



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA



REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA LÍQUIDA PARA EXTRAÇÃO DE
DNA TUMORAL NO LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO
(LCR) EM PACIENTES COM TUMOR CEREBRAL

PALOAM CARDOSO NÔVO

MANAUS, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

PALOAM CARDOSO NÔVO

**REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA LÍQUIDA PARA EXTRAÇÃO DE
DNA TUMORAL NO LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO
(LCR) EM PACIENTES COM TUMOR CEREBRAL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Mestrado em Imunologia da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração Imunologia básica e aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Robson Luís Oliveira de Amorim

Co-orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

MANAUS, 2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N945r Novo, Paloam Cardoso
Realização de biópsia Líquida para extração de DNA tumoral no líquido cefalorraquidiano (LCR) em pacientes com tumor cerebral / Paloam Cardoso Novo . 2014
64 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Robson Luís Oliveira de Amorim
Coorientador: Spartaco Astolfi Filho
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Biópsia líquida. 2. DNA tumoral. 3. Tumor cerebral. 4. Líquor . I. Amorim, Robson Luís Oliveira de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

PALOAM CARDOSO NÔVO

REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA LÍQUIDA PARA EXTRAÇÃO DE
DNA TUMORAL NO LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)
EM PACIENTES COM TUMOR CEREBRAL

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de
Mestrado em Imunologia da Universidade Federal do
Amazonas, na área de concentração Imunologia básica e
aplicada.

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. ROBSON LUIS OLIVEIRA DE AMORIM
Universidade Federal do Amazonas

PROF.DRA. KATIA LUZ TORRES SILVA
Universidade Federal do Amazonas

PROF.DR. DIEGO MONTEIRO DE CARVALHO
Universidade Federal do Amazonas

MANAUS, 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por toda misericórdia, bondade e generosidade para comigo;

A minha esposa Juliane G. Belan Novo pela paciência, companheirismo e amor, pelas longas horas de estudo e de ausência que tivemos que enfrentar;

A minha mãe Eliomar Cardoso cujo o exemplo acadêmico desde pequeno me inspirou. As minhas irmãs Pollyanna e Paloma Cardoso por sempre estarem ao meu lado, cada segundo. Vocês três representam minha fortaleza;

A minha sobrinha Danny e Venna e ao meu sobrinho e João, por serem minha alegria nos momentos de cansaço e por refletirem o amor que sinto pelas minhas irmãs;

Aos meus cunhados André e Cleber por serem o apoio necessário para nossa família e além de cunhados, bons amigos;

Ao meu orientador, professor, colega de profissão e amigo Dr. Robson Amorim, no qual me inspiro profissionalmente e aprendo todos os dias; minha eterna gratidão.

Ao meu Co-orientador Spartaco, por ser uma inspiração de pesquisador visionário na biotecnologia do país e muito me inspirar, por abrir as portas do seu laboratório;

Aos colaboradores Whendel e Jimmy, por não medirem esforços no desenvolvimento dessa pesquisa;

Ao Hospital Universitário Getúlio Vargas e Laboratório de Biotecnologia da UFAM, por acolherem minhas ideias e não medirem esforços para o nosso estudo;

A UFAM e ao PPGIBA por serem os grandes viabilizadores desse sonho;

Compartilho este sucesso com vocês. A todos vocês, meu muitíssimo obrigado.

“Quanto mais eu estudo a natureza, mais me maravilho com a obra do Criador.”

Louis Pasteur

RESUMO

Introdução: Os gliomas são os tumores primários mais comuns do Sistema Nervoso Central (SNC), com o glioblastoma multiforme (GBM) sendo a forma mais maligna e agressiva. Apesar do tratamento, a sobrevida global desses pacientes varia de 15 a 23 meses. Recentes avanços na caracterização molecular dos gliomas têm permitido o uso dessas características para prever prognósticos, guiar tratamentos individualizados e refinar a classificação dos tumores. A biópsia líquida, que detecta DNA tumoral circulante (DNAct) no líquido, tem se mostrado promissora para o diagnóstico precoce de recidivas, identificação de mutações tumorais e distinção entre alterações causadas pela radioterapia e a progressão da doença. No Brasil, não há registros de tentativas anteriores de extração de DNAct a partir do líquido em pacientes com gliomas, representando uma lacuna significativa no manejo molecular desses tumores.

Materiais e Métodos: Esta é uma série de casos prospectiva de pacientes com quadro clínico-imaginalógico de glioma de alto grau. Os pacientes foram submetidos a coleta de material biológico, incluindo líquido, e utilizado duas técnicas de baixo custo para obtenção de DNAct. Para análise de sobrevida, foi utilizada a curva de Kaplan-Meier.

Resultados: Este estudo prospectivo incluiu 16 pacientes com tumores cerebrais, dos quais 13 foram diagnosticados com gliomas. A idade média dos pacientes foi de $52,1 \pm 15,4$ anos, com uma mediana do KPS de 80%. A análise de Kaplan-Meier revelou uma alta mortalidade entre os pacientes com gliomas, com apenas 46,2% de sobrevida em 5 meses. Os protocolos utilizados para extração de DNAct foram negativos.

Conclusão: Este estudo destaca a primeira tentativa documentada no Brasil de extrair DNAct do líquido em pacientes com gliomas, evidenciando os desafios inerentes a essa abordagem. Embora os resultados iniciais tenham sido negativos, a criação de um banco de material biológico representa um recurso valioso para a continuidade das pesquisas, principalmente em um cenário onde a sobrevida é extremamente baixa quando comparadas com países desenvolvidos.

Palavras-Chaves: Tumor cerebral, Biópsia líquida, líquido, biomarcadores tumorais, DNA tumoral.

ABSTRACT

Introduction: Gliomas are the most common primary tumors of the Central Nervous System (CNS), with glioblastoma multiforme (GBM) being the most malignant and aggressive form. Despite treatment, the overall survival of these patients varies from 15 to 23 months. Recent advances in the molecular characterization of gliomas have allowed the use of these characteristics to predict prognoses, guide individualized treatments and refine the classification of tumors. Liquid biopsy, which detects circulating tumor DNA (ctDNA) in CSF, has shown promise for early diagnosis of relapses, identification of tumor mutations and distinction between changes caused by radiotherapy and disease progression. In Brazil, there are no records of previous attempts to extract ctDNA from the CSF in patients with gliomas, representing a significant gap in the molecular management of these tumors. **Materials and Methods:** This is a prospective case series of patients with clinical and imaging findings of high-grade glioma. The patients underwent collection of biological material, including CSF, and two low-cost techniques were used to obtain ctDNA. For survival analysis, the Kaplan-Meier curve was used. **Results:** This prospective study included 16 patients with brain tumors, of which 13 were diagnosed with gliomas. The mean age of the patients was 52.1 ± 15.4 years, with a median KPS of 80%. Kaplan-Meier curve revealed high mortality among patients with gliomas, with only 46.2% survival at 5 months. The protocols used for ctDNA extraction were negative. **Conclusion:** This study highlights the first documented attempt in Brazil to extract ctDNA from CSF in patients with gliomas, highlighting the challenges inherent to this approach. Although the initial results were negative, the creation of a bank of biological material represents a valuable resource for continuing research, especially in a scenario where survival is extremely low when compared to developed countries.

Keywords: Brain tumor, Liquid biopsy, cerebrospinal fluid, tumor biomarkers, tumor DNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1:** Distribuição de todos os tumores primários do SNC e outros tumores do SNC por comportamento----- 14
- Gráfico 2:** Distribuição de todos os tumores primários do SNC e outros tumores do SNC (malignos e benignos), por A) Sitio B) Histologia----- 14
- Figura 1:** Aplicações clínicas de CTCs e ctDNA como biópsia líquida para medicina personalizada. Amostras de sangue podem ser testadas repetidamente para prever recaída em pacientes M 0 ou progressão metastática em pacientes M 1, monitora a eficácia das terapias e entende os possíveis mecanismos de resistência. Antes da terapia, os pacientes podem ser estratificados para os medicamentos mais eficazes, enquanto após o início do tratamento persistem aumentos de CTCs/ctDNA indica resistência à terapia, e esta informação pode permitir uma mudança precoce para um regime mais eficaz antes que a carga tumoral seja excessiva e incurável MT, mutação; CM, câncer de mama; PC, câncer de próstata; CCR, câncer colorretal. ----- 22
- Figura 2:** Visão geral do uso de Biopsia líquida nos Glioblastomas. As células tumorais do GBMs produzem vesículas extracelulare, CTCs, cfDNA/RNA, os quais atravessam a BHE e caem na corrente sanguínea. Uma porção desses biomarcadores permanecem no Líquor. Biopsia líquida analisa o líquido ou o sangue em busca desses biomarcadores por meio de PCR, sequenciamento genético e proteômica. Os dados resultantes podem ser usados para caracterizar a genética tumoral, quantificar a resposta ao tratamento, e proporcionar opções terapêuticas individualizadas. ----- 24

