guia QUORUM foi revisado e, como resultado dessa revisão, surgiu a recomendação PRISMA (*P*referred *R*eporting *I*tems *f*or *S*ystematic *R*eviews and *M*eta-*A*nalyses), que consiste em um checklist com 27 itens (ANEXO A) e um fluxograma de quatro etapas (ANEXO B) que tem por objetivo melhorar (e não avaliar) a qualidade de revisões sistemáticas e meta-análises (MOHER et al., 2009).

De modo a identificar os principais materiais biológicos armazenados nos biobancos credenciados no Brasil, foi realizada uma busca na aba pública do Sistema Plataforma Brasil onde constam os biobancos de material biológico humano para fins de pesquisa aprovados pela Conep.

Após a seleção dos principais materiais biológicos contemplados na revisão sistemática, foram construídas estratégias de busca que contemplaram, além dos principais materiais biológicos, os seguintes termos e seus sinônimos: “humano”, “qualidade” e “biobanco”.

As buscas foram conduzidas aplicando-se as respectivas estratégias das bases de dados eletrônicas *Web of Science*, MedLine (interface Pubmed), Embase e Biblioteca virtual em Saúde do Ministério da Saúde (BVS) (acesso a Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde – LILACS - e Índice Bibliográfico *Español em Ciencias de la Salud* - IBECS).

As informações sobre a condução desta revisão sistemática foram registradas no PROSPERO, um banco de dados internacional de revisões sistemáticas prospectivamente registradas na área da saúde ou outras temáticas cujo resultado está relacionado à saúde (PROSPERO 2021: CRD42021234934).

4.2 Seleção dos estudos:

De modo a evitar vieses, a seleção dos artigos foi conduzida de forma independente e cega por 02 revisores (CLVF e CGS). Os resultados encontrados por cada revisor foram confrontados e as divergências foram resolvidas por um terceiro revisor (TST).

Nas etapas de avaliação de títulos e resumos, foram selecionados (1) trabalhos originais que envolviam preservação e controle de qualidade de sangue, derivados de sangue e tecidos humanos armazenados em biobancos ou biorrepositórios, (2) disponibilizados em português, inglês ou espanhol.

Foram excluídos: (1) artigos em que o tempo de armazenamento/conservação não foi avaliado ou não informado; (2) artigos em que o período de armazenamento foi inferior a 1 ano ou quando amostras foram submetidas a condições de estresse para simular um período de armazenamento; (3) artigos que abordavam exclusivamente a preservação de outras matrizes biológicas não contempladas nesta revisão (como, por exemplo, cabelo, saliva, fezes, sêmen e outros); (4) publicações que avaliaram a conservação de materiais biológicos de origem não humana; (5) artigos que avaliaram a conservação de amostras biológicas para fins de transplante e transfusão; (6) publicações anteriores ao ano 2000 (considerando que os recursos biológicos passaram a ter maior importância para o desenvolvimento biotecnológico com a ascensão da medicina personalizada e da pesquisa translacional, que ocorreram principalmente devido ao Projeto Genoma Humano, concluído em abril de 2003); (7) artigos referentes a amostras fixadas e impregnadas em parafina – FFPE pois esses materiais não requerem condições especiais para seu armazenamento a longo prazo, além de serem espécimes amplamente utilizados pelos serviços de anatomia patológica e alguns tipos de biobancos, como os bancos de tumores; (8)

artigos completos não disponíveis; (9) revisões sistemáticas; (10) artigos com resultados inconclusivos.

Considerando a justificativa desta revisão a qual foi pautada na possibilidade de transferência, para biobancos, de materiais biológicos oriundos de biorrepositórios, onde o tempo de armazenamento é determinado pelo cronograma do projeto de pesquisa e raramente é inferior a 1 ano, os revisores concordaram com a inclusão de publicações que avaliaram o tempo de conservação a longo prazo, neste caso, amostras armazenadas por um período maior ou igual a 1 ano.

Durante a etapa de elegibilidade, foram avaliados os textos completos dos artigos selecionados de mesma forma independente e cega por 02 revisores (CLVF e CGS). Os resultados encontrados por cada revisor foram confrontados e as divergências foram resolvidas por um terceiro revisor (TST). Os artigos considerados “elegíveis” foram incluídos na revisão sistemática e tiveram seus dados extraídos para a síntese descritiva. Neste projeto não foi realizada síntese quantitativa (metanálise).

Para extração dos dados, foi desenvolvida uma planilha para cada matriz biológica, considerando (1) características da população / estudo; (2) características do material biológico/conservação e (3) análises conduzidas/alvos de interesse e manutenção da viabilidade dos biomarcadores (quadro 3).

Quadro 3 - Parâmetros utilizados para extração de dados

Informações de interesse	Dados extraídos
Características da publicação/estudo	Referência (autores); País (origem da publicação/condução dos estudos); N (tamanho amostral).
Características do material biológico/conservação	Tipo de tecido (origem anatômica) / Material Biológico (sangue e derivados); Método para conservação (estabilizantes); Temperatura de armazenamento (a longo prazo); Tempo máximo de armazenamento (preliminar as análises conduzidas).
Análises conduzidas/alvos de interesse e manutenção da viabilidade dos biomarcadores	Método(s) empregado(s) (análises realizadas); Parâmetros de avaliação (alvos de interesse); Principais achados (resultado principal da análise de viabilidade do alvo de interesse).

Foram utilizadas planilhas do software Excel em todas as etapas desta revisão sistemática, desde a eliminação de duplicatas, avaliação de títulos, resumos até a extração de dados.

4.3 Aspectos éticos:

De acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 510 de 07 de abril de 2016 (Resolução complementar à Resolução CNS nº 446/2012), pesquisas realizadas exclusivamente com textos científicos para revisão da literatura científica estão dispensadas de registro e avaliação pelo Sistema CEP/Conep. O presente projeto se enquadra em tais características por ser uma revisão sistemática da literatura.

5. RESULTADOS

5.1 Seleção dos artigos:

Com a realização da busca pelos principais materiais biológicos armazenados nos biobancos brasileiros, junto ao Sistema Plataforma Brasil, foi possível identificar que dos 57 biobancos aprovados até a data de 19 de setembro de 2019, 28 armazenavam sangue e derivados e 23 armazenavam tecidos, sendo os dois principais tipos de materiais armazenados. Esses resultados não são mutuamente exclusivos, logo um biobancos pode armazenar outros tipos de materiais, mas essas representam as duas principais matrizes biológicas armazenadas nos biobancos brasileiros. A partir dessa análise, pôde-se elencar os materiais biológicos em: tecidos (incluindo tecidos congelados) esangue (incluindo derivados como soro, plasma, camada leucocitária [ou buffy coat], células mononucleares do sangue periférico [ou peripheral blood mononuclear cell - PBMC], glóbulos vermelhos [ou eritrócitos]).

As estratégias de busca foram elaboradas e aplicadas nas bases de dados selecionadas.

Ao todo, foram identificados 2.799 relatos nas bases de dados, utilizando-se as chaves de busca selecionadas.

Os resultados obtidos e as datas das consultas podem ser observados no Quadro 4:

Quadro 4 - Resultados das buscas nas bases de dados

CHAVES DE BUSCA	BASES DE DADOS	RESULTADOS	DATAS DAS BUSCAS
(TS=(((("tissue" OR tissue* OR "frozen tissue" OR "serum" OR "blood" OR "plasma" OR "leukocyte layer" OR "buffy coat" OR "Mononuclear Blood Cells" OR "mononuclear cells" OR "Red blood cells" OR "erythrocytes") AND ("human" OR human*)) AND (("quality control" OR "quality assurance" OR "quality assessment" OR "quality") AND ("biobank" OR "biobanking" OR "storage" OR "repository" OR biorepositor* OR biotrust* OR biodistributor*)))) AND TIPOS DE DOCUMENTO: (Article)	WEB OF SCIENCE	1.073 artigos	14/11/2019

(((("tissue" OR tissue* OR "frozen tissue" OR "serum" OR "blood" OR "plasma" OR "leukocyte layer" OR "buffy coat" OR "Mononuclear Blood Cells" OR "mononuclear cells" OR "Red blood cells" OR "erythrocytes") AND human*) AND (("quality control"[Title/Abstract] OR "quality assurance"[Title/Abstract] OR "quality assessment"[Title/Abstract] OR "quality"[Title/Abstract]) AND ("biobank"[Title/Abstract] OR "biobanking"[Title/Abstract] OR "storage"[Title/Abstract] OR "repository"[Title/Abstract] OR biorepositor*[Title/Abstract] OR biotrust*[Title/Abstract] OR biodistributor*[Title/Abstract])))	PUBMED	1.039 artigos	13/11/2019
(((("tissue" OR tissue* OR "frozen tissue" OR "serum" OR "blood" OR "plasma" OR "leukocyte layer" OR "buffy coat" OR "Mononuclear Blood Cells" OR "mononuclear cells" OR "Red blood cells" OR "erythrocytes") AND human*) AND (("quality control" OR "quality assurance" OR "quality assessment" OR "quality assurance") AND ("biobank" OR "biobanking" OR "storage" OR "repository" OR biorepositor* OR biotrust* OR biodistributor*)):ab,ti)	EMBASE	645 artigos	13/11/2019
((tissue OR tissue* OR "frozen tissue" OR serum OR blood OR plasma OR "leukocyte layer" OR "buffy coat" OR "Mononuclear Blood Cells" OR "mononuclear cells" OR "Red blood cells" OR "erythrocytes") (human OR human*)) (("quality control" OR "quality assurance" OR "quality assessment" OR quality) (biobank OR biobanking OR storage OR repository OR biorepository OR biotrust* OR biodistributor*))	BVS (LILACS)	33 artigos	05/11/2019
((tissue OR tissue* OR "frozen tissue" OR serum OR blood OR plasma OR "leukocyte layer" OR "buffy coat" OR "Mononuclear Blood Cells" OR "mononuclear cells" OR "Red blood cells" OR "erythrocytes") (human OR human*)) (("quality control" OR "quality assurance" OR "quality assessment" OR quality) (biobank OR biobanking OR storage OR repository OR biorepository OR biotrust* OR biodistributor*))	BVS (IBECS)	9 artigos	05/11/2019

A sobreposição de publicações entre as bases de dados levou à eliminação de 837 publicações, resultando em 1.962 artigos para avaliação de títulos. Nesta etapa, ambos os revisores (CLVF, CGS) concordaram com a seleção de 163 publicações para leitura de resumos, e divergiram de 312 publicações, que foram resolvidas pelo terceiro revisor (TST). Desta forma, 320 artigos foram selecionados para leitura de resumo.

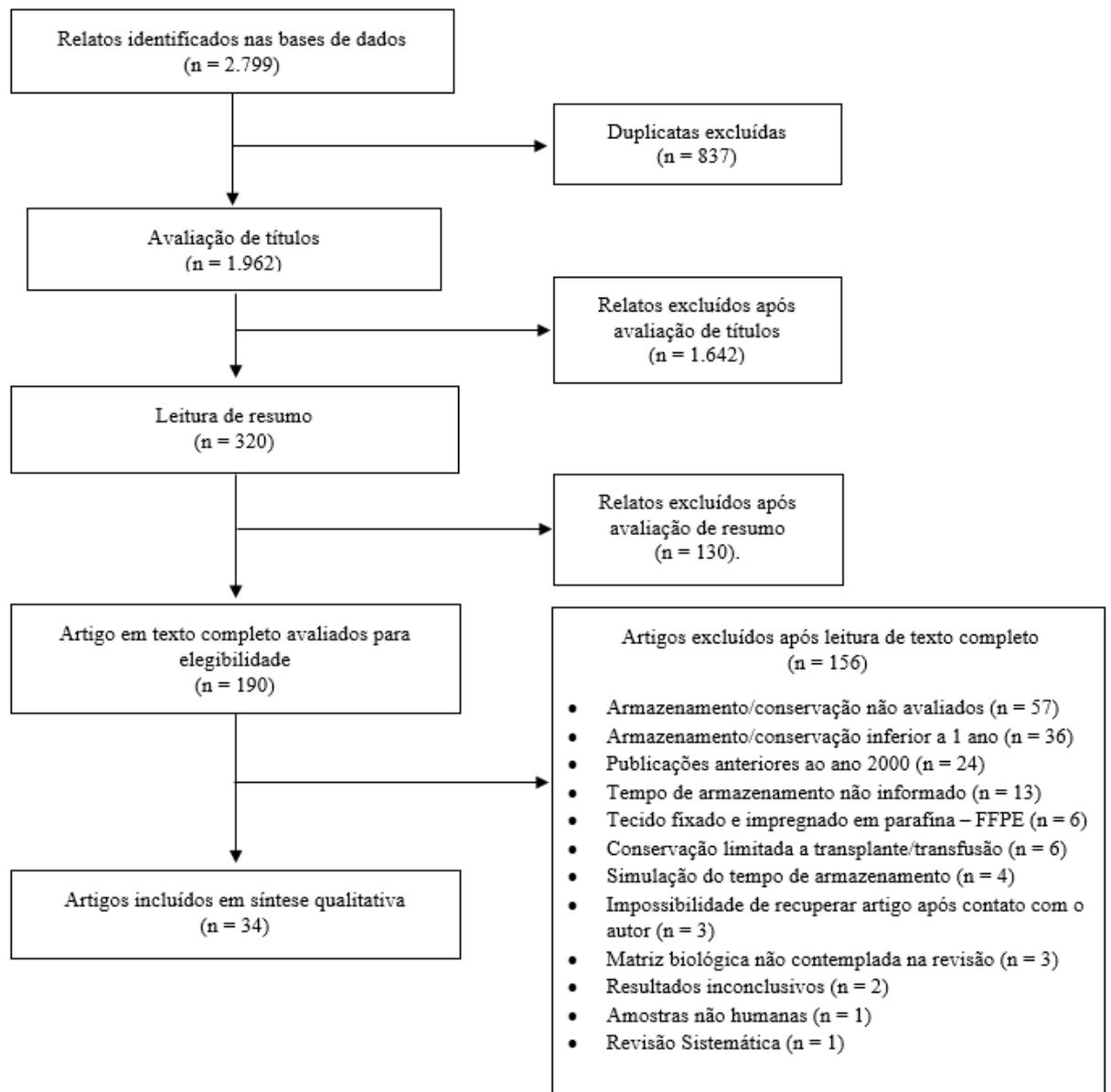
Durante a etapa seguinte (avaliação de resumos), os mesmos revisores concordaram, de forma independente e cega, com a seleção de 148 artigos. Nesta etapa, 13 artigos foram excluídos devido ao idioma da publicação (5 artigos em alemão, 03 em francês, 02 em chinês, 1 em russo, 1 em italiano e 1 em japonês). Divergências nas avaliações dos revisores foram encontradas em 66 publicações.

Após análise do terceiro revisor, foram selecionados 190 artigos para leitura de texto completo.

Com a aplicação dos critérios de elegibilidade, das 190 publicações, 34 foram incluídas na síntese descritiva, dentre as quais, 17 abordaram conservação de amostras de tecidos e 17 de amostras de sangue (e derivados). A extração de dados foi conduzida de acordo com os parâmetros estabelecidos e de forma separada, considerando cada matriz biológica avaliada (Tabelas 1 e 2).

As etapas percorridas até a seleção e inclusão dos artigos que atenderam aos critérios estabelecidos nesta revisão, estão detalhadas no fluxograma PRISMA (Figura 2). Além disso, o checklist contendo as recomendações PRISMA foi preenchido de acordo com os itens atendidos e aplicáveis a esta revisão (Anexo A).

Figura 3 - Fluxograma do processo de seleção dos estudos para revisão sistemática e síntese qualitativa



5.2 Principais achados para amostras de tecido:

Os 17 artigos referentes a amostras de tecidos incluídos nesta análise foram publicados entre 2002 e 2019, e conduzidos em países da Ásia (41%; n = 7), América do Norte (35%; n = 6), Europa (18%; n = 3) e América do Sul (6%; n = 1).

Os estudos incluíram em suas análises entre 12 e 3.197 amostras de tecidos que tiveram origem, principalmente, de tumores (88%; n=15) extraídos de diferentes regiões anatômicas como, por exemplo, mama, pulmão e cólon. As demais publicações avaliaram amostras de tecido cerebral post-mortem (6%; n=1) e oriundos de indivíduos portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (6%; n=1). A obtenção dos tecidos foi feita predominantemente por meio de cirurgia (76%; n = 13).

O congelamento instantâneo (snap-freezing), preliminar ao armazenamento a longo prazo foi, majoritariamente, o método de escolha para conservação das amostras (76%; n = 13). O uso de RNALater®, uma solução comercial para estabilização e preservação do RNA que minimiza a necessidade de congelar instantaneamente a amostra de tecido, foi reportado em duas publicações (12%) (LE PAGE et al., 2013; ZHANG et al., 2016). Em duas publicações (12%) foram reportados o uso de composto OCT (Optimal cutting temperature) ou Cryomatrix® (DING et al., 2004; LE PAGE et al., 2013), meios que permitem o corte de lâminas de tecido congelado.

A faixa de temperatura para o armazenamento das amostras variou entre -20 °C e -200 °C, sendo mais frequente o armazenamento a -80 °C, relatado em 82% das publicações (n=14).

O tempo de armazenamento das amostras variou entre 1 e 27 anos, com uma média de 10 anos.

A maioria das publicações incluídas tiveram como parâmetro de avaliação a qualidade de ácidos nucleicos, sendo 94% (n=16) referentes a RNA e 23% (n=4) a DNA. Vale ressaltar que esses resultados não são mutuamente excludentes, podendo uma mesma publicação avaliar ambos os biomarcadores.

Os principais métodos empregados para avaliação da qualidade dos ácidos nucleicos foram, para RNA, eletroforese capilar (algoritmo RIN - RNA Integrity Number), presente em 81% das análises realizadas (n=13), seguido de

espectrofotometria (64%; n = 10), reação em cadeia de polimerase – PCR (44%; n =7) e, para DNA, a amplificação por PCR (75%; n=3), integridade por eletroforese em gel de agarose (50%; n = 2) e a quantificação e pureza por espectrofotometria (50%; n=2). Uma publicação utilizou o método de eletroforese capilar para avaliação da integridade do DNA (KELLY et al., 2019).

O algoritmo RIN permite a classificação do RNA total com uma numeração de 1 a 10, sendo 1 correspondendo ao RNA mais degradado e 10 mais intacto. Valores de RIN > 5 indicam boa qualidade do RNA total e RIN > 8 indicam RNA total em perfeito estado para aplicações a jusante (*downstream*) (FLEIGE; PFAFFL, 2006). Para Kap et al. (2014), RIN < 5 não são adequados para análises *downstream*, $5 \leq$ RIN < 6 adequados apenas para RT-qPCR, $6 \leq$ RIN < 8 adequados para RT-qPCR e ensaios de expressão gênica e RIN \geq 8 adequado para todas as técnicas à jusante (*downstream*).

Considerando essas definições, no que se refere às amostras de tecido, as análises realizadas por meio do algoritmo RIN demonstraram viabilidade de grande parte do RNA extraído dos diferentes tipos de tecidos, conservados a -80 °C (ou menos) por períodos que variaram entre 1 e 27 anos.

Valor médio de RIN de 6,68 pôde ser calculado a partir da média apresentada de forma individualizada em 6 publicações (ANDREASSON et al., 2013; AUER et al., 2014; KELLY et al., 2019, OLIVIERI et al., 2014; ZHANG et al., 2016; ZHANG et al., 2019). Em 03 publicações, o valor mediano de RIN apresentado foi 7.0 (OLIVIERI et al., 2014; ZHANG et al., 2019). A análise conjunta dos dados apresentados em outras 8 publicações demonstra que, pelo menos, 71,6% das amostras apresentaram RIN \geq 7 (BAO et al., 2013;; KAP et al., 2014; LE PAGE et al., 2013; SHAH et al., 2019; SONG et al., 2018; SUN et al., 2016; WHITE et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

A qualidade do DNA pôde ser demonstrada pelo alto percentual de usabilidade presente nas amostras avaliadas (pelo menos 80%), através da técnica de eletroforese em gel de agarose, e pela boa amplificação dos genes de interesse por PCR.

O tempo de isquemia foi reportado em 9 dos artigos selecionados (56%), sendo a isquemia fria, compreendida pelo tempo entre a remoção cirúrgica do tecido e seu congelamento (CONDELLI V. et al., 2014), presente em todos estes artigos. O tempo

de isquemia fria observado nos relatos variou entre 10 e 70 minutos. Não foram relatadas alterações que pudessem ser atribuídas aos tempos avaliados.

Adicionalmente, informações relativas ao transporte dos materiais biológicos foram mencionadas por Kelly et al. (2019) e Song et al. (2017), que referiram amostras resfriadas (4 °C) e congeladas (gelo seco), respectivamente.

A utilização, ou não, de terapia neoadjuvante foi referida por cinco autores (33%) (ANDREASSON et al., 2013; BAO et al., 2013; GALISSIER et al., 2016; SONG et al., 2018;; ZHANG et al., 2019). Não foram relatadas interferências do tratamento na qualidade dos tecidos, exceto por uma publicação, que indicou baixo valor de RIN (5,3) atribuído a presença de necrose e fibrose causada por quimioterapia e radioterapia (ANDREASSON et al., 2013). Em duas publicações, os autores afirmam não terem analisado amostras oriundas de participantes submetidos ao tratamento (BAO et al., 2013; GALISSIER et al., 2016;).

A ocorrência, ou não, de ciclos de congelamento e descongelamento, foi relatada em 17% (n=3) das publicações, apesar da importância de se conhecer essa informação. Para as amostras de tecido que foram submetidas ao ciclo de congelamento e descongelamento, não foram observadas alterações nos resultados que pudessem ser atribuídas a esse fato (OLIVIERI et al., 2014; SHAH et al., 2019).

Não foram observadas correlações entre as condições de armazenamento e a qualidade do ácido nucleico extraído, com a exceção de duas publicações. Le Page et al. (2013) observaram qualidade inferior do DNA obtido de amostras armazenadas a -80 °C por até 9 anos, quando comparadas com amostras armazenadas em temperaturas mais baixas. Zhang et al. (2016) observaram melhor qualidade do RNA obtido de amostras armazenadas a -80 °C com uso de RNALater®, em comparação com as que foram conservadas sem o uso do estabilizante.