Figura 3:	Potenciais aplicações de ctDNA-----	27
Figura 4:	Esquema mostrando a propagação de DNA das células tumorais de tumores primário do encéfalo e medula espinhal para o líquido. -----	30
Figura 5:	a. Pacientes com glioblastoma, ressecção pós-cirúrgica e quimiorradiação, são monitorados usando imagens seriadas de ressonância magnética. Uma lesão realçada por gadolínio na ressonância magnética (MRI) com contraste realçado pode ser uma doença progressiva (DP) verdadeira ou efeitos de radiação, como pseudoprogredão ou necrose por radiação (RN). Estratégias de biópsia líquida, incluindo células tumorais circulantes (CTCs), DNA livre circulante (CfDNA), vesículas extracelulares (EVs) podem fornecer modalidades minimamente invasivas de monitoramento de tumores cerebrais. b. A abordagem de monitoramento em três frentes usando a integração do estado clínico, modalidades de imagem e estratégias de biópsia líquida pode ser uma solução potencial para rastrear a evolução do tumor ao longo do tempo e da terapia. Imagem de vasos sanguíneos da Smart Servier. -----	33
Figura 6:	As quatro localizações mais prevalentes de acordo com o lobo cerebral dos tumores cerebrais estudados na amostra, representado por sua porcentagem-----	35
Figura 7:	Curva de Kaplan-Meier dos pacientes diagnosticados com glioma cerebral e sua sobrevivência até o desfecho óbito-----	40
Figura 8:	Curva de Kaplan-Meier dos pacientes diagnósticos com glioma cerebral e do status do <i>IDH</i> como análise de sobrevivência-----	41
Figura 9:	PCR convencional do LCR-----	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Genes, moléculas, vias e/ou combinações na maioria dos tumores do SNC-	18
Tabela 2:	Graus do SNC OMS de tipos selecionados, abrangendo entidades para as quais há uma nova abordagem de classificação-----	20
Tabela 3:	Características clínicas dos pacientes estudados-----	34
Tabela 4:	Características tumorais da biópsia sólida (histopatologia) dos pacientes-	36
Tabela 5:	Participantes com gliomas cerebrais, Status do <i>IDH</i> e o tempo de sobrevida até o óbito-----	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%	Porcentagem
SNC	Sistema nervos central
BHE	Barreira hematoencefálica
GBM	Glioblastoma
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
DNAct	DNA tumoral circulante
NGS	Sequenciamento de nova geração
CTC	Células tumorais circulantes
INCA	Instituto Nacional de Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization
CDC	Central for Disease Control and Prevention
EUA	Estados Unidos da America
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of the United States
NCI	National Cancer Institute
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
IDH 1	Isocitrato de desidrogenase 1
IDH 2	Isocitrato de desidrogenase 2
α-KG	α -cetogluturato
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
VE	Vesículas extracelulares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Tumores Malignos Cerebrais	13
2.1.1 Epidemiologia, Classificação e Biomarcadores.....	13
2.1.2 Glioblastoma (IDH selvagem)	18
2.2 Biopsia líquida	20
2.2.1 DNA tumoral circulante (DNAct).....	24
2.3- Biópsia Líquida no SNC.....	27
3-OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Tipo de Estudo.....	32
4.2 Local do Estudo e Análise das Amostras	32
4.3 Aspectos Éticos	32
4.4 Critérios de Inclusão.....	32
4.5 Critérios de Exclusão	33
4.6 Organização, coleta e análise dos dados	33
4.6.1- Processamento de amostras de LCR	33
4.6.2- Extração de ácido nucleico a partir de LCR.....	33
4.6.3 – Extração de ácido nucleico a partir de amostras de tecido tumoral, camada leucoplaquetária e plasma	35
4.6.4 – Identificação de mutações no IDH por PCR.....	35
5- RESULTADOS	37
5.1 – Características clínicas e epidemiológicas da população estudada	37
5.2 – Análise da sobrevida dos pacientes com glioma	39
5.3– Extração do DNA circulante	41
6 - DISCUSSÃO.....	42
6 - CONCLUSÕES.....	45
7- REFERÊNCIAS.....	46
8- APÊNDICES	49
8.1- EQUIPE DE PESQUISADORES	49
9-ANEXOS	50
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	50

ANEXO B – CARTA DE ANUÊNCIA HUGV	54
ANEXO C – CARTA DE ANUÊNCIA LABORATÓRIO	55
ANEXO D – PARECER CEP	56

1. INTRODUÇÃO

O câncer do sistema nervoso cerebral (SNC) representa 1,4 a 1,8% de todos tumores malignos no mundo e cerca de 88% desses tumores estão localizados no cérebro. A incidência mundial dos tumores cerebrais aumenta a cada ano e em países desenvolvidos representam a segunda principal causa de morte por câncer em homens adultos jovens. (YUSOFF et al.,2015).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que para cada ano do triênio 2023/2025 mais de 11 mil novos casos serão diagnosticados, estimando mais de nove mil mortes anuais (INCA, 2023).

Os gliomas, tumores derivados do parênquima cerebral, representam cerca de 27% dos tumores primários e 80% de todos os tumores malignos do SNC. O glioblastoma (GBM), forma mais maligna dos gliomas, compreende 54%, a taxa de incidência aproxima-se de 3,2 por 100 mil pessoas, com mediana de idade de 64 anos e afetando mais homens que mulheres (PIPERI, et al, 2019).

Os GBMs são tumores cerebrais heterogêneos com interações complexas entre si e com diferentes células, caracterizado por proliferação vascular, inflamação, necrose com invasão, e escape da resposta imune, dificultando dessa forma, tanto o diagnóstico, a confirmação do estágio inicial como o tratamento (PIPERI, et al, 2019).

Os tratamentos atuais incluem ressecção tumoral, irradiação e medicamentos quimioterápicos e apesar dessas terapias invasivas, os tumores malignos cerebrais quase que invariavelmente recaem devido à sua natureza altamente resistente e infiltrativa, sendo, portanto, ineficazes na prevenção e progressão da doença (BIELLI, et al, 2020; OSUKA, et al, 2017).

Por isso o GBM, é considerado um tumor maligno altamente agressivo, com sobrevida global que varia de apenas 15 a 23 meses, a despeito do tratamento utilizado (YEKULA et al., 2020).

O diagnóstico definitivo é alcançado através da obtenção de uma amostra de tecido tumoral por biópsia intracraniana, que por muitas vezes o acesso é restrito e invasivo, tornando-se um procedimento complexo e não isento de complicações (YEKULA et al., 2020).

Além do mais, apesar da importância da ressonância nuclear magnética (RNM) para o monitoramento do tratamento a longo prazo, a maioria dos pacientes que recebem quimiorradioterapia para o GBM, podem evoluir com alterações ocasionadas pela radioterapia, como pseudoprogressão ou necrose por radiação, tornando-se indistinguível da real progressão do tumor (YEKULA., 2020).

Com isso, a conduta atual nos pacientes que apresentam alteração na RNM de crânio de controle pós tratamento com cirurgia e radioterapia é aguardar ou realizar novas biópsias invasivas e debilitantes (YEKULA., 2020).

Estudos recentes têm demonstrado grande potencial para o uso do DNA tumoral circulante (DNAct) coletados no sangue periférico ou no líquido, permitindo o diagnóstico precoce de pacientes com recidiva, identificando mutações específicas em tumores cerebrais, ou até mesmo diferenciando entre alterações da radioterapia e real progressão da doença de forma minimamente invasiva e menos demorada, um método denominado biópsia líquida (GATO, et al, 2021).

O termo biópsia líquida, é usado para designar uma coleta de tecido biológico não sólido, extraído de sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva, urina e outros fluídos corporais (GINER, et al, 2018).

Tal procedimento, torna-se possível pois o líquido cefalorraquidiano (LCR), circula no SNC e tem uma grande interface com o cérebro e os tecidos malignos, com isso as células tumorais e seus DNAs são liberadas no líquido e o DNA tumoral livre circulante pode ser isolado, sem a necessidade de novas intervenções (novas neurocirurgia para realização de biópsia) (GINER, et al, 2018).

Na neurocirurgia, a única forma de biopsiar um tumor cerebral é através de um procedimento neurocirúrgico invasivo e que dependendo do status performance do paciente torna-se difícil a realização.

Desse modo, a biopsia líquida, permite identificar pacientes cujos tumores apresentam mutações específicas de forma minimamente invasiva, tornando-se atualmente um verdadeiro biomarcador dos tumores cerebrais (KWAPISZ et al., 2016).

A biopsia líquida em paciente com câncer tem como objetivo a extração de células tumorais circulantes (CTC), DNA de células tumoral circulante (DNAct) e, eventualmente, de outro material derivado de tumor (por exemplo, exossomos) (GINER, et al, 2018; PERAKIS, et al, 2017).

Nesse contexto, em que o campo da oncologia espera que as abordagens terapêuticas sejam ditadas e guiadas pelas características genômicas dos tumores, a biopsia líquida do LCR pode fornecer um método minimamente invasivo para avaliar as alterações genômicas dos tumores primários e recidivantes, ajudando a selecionar o tratamento ideal ditado pelas características moleculares do câncer cerebral.

O serviço de neurocirurgia da Universidade Federal do Amazonas, é o único centro de referência em tumores cerebrais no estado e nas regiões vizinhas, atendendo, diagnosticando e tratando centenas de casos anuais de tumores cerebrais e no momento, carece de estudos moleculares sobre o tema.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tumores Malignos Cerebrais

2.1.1 Epidemiologia, Classificação e Biomarcadores

Ao contrário de outros cânceres que são estadiados e classificados por organizações internacionais, os tumores cerebrais primários e outros tipos de tumores cerebrais não são estadiados, são classificados de acordo com a classificação de tumores cerebrais do Sistema Nervoso Central da OMS (WHO 2000), atribuindo um grau (grau 1 a grau 4) com base no comportamento clínico previsto (OSTROM et al., 2023).

De todos os tumores malignos e não malignos no cérebro e outros tumores do SNC, segundo o Central Brain Tumor Registry dos Estados Unidos (CBTRUS), em colaboração com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e o Instituto Nacional do Câncer (NCI), a taxa de incidência média anual dos tumores cerebrais ajustada à idade foi de 24,83 por 100.000 entre 2016 a 2020 (CBTRUS, 2023).

Houve 1.323.121 indivíduos previamente diagnosticado com tumores cerebrais malignos e não malignos nos EUA em 31 de dezembro de 2019 (CBTRUS, 2023).

Houve 86.030 mortes atribuídas a tumores cerebrais malignos e outros tumores do SNC entre 2016 e 2020. Isso representa uma taxa de mortalidade média anual de 4,42 por 100.000, e uma média de 17.206 mortes por ano causadas por tumores malignos do cérebro e outros tumores do SNC (CBTRUS, 2023).

O tumor maligno do cérebro mais comum é o glioblastoma (14,2% de todos os tumores e 50,9% dos tumores malignos), e o tumor não maligno mais comum foi o meningioma (40,8% de todos os tumores e 56,2% dos tumores não malignos). O glioblastoma são mais comuns no sexo masculino e o meningioma no sexo feminino (CBTRUS, 2023).