Tabela 1 – Características das amostras de tecido dos estudos selecionados (1/4)

Referência	País	N	Tipo de Tecido	Método para conservação	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento	Método(s) empregado(s)	Parâmetros de avaliação	Principais achados
Andreasson <i>et al.</i> , 2013	Suécia	153	Endócrino FF	SF em NL	-80°C	27 anos	Integridade por eletroforese capilar (algoritmo RIN)	Qualidade (integridade) de RNA	As condições avaliadas não afetaram a qualidade do RNA extraído (RIN médio = 7,1).
Auer <i>et al.</i> , 2014	EUA	98	Diversos FF	NI	-80°C (49 amostras) NL fase de vapor (49 amostras)	12 anos	- Quantificação de RNA por espectrofotometria; - Integridade de RNA por eletroforese capilar; (algoritmo RIN); - Expressão gênica por microarranjo; - Análise de proteínas por espectrometria de massa (SELDI-TOF-MS, MALDI-TOF-MS)	- Rendimento e qualidade (integridade e funcionalidade) de RNA - Rendimento e qualidade (integridade e estabilidade) de proteínas	RIN 5,8 (SD 2.8) para amostras armazenadas a -80°C; RIN 4,3 (SD 3,3) para amostras armazenadas em NL. Não houve diferença na integridade de proteínas e razão GAPDH e ACTB entre os 02 métodos de conservação.
Bao <i>et al.</i> , 2013	China	102	Cólon FF	SF	-80°C	3 anos e 4 meses	Quantificação e integridade por eletroforese capilar (algoritmo RIN);	Rendimento e qualidade de RNA (integridade)	Aproximadamente 80% das amostras apresentaram alto rendimento de RNA (RIN ≥ 7), sendo 94% tecidos tumorais (48 de 51) e 67% tecidos normais (34 de 51). Tempo de isquemia máximo de 60 minutos.
Ding <i>et al.</i> , 2004	Canadá	23	Pulmão	Uso OCT® ou Cryomatrix®. SF em NL	-70°C	10 anos	- Quantificação e pureza por espectrofotometria; - RT-PCR convencional (GAPDH, ILK, ACTB)	Rendimento e qualidade de RNA (pureza, integridade e funcionalidade)	Rendimento de RNA 257 \pm 183 ng/mg. Subunidades 18S e 28S intactas presentes em 11/23 tecidos. Tempo de armazenamento não impactou. Amostras adequadas para estudos de expressão gênica. Amplificação bem-sucedida dos alvos. (296-bp / 983-bp GAPDH)
Galissier <i>et al.</i> , 2016	França	356	Cólon FF	SF em NL	-80°C	Mais de 1 ano	- Integridade por eletroforese capilar (algoritmo RQI); - 5'3'mRNA integridade por qRT-PCR (TBP, B2M)	Qualidade de RNA (integridade)	RQI ≥ 5 para 82.2% das amostras de tecido tumoral, destas, 57.3% apresentaram RQI ≥ 7 .

Tabela 1 – Características das amostras de tecido dos estudos selecionados (2/4)

Referência	País	N	Tipo de Tecido	Método para conservação	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento	Método(s) empregado(s)	Parâmetros de avaliação	Principais achados		
Jewell <i>et al.</i> , 2002	EUA	151	Diversos	NI	-80°C	1 ano	- Quantificação e pureza por espectrofotometria; - RT-PCR (HPRT) - PCR (HPRT); - Integridade por eletroforese em gel de agarose; - Northern Blot (G3PDH);	Rendimento e qualidade (integridade e funcionalidade) de DNA e RNA	Usabilidade do DNA para, aproximadamente, 80% das amostras. A usabilidade de RNA foi de aproximadamente 60% (menor usabilidade em tecido de mama devido a tecido adiposo).		
		103				NL				1 ano	6 ≤ RIN < 8 para 49,5% e RIN ≥ 8 para 43%
		48				-80°C				20 anos	6 ≤ RIN < 8 para 59% e RIN ≥ 8 para 41%
Kap <i>et al.</i> , 2014	Países Baixos	123	Diversos	SF em isopentano	-20°C seguido de -80°C	15 anos	Integridade por eletroforese capilar (algoritmo RIN)	Qualidade (integridade) de RNA	6 ≤ RIN < 8 para 53.7% e RIN ≥ 8 para 39%		
		24				NL				13 anos	6 ≤ RIN < 8 para 25% e RIN ≥ 8 para 45,83%
Kelly <i>et al.</i> , 2019	Canadá	87	Diversos FF	NI	NL fase de vapor (faixa entre -150° C e -200° C)	11 anos	- Quantificação e pureza por espectrofotometria; - Integridade por eletroforese capilar (algoritmo DIN e RIN)	Rendimento e qualidade (pureza, integridade e funcionalidade) de DNA e RNA	As amostras apresentaram valores médios de RIN = 7,4 e DIN = 6,5.		
Le Page <i>et al.</i> , 2013	Canadá	135	Ovário	- Tecidos congelados em OCT (n= 15)	-80°C (com e sem RNALater)	9 anos	- Quantificação e pureza por espectrofotometria; - Integridade de RNA por eletroforese capilar (algoritmo RIN); -PCR (HBB)	Rendimento e qualidade (pureza, integridade e funcionalidade) de DNA e RNA	Razão 260/280 esteve entre 1.8 e 2.0 (DNA). Cerca de 86% do DNA apresentou boa qualidade (amplificação β-globulina)		
				- Tecidos congelados em RNALater (n= 11)	-150°C				O valor de RIN foi ≥ 7 para 60% das amostras (n = 80/135).		
				- SF em NL (n= 109)	-NL (com OCT sem OCT)				Tecidos armazenados em -80°C foram associados a menor qualidade de DNA em comparação ao armazenamento em -150°C e NL.		

Tabela 1 – Características das amostras de tecido dos estudos selecionados (3/4)

Referência	País	N	Tipo de Tecido	Método para conservação	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento	Método(s) empregado(s)	Parâmetros de avaliação	Principais achados
Olivieri <i>et al.</i> , 2014	Brasil	189	Cabeça e pescoço	NI	-140°C	7 anos			- Valor mediano de RIN 7,0 para amostras armazenadas até 8 meses e 6,2 para amostras armazenadas por 7 anos.
		98	RNA extraído de Tecido (cabeça e pescoço)	Diluição em água livre de RNase tratada com DEPC para ajustar em concentrações de RNA de 25 e 250 ng/μL	-80°C	até 4 anos	- Quantificação por espectrofotometria; - Integridade por eletroforese capilar (algoritmo RIN);	Rendimento e qualidade de RNA (integridade)	- Valor mediano RIN 7,0 aos 4 anos para concentração de 250ng/μL. RIN 2,0 aos 12 meses e ND aos 4 anos para concentração de 25 ng/μL.
		3197	RNA purificado de tumores diversos	NI	-140°C	12 anos			- Média de RIN ≥ 7 para maioria dos tecidos e RIN ≤ 5 para tecido do estômago e ovário.
Pansare <i>et al.</i> , 2019	Índia	140	Tecido oral, mama, colorretal FF	SF em NL	-80°C	4 anos	- Quantificação e pureza por espectrofotometria; - Integridade de DNA por eletroforese em gel de agarose; - Análise qualitativa por espectroscopia Raman; - PCR (GAPDH)	Rendimento e qualidade (pureza, integridade e funcionalidade) de DNA	Razão A260/A280nm entre 1.6 e 2.0 Qualidade do DNA preservada em 87% das amostras.
Shah <i>et al.</i> , 2019	Índia	30	Cérebro, mama, estômago e testículo	NI	- 80°C	4 anos e 2 meses	- Quantificação e pureza por espectrofotometria; -Integridade de RNA por eletroforese capilar (algoritmo RIN); - Expressão gênica por real-time RT-PCR (RPS13, ACTB)	Rendimento e qualidade (pureza, integridade e funcionalidade) de RNA	Cerca de 50% das amostras tiveram RIN ≥ 6.9 e razão 260/280 ≤ 2.04, 27% tiveram RIN ≥ 5.0 e razão 260/280 ≤ 2.08. As demais amostras apresentaram RIN < 5 e razão 260/280 >2.08.
Song <i>et al.</i> , 2018	Coreia do Sul	549	Diversos FF	SF em NL	-175°C (NL fase vapor)	6 anos	Integridade por eletroforese capilar (algoritmo RIN)	Qualidade (integridade) de RNA	RIN variou entre 7,4 e 9,8.

Tabela 1 – Características das amostras de tecido dos estudos selecionados (4/4)

Referência	País	N	Tipo de Tecido	Método para conservação	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento	Método(s) empregado(s)	Parâmetros de avaliação	Principais achados
Sun <i>et al.</i> , 2016	China	200	Rim FF	SF em NL	-80 °C	2 anos e 6 meses	- Integridade por eletroforese capilar (algoritmo RIN); - Expressão gênica por qRT-PCR (GAPDH, HIF-1a, HMOX1, FOS, JUN, BCL2, BAG1, EGFR, MMP-9)	Qualidade de RNA (integridade e funcionalidade)	RIN ≥ 7 em aproximadamente 82% das amostras tumorais avaliadas (sinais de degradação após 2 anos). RIN ≥ 7 em apenas 4% dos tecidos normais adjacentes.
White <i>et al.</i> , 2018	EUA	1068	Cérebro	SF em mix de isopentano e gelo seco	- 80°C	23 anos	- Quantificação e pureza por espectrofotometria; - Integridade de RNA por eletroforese capilar (algoritmo RIN); - Expressão gênica por real-time RT-PCR (PAK2, SERBP1, TUBA4A, ACO1, NAPA, PRDX5, ETVB, GSTM5, MCTS1, ACTB)	Rendimento e qualidade (pureza, integridade e funcionalidade) de RNA	Mais de 80% das amostras apresentaram RIN ≥ 6.
Zhang <i>et al.</i> , 2016	China	24	Mama	RNALater por 16 horas	-80°C	5 anos	- Avaliação de marcadores de estresse por IHQ (ERK512 e Peroxiredoxina V);	- Avaliação de marcadores de estresse (proteínas); - Rendimento e qualidade de RNA (pureza, integridade e funcionalidade)	Valor médio de RIN 7,17.
		24		SF a -196°C por 16 horas	-80°C		- Quantificação e pureza de RNA por espectrofotometria; - Integridade de RNA por eletroforese capilar (algoritmo RIN);		Valor médio de RIN 4,75.
		24		SF a -196°C por 16 horas	-196°C		- Real-time PCR (GAPDH)		Valor médio de RIN 6,96.
Zhang <i>et al.</i> , 2019	China	90	Gástrico FF	SF em NL	-80°C	12 anos	- Quantificação por espectrofotometria; - Integridade por eletroforese capilar (algoritmo RIN);	Rendimento e qualidade (integridade) de RNA	RIN 6.58 ± 1.71 (mediana 7.0), sendo que 81.1% das amostras tinham RIN ≥ 6.0.

LEGENDA: DIN – DNA Integrity Number / FF – Fresh Frozen / NI – Não Informado / NL – Nitrogênio Líquido / RIN – RNA Integrity Number / RQI – RNA Quality Indicator / SD – Standard Deviation / SF – Snap-frozen

5.3 Principais achados para amostras de sangue e derivados:

Os 17 artigos referentes a amostras de sangue e derivados foram publicados entre 2004 e 2019 e conduzidos em países da Europa (53%; n = 9), América do Norte (29%; n = 5), Ásia (12%; n = 2) e África (12%; n = 2). Os estudos incluíram em suas análises entre 2 e 2.758 amostras de sangue ou derivados.