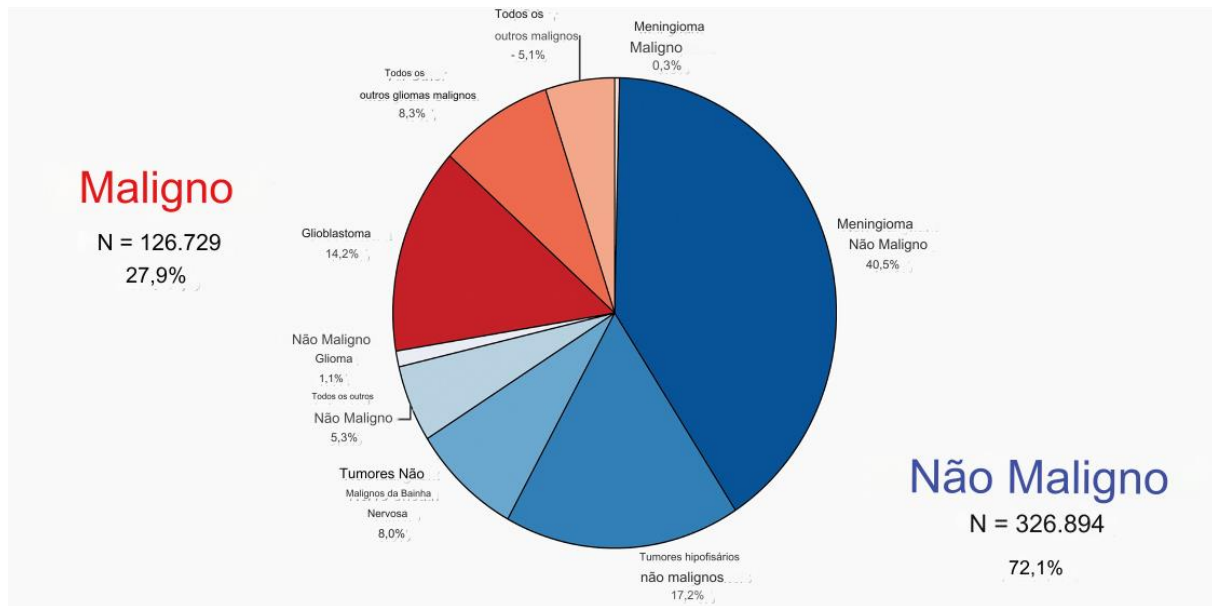


Gráfico 1: Distribuição de tumores cerebrais primários e outros tumores do sistema nervoso central por comportamento (total de cinco anos = 453.623; média anual Casos = 90.725), Relatório Estatístico CBTRUS: Estatísticas de Câncer dos EUA — NPCR e SEER, 2016-2020. *Neuro Oncol*, Volume 25, Issue Supplement_4, October 2023, Pages iv1–iv99, <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad149>

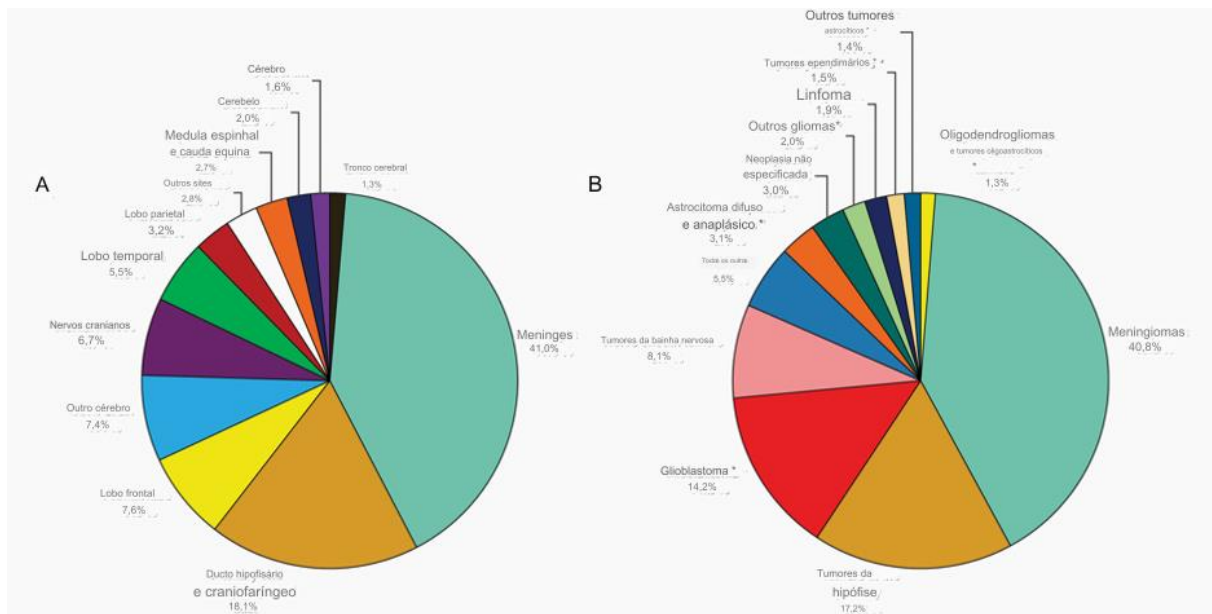


Gráfico 2: Distribuição de todos os Tumores Primários do Cérebro e Outros Tumores do Sistema Nervoso Central (Malignos e Não Malignos Combinados; Total de Cinco Anos = 453.623; Casos Médios Anuais = 90.725), por A) Local e B) Histopatologia, Relatório Estatístico CBTRUS: Estatísticas de Câncer dos EUA—NPCR e SEER, 2016-2020 *Neuro Oncol*, Volume 25, Issue Supplement_4, October 2023, Pages iv1–iv99, <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad149>

Os gliomas, são tumores que surgem de células gliais ou precursoras e incluem astrocitoma (incluindo glioblastoma), oligodendroglioma, ependimoma, oligoastrocitoma (glioma misto) e algumas histologias raras (OSTROM et al., 2021).

Atualmente o principal documento relacionado a classificação dos tumores cerebrais a nível mundial é a quinta edição da classificação da OMS de tumores do SNC, publicada recentemente em 2021 que representa a sexta versão do padrão internacional para classificação de tumores do cérebro e da medula espinhal (LOUIS et al., 2021).

Com base na quarta edição atualizada de 2016 e no trabalho do Consórcio para Informar Abordagens Moleculares e Práticas à Taxonomia de Tumores do SNC, a quinta edição de 2021 apresenta grandes mudanças que avançam o papel do diagnóstico molecular na classificação de tumores do SNC. Ao mesmo tempo, permanece ligado a outras abordagens estabelecidas para o diagnóstico de tumores, como histologia e imuno-histoquímica (LOUIS et al., 2021).

Os tumores primários do cérebro são doenças com histologias altamente heterogêneas e sua caracterização ao longo do tempo foi refinada, pois a classificação dos tumores do SNC era baseada exclusivamente nas características histológicas (LOUIS et al., 2021).

Porém, certos marcadores moleculares podem fornecer informações prognósticas poderosas. Por esse motivo, os parâmetros moleculares agora foram adicionados como biomarcadores de classificação e para estimar ainda mais o prognóstico dentro de vários tipos de tumores (LOUIS et al., 2021).

Com o advento de novas tecnologias para caracterizar o DNA, RNA e metilação do DNA levaram à descobertas dos chamados de biomarcadores, que de forma mais precisa são usados para classificar, estimar o prognóstico, grau de malignidade e outras características com mais especificidade que aparência histológica da lesão (LOUIS et al., 2021).

Uma das primeiras descobertas foram as deleções encontradas nos oligodendrogliomas, que são partes ausentes do cromossomo, também conhecido como perda da heterozigosidade, no braço curto do cromossomo 1 (1p) e no braço longo do cromossomo 19 (19q), configurando o status 1p/19q (positivo ou negativo). Essas deleções predizem significativamente a resposta positiva à quimioterapia e radioterapia nesses tumores, tendo desse modo uma enorme importância clínica (REIFENBERGER et al., 2021).

Outros biomarcadores encontrados principalmente em glioma de grau inferiores, como 2 e 3 da OMS, são as mutações dos genes da isocitrato de desidrogenase 1 (*IDH 1*) e isocitrato de desidrogenase 2 (*IDH 2*) que também estão associados a um melhor prognóstico dos gliomas. Não encontrado nos glioblastoma de acordo com a nova classificação da OMS de 2021 (LOUIS et al., 2021).

De fato, sabe-se que a descoberta das mutações do *IDH*, constituíram um avanço chave na compreensão dos tumores cerebrais, pois numerosos estudos revelaram que a presença dessas mutações distingue os gliomas com biológicas e comportamentos clínicos distintos, desse modo, saber se o glioma é *IDH* positivo ou selvagem (negativo) é atualmente o principal método para estratificar o prognóstico do glioma, superando os critérios histológicos (REIFENBERGER et al., 2021).

De fato, sabe-se que as mutações do *IDH 1* e *IDH 2* reduzem a capacidade enzimática destas proteínas de se ligar ao isocitrato, seu substrato e convertê-lo em α -cetogluturato (α -KG), gerando dióxido de carbono e repondo NADH e NADPH como produtos secundários (GREENBERG.,2020).

Este é um dos passos irreversíveis no ciclo do ácido tricarbóxico importante para a respiração celular, e além disso, as enzimas *IDH 1* (citoplasmática) e *IDH 2* (mitocôndrial) também apresentam uma capacidade enzimática modificada de converter (-KG em 2-hidroxi-glutarato (2-HG), um pequeno oncometabólito (GREENBERG.,2020).

Em resumo mutações no *IDH1* e *IDH2* estratificam os indivíduos em subtipos moleculares com resultados clínicos distintos, as mutações estão associadas a astrocitomas de grau mais baixo, oligodendroglioma e gliomas secundários com melhor sobrevivência global, sobrevida livre de progressão e quimiossensibilidade do que os GBMs do tipo selvagem para ambos os genes (GREENBERG.,2020).

Outros biomarcadores podem fornecer informações diagnósticas adicionais, incluindo perda de expressão nuclear *ATRX*, mutação do promotor *TERT*, mutação *BRAF* ou fusão e mutação *H3-G34* (REIFENBERGER et al., 2021).

O número de biomarcadores de significância preditiva para orientar o tratamento estão aumentando, com associação inclusiva à melhora da sobrevida, como no caso, do aumento da metilação (onde as moléculas de metil são ligadas ao DNA) na região promotora do gene O-6-

metilguanina- DNA metiltransferase (MGMT). O gene MGMT, atua codificando a proteína MGMT cujo o papel é reparo do DNA, ou seja, atuando em nosso organismo como protetor do DNA (REIFENBERGER et al., 2021).

A metilação desta região silencia efetivamente o gene e previne a transcrição em RNA. Como o MGMT é uma proteína de reparo de DNA, e supõem-se que a diminuição nos níveis dessa proteína aumenta a sensibilidade às quimioterapias alquilantes (por exemplo, temozolomida) frequentemente usadas no tratamento de gliomas visando combater o crescimento tumoral através de danos no DNA. Essa alteração é comum no glioblastoma e menos comum nos gliomas de grau inferior (REIFENBERGER et al., 2021).

Além disso, a classificação da OMS de 2021, utiliza o uso de sufixos NOS (não especificado de outra forma) e NEC (não classificado em outro lugar) para separar os diagnósticos padrão e bem caracterizados da OMS daqueles diagnósticos que resultam de falta de informações diagnósticas necessárias (por exemplo, moleculares) ou não diagnósticos (ou seja, para um diagnóstico da OMS) ou resultados negativos (LOUIS et al., 2021).

Com isso, adicionar um sufixo NOS indica que as informações de diagnóstico (histológicas ou moleculares) necessárias para atribuir um diagnóstico específico da OMS não estão disponíveis, fornecendo um alerta ao oncologista de que um trabalho molecular não foi realizado ou falhou tecnicamente (LOUIS et al., 2021).

Um sufixo NEC, por outro lado, indica que o teste de diagnóstico necessário foi realizado com sucesso, mas que os resultados não permitem prontamente um diagnóstico da OMS; por exemplo, se houver uma incompatibilidade entre características clínicas, histológicas, imuno-histoquímicas e/ou genéticas (LOUIS et al., 2021).

Os diagnósticos NEC são o que os patologistas chamaram de “diagnósticos Descritivos”, nos quais o patologista usa um diagnóstico não-OMS para categorizar o tumor. A este respeito, uma designação NEC fornece um alerta ao oncologista de que, apesar de um trabalho patológico adequado, o tumor não está em conformidade com um diagnóstico padrão da OMS (LOUIS et al., 2021).

Tipo de Tumor	Genes Associados
Astrocitoma, IDH-mutante	IDH1, IDH2, ATRX, TP53, CDKN2A/B
Oligodendroglioma, IDH-mutante e 1p/19q-codeletado	IDH1, IDH2, 1p/19q, TERT promoter, CIC, FUBP11, NOTCH1
Glioblastoma, IDH-tipo selvagem	IDH-wildtype, TERT promoter, cromossomo 7/10, EGFR
Astrocitoma difuso, glioma angiocêntrico alterado por MYB ou MYBL1	MYB, MYBL1
Glioma Angiogênico	MYB
Tumor neuroepitelial polimorfo de baixo grau do jovem	BRAF, FGFR family
Glioma difuso de baixo grau, via MAPK alterada	FGFR, BRAF
Glioma difuso de linha média, H3 K27 alterado	H3 K27, TP53, ACVR1, PDGFRA, EGFR, EZHIP
Glioma hemisférico difuso, mutante H3 G34	H3 G34, TP53, ATRX
Glioma de alto grau difuso tipo pediátrico, tipo selvagem H3 e tipo selvagem IDH Glioma hemisférico tipo infantil	IDH-wildtype, H3-wildtype, PDGFRA, MYCN, EGFR
Glioma Hemisférico do tipo infante	NTRK Family, ALK, ROS., MET
Astrocitoma pilocítico	KIAA1549-BRAF, BRAF, NF1
Astrocitoma de alto grau com características pilóides	BRAF, NF1, ATRX, CDKN2A/B
Xantastrocitoma Pleomórfico	BRAF, CDK2A/B
Astrocitoma subependimário de células gigantes	TSC1, TSC2
Glioma cordoide	PRKCA
Astroblastoma, tumores de células ganglionares alteradas por MN1	MN1
Tumores de células ganglionares	BRAF
Tumor neuroepitelial disembrionoplásico	FGFR1
Tumor glioneural difuso com característica semelhante a oligodendroglioma e aglomerados nucleares	Cromossomo 14
Tumor papilar glioneural	PRKCA
Tumor glioneural formador de roseta	FGFR1, PIK3CA, NF1
Tumor glioneural mixoide	PDGFRA
Tumor glioneural leptomeníngeo difuso	KIAA1549-BRAF
Tumor neuronal multinodular e vacuolizante	MAPK
Gangliocitoma cerebelar displásico (doença de Lhermitte-Duclos)	PTEN
Neurocitoma extraventricular	FGFR
Ependimomas supratentoriais	ZFTA, RELA, YAP, MAML2
Ependimomas da fossa posterior	H3 K27me3, EZHIP
Ependimomas espinhais	NF2, MYCN
Meduloblastoma, Meduloblastoma ativado por WNT, Meduloblastoma ativado por SHH, não WNT/não SHH	TP53, PTCH1, SUFU, MYC, MYCN
Tumor teratóiderabdoide atípico	SMARCB1, SMARCA4
Tumor embrionário com rosetas multicamadas	C19MC, DICER1
Neuroblastoma do SNC, ativado por FOXR2	FOXR2
Tumor do SNC com duplicação em tandem interna do BCOR	BCOR
Tumor mixoide desmoplásico da região da pineal, meningiomas mutantes SMARCB1	SMARCB1
Meningismo	NF2, AKT1, TRAF7, SMO, PIKCA, KLF4, SMARCE1, BAP11, TERT promoter, H3K27me3, CDKN2A/B
Tumor fibroso solitário	NAB2-STAT6
Tumores melanócitos meníngeos	NRAS, GNAO1, GNAI1, PLCB4, CYSLTR2

Tabela 1 – Genes, moléculas, vias e/ou combinações na maioria dos tumores do SNC.

Fonte: Adaptado de Louis et al (2021).

2.1.2 Glioblastoma (IDH selvagem)

O GBM do tipo IDH selvagem são caracterizados por glioma de alto grau predominantemente com diferenciação astrocítica, caracterizado por atipia nuclear, pleomorfismo celular (na maioria dos casos), atividade mitótica e tipicamente um padrão de crescimento difuso bem como proliferação e/ou necrose microvascular, e não possuindo mutações nos genes do *IDH* de acordo com a nova classificação da OMS, 2021 (LOUIS et al., 2021).

O GBM do tipo IDH selvagem (*IDH* negativo), classificado como grau 4 da OMS, pode surgir em indivíduos de qualquer faixa etária, porém manifestam-se mais frequentemente em pacientes acima de 50 anos de idade, com rápida evolução clínica, e são considerados primários, ou seja, sem glioma de baixo grau preexistente (REIFENBERGER et al., 2021).

Os GBM do tipo IDH selvagem também são caracterizados frequentemente por ganho do cromossomo 7, monossomia 10, mutação ou homozigose deleção de *PTEN*, deleção homozigótica de *CDKN2A* e *CDKN2B* e mutação promotor *TERT*, outras menos comuns incluem mutações em *TP53*, *PIK3CA*, *PIK3R1* (codificação da subunidade 1 reguladora de PI3K) (REIFENBERGER et al., 2021).

Em relação as amplificações gênicas, o GBM do tipo IDH selvagem, são comumente detectados os genes *EGFR*, *PDGFRA* e *MET* que codificam *RTKs* mitogênicos, dependente de genes ciclina quinases *CDK4* e *CDK6*, que medeiam a transição da fase G1 para S do ciclo celular, e *MDM2* e *MDM4* que codificam as proteínas que inibem a atividade de p53 (REIFENBERGER et al., 2021).

A amplificação do *EGFR* é detectada em 40% dos GBM do tipo selvagem, e outra metade desses tumores abrigam um rearranjo genético que resulta na deleção de *EGFR*. O *BRAF* é outra mutação, considerada rara do GBM selvagem que é detectável em aproximadamente 50% dos glioblastoma epitelioides (variantes do glioblastoma do tipo IDH selvagem) (REIFENBERGER et al., 2021).

Desde a classificação da OMS 2016, também poderíamos classificar o glioblastoma como IDH mutado, sendo responsável por menos de 10% dos GBMs e geralmente se manifestando em adultos jovens. Esses tumores, considerados glioblastomas secundários se desenvolveram por progressão de gliomas de baixo grau preexistentes (LOUIS et al., 2021).

Na classificação de 2016, os gliomas difusos comuns do adulto foram divididos em 15 entidades, em grande parte porque diferentes graus foram atribuídos a entidades diferentes, por exemplo, o oligodendroglioma anaplásico, foi considerado um tipo diferente de oligodendroglioma) e porque as designações NOS foram atribuídas a entidades distintas (por exemplo, astrocitoma difuso, NOS) (LOUIS et al., 2021).

Graus do SNC de tipos selecionados pela OMS	
Astrocitoma, IDH-mutante	2,3,4
Oligodendroglioma, IDH-mutante e 1p/19q-codeletado	2,3
Glioblastoma, IDH-tipo selvagem	4
Astrocitoma difuso, MYB ou MYBL1 alterado	1
Tumor neuroepitelial polimorfo de baixo grau do jovem	1
Glioma hemisférico difuso. H3 G34-mutante	4
Xantastrocitoma floculoso	2,3
Tumor neuronal multinodular e vacuolizante	1
Ependimoma supratentorial	2,3
Ependimoma da fossa posterior	2,3
Ependimoma mixoapilar	2
Meningioma X	1,2,3
Tumor de Fibroblasto Solitário	1,2,3

Tabela 2 – Graus do SNC OMS de tipos selecionados, abrangendo entidades para as quais há uma nova abordagem de classificação

Fonte: Adaptado de Louis et al (2021).

Na classificação da OMS de 2016, os tumores astrocíticos difusos IDH-mutantes foram atribuídos a 3 tipos diferentes de tumores (astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e glioblastoma) dependendo dos parâmetros histológicos.

Na classificação atual, no entanto, todos os tumores astrocíticos difusos IDH-mutantes são considerados um único tipo (Astrocitoma, IDH-mutante) e, em seguida, são classificados de acordo com a OMS grau 2, 3 ou 4.