A faixa de temperatura para o armazenamento das amostras variou desde a temperatura ambiente (máxima 37 °C) até -196 °C, sendo mais frequente o armazenamento a -80 °C, presente em 59% das publicações (n=10).

O tempo de armazenamento das amostras variou entre 1 e 26 anos, apresentando uma média de 10 anos.

De uma maneira geral, as análises conduzidas nas amostras de sangue e derivados tiveram como principal parâmetro de avaliação a qualidade de ácidos nucleicos (71%; n=12), sendo mais predominante análise de DNA (75%; n=9). Para a quantificação do DNA, as técnicas mais empregadas foram espectrofotometria e/ou fluorimetria (89%; n=8). A integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose (56%; n=5). Outros ensaios foram conduzidos, como os de expressão gênica/marcadores genéticos, através de diversas técnicas de PCR (78%; n=7).

Com relação à matriz biológica, 53% (n=9) dos artigos avaliaram a qualidade de amostras de sangue total, 29% (n=5) utilizaram amostras de plasma, 12% (n=2) amostras de camada leucocitária (buff coat), 12% (n=2) células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e uma publicação avaliou amostras de soro. Os achados não são mutuamente excludentes entre as publicações. Portanto, uma mesma publicação pode ter avaliado mais de uma matriz biológica.

Para as amostras de sangue total, as publicações avaliaram a qualidade dos materiais coletados e armazenados sob diferentes métodos: 44% (n=4) coletadas sob forma de machas de sangue secas (dried blood spots - DBS), 33% (n=3) coletadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), uma

coletada em tubo PAXgene® e uma coletada em tubo contendo ácido cítrico-citrato de sódio-dextrose (ACD).

Das quatro publicações que avaliaram a qualidade de amostras de manchas de sangue secas, 03 (75%) foram em coletas feitas em papel de filtro. O tempo de armazenamento variou entre 15 e 26 anos (média de 19 anos) em temperatura ambiente. Um subgrupo de amostras coletadas em papel de filtro foi armazenado a -20 °C (SJÖHOLM, DILLNER, CARLSON, 2007). Informações sobre exposição ao calor, à luz solar, humidade, fatores que podem interferir na estabilidade do material, não foram mencionadas pelos autores.

As amostras de sangue total conservadas em EDTA foram armazenadas entre 1 e 19 anos, sob diferentes temperaturas, variando entre temperatura ambiente e -80 °C, com e sem a presença de aditivos (BULLA et al., 2016)

As amostras coletadas e armazenadas em tubo ACD e PAXgene® foram conservadas a -80 °C por 1 e 7 anos para avaliação do rendimento e qualidade de ácidos nucleicos DNA e RNA, respectivamente. Tubos PAXgene® possuem um reagente específico que protegem o RNA da degradação causada pelas RNAses (TANG et al., 2019).

Os plasmas avaliados em cinco publicações foram obtidos a partir do sangue coletado em tubo contendo EDTA. O tempo entre a coleta e processamento, registrado em 4 publicações (80%), variou entre 1 e 2 horas. Para o armazenamento a longo prazo, a temperatura de escolha foi -80 °C, entretanto um artigo avaliou paralelamente a conservação a -20 °C (ZAVRIDOU et al., 2018). O período de armazenamento variou entre 1 e 17 anos. As análises conduzidas tiveram como alvos ácidos nucleicos (n= 2/5), metabólitos (n= 2/5) e proteínas (n= 1/5).

Os buffy coats foram extraídos de amostras sangue coletadas em tubos ACD e armazenados entre 1 e 10 anos sob temperatura de -80 °C.

As amostras de PBMC foram submetidas a protocolos de conservação com o uso de soluções crioprotetoras (dimetilsulfóxido - DMSO) associados ao soro fetal bovino (SFB), em diferentes concentrações. O tempo de armazenamento das amostras variou entre 2 e 10 anos e a faixa de temperatura foi de -80 °C a -196 °C (incluindo nitrogênio líquido em fase de vapor).

Amostras de soro foram avaliadas quanto ao rendimento e qualidade de proteínas. Essas amostras foram processadas em, no máximo 1,5 horas e armazenadas a -80 °C por um período de 17 anos (HASSIS et al., 2015).

O tempo entre a coleta e o processamento foi reportado em 5 de 9 publicações (55%), variando entre 1 e 2 horas para amostras de soro e plasma, e ocorreu de forma imediata para amostras de DNA extraídos de buffy coat, (HASSIS et al., 2015; PALTIEL et al., 2008; WAGNER-GOLBS et al., 2019; ZAVRIDOU et al., 2018; FERRO GALLEGO et al., 2019). Para as demais publicações (n=8) esse parâmetro foi considerado “não aplicável”, pois compreendem amostras armazenadas em tubos primários de coleta ou em papel de filtro.

Parâmetros de centrifugação foram reportados em 6 de 9 publicações (67%). Para avaliação de rendimento e qualidade de ácidos nucleicos, as amostras foram processadas entre 530 xg e 3.838 xg, por períodos que variaram entre 8 e 30 minutos. FERRO GALLEGO et al., 2019; MYCHALECKYJ et al., 2011; WONG; LO; CHEUNG, 2004; ZAVRIDOU et al., 2018). Para análises de proteínas e metabólitos, o processamento foi feito entre 1.800 xg e 2.000 xg, entre 10 e 20 minutos (HASSIS et al., 2015; PALTIEL et al., 2008). Os cenários apresentados não interferiram na qualidade das amostras avaliadas.

Adicionalmente, informações relativas ao transporte das amostras foram reportadas em 04 publicações (23%), com temperaturas que variaram desde a ambiente à -150 °C (CHEN et al., 2018; MYCHALECKYJ et al., 2011; PALTIEL et al., 2008; SARZOTTI-KELSOE et al., 2014). Não foram observadas interferências das condições de transporte na qualidade das amostras.

O uso de medicamentos pelos participantes que tiveram suas amostras analisadas não foi relatado nas publicações.

A ocorrência, ou não, de ciclos de congelamento e descongelamento, foi reportada em 4 de 14 publicações (28%). Para as amostras que foram submetidas ao ciclo de congelamento e descongelamento, não foram observadas alterações significativas que pudessem comprometer integralmente a qualidade das amostras (HASSIS et al., 2015; PALTIEL et al., 2008; ZAVRIDOU et al., 2018). Para as demais publicações (n=3) esse parâmetro foi

considerado “não aplicável”, pois compreendem amostras armazenadas em temperatura ambiente.

Tabela 2 – Características das amostras de sangue e derivados dos estudos selecionados (1/5)

Referência	País	N	Material biológico	Método para conservação	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento	Método(s) empregado(s)	Parâmetros de avaliação	Principais achados
Cardoso <i>et al.</i> , 2010	Espanha	6		Conservados em papel absorvente					
		8	DBS	Pedaço de "cotão"	Temperatura ambiente	15 anos	- Quantificação por fluorometria; - Análise STR por eletroforese capilar.	Perfil de marcadores STR	Perfis genéticos completos e confiáveis obtidos para todas as 26 amostras. Adequado para autenticação genética.
		12		Tecido de algodão não colorido					
Ho <i>et al.</i> , 2016	EUA	106	DBS	Papel de filtro	Temperatura Ambiente (não controlada)	16 anos	- Integridade por eletroforese capilar (algoritmo RIN); - Expressão gênica por qRT-PCR (genes "housekeeping" PPIA, ACTB e GAPDH); - Expressão gênica por microarranjo	Qualidade de RNA (integridade e funcionalidade)	Dados de expressão gênica podem ser gerados de mRNA de amostras armazenadas até 16 anos a temperatura ambiente. No entanto há uma diminuição ao longo do tempo. Portanto, amostras DBS até 6 anos são recomendadas.
Rahikainen <i>et al.</i> , 2016	Finlândia	32	DBS	Papel de Filtro (Cartão FTA®)	Temperatura Ambiente	16 anos	- Quantificação e integridade de DNA por real-time PCR; - Análise STR por eletroforese capilar; - LD-PCR (CYP2D6)	Rendimento e qualidade de DNA (integridade e funcionalidade)	Degradação do DNA com o tempo de armazenamento. Amostras inadequadas para estudos genômicos em larga escala, pode ser mais difícil a obtenção do DNA intacto. - Quantidade suficiente de DNA para fins de identificação humana.
Sjöholm; Dillner; Carlson, 2007 (a)	Suécia	10			-20°C	22 anos	- Quantificação por fluorometria e real-time PCR; - Integridade por eletroforese em gel de agarose; - MDA (amplificação de deslocamento múltiplo); - Análises SNP por real-time PCR (TaqMan); - Análises SNP por espectrometria de massa	Rendimento e qualidade de DNA (integridade e funcionalidade)	Performance similar à de amostras frescas. Método de escolha, em comparação a temperatura ambiente para análises SNP. Baixo peso molecular do DNA devido a degradação.
		10	DBS	Papel de filtro	Temperatura ambiente	26 anos			

Tabela 2 – Características das amostras de sangue e derivados dos estudos selecionados (2/5)

Referência	País	N	Material biológico	Método para conservação	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento	Método(s) empregado(s)	Parâmetros de avaliação	Principais achados
Bulla <i>et al.</i> , 2016	Suíça	32	Sangue Total	100uL de DNAgard adicionado a 300uL de sangue total com EDTA antes do armazenamento	-20°C	1 ano	- Quantificação por espectrofotometria UV/Vis e fluorimetria; - Integridade por eletroforese em gel de agarose; - LD-PCR; - Análise de metilação de DNA (22 genes).	Rendimento e qualidade de DNA (integridade e funcionalidade)	Armazenamento a -80°C garante alta qualidade e rendimento de DNA. Maiores rendimentos de foram obtidos com a adição do DNAgard antes do descongelamento das amostras armazenadas a -20°C e -80°C. Adição do DNAgard antes do armazenamento das amostras a -80°C demonstrou ter o mesmo rendimento de extração de DNA das amostras <i>baseline</i> . No entanto, quando armazenadas a -20°C, o rendimento médio do DNA extraído caiu progressivamente ao longo do período avaliado. Em temperatura ambiente, DNAgard também demonstrou ser uma alternativa aceitável. Metilação do DNA não foi afetada pelas condições avaliadas.
		32			-80°C				
		40			Temperatura ambiente				
		32			-20°C				
		32			-80°C				
		32			-20°C				
		32			-80°C				
Chen <i>et al.</i> , 2018	África do Sul	2.758	Sangue Total	Sangue coletado em EDTA	-30°C	19 anos	- Quantificação e pureza por espectrofotometria; - Quantificação por fluorimetria; - Integridade por eletroforese em gel de agarose.	Rendimento e qualidade de DNA (pureza e integridade)	DNA de alta qualidade, quantidade e pureza pôde ser extraído. Não foi observada queda no rendimento do DNA com o tempo de armazenamento,
Tevis <i>et al.</i> , 2018	EUA	18	Sangue Total	Sangue coletado em EDTA	-70°C	3 anos	- Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com célula de reação dinâmica (DRC-ICP-MS)	Estabilidade de elementos essenciais no sangue total (Cd, Mn, Pb, Se e Hg)	Armazenamento a -20°C e 4°C são equivalentes a -70°C para estabilidade de Cd, Mn, Pb, Se e Hg por pelo menos 3 anos. Deve-se evitar armazenamento em temperatura ambiente (23°C e 37°C), devido à redução de recuperação de Se e Hg, além do desenvolvimento de coágulos.
		18			-20°C				
		18			4°C				
		18			23°C				
		18			37°C				
Tang <i>et al.</i> , 2019	China	300	Sangue total	Amostras coletadas em Tubos PAXgene	-80°C	7 anos	- Quantificação e pureza por espectrofotometria; - Integridade de RNA por eletroforese capilar (algoritmo RIN)	Rendimento e qualidade de RNA (integridade, pureza)	Quando mantidas a -80°C, 90% das amostras apresentaram RNA com qualidade suficiente para análises a jusante. Das 300 amostras, 19 apresentaram coágulos e, portanto, menor rendimento e integridade do RNA.