Além disso, a classificação não é mais totalmente histológica, já que a presença de deleção homocigótica de *CDKN2A/B* resulta em um grau 4 da OMS, mesmo na ausência de proliferação ou necrose microvascular.

2.2 Biópsia líquida

A biópsia líquida é um termo que se refere à amostragem de tecido biológico não sólido, mas comumente de sangue e podendo ser de saliva, urina, líquido cefalorraquidiano e outros fluidos corporais (GATO, et al, 2021).

A realização da biópsia líquida em pacientes com câncer é usado principalmente para a extração de DNA livre de células, que são geralmente DNA derivados de processos fisiológicos do organismo, células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (DNAct) e eventualmente, outro material derivado de tumor (por exemplo, exossomos) coletado de sangue

periférico, conforme realizado nas primeiras pesquisas sobre biópsia líquida (GINER et al., 2018; ACETO., et al 2014). Figura 1

Morfológicamente as CTCs estão presentes como células únicas ou aglomerados de células (clusters de CTCs), eliminadas na corrente sanguínea a partir de lesões primárias e metastáticas (GINER et al., 2018; ACETO., et al 2014).

Atualmente, a extração de CTC nas biópsias líquidas permite a investigação de vários fenômenos associados ao câncer, como à presença de mutações, translocações, rearranjos genéticos, perda de heterozigidade, superexpressão e downregulation de genes, splicing alternativo, expressão de proteínas e sensibilidade a drogas (GINER et al.,2018).

Em contraste, o DNAct é derivado de células tumorais em apoptose ou necrose, e representa uma fração do total de DNA livre de células (DNActf) que está circulando no sangue ou outros produtos biológicos como o líquido, sendo, portanto, derivado de eventos fisiológicos de remodelação tecidual (GINER et al., 2018; WAN et al., 2017).

De fato, o DNAct representa entre 0,1 a 10% do total de DNActf detectável no sangue humano e uma quantidade que pode variar como consequência da carga tumoral, estado inflamatório, renovação celular e acessibilidade das células cancerosas aos vasos sanguíneos (GINER et al, 2018; WAN et al., 2017).

Curiosamente, pacientes com câncer têm níveis muito mais altos de DNActf total do que indivíduos saudáveis (GINER et al., 2018; ALIX-PANABIERES et al.,2016). Quando os tumores aumentam de volume, o mesmo acontece com a renovação celular e, portanto, o número de células apoptóticas e necróticas dentro do próprio tecido tumoral, levando à liberação de DNAct na corrente sanguínea, misturado com DNActf normal (GINER et al., 2018).

A maioria dos fragmentos de DNA em circulação, incluindo DNActf e DNAct, mede entre 180 e 200 nucleotídeos de tamanho, sugerindo que a apoptose provavelmente produz a maioria dos fragmentos de DNA encontrados na corrente sanguínea (GINER et al., 2018; WAN et al., 2017).

Fragmentos de DNAct mais curtos foram relatados em pelo menos alguns tipos de tumores (por exemplo, carcinoma hepatocelular), bem como grandes fragmentos de DNActf de milhares de pares de bases, que provavelmente são o resultado de necrose tecidual (GINER et al., 2018; JIANG., 2016). Figura 1

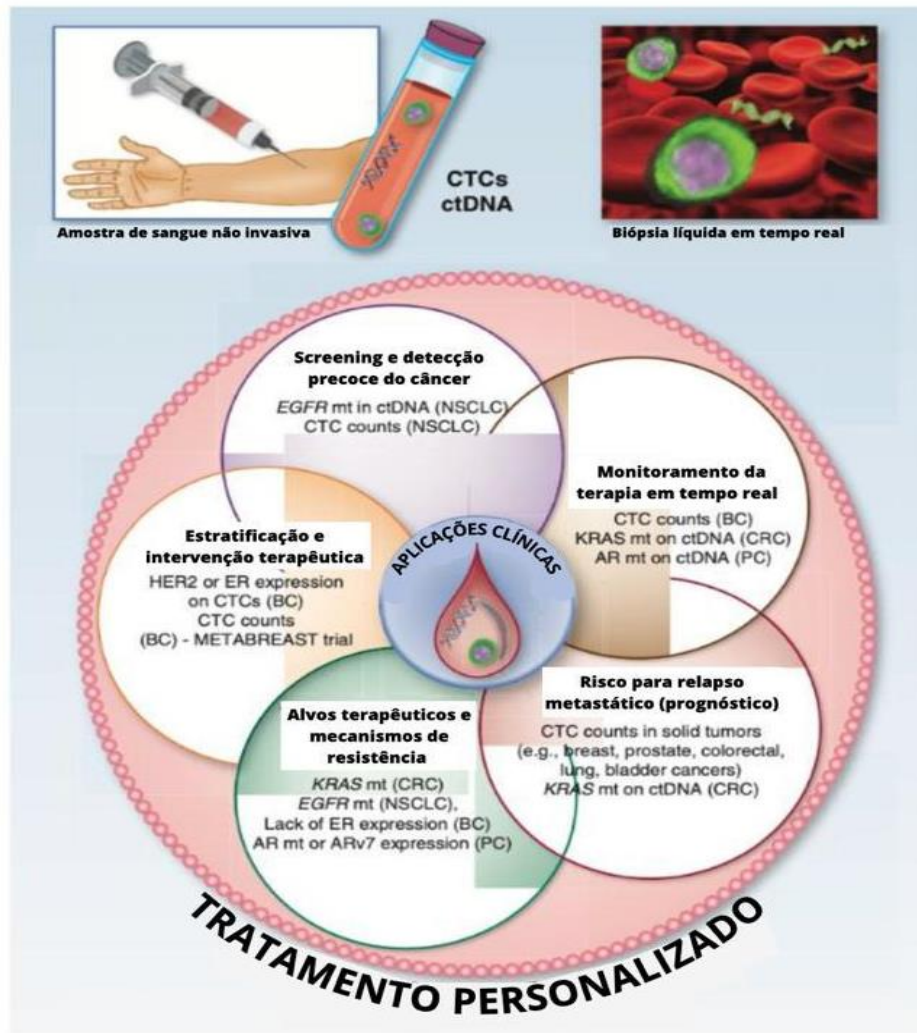


Figura 1 – Aplicações clínicas de CTCs e ctDNA como biópsia líquida para medicina personalizada. Amostras de sangue podem ser testadas repetidamente para prever recaída em pacientes M0 ou progressão metastática em pacientes M1, monitora a eficácia das terapias e entende os possíveis mecanismos de resistência. Antes da terapia, os pacientes podem ser estratificados para os medicamentos mais eficazes, enquanto após o início do tratamento persistem aumentos de CTCs/ctDNA indica resistência à terapia, e esta informação pode permitir uma mudança precoce para um regime mais eficaz antes que a carga tumoral seja excessiva e incurável. mt, mutação; CM, câncer de mama; PC, câncer de próstata; CCR, câncer colorretal.

Fonte: Adaptado de Alix-Panaieres et al (2016)

CTCs representam células cancerosas que se destacaram de um tumor primário ou de uma lesão metastática e estão a caminho de estabelecer uma lesão metastática em um local distante. A enumeração de CTC em pacientes forneceu uma ferramenta adicional para

determinar a agressividade da doença e a resposta à terapia (GINER et al., 2018; ARRUDA et al., 2014; BETTEGOWDA et al., 2014). Figura 2

O maior desafio no uso de CTCs para fins diagnósticos tem sido o baixo número de CTCs que são tipicamente isolados nos pacientes, especialmente no início da doença, porém, com o desenvolvimento de tecnologias capazes de lidar com números mínimos de células, como sequenciamento de nova geração, o campo da biópsia líquida vem crescendo a cada dia (MA et al., 2017).

O grande destaque das CTCs se deu, com a comprovação da eficácia dessas células na avaliação da responsividade a uma determinada terapia antes que a terapia seja administrada no paciente, tornando-se uma forma de estratificação (GINER et al., 2018; ARRUDA et al., 2014; BETTEGOWDA et al., 2014).

No câncer de pulmão de pequenas células, as variações do número de cópias (CNVs) foram determinadas em CTCs antes da quimioterapia e permitiram a identificação de um classificador de CNV para prever indivíduos quimiossensíveis versus quimiorrefratários (GINER et al., 2018). Este classificador CNV baseado em CTC foi capaz de atribuir corretamente 83% dos pacientes testados como quimiossensíveis ou quimiorrefratários usando amostras de sangue pré-tratamento (CARTER et al., 2016).

Além disso, as CTCs apresentam potencial de contribuir nas decisões de tratamento no cenário metastáticos, como comprovado no câncer de mama, melanomas e outros cânceres (GAO et al., 2014; HONG et al., 2018; YU., 2014).

No contexto da medicina personalizada, a obtenção de culturas CTC traz o excelente potencial para monitorar de forma não invasiva as mudanças nos padrões de suscetibilidade a drogas em pacientes individuais à medida que seus tumores adquirem novas mutações. Figura 2

Esses trabalhos representam estudos de prova de conceito de como a análise de CTC pode ser usada para gerenciamento clínico e fins terapêuticos, além do NGS, várias técnicas de biologia celular e molecular bem estabelecidas e acessíveis podem ser aplicadas a CTCs (por exemplo, imunocoloração e hibridização *in situ* de fluorescência) para detectar biomarcadores específicos no cenário de diagnóstico (MAZEL et al., 2015).

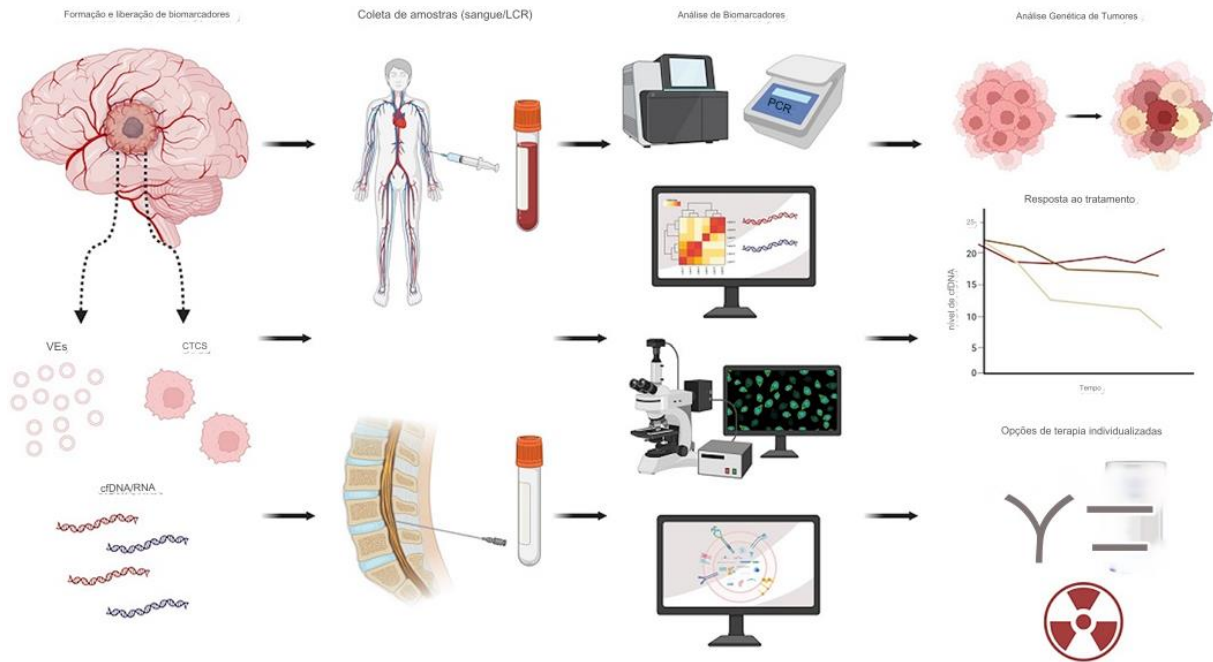


Figura 2 - Visão geral do uso de Biópsia líquida nos Glioblastomas. As células tumorais do GBMs produzem vesículas extracelulares, CTCs, cfDNA/RNA, os quais atravessam a BHE e caem na corrente sanguínea. Uma porção desses biomarcadores permanece no Líquor. Biópsia líquida analisa o líquido ou o sangue em busca desses biomarcadores por meio de PCR, sequenciamento genético e proteômica. Os dados resultantes podem ser usados para caracterizar a genética tumoral, quantificar a resposta ao tratamento, e proporcionar opções terapêuticas individualizadas.

Fonte: Adaptado de Bauman et al (2022).

2.2.1 DNA tumoral circulante (DNAct)

O DNAct consiste em fragmentos de DNA fita dupla que são liberados por tumores, implicando todo o espectro de aberrações do genoma tumoral e por isso, muitas vezes é considerado um biomarcador encontrado no sangue dos pacientes na prática clínica, atualmente excedendo o uso de CTCs (ZHAO et al., 2019).

Atualmente, o DNAct é usado para o monitoramento de doenças em pacientes com câncer, superando os riscos inerentes associados a repetidas biópsias de tecidos tumorais, e especificamente, podendo monitorar a resposta à terapia, detectar doença residual mínima ao longo do tratamento e avaliar o desenvolvimento de resistência à terapia (ALIX-PANABIÈRES et al., 2016; DAWSON., 2013).

O FDA aprovou recentemente o primeiro teste de DNAct para mutações de *EGFR* em câncer de pulmão de células não pequenas (cobas® Mutation Test v2), uma primeira indicação da implementação iminente do teste de DNAct no cenário clínico (DIAZ et al., 2012).

Dessa forma, o papel potencial do DNAct no diagnóstico do câncer torna-se duplo, ou seja, como substituto molecular para biópsia de tecido sólido e como ferramenta de triagem para detecção precoce.

A associação entre a quantidade e a fração de DNAct com o estágio do tumor sugere a utilidade do DNAct como substituto tecidual em pacientes com elevada massa tumoral (BETTEGOWDA et al., 2014; DIAZ et al., 2014).

O DNAct como substituto tecidual é especialmente promissor em tumores pouco acessíveis e em tumores não rotineiramente biopsiados ou excisados. A presença da heterogeneidade entre o tumor primário e a metástase também apresenta desafios práticos na amostragem do tecido adequado e pode ser superada pelo perfil de DNAct, embora isso precise ser avaliado em grandes coortes de pacientes.

Das muitas utilidades possíveis na prática clínica da utilização de DNAct, a detecção precoce do câncer é sem dúvida a mais ambiciosa, pois são necessárias coortes e grandes ensaios clínicos para estabelecer a sensibilidade e especificidade necessária para identificar com precisão pacientes com doença em estágio inicial.

Vários estudos relataram a detecção de alterações genéticas em pacientes com doença em estágio precoce, porém pacientes com doença em estágio inicial podem abrigar menos que uma molécula molde mutante por mililitro de plasma, estando dessa forma além da detecção das tecnologias atuais (GINER et al., 2018; 2014; BETTEGOWDA et al., 2014). Figura 3

Atualmente, as abordagens para a detecção de aberrações do genoma do tumor no DNAct incluem métodos baseados em PCR visando mutações específicas e as opções baseadas em NGS que permite a detecção de todas as possíveis aberrações no DNA (ZHAO et al., 2019).

Melhorias no comprimento de leitura, qualidade de sequência e rendimento permitiu que o NGS se tornasse um método mais eficiente para quantificar DNAct do que métodos baseados em PCR (ZHAO et al., 2019).

O DNAct do plasma derivado do tumor tem sido utilizado para detectar vários tipos diferentes de câncer, no entanto, o DNAct plasmático de tumores confinados ao sistema nervoso central foi raramente detectável, dado que obstáculos físicos como a barreira hematoencefálica pode impedir que o DNAct entre na circulação sanguínea (ZHAO et al., 2019).

Desse modo, alguns estudos estão sendo publicados na literatura atual evidenciando que o DNAct no líquor possa ser um método importante de biópsia líquida em pacientes com câncer do SNC (ZHAO et al., 2019).

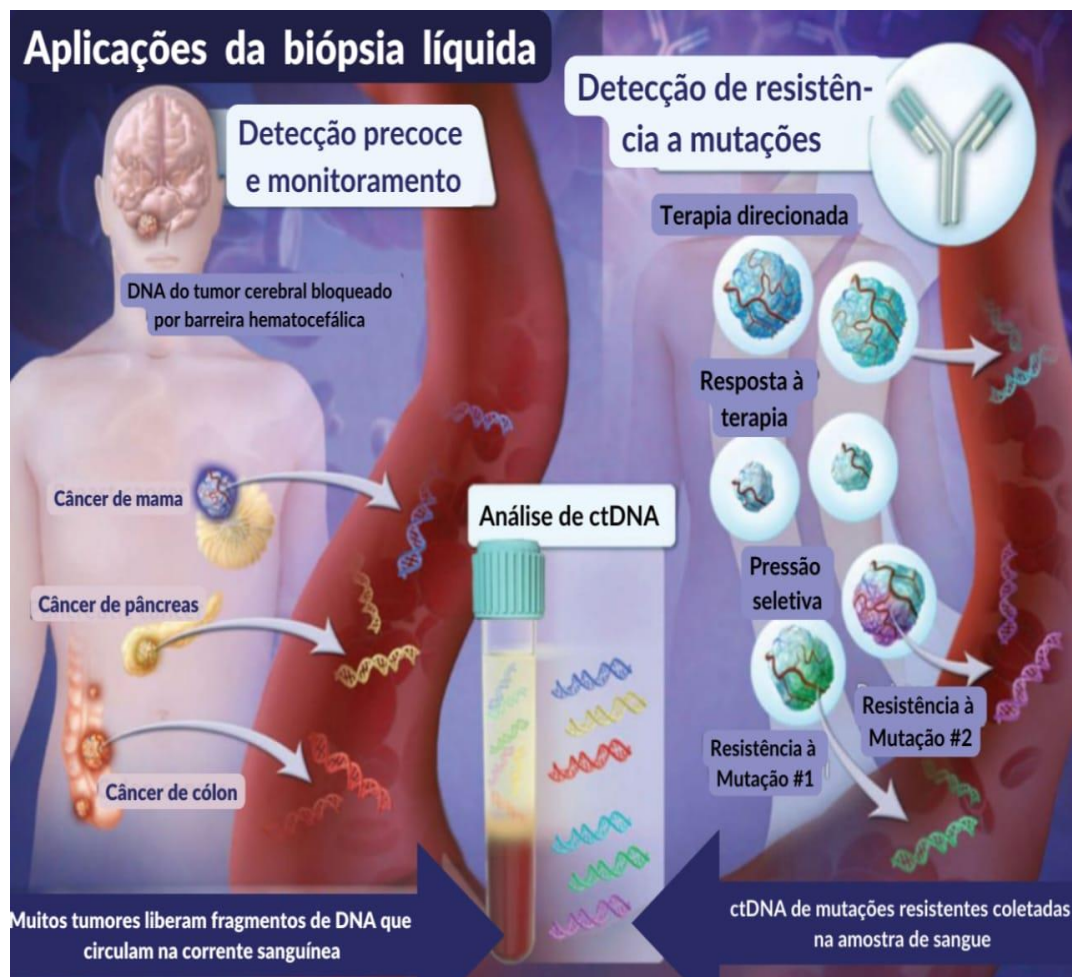


Figura 3 - Potenciais aplicações de ctDNA

Fonte: Adaptado de Bettgowda et al (2014).

2.3- Biópsia Líquida no SNC

A pesquisa realizada por Pan, et al, em 2015, teve como objetivo determinar a presença e a quantidade de DNAct tumoral no LCR de pacientes com diferentes tipos de cânceres cerebrais usando duas estratégias: pesquisar as mutações específicas *hotspots* (os loci frequentemente mutados para um tipo de tumor) no líquido, usando Droplet Digital PCR (ddPCR) ou sequenciamento de ampliação direcionado. E a segunda estratégia no estudo, foi caracterizar de forma abrangente as aberrações genômicas em genes de câncer conhecidos pelo painel de sequenciamento de câncer no LCR.

Ao contrário do sangue, que tem 3500 a 10500 glóbulos brancos/L, poucas células estão presentes no LCR em condições de rotina (0 –5 células/L). A escassez de células no LCR pode reduzir o ruído de fundo do DNA normal para detectar mutações. Inflamação ou metástase tumoral pode aumentar o número de células presentes no LCR (PAN et al., 2015).