Tabela 2 – Características das amostras de sangue e derivados dos estudos selecionados (3/5)

Referência	País	N	Material biológico	Método para conservação	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento	Método(s) empregado(s)	Parâmetros de avaliação	Principais achados
Ferro Gallego <i>et al.</i> , 2019	Espanha	30	Sangue Total	Sangue coletado em tubos com ACD	-80°C	1 ano	<ul style="list-style-type: none"> - Quantificação e pureza por espectrofotometria; - Quantificação por fluorometria; - Integridade por eletroforese em gel de agarose; - PCR convencional (HGH, HLA); - Real-time PCR (GAPDH) 	Rendimento e qualidade de DNA (pureza, integridade e funcionalidade)	Apesar de haver uma queda de rendimento em função do tempo de armazenamento, os DNA extraído de todas as amostras foram funcionais quando avaliados por PCR e qPCR. Todas as amostras foram positivas para os genes avaliados. No entanto, o sangue total deve ser escolhido para obtenção de DNA de alta qualidade e maior performance.
		30	Camada leucoplaquetária (buffy coat)						
Mychaleckyj <i>et al.</i> , 2011	EUA	120	Camada leucoplaquetária (buffy coat)	Sangue total foi coletado em tubo ACD.	-80°C	9 anos	<ul style="list-style-type: none"> - Quantificação e pureza por espectrofotometria; - Análises SNP por real-time PCR (TaqMan); - Análises SNP/CNV por GWAS 	Rendimento e qualidade de DNA (pureza e funcionalidade)	DNA e Buffy Coat podem ser armazenados por até 9 anos a -80°C e ainda produzir alto rendimento de DNA, adequados para análises de associação genômica ampla e outros testes genéticos.
Ortega-Pinazo <i>et al.</i> , 2019	Espanha	70	PBMC	Sangue coletado em tubos EDTA para avaliação de RNA Para alíquota PBMC: Meio RPMI + 40% SFB e DMSO 10%	PBMC: 24 horas em -80°C seguido de transferência para -196°C.	10 anos	<ul style="list-style-type: none"> - Quantificação e pureza de DNA e RNA por espectrofotometria; - Quantificação de DNA por fluorometria; - Integridade de DNA e RNA por eletroforese em gel de agarose; - PCR (HGH) e RT-PCR (HIST1H4A) convencionais; - Viabilidade celular por exclusão de azul tripano 	Rendimento e qualidade de DNA e RNA (pureza, integridade e funcionalidade) e viabilidade celular	Obtenção de células viáveis (60%) que podem ser utilizadas para fins de cultura de células, estudos de proteínas etc. O RNA extraído de PBMC apresentou alta qualidade, integridade e funcionalidade. O DNA extraído de buffy coat apresentou alta qualidade, comparado a DNA extraído de amostras frescas.
		70	DNA (obtido de buffy coat)	Sangue Coletado em tubos ACD	DNA obtido do buffy coat: -80°C				
Sarzotti-Kelsoe <i>et al.</i> , 2014	EUA/África do Sul	406	PBMC (Amostra coletada por leucaférese)	PBMC conservado em 90% SFB + DMSO 10%	NL em fase de vapor	2 anos	Contagem e viabilidade celular em hemacitômetro (corantes vitais)	Contagem e viabilidade celular	A viabilidade e recuperação das amostras de PBMC foram mantidas durante o período de avaliação. A viabilidade média foi de 97,4% para todas as amostras e 99% das amostras apresentaram recuperação média de 86,7%

Tabela 2 – Características das amostras de sangue e derivados dos estudos selecionados (4/5)

Referência	País	N	Material biológico	Método para conservação	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento	Método(s) empregado(s)	Parâmetros de avaliação	Principais achados
Hassis <i>et al.</i> , 2015	EUA	20	Soro	Sangue coletado em tubos revestidos em silicone sem aditivos	-80°C	17 anos	- Quantificação de proteínas totais por ensaio colorimétrico (BCA); - Quantificação de proteínas por LC-MS/MS	Rendimento e qualidade de proteínas	No soro, houve diminuição da proteína alfa-2-macroglobulina. No plasma, houve diminuição da proteína alfa-2-macroglobulina e proteínas C1QB e inibidor de C1 mais abundantes. Até 03 ciclos de congelamento e descongelamento não impactou na qualidade das amostras.
		20	Plasma	Sangue coletado em K2EDTA					
Paltiel <i>et al.</i> , 2008	Noruega EUA	40	Plasma	Sangue coletado em EDTA Amostras aliqüotadas em placas de 96 poços seladas com "Easy pierce heat sealing foils"	-80°C	2 anos	Quantificação por métodos analíticos rotina em laboratórios clínicos.	Estabilidade de metabolitos em plasma (sódio, colesterol, triglicerídeos, ácidos graxos livres, vitamina E, aspartato aminotransferase)	Aumento nos níveis de Vitamina E com 2 anos de avaliação Diminuição nos níveis de triglicerídeos após 1 ano de avaliação. Para amostras que foram submetidas ao congelamento e descongelamento, a maioria dos metabolitos permaneceu estável nos 10 primeiros ciclos.
Wagner-Golbs <i>et al.</i> , 2019	Alemanha	2.398	Plasma	Sangue coletado em EDTA	-80°C	16 anos	- Espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (GC-MS); - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)	Estabilidade de metabolitos em plasma (aminoácidos, carboidratos, lipídios complexos, ácidos graxos, vitaminas etc.)	Durante os 7 primeiros anos 98% dos metabolitos permaneceram estáveis. Após esse período, alterações significativas foram observadas, principalmente lipídios complexos, ácidos graxos, moléculas do metabolismo energético e aminoácidos.
Wong; Lo; Cheung, 2004	China	25	Plasma	Sangue coletado em EDTA. Uso do reagente Trizol no plasma antes do armazenamento.	-80°C	3 anos	RT-PCR convencional (<i>CTNNB1</i> , <i>ACTB</i>)	Qualidade de RNA (funcionalidade)	Adição do reagente foi capaz de manter o mRNA estável durante todo o período avaliado (detecção de β -catenina e β -actina). Isolamento de mRNA não viral de alta qualidade.

Tabela 2 – Características das amostras de sangue e derivados dos estudos selecionados (5/5)

Referência	País	N	Material biológico	Método para conservação	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento	Método(s) empregado(s)	Parâmetros de avaliação	Principais achados
Zavridou <i>et al.</i> , 2018	Grécia	2	Plasma	Sangue coletado em EDTA. DNA submetido à conversão pelo bissulfito de sódio	-80°C e -20°C	1 ano	- Quantificação de RNA e DNA por espectrofotometria; - Expressão gênica por qRT-PCR (CK19, B2M); - Avaliação de DNA metilado por PCR metilação-específica em tempo real (ACTB, SOX17, BRMS1)	Estabilidade do DNA metilado CTC	DNA submetido a conversão por bissulfito de sódio é estável quando armazenado a -20°C e -80°C por até 1 ano. Mesmo quando submetido a ciclos de congelamento e descongelamento, apresentaram qualidade para serem usadas em análises moleculares à jusante (downstream).

LEGENDA: CTC- Células Tumorais Circulantes / DBS – Dried Blood Spots / DMSO - Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo / SFB – Soro Fetal Bovino / SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único / STR - Repetições Curtas em Tandem

6. DISCUSSÃO

A revisão sistemática da literatura foi conduzida de modo a identificar as condições pré-analíticas, nas quais foram submetidas as matrizes biológicas (tecido, sangue e derivados) avaliadas em cada publicação incluída, bem como a viabilidade dos marcadores de interesse. A partir das informações sintetizadas, este trabalho acrescenta ao conhecimento na área visto que ainda é necessário entender como as amostras biológicas são afetadas por variáveis pré-analíticas e se essas variáveis agem de forma semelhante nas matrizes biológicas (YONG; DRY; SHABIHKHANI, 2014).

Para as amostras de tecidos, diversos fatores que ocorrem entre a ressecção e análise podem potencialmente afetar a amostra e, conseqüentemente, os resultados obtidos. Esses fatores incluem, além do tempo de isquemia e o tempo de armazenamento, a ocorrência de ciclos de congelamento e descongelamento (MA; DAI; KONG, 2012). Quanto ao tempo de armazenamento, para Huang et al. (2017), este constitui um dos maiores problemas quando se trata de conservação de ácidos nucleicos, isso porque o armazenamento a longo prazo implica na degradação gradual produzindo uma diminuição na qualidade dos biomarcadores.

A maior parte das publicações incluídas nesta revisão avaliaram o rendimento e qualidade de ácidos nucleicos, sendo mais predominante a avaliação de RNA nas amostras de tecido e DNA nas amostras de sangue.

É sabido que o RNA é mais sensível e, portanto, se degrada mais facilmente devido ao efeito catalisador da enzima RNase (JACKSON et al., 1990). Isso faz com que as suas condições de armazenamento sejam mais estritas.

De uma maneira geral, as variáveis relacionadas ao tempo e temperatura de armazenamento não influenciaram negativamente na qualidade das amostras de tecido. A integridade dos ácidos nucleicos esteve mais relacionada às características do tecido tumoral como, por exemplo, tipo de cirurgia (laparoscopia), localização do tumor, tipo de tumor (gastrointestinal, ovário) e condições histológicas envolvendo presença de necrose, percentual de estroma e tecido adiposo (ANDREASSON et al. 2013; GALISSIER et al. 2016; JEWELL et al. 2002; OLIVIERI et al. 2014).

Oitenta e dois por cento das amostras de tecidos avaliadas nesta revisão foram armazenadas à -80 °C, por um período máximo de 27 anos. Apesar de as diretrizes da IARC (2017) referirem o armazenamento em nitrogênio líquido como método ideal quando se trata de longo prazo, por mais de cinco anos, os resultados aqui obtidos demonstraram que a conservação a -80 °C também pode ser uma alternativa factível para manutenção das amostras biológicas.

Embora seja um parâmetro crítico, o tempo de isquemia foi reportado em 56% (n=9) das publicações, sendo predominante a isquemia fria (100%). A tolerância ao tempo de exposição a isquemia fria está relacionada ao tipo de tecido avaliado. De acordo com Viana et al. (2012), tecidos do cólon e da tireoide, são mais sensíveis a variações relacionadas à isquemia fria, enquanto os oriundos do estômago e pulmão são menos sensíveis. Além disso, o tempo de isquemia fria avaliado nas publicações incluídas (entre 10 e 70 minutos) não foi relacionado a interferências na qualidade das amostras de diferentes tecidos. Apesar disso, alguns autores recomendam que o tempo de isquemia fria seja limitado a 30 minutos para garantir, de forma mais eficiente, a integridade do RNA (VIANA et al., 2012; HONG et al., 2010).