O estudo ainda detectou mutações tumorais em amostras de LCR de 6 dos 7 pacientes com tumores cerebrais sólidos pesquisados. A concentração dos alelos mutantes do tumor variou amplamente entre os pacientes, de 5 a quase 3.000 cópias/mL de LCR (PAN et al., 2015).

Foi identificado 7 mutações somáticas no DNA do LCR de um paciente com doença leptomeninge por câncer no sequenciamento em painel, e o resultado foi concordante com teste genético na biópsia do tumor primário (PAN et al., 2015).

Porém, no estudo de Arruda, et al, 2015, a possibilidade de detectar DNA tumoral circulante livre de células no sangue foi questionada, e por isso o estudo teve como objetivo determinar se a análise do DNAct do líquido poderia ser útil para a caracterização e monitoramento de tumores cerebrais em comparação com DNAct sérico.

No estudo, foi aplicado sequenciamento direcionado massivamente paralelo baseado em captura de hibridização e/ou sequenciamento do axoma acoplado a PCR digital de gotículas (ddPCR) a DNAct, sendo então comparado o DNAct presente no LCR com o DNAct

plasmático, foi sequenciado o DNA obtido de amostras de tumor, DNA da linhagem germinativa (linfócitos do sangue periférico), plasma e LCR de uma coorte de 12 pacientes.

Foi realizado o sequenciamento massivamente paralelo de captura direcionada e, variantes somáticas de nucleotídeo único (SNVs), inserção/deleções (indels) e alterações no número de cópias (CNA) foram identificadas no DNAct do LCR e no DNAct plasmático e validadas no tecido de tumor cerebral dos respectivos pacientes.

Contudo, o trabalho enfatiza que o DNAct no LCR foi identificado em todos os casos pesquisados, enquanto o DNAct no plasma foi detectado apenas em pacientes com doença avançadas.

O trabalho de Wanga, et al, 2015, acerca da possibilidade de detecção de DNAct, no líquido que banha o SNC, o líquido, contou com 35 tumores malignos do SNC, sendo 6 meduloblastoma e 29 gliomas, submetidos tanto a biópsia e a análise do líquido através do sequenciamento direcionado seguido de sequenciamento de todo o axoma. Figura 4

No estudo pelo menos uma mutação foi identificada em cada um dos 35 tumores analisados usando uma abordagem em camadas (sequenciamento direcionado seguido de sequenciamento de todo o genoma).

Usando essas mutações específicas do paciente como biomarcadores, foi identificado níveis detectáveis no LCR de DNAct em 74% [intervalo de confiança de 95% (IC 95%) = 57–88%] dos casos.

Além disso, todos os meduloblastomas, ependimomas e gliomas de alto grau que confinavam com um espaço do LCR foram detectáveis (100% de 21 casos; IC 95% = 88-100%), enquanto nenhum DNAct do LCR foi detectado em pacientes cujos tumores não eram diretamente adjacentes ao um reservatório de LCR ($P < 0,0001$, teste exato de Fisher).

O estudo de Pentsova, et al, 2016, usou o DNA livre de células (DNAcf) como fonte de DNA para todas as análises genômicas e conseguiu sequenciar 341 genes associados ao câncer em DNAcf do líquido obtido por punção lombar de rotina em 53 pacientes com suspeita ou conhecimento de envolvimento do SNC por câncer.

O estudo detectou, alterações somáticas de alta confiança em 63% (20 de 32) dos pacientes com metástases no SNC de tumores sólidos, 50% (seis de 12) dos pacientes com tumores cerebrais primários e 0% (zero de nove) dos pacientes sem SNC envolvimento por câncer.

Além disso, pacientes com progressão tumoral no SNC durante a terapia com inibidores de quinases oncogênicas abrigaram mutações no alvo da quinase ou nas vias de desvio da quinase. Em pacientes com glioma, o exame de DNAct revelou padrões de evolução do tumor, incluindo mutações associadas à droga temozolomida (Pentsova, et al, 2016).

O estudo de Zhao, et al, 2019, teve como objetivo avaliar a sensibilidade da detecção do DNAct no líquido de pacientes com carcinomatose meníngea (CM) (Zhao, et al, 2019).

A carcinomatose meníngea é a forma mais grave de metástase cerebral apresentando significativa morbidade e mortalidade. Atualmente, o diagnóstico de CM é rotineiramente confirmado com base na manifestação clínica, citologia positiva do LCR e/ou características de neuroimagem. No entanto, a taxa negativa de achados de citologia no LCR e neuroimagem muitas vezes resulta em falha no diagnóstico de CM, atrasando o diagnóstico e piorando o prognóstico (Zhao, et al, 2019).

O estudo contou com um total de 35 amostras de LCR coletadas de 35 pacientes com suspeita clínica e características nos exames de imagem de CM para exame citológico de LCR, extração de DNAct de LCR e detecção de mutações genéticas associadas ao câncer por NGS ao mesmo tempo.

Em vinte e cinco amostras de LCR (25/35; 71%) foram encontradas células neoplásicas no exame citológico, enquanto todas as 35 amostras de LCR (35/35; 100%) revelaram ter DNAct detectável em que mutações genéticas associadas ao câncer foram detectadas por NGS

Todos os 35 pacientes com CM no estudo foram submetidos a ressonância (RN) de crânio e/ou tomografia cerebral com contraste e 22 características de neuroimagem (22/35; 63%) foram consistentes com CM. A sensibilidade da neuroimagem foi de 88% ([IC 95%], 75 a 100) ($p = 22/25$) e 63% (IC 95%, 47 a 79) ($p = 22/35$) em comparação aos da citologia do líquido e DNAct do líquido, respectivamente.

A sensibilidade da citologia do LCR foi de 71% (IC 95%, 56 a 86) (n = 25/35) em comparação com a do DNAct do LCR. Este estudo sugere uma maior sensibilidade do DNAct do LCR do que os achados de citologia e neuroimagem do LCR, além disso, a especificidade do DNAct no líquido em todos os casos foi de 100%.

O estudo encontrou mutações genéticas associadas ao câncer no DNAct do LCR de pacientes com CM em 100% da coorte, e concluiu que utilizar o DNAct do LCR como tecnologia de biópsia líquida com base na detecção de mutações genéticas associadas ao câncer pode fornecer informações adicionais para diagnosticar CM com LCR negativo citologia e/ou achados de neuroimagem negativos.

O trabalho de Hickmann et al, 2019, cujo objetivo era provar a viabilidade de uma abordagem diagnóstica minimamente invasiva para caracterização molecular do linfoma do SNC, realizou a biópsia de tecido de seis pacientes suspeitos usando painel tumoral de NSG de 649 genes.

O padrão de mutação somática individual foi usado como base para a análise da PCR digital do DNAct de amostras de sangue e LCR.

A extração de cfDNA foi dependente do kit de extração usado e viável em 3 amostras, em todas mutações somáticas foram detectáveis (100%). A análise do DNAct derivado do LCR foi superior ao DNAct derivado do plasma e a análise microscópica de rotina (células de linfoma: n = 2, 40%).

O trabalho evidencia que a análise de DNAct em tumores do SNC é viável e a caracterização molecular de linfomas do SNC pode ser alcançada por análise de DNAct derivado do líquido.

O estudo de Liang, et al, 2020, também com a utilização do sequenciamento de nova geração para análise de tumor cerebral primário e metastático, foi extraído o DNA genômico de amostras de sangue periférico ou tecidos cerebrais de 28 pacientes (sendo 21 gliomas e 7 metástases). Em dois pacientes (28,3%), foi detectado DNAct no sangue no grupo de tumor cerebral metastático, enquanto o DNAct no sangue foi encontrado em 10 pacientes com glioma (47,6%).

O estudo demonstrou que os genes mutantes de glioma e tumores cerebrais metastáticos são diferentes. Além disso, os ctDNAs nos tumores cerebrais metastáticos incluíram ALK e MDM2, e ctDNAs relacionados ao glioma incluíram 1p/19q e MDM2 seguidos por frequência de *ERBB2*, *IDH1*, *CDKN2A*, *CDK4*, *PDGFRA*, *CCNE1*, *MET*. Esses ctDNAs podem ser biomarcadores e respondedores terapêuticos em tumores cerebrais conforme concluiu o estudo.

3-OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Explorar a viabilidade de extração e análise de DNA tumoral circulante (DNAct) no líquido de pacientes com gliomas de alto grau, buscando identificar mutações no gene do IDH e outros marcadores moleculares que possam ser utilizados como indicadores prognósticos e para guiar o tratamento.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Realizar a coleta de amostras de líquido, plasma e tecido tumoral cerebral de pacientes com gliomas de alto grau, estabelecendo um banco de material biológico para estudos futuros.

3.2.2 Implementar protocolos para a tentativa de extração de DNAct, células tumorais circulantes e outros materiais derivados do tumor nas amostras de LCR, avaliando a eficácia desses métodos.

3.2.3 Realizar a análise de sobrevivência dos pacientes utilizando a curva de Kaplan-Meier, correlacionando os achados clínicos e moleculares com os desfechos clínicos.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo, prospectivo, com análise de material biológico (LCR, plasma e amostra de tecido cerebral) extraído de paciente com tumores cerebrais.

4.2 Local do Estudo e Análise das Amostras

O estudo foi realizado no serviço de neurocirurgia do Hospital Universitário Getúlio Vargas – HUGV/UFAM, onde foi realizado o procedimento neurocirúrgico dos pacientes com tumores cerebrais. Os pacientes selecionados pelo estudo foram submetidos a punção lombar para obtenção do líquido, bem como amostras de sangue periférico e fragmentos do tecido tumoral cerebral. As amostras foram transportadas com armazenamento adequado para a análise no Laboratório de Tecnologias de DNA da Divisão de Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar – UFAM.

4.3 Aspectos Éticos

O presente estudo foi submetido à avaliação de um Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos local, onde foi obtido a aprovação em obediência da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (CAAE: 619141021.0.0000.9167), do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido presentes em ANEXO.

4.4 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo 16 pacientes com idade superior a 18 anos, que possuem diagnóstico clínico, imaginológico de tumor cerebral com características malignas, e que possuíam programação cirúrgica para ressecção tumoral ou biópsia tumoral.