Após a ressecção, a maior parte das amostras de tecido avaliadas foram estabilizadas por meio de congelamento instantâneo (snap-freezing) em nitrogênio líquido, isopentano ou gelo seco. Esse procedimento, considerado por alguns autores o “padrão ouro” na preservação de tecidos, permite mitigar alterações na expressão gênica e em proteínas (JEWEL et al., 2002; MICKE et al., 2006; SHABIHKHANI et al., 2014). A utilização do reagente RNAlater constitui um método alternativo para estabilização das amostras. Alguns autores referem que essa técnica viabiliza a preservação do RNA de forma comparável às amostras estabilizadas por meio do congelamento instantâneo (snap-freezing), quando não demonstram ser ligeiramente mais eficazes (HENTZE et al., 2019; LINDNER et al., 2019). Esses achados são compatíveis com os resultados encontrados nas publicações incluídas nesta revisão, cujas amostras foram preservadas em RNAlater e armazenadas a -80 °C (LE PAGE et al., 2013; ZHANG et al., 2016).

Outro método de estabilização, consiste na aplicação do OCT, um composto que permite a realização de cortes histológicos de tecidos congelados. Ao contrário do que demonstram algumas publicações, as quais mencionam dificuldades para extração de RNA de qualidade (ANDREASSON et al., 2013; YONG, DRY,

SHABIHKHANI, 2014), a técnica empregada por Ding et al. (2004) e Le Page et al. (2013) não pareceu interferir na qualidade dos ácidos nucleicos extraídos. Resultados semelhantes foram observados por Esteva-Socias et al. (2020), que comparou quatro métodos de estabilização de amostras de tecido pulmonar armazenadas por até cinco anos, incluindo o uso do composto OCT associado ao congelamento instantâneo em nitrogênio líquido, demonstrando bom desempenho na preservação do RNA, comparáveis ao grupo de amostras estabilizadas em RNAlater®.

Ciclos de congelamento e descongelamento podem ocorrer por falha do equipamento de armazenagem, frequentes aberturas de porta ou, até mesmo, quando um material biológico é amostrado repetidas vezes para análise (Yu et al., 2017). No presente trabalho, apenas duas das publicações referiram a ocorrência destes ciclos. O número de ciclos não foi informado por Olivieri et al. (2014) e Shah et al. (2019) informaram ter havido um ciclo, no qual a temperatura subiu de -80 °C para -20 °C. Em ambos os cenários, não foram relatadas alterações que pudessem ser atribuídas à flutuação da temperatura. Outros autores referem perda de qualidade de RNA extraídos de tecido de câncer de mama e gastrointestinais que foram submetidas a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento (WANG et al. 2015; HU et al, 2017). Yu et al. (2017), observaram que a ocorrência de até 03 ciclos não interfere na qualidade do RNA extraído de tumor pulmonar. Fan et al. (2019) demonstraram a viabilidade de ácidos nucleicos de tecidos do cólon após exposição a sete ciclos de congelamento e descongelamento. Cabe ressaltar que as Boas Práticas recomendam que essas excursões de temperatura sejam evitadas, mas, caso ocorram, devem ser documentadas (CAMPBELL et al., 2018).

Além de amostras de tecido, neste estudo também foram avaliados os impactos de variáveis pré-analíticas em amostras de sangue e derivados, conservados sob diferentes métodos.

Amostras de sangue total conservadas sob a forma de manchas de sangue secas (DBS) apresentaram sinais de degradação do DNA e RNA relacionadas ao tempo de armazenamento, que variou entre 16 e 26 anos. Entretanto, as amostras permaneceram viáveis para avaliação de marcadores STR e SNP, além de estudos de expressão gênica, a partir do RNA extraído (SJÖHOLM, DILLNER, CARLSON, 2007; RAHIKAINEN et al., 2016; HO et al., 2016). Outros autores demonstraram a eficiência do método de conservação para extração de ácidos nucleicos. Haak et al.

(2008) obtiveram sucesso na obtenção de RNA a partir de DBS armazenados por 9 anos a temperatura ambiente, enquanto Gauffin et al. (2009) demonstraram resultados semelhantes em amostras armazenadas por 20 anos. As Boas Práticas para Repositórios recomendam o uso de papel de filtro para a preservação de DBS em temperatura ambiente, desde que o armazenamento não exceda 15 anos (CAMPBELL et al., 2018).

Quando o sangue total foi armazenado a longo prazo em seu tubo primário contendo EDTA (com e sem DNAgard®), ACD ou armazenado em tubo PAXgene®, os ácidos nucleicos extraídos se mantiveram preservados, mesmo com o cenário de armazenamento a -30 °C por 19 anos. No entanto, outros autores sugerem que a extração do DNA do sangue total coletado em EDTA seja feita o mais breve possível, após terem observado queda de aproximadamente 40% do rendimento total do DNA extraído dessa matriz em amostras armazenadas a -20 °C por 95 dias (ALROKAYAN, 2000)

Para o RNA extraído de sangue total conservado a -80 °C, o uso de tubo PAXgene possibilitou a extração de RNA de alta qualidade e integridade, mesmo após armazenamento por sete anos. Resultados semelhantes foram encontrados por Stephenson et al. (2020), com valores médios de RIN = 8,49 para amostras armazenadas por até 10 anos a -80 °C.

Análises de proteínas a partir de amostras de soro e plasma demonstram pouca interferência das condições de processamento e armazenamento na viabilidade dos alvos, mesmo quando submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento (HASSIS et al., 2015). Mateos et al. (2016), concluíram que as proteínas presentes no plasma, ao nível do peptídeo, são resistentes aos ciclos de congelamento e descongelamento. No entanto, outras variáveis pré-analíticas, relacionadas em temperatura entre coleta e processamento, além de parâmetros para centrifugação das amostras, constituem fatores que podem interferir no rendimento de proteínas no plasma (DANIELS et al., 2019).

Quando se trata de metabólitos, também é possível observar grande estabilidade dos analitos no plasma. Amostras armazenadas a -80 °C apresentaram apenas alterações nos níveis de triglicerídeos e vitamina E, após um e dois anos de armazenamento, respectivamente. Quando submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, observou-se maior instabilidade nos ácidos graxos (PALTIEL et al.,

2008). Os achados de Wagner-Golbs et al. (2019), demonstraram que 98% dos metabolitos permaneceram estáveis nos primeiros sete anos de armazenamento a -80 °C. As classes de ácidos graxos, lipídios complexos, aminoácidos e moléculas do metabolismo de energia são as que exibiram maior sensibilidade contra o armazenamento a longo prazo. Esses achados são semelhantes com os apresentados por Pinto et al. (2014), que demonstraram estabilidade das amostras armazenadas a -80° C por, aproximadamente, dois anos. Alterações nos níveis de lipídeos foram observadas nas amostras submetidas a cinco ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostras de PBMC conservadas em nitrogênio líquido ou em fase de vapor, apresentaram recuperação celular em torno de 86%, quando armazenadas por até dois anos (SARZOTTI-KELSOE et al., 2014). Observa-se que o aumento no tempo de armazenamento (até 10 anos) promove queda de cerca de 40% na viabilidade celular, em comparação às amostras frescas, entretanto, para RNA, alta pureza e qualidade foram mantidas (ORTEGA-PINAZO et al., 2019). Com relação a viabilidade celular, os resultados encontrados por Kleeberger et al. (1999) demonstraram viabilidade celular de, aproximadamente, 90% sugerindo não haver uma tendência de perda celular ao longo do tempo avaliado (12 anos).

Para amostras de buffy coat, observou-se que amostras armazenadas por até nove anos a -80 °C apresentaram rendimentos de DNA adequados, entretanto, o uso de sangue total para obtenção de DNA de melhor qualidade e performance foi pontuado por Ferro-Gallego et al. (2009).

De uma forma geral, a viabilidade biológica dos marcadores de interesse em cada publicação incluída foi demonstrada sob as condições pré-analíticas as quais foram submetidas. Entretanto, a maioria das publicações deixaram lacunas quanto alguns parâmetros importantes de serem conhecidos como, por exemplo, a ocorrência ou não de ciclos de congelamento e descongelamento e tempo de isquemia (tecidos sólidos), bem como fatores intrínsecos aos indivíduos cujos materiais foram coletados (uso de medicamentos, idade, sexo, tabagismo, entre outros).

Apesar de as buscas terem sido realizadas em quatro bases de dados para pesquisa biomédica, artigos que seriam elegíveis para esta revisão possivelmente não foram triados. Além disso, devido à extensa diversidade de biomarcadores existentes, é possível presumir que existe uma lacuna não explorada nesta revisão. Entretanto,

os principais alvos utilizados na pesquisa biomédica, por exemplo, ácidos nucleicos, foram contemplados e frequentemente reportados nas publicações incluídas. Esses aspectos constituem limitações do trabalho apresentado.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível sintetizar, por meio de uma revisão sistemática, a literatura publicada em bases de dados indexadas, apresentando as condições de conservação e armazenamento a longo prazo das duas principais matrizes biológicas armazenadas nos biobancos credenciados no território nacional (tecidos, sangue e derivados), identificadas a partir da consulta realizada à aba pública do Sistema Plataforma Brasil.

As publicações avaliadas nesta revisão sugerem que a maioria das amostras de tecidos, sangue e derivados apresentaram boa qualidade nas condições pré-analíticas avaliadas. Os materiais biológicos devem seguir estritos padrões de qualidade em todas as etapas percorridas, desde a sua extração, até o momento da análise. Importante ressaltar que todos esses parâmetros, além dos fatores inerentes aos indivíduos, devem ser conhecidos e registrados, pois além de garantirem maior rastreabilidade, também fornecem informações associadas aos materiais biológicos.

Os achados apresentados neste estudo fornecem maior compreensão a respeito da influência de algumas variáveis pré-analíticas na integridade de biomarcadores. A caracterização de amostras para demonstrar a viabilidade dos alvos de interesse representa o cenário mais fidedigno para avaliar a qualidade dos materiais a serem incorporados nos biobancos. Entretanto, considerando o volume restrito de recursos biológicos, a disponibilização para a comunidade científica deve ser priorizada. Desta forma, o artigo a ser publicado a partir deste estudo, permitirá que curadores de biobancos possam ponderar sobre a incorporação de amostras que foram submetidas às condições avaliadas em seus acervos. Além disso, os dados apresentados também poderão pautar políticas de qualidade aplicáveis às amostras já armazenadas em biobancos.

REFERÊNCIAS

ALROKAYAN, S. A. H. Effect of Storage Temperature on the Quality and Quantity of DNA Extracted from Blood. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 392–394, 15 fev. 2000.

ANDREASSON, A. et al. Long-term storage of endocrine tissues at - 80 degrees C does not adversely affect RNA quality or overall histomorphology. **Biopreservation and biobanking**, v. 11, n. 6, p. 366–370, dez. 2013

ARTENE, S.-A. et al. Biobanking in a Constantly Developing Medical World. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

AUER, H. et al. The effects of frozen tissue storage conditions on the integrity of RNA and protein. **BIOTECHNIC & HISTOCHEMISTRY**, v. 89, n. 7, p. 518–528, out. 2014.

BAO, W.-G. et al. Biobanking of fresh-frozen human colon tissues: impact of tissue ex-vivo ischemia times and storage periods on RNA quality. **Annals of surgical oncology**, v. 20, n. 5, p. 1737–1744, maio 2013.

BETSOU, F. et al. Standard Preanalytical Coding for Biospecimens: Defining the Sample PREanalytical Code. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 4, p. 1004–1011, abr. 2010.

BETSOU, F. Quality Assurance and Quality Control in Biobanking. In: HAINAUT, P. et al. (Eds.). **Biobanking of Human Biospecimens**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 23–49.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 441, de 12 de maio de 2011. **Aprovar as seguintes diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores**. Diário Oficial da União. 2011 b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 510, de 07 de abril de 2016. **Dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisas em Ciências Humanas e Sociais cujos procedimentos metodológicos envolvam a utilização de dados diretamente obtidos com os participantes ou de informações identificáveis ou que possam acarretar riscos maiores do que os existentes na vida cotidiana, na forma definida nesta Resolução**. Diário Oficial da União. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2201, de 14 de setembro de 2011. **Estabelece as Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa**. Diário Oficial da União. 2011 a.

BULLA, A. et al. Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage. **Biopreservation and Biobanking**, v. 14, n. 1, p. 29–38, fev. 2016.

CAMPBELL, LD. et al. The 2018 Revision of the ISBER Best Practices: Summary of Changes and the Editorial Team's Development Process. **Biopreservation and Biobanking** 16(1): 3-6.

CABOUX EPA, HAINAUT P. Common minimum technical standards and protocols for biological resource centres dedicated to cancer research, workgroup report 2, **World Health Organization, International Agency for Research on Cancer**; 2007.

CARDOSO, S. et al. Quality standards in Biobanking: authentication by genetic profiling of blood spots from donor's original sample. **EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS**, v. 18, n. 7, p. 848–851, jul. 2010.

CHEN, H.; PANG, T. A call for global governance of biobanks. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 93, n. 2, p. 113–117, 1 fev. 2015.

CHEN, W. C. et al. The Integrity and Yield of Genomic DNA Isolated from Whole Blood Following Long-Term Storage at -30 degrees C. **Biopreservation and biobanking**, v. 16, n. 2, p. 106–113, abr. 2018.

CONEP. **Biobancos aprovados.** Disponível em: <<http://plataformabrasil.saude.gov.br/login.jsf;jsessionid=0BEA79D0CD5F640DF07D7B8F9C2ADED5.server-plataformabrasil-srvjpdf130>>. Acesso em: 19 set. 2019.

CONDELLI, V. et al. Validation of vacuum-based refrigerated system for biobanking tissue preservation: analysis of cellular morphology, protein stability, and RNA quality. **Biopreservation and biobanking**, v. 12, n. 1, p. 35–45, fev. 2014.

DANIELS, J. R. et al. Stability of the Human Plasma Proteome to Pre-analytical Variability as Assessed by an Aptamer-Based Approach. **Journal of proteome research**, v. 18, n. 10, p. 3661–3670, 4 out. 2019.

DE SOUZA, Y. G.; GREENSPAN, J. S. Biobanking past, present and future: responsibilities and benefits. **AIDS**, v. 27, n. 3, p. 303–312, jan. 2013.

DING, L. et al. A lung tissue bank for gene expression studies in chronic obstructive pulmonary disease. **COPD**, v. 1, n. 2, p. 191–204, 2004

ESTEVA-SOCIAS, M. et al. Impact of different stabilization methods on RT-qPCR results using human lung tissue samples. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3579, dez. 2020.

FAN, X.-J. et al. Impact of Cold Ischemic Time and Freeze-Thaw Cycles on RNA, DNA and Protein Quality in Colorectal Cancer Tissues Biobanking. **JOURNAL OF CANCER**, v. 10, n. 20, p. 4978–4988, 2019.

FERRO GALLEGO, P. et al. On the Use of Buffy or Whole Blood for Obtaining DNA of High Quality and Functionality: What Is the Best Option? **Biopreservation and biobanking**, 20 ago. 2019.

FERROCO, C. L. V.; TORRES, T. S.; STEFANOFF, CG. **Quality recommendations for storage samples in biobanks of human biological specimens for research purposes: a systematic review**. PROSPERO 2021 CRD42021234934 Available from: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42021234934

FIOCRUZ. Portaria nº 1228/2014-PR de 7 de novembro de 2014. **Criar o Grupo de Trabalho (GT) para a constituição de Biobanco modelo institucional, vinculado à Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência (VPPLR) da Fiocruz**. Portal Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, 7 nov. 2014.

FIOCRUZ. Portaria nº 986/2015-PR de 4 de agosto de 2015. **Criar o Grupo de Trabalho (GT) para a elaboração do Regimento Interno da Rede Fiocruz de Biobancos (RFBB), vinculado à Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência (VPPLR) da Fiocruz**. Portal Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, 4 ago. 2015.

FIOCRUZ. Portaria nº 744/2015-PR de 10 de junho de 2015. **Criar a Rede Fiocruz de Biobancos (RFBB), vinculada à Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência (VPPLR) da Fiocruz**. Portal Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, 10 jun. 2015.

FIOCRUZ. Portaria nº 434/2017-PR de 28 de março de 2017. **Instituir o Comitê Gestor da Rede Fiocruz de Biobancos (RFBB), vinculada à Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções (VPPCB) da Fiocruz**. Portal Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, 28 mar. 2017

FIOCRUZ. **Regimento Interno da Rede Fiocruz de Biobancos (RFBB)**. Disponível em: <http://www.portaria.fiocruz.br/Doc/FINAL_Regimento_Interno_RFBB.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2019a.

FIOCRUZ. **Perfil Institucional**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/perfil-institucional>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 126–139, abr. 2006

GALISSIER, T. et al. Biobanking of Fresh-Frozen Human Adenocarcinomatous and Normal Colon Tissues: Which Parameters Influence RNA Quality? **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0154326, 2016.

GAUFFIN, F. et al. Quantitation of RNA decay in dried blood spots during 20 years of storage. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 12, 1 jan. 2009.

HAAK, P. T. et al. Archived Unfrozen Neonatal Blood Spots Are Amenable to Quantitative Gene Expression Analysis. **Neonatology**, v. 95, n. 3, p. 210–216, 2009

HASSIS, M. E. et al. Evaluating the effects of preanalytical variables on the stability of the human plasma proteome. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 478, p. 14–22, 1 jun. 2015.

HENTZE, J. L. et al. Optimized Biobanking Procedures for Preservation of RNA in Tissue: Comparison of Snap-Freezing and RNAlater-Fixation Methods. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 6, p. 562–569, 1 dez. 2019.

HEWITT, R. E. Biobanking: the foundation of personalized medicine. **Current Opinion in Oncology**, v. 23, n. 1, p. 112–119, jan. 2011.

HO, N. T. et al. Effect of storage time on gene expression data acquired from unfrozen archived newborn blood spots. **Molecular genetics and metabolism**, v. 119, n. 3, p. 207–213, nov. 2016.

HONG, S. H. et al. Effects of Delay in the Snap Freezing of Colorectal Cancer Tissues on the Quality of DNA and RNA. **Journal of the Korean Society of Coloproctology**, v. 26, n. 5, p. 316, 2010.

HU, Y. et al. Influence of Freeze-Thaw Cycles on RNA Integrity of Gastrointestinal Cancer and Matched Adjacent Tissues. **Biopreservation and Biobanking**, v. 15, n. 3, p. 241–247, jun. 2017

HUANG, L.-H. et al. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. **PLOS ONE**, p. 13, 2017.

International Agency for Research on Cancer (IARC). **Common Minimum Technical Standards and Protocols for Biological Resource Centres dedicated to Cancer Research**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2007.

International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). **Best Practices for Repositories collection, storage, retrieval, and distribution of biological materials for research international society for biological and environmental repositories**. Biopreserv Biobank. 2012; 10(2):79-161.

JACKSON, D. P. et al. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 43, n. 6, p. 499–504, 1 jun. 1990.

JEWELL, S. et al. Analysis of the molecular quality of human tissues - An experience from the cooperative human tissue network. **AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY**, v. 118, n. 5, p. 733–741, nov. 2002.

KANG, B. et al. Current Status, Challenges, Policies, and Bioethics of Biobanks. **Genomics & Informatics**, v. 11, n. 4, p. 211, 2013.

KAP, M. et al. Fit for Purpose Frozen Tissue Collections by RNA Integrity Number-Based Quality Control Assurance at the Erasmus MC Tissue Bank. **Biopreservation and Biobanking**, v. 12, n. 2, p. 81–90, abr. 2014.

KELLY, R. et al. RNA and DNA Integrity Remain Stable in Frozen Tissue After Long-Term Storage at Cryogenic Temperatures: A Report from the Ontario Tumour Bank. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 4, p. 282–287, ago. 2019.

KLEEBERGER, C. et al. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study. **CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY**, v. 6, n. 1, p. 14–19, jan. 1999.

LE PAGE, C. et al. Specimen Quality Evaluation in Canadian Biobanks Participating in the COEUR Repository. **BIOPRESERVATION AND BIOBANKING**, v. 11, n. 2, p. 83–93, abr. 2013.

LIND, L. et al. Mixture effects of 30 environmental contaminants on incident metabolic syndrome—A prospective study. **Environment International**, v. 107, p. 8–15, out. 2017.

LINDNER, M. et al. Quality assessment of tissue samples stored in a specialized human lung biobank. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, 4 abr. 2019.

MA, Y.; DAI, H.; KONG, X. Impact of warm ischemia on gene expression analysis in surgically removed biosamples. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 423, n. 2, p. 229–235, 15 abr. 2012

MARODIN, G. et al. Diretrizes nacionais para biorrepositório e biobanco de material biológico humano. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 1, p. 72–77, jan. 2013.

MATEOS, J. et al. Multicentric study of the effect of pre-analytical variables in the quality of plasma samples stored in biobanks using different complementary proteomic methods. **JOURNAL OF PROTEOMICS**, v. 150, p. 109–120, 6 jan. 2017

MICKE, P. et al. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 86, n. 2, p. 202–211, fev. 2006.

MOHER, D. et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and MetaAnalyses: The PRISMA Statement. **PLOS Medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000097, 21 jul. 2009.

MYCHALECKYJ, J. C. et al. Buffy coat specimens remain viable as a DNA source for highly multiplexed genome-wide genetic tests after long term storage. **Journal of translational medicine**, v. 9, p. 91, 10 jun. 2011.

National Cancer Institute (NCI). **Best Practices for Biospecimen Resources**. 2011.

NCBI. **Translational Medical Research**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=translational+research>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

OLIVIERI, E. H. R. et al. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. **Biopreservation and biobanking**, v. 12, n. 1, p. 46–52, fev. 2014.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). **Best Practice Guidelines for Biological Resource Centers – General Best Practice Guidelines for all BRCs**. Paris: OECD, 2007.

ORTEGA-PINAZO, J. et al. Quality assessment on the long-term cryopreservation and nucleic acids extraction processes implemented in the andalusian public biobank. **CELL AND TISSUE BANKING**, v. 20, n. 2, p. 255–265, jun. 2019.

PALTIEL, L. et al. Evaluation of Freeze-Thaw Cycles on Stored Plasma in the Biobank of the Norwegian Mother and Child Cohort Study. **CELL PRESERVATION TECHNOLOGY**, v. 6, n. 3, p. 223–229, 2008.

PANSARE, K. et al. Quality assessment of cryopreserved biospecimens reveals presence of intact biomolecules. **Journal of Biophotonics**, v. 12, n. 12, dez. 2019.

PARK, A. Biobanks. **Time**, 12 mar. 2009.

PINHO, J. R. R.; SITNIK, R.; MANGUEIRA, C. L. P. Personalized medicine and the clinical laboratory. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, n. 3, p. 366–373, set. 2014.

PINTO, J. et al. Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. **The Analyst**, v. 139, n. 5, p. 1168–1177, 2014.

RAHIKAINEN, A.-L. et al. DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. **Forensic science international**, v. 261, p. 148–153, abr. 2016.

ROTHSTEIN, M. A. Expanding the Ethical Analysis of Biobanks. **The Journal of Law, Medicine & Ethics**, v. 33, n. 1, p. 89–101, mar. 2005.

SARZOTTI-KELSOE, M. et al. The Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (CHAVI) multi-site quality assurance program for cryopreserved Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS**, v. 409, n. SI, p. 21–30, jul. 2014.

SERRANO DIAZ, N. et al. Biobanco: Herramienta fundamental para la investigación biomédica actual. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud**, v. 48, n. 1, p. 97–117, 1 jan. 2016.

SHABIHKHANI, M. et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. **Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 4–5, p. 258–266, mar. 2014

SHAH, S. G. et al. Establishing a correlation between RIN and A260/280 along with the multivariate evaluation of factors affecting the quality of RNA in cryopreserved cancer bio-specimen. **Cell and tissue banking**, 23 ago. 2019.

SJÖHOLM, M. I. L.; DILLNER, J.; CARLSON, J. Assessing Quality and Functionality of DNA from Fresh and Archival Dried Blood Spots and Recommendations for Quality Control Guidelines. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1401–1407, 1 ago. 2007.

SONG, S. Y. et al. Biobanking of Fresh-Frozen Cancer Tissue: RNA Is Stable Independent of Tissue Type with Less Than 1 Hour of Cold Ischemia. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 1, p. 28–35, fev. 2017.

SPRUESSEL, A. et al. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. **BioTechniques**, v. 36, n. 6, p. 1030–1037, jun. 2004.

STEPHENSON, N. L. et al. Quality assessment of RNA in long-term storage: The All Our Families biorepository. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, p. e0242404, 1 dez. 2020.

SUN, H. et al. Effect of Duration of Ex Vivo Ischemia Time and Storage Period on RNA Quality in Biobanked Human Renal Cell Carcinoma Tissue. **Annals of surgical oncology**, v. 23, n. 1, p. 297–304, jan. 2016.

SZECSI, P. B.; ØDUM, L. Error tracking in a clinical biochemistry laboratory. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 10, 1 jan. 2009

TANG, R. et al. Quality Control of RNA Extracted from PAXgene Blood RNA Tubes After Different Storage Periods. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 5, p. 477–482, 1 out. 2019.

TEVIS, D. S. et al. Assessing the stability of Cd, Mn, Pb, Se, and total Hg in whole human blood by ICP-DRC-MS as a function of temperature and timen. **CLINICA CHIMICA ACTA**, v. 485, p. 1–6, out. 2018.

VAN OMMEN, G.-J. B. et al. BBMRI-ERIC as a resource for pharmaceutical and life science industries: the development of biobank-based Expert Centres. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 23, n. 7, p. 893–900, jul. 2015.

VAUGHT, J. Developments in biospecimen research. **British Medical Bulletin**, v. 114, n. 1, p. 29–38, jun. 2015.

VAUGHT, J. Biobanking Comes of Age: The Transition to Biospecimen Science. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 211–228, 6 jan. 2016.

VIANA, C. R. et al. The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples. **Cell and Tissue Banking**, v. 14, n. 2, p. 167–173, jun. 2012.

WAGNER-GOLBS, A. et al. Effects of Long-Term Storage at -80 degrees C on the Human Plasma Metabolome. **METABOLITES**, v. 9, n. 5, maio 2019.

WANG, Y. et al. The Impact of Different Preservation Conditions and Freezing-Thawing Cycles on Quality of RNA, DNA, and Proteins in Cancer Tissue. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, n. 5, p. 335–347, out. 2015.

WHITE, K. et al. Effect of Postmortem Interval and Years in Storage on RNA Quality of Tissue at a Repository of the NIH NeuroBioBank. **Biopreservation and biobanking**, v. 16, n. 2, p. 148–157, abr. 2018.

WONG, S. C. C.; LO, E. S. F.; CHEUNG, M. T. An optimised protocol for the extraction of non-viral mRNA from human plasma frozen for three years. **Journal of clinical pathology**, v. 57, n. 7, p. 766–768, jul. 2004.

YONG, W. H.; DRY, S. M.; SHABIHKHANI, M. A Practical Approach to Clinical and Research Biobanking. In: DAY, C. E. (Ed.). **Histopathology**. New York, NY: Springer New York, 2014. v. 1180p. 137–162.

YU, K. et al. Effect of multiple cycles of freeze-thawing on the RNA quality of lung cancer tissues. **Cell and tissue banking**, v. 18, n. 3, p. 433–440, set. 2017

ZAVRIDOU, M. et al. Evaluation of Preanalytical Conditions and Implementation of Quality Control Steps for Reliable Gene Expression and DNA Methylation Analyses in Liquid Biopsies. **Clinical chemistry**, v. 64, n. 10, p. 1522–1533, out. 2018.

ZHANG, G. et al. A High-Quality Biobank Supports Breast Cancer Research in Harbin, China. **Biopreservation and biobanking**, v. 14, n. 5, p. 375–382, out. 2016.

ZHANG, X. et al. Biobanking of Fresh-Frozen Gastric Cancer Tissues: Impact of Long-Term Storage and Clinicopathological Variables on RNA Quality. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 1, p. 58–63, fev. 2019.

ANEXO A – Itens do checklist a serem incluídos no relato de revisão sistemática ou meta-análise

Seção/Tópico	N.	Item do <i>checklist</i>	Relatado na página n.
TÍTULO			
Título	1	Identifique o artigo como uma revisão sistemática, meta-análise ou ambos.	Capa
RESUMO			
Resumo estruturado	2	Apresente um resumo estruturado incluindo, se aplicável: referencial teórico; objetivos; fonte de dados; critérios de elegibilidade; participantes e intervenções; avaliação do estudo e síntese dos métodos; resultados; limitações; conclusões e implicações dos achados principais; número de registro da revisão sistemática.	vi
INTRODUÇÃO			
Racional	3	Descreva a justificativa da revisão no contexto do que já é conhecido.	11
Objetivos	4	Apresente uma afirmação explícita sobre as questões abordadas com referência a participantes, intervenções, comparações, resultados e desenho de estudo (PICOS).	12
MÉTODOS			
Protocolo e registro	5	Indique se existe um protocolo de revisão, se e onde pode ser acessado (ex. endereço eletrônico), e, se disponível, forneça informações sobre o registro da revisão, incluindo o número de registro.	14
Crítérios de Elegibilidade	6	Especifique características do estudo (ex. PICOS, extensão do seguimento) e características dos relatos (ex. anos considerados, idioma, se é publicado) usadas como critérios de elegibilidade, apresentando justificativa.	14
Fontes de Informação	7	Descreva todas as fontes de informação na busca (ex. base de dados com datas de cobertura, contato com autores para identificação de estudos adicionais) e data da última busca.	17
Busca	8	Apresente a estratégia completa de busca eletrônica para pelo menos uma base de dados, incluindo os limites utilizados, de forma que possa ser repetida.	17
Seleção dos estudos	9	Apresente o processo de seleção dos estudos (isto é, busca, elegibilidade, os incluídos na revisão sistemática, e, se aplicável, os incluídos na meta-análise).	14
Processo de coleta de dados	10	Descreva o método de extração de dados dos artigos (ex. formas para piloto, independente, em duplicata) e todos os processos para obtenção e confirmação de dados dos pesquisadores.	15
Lista dos dados	11	Liste e defina todas as variáveis obtidas dos dados (ex. PICOS, fontes de financiamento) e quaisquer suposições ou simplificações realizadas.	16
Risco de viés em cada estudo	12	Descreva os métodos usados para avaliar o risco de viés em cada estudo (incluindo a especificação se foi feito durante o estudo ou no nível de resultados), e como esta informação foi usada na análise de dados.	NA
Medidas de sumarização	13	Defina as principais medidas de sumarização dos resultados (ex. risco relativo, diferença média).	NA
Síntese dos resultados	14	Descreva os métodos de análise dos dados e combinação de resultados dos estudos, se realizados, incluindo medidas de consistência (por exemplo, I ²) para cada meta-análise.	NA
Risco de viés entre os estudos	15	Especifique qualquer avaliação do risco de viés que possa influenciar a evidência cumulativa (ex. viés de publicação, relato seletivo nos estudos).	NA
Análises adicionais	16	Descreva métodos de análise adicional (ex. análise de sensibilidade ou análise de subgrupos, metarregressão), se realizados, indicando quais foram pré-especificados.	NA
RESULTADOS			
Seleção dos estudos	17	Apresente números dos estudos rastreados, avaliados para elegibilidade e incluídos na revisão, razões para exclusão em cada estágio, preferencialmente por meio de gráfico de fluxo.	19
Características dos estudos	18	Para cada estudo, apresente características para extração dos dados (ex. tamanho do estudo, PICOS, período de acompanhamento) e apresente as citações.	23-27 / 31-35
Risco de viés entre os estudos	19	Apresente dados sobre o risco de viés em cada estudo e, se disponível, alguma avaliação em resultados (ver item 12).	NA
Resultados de estudos individuais	20	Para todos os desfechos considerados (benefícios ou riscos), apresente para cada estudo: (a) sumário simples de dados para cada grupo de intervenção e (b) efeitos estimados e intervalos de confiança, preferencialmente por meio de gráficos de floresta.	NA
Síntese dos resultados	21	Apresente resultados para cada meta-análise feita, incluindo intervalos de confiança e medidas de consistência.	NA
Risco de viés entre os estudos	22	Apresente resultados da avaliação de risco de viés entre os estudos (ver item 15).	NA
Análises adicionais	23	Apresente resultados de análises adicionais, se realizadas (ex. análise de sensibilidade ou subgrupos, metarregressão [ver item 16]).	NA
DISCUSSÃO			
Sumário da evidência	24	Sumarize os resultados principais, incluindo a força de evidência para cada resultado; considere sua relevância para grupos-chave (ex. profissionais da saúde, usuários e formuladores de políticas).	20
Limitações	25	Discuta limitações no nível dos estudos e dos desfechos (ex. risco de viés) e no nível da revisão (ex. obtenção incompleta de pesquisas identificadas, relato de viés).	40
Conclusões	26	Apresente a interpretação geral dos resultados no contexto de outras evidências e implicações para futuras pesquisas.	42
FINANCIAMENTO			
Financiamento	27	Descreva fontes de financiamento para a revisão sistemática e outros suportes (ex. suprimento de dados), papel dos financiadores na revisão sistemática.	NA

ANEXO B – Fluxograma com as diferentes fases de uma revisão sistemática