4.5 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do trabalho pacientes com sinais e sintomas de hipertensão intracraniana pois, inviabilizaria a punção lombar devido ao risco de herniação cerebral.

4.6 Organização, coleta e análise dos dados

Os pacientes incluídos neste estudo foram submetidos a neurocirurgia para exérese do tumor no período de março de 2023 a junho de 2024. Os dados clínico-radiológicos foram coletados na admissão para a cirurgia eletiva: sexo, idade, *Karnofski Performance Status* (KPS), sintomas de admissão e localização tumoral. Os pacientes estão sendo acompanhados até o desfecho óbito.

No dia da cirurgia, o paciente foi conduzido à sala de operação e então submetido a punção lombar com coleta de 10ml de líquido, bem como retirada de sangue de veia periférica. Assim que coletado o material, foi adicionado EDTA em concentração de 25mM a partir de uma solução estoque de 0,5M (pH=7,50). O material foi transportando devidamente armazenado com gelo seco para o laboratorial de tecnologia de DNA da Divisão de Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar – UFAM.

4.6.1- Processamento de amostras de LCR

Foram transferidos 1800 µL de LCR do tubo de vácuo para microtubos de 2 mL, em duplicata, totalizando 3600 µL. O restante, 400 µL de LCR, foi descartado no lixo biológico. Em seguida, foi realizada uma centrifugação por 15 minutos a 1900 RPM a 4°C. Após a centrifugação, 1600 µL do sobrenadante foram cuidadosamente transferidos para novos microtubos. As amostras foram então submetidas a uma nova centrifugação por 20 minutos a 13.000 RPM a 4°C. Posteriormente, 1400 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo, para ser utilizada na extração de ácidos nucleicos.

4.6.2- Extração de ácido nucleico a partir de LCR

Para extração de DNA do LCR, foram utilizados 2 métodos diferentes: Fenol-Clorofórmio e o kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kits for DNA Isolation (Qiagen), para comparação de rendimento e posterior análises.

Para extração de DNA utilizando Fenol-Clorofórmio: Uma alíquota de 300 μL do sedimento de uma amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR) foi adicionada a um microtubo contendo 200 μL de Fenol-clorofórmio. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos a 8°C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e transferido para outro microtubo contendo 320 μL de clorofórmio, a mistura foi homogeneizada lentamente por 2 minutos e centrifugada a $3.400 \times g$. Para obter a quantidade máxima de DNA, aproximadamente 300 μL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo contendo 100 mM de acetato de sódio, 40 μg de glicogênio e dois volumes de etanol absoluto, e a mistura foi incubada em banho de gelo por 15 minutos para precipitar o DNA. Após isso, as amostras foram centrifugadas a $15.900 \times g$ por 15 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Finalmente, após a volatilização do etanol, o DNA foi ressuspenso em 30 μL de água ultrapura estéril e armazenado a -70 °C.

A extração foi realizada conforme o protocolo indicado para o kit DNeasy Blood and Tissue Kits for DNA Isolation da Qiagen com modificações. Para cada paciente, 1400 μL de amostra de CSF processados foram alíquotados em volumes de 200 μL em tubos de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 40 μL de solução de proteinase K e 200 μL de tampão de lise a cada tubo. As amostras foram incubadas a 56°C por 2 horas. Após a incubação, foram adicionados 200 μL de álcool absoluto em cada microtubo.

Todas as amostras foram transferidas para uma única coluna, em múltiplas etapas de mini spin. Após a transferência completa, foi realizada uma lavagem com 500 μL de tampão AW1, descartando o passthrough. Em seguida, foi feita uma lavagem com 500 μL de tampão AW2, novamente descartando o passthrough. Foi realizada uma segunda lavagem com 500 μL de tampão AW2 por 3 minutos a 13.000 RPM. Com cautela, a coluna foi retirada do microtubo e alocada em um tubo de 1,5 mL; em seguida, foi realizado um spin para verificar a presença de resíduos líquidos na coluna. Posteriormente, o DNA foi recuperado com 25 μL de tampão de eluição do kit. A recuperação foi realizada colocando 25 μL no centro da coluna, incubando a amostra por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugando; depois, os mesmos 25 μL foram passados novamente pela coluna.

A pureza do DNA total extraído em ambos os métodos, foi verificada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) onde foi observada a

absorbância das moléculas na relação de 260/280 e 260/230 adotando uma razão de 1,8 a 2,0 como critério para utilização da amostra. Para a quantificação do DNA extraído foi utilizado o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

4.6.3 – Extração de ácido nucleico a partir de amostras de tecido tumoral, camada leucoplaquetária e plasma

As extrações foram realizadas conforme o protocolo indicado para o kit DNeasy Blood and Tissue Kits for DNA Isolation da Qiagen com modificações. Para cada extração de ácido nucléico a partir de amostras de tecido tumoral, utilizou-se 100 mg de tecido tumoral. Cada amostra foi fragmentada com auxílio de um bisturi estéril e, em seguida, transferidas para um microtubo onde se adicionou 40 µL de solução de proteinase K e 200 µL de tampão de lise a cada tubo. As amostras foram incubadas a 56°C por 2 horas.

Após a incubação, foram adicionados 200 µL de álcool absoluto em cada microtubo. Todas as amostras foram transferidas para uma única coluna, em múltiplas etapas de *mini spin*. Após a transferência completa, foi realizada uma lavagem com 500 µL de tampão AW1, descartando o *passthrough*. Em seguida, foi feita uma lavagem com 500 µL de tampão AW2, novamente descartando o *passthrough*. Foi realizada uma segunda lavagem com 500 µL de tampão AW2 por 3 minutos a 13.000 RPM. Em seguida, a coluna foi retirada do microtubo e alocada em um tubo de 1,5 mL; e na sequência, foi realizado um *spin* para verificar a presença de resíduos líquidos na coluna.

Posteriormente, o DNA foi recuperado com 25 µL de tampão de eluição do kit. A recuperação foi realizada colocando 25 µL no centro da coluna, incubando a amostra por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugando; depois, os mesmos 25 µL foram passados novamente pela coluna. Para posterior análise de pureza no NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) e quantificação no Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies).

4.6.4 – Identificação de mutações no IDH por PCR

Entre as mutações descritas em IDH1 e IDH2, a mutação R132H em IDH1 está presente em aproximadamente 80% dos casos, mostrando assim sua relevância clínica e, portanto, foi a

mutação selecionada para identificação. (YAN, et al. 2009; Balss Jorg, et al., 2008). Para isso, foram planejadas duas estratégias de identificação:

Na primeira estratégia, foram desenhados dois pares de primers, que se diferenciavam apenas no último nucleotídeo da sequência do primer reverse, para distinção entre a sequência Wild-type de IDH1 (5' CTTGATCCCCATAAGCATGAC 3') e a sequência mutante de IDH1 (5' CTTGATCCCCATAAGCATGAT 3'), ambas compartilhavam a mesma sequência do primer forward (5' CCATTACAAGAGGAGGGGCA 3'), gerando um amplicon de 520 nucleotídeos.

Na segunda estratégia, foi desenhado um par de primer com adição de sítios de enzima de restrição na porção 5', sendo EcoRI no primer forward (5' tatgaattcCCATTACAAGAGGAGGGGCA 3') e PstI no primer reverse (5' tagctgcagacttgatCCCCATAAGCATGACGACCTA 3') gerando um amplicon de 514 nucleotídeos flanqueados por sítios de restrição utilizados para clonagem direcionada em plasmídeo para posterior sequenciamento de sanger.

4.6.4 - Análise Estatística

Foi feita análise descritiva da série de pacientes, sendo utilizado média e desvio-padrão para variáveis contínuas e frequência absoluta e porcentagem para variáveis categóricas. Foi realizada Curva de Kaplan Meier para análise de sobrevida. Assumido $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. As análises foram realizadas no programa Stata 17.0.

5- RESULTADOS

5.1 – Características clínicas e epidemiológicas da população estudada

Foram incluídos 16 pacientes no presente trabalho, sendo realizado a punção lombar para retirada de líquido em todos os pacientes, coleta de sangue periférico para análise do plasma e amostra de tecido tumoral cerebral em quatro dos pacientes incluídos.

A maioria dos pacientes estudados foram do sexo masculino, 10 (62,5%), a idade variou de 18 a 69 anos com média de 52,1 anos (+-15,4). Os principais sintomas relatados no início da investigação foram cefaleia, crise epiléptica, desorientação, déficit motor e sonolência (Tabela 3).

Utilizando o KPS como medição da capacidade funcional dos pacientes antes da realização da neurocirurgia, foi observado que a maioria dos pacientes apresentavam KPS > 70%, configurando adequado status funcional. Em seis pacientes a região occipital foi acometida e em outros seis o lobo frontal (Figura 6).

Tabela 3: Características clínico-radiológicas de base

Paciente	Idade	Sexo	Principal Sintomas	KPS	Localização do Tumor
1	61	M	Cefaleia + Déficit motor	80%	Parietal esquerdo
2	46	M	Desorientação + Crise Convulsiva + Vômitos	70%	Temporal insular
3	38	F	Cefaleia + Perda da acuidade visual	90%	Occipital direito
4	67	F	Cefaleia + déficit motor	80%	Occipital esquerdo
5	18	M	Amaurose bilateral + Sonolência	<70%	Selar, supresselar e 3VT
6	60	M	Cefaleia + Desorientação + Sonolência	<70%	Frontal + Cíngulo + Corpo caloso
7	46	F	Desorientação	80%	Insular esquerdo
8	54	M	Cefaleia + déficit motor	80%	Occipital esquerdo
9	62	F	Cefaleia + desorientação	80%	Frontal direito
10	66	M	Cefaleia + déficit motor	80%	Occipital esquerdo
11	64	M	Cefaleia+ crise convulsiva	80%	Frontal esquerdo
12	61	M	Cefaleia + perda de memória	90%	Frontal direito
13	69	M	Cefaleia + déficit motor	90%	Frontal e Temporal
14	22	M	Cefaleia + déficit motor	80%	Occipital direito

15	45	F	Cefaleia + Crise convulsiva	90%	Occipital direito
16	55	F	Déficit motor + Crise Convulsiva	80%	Frontal Esquerdo

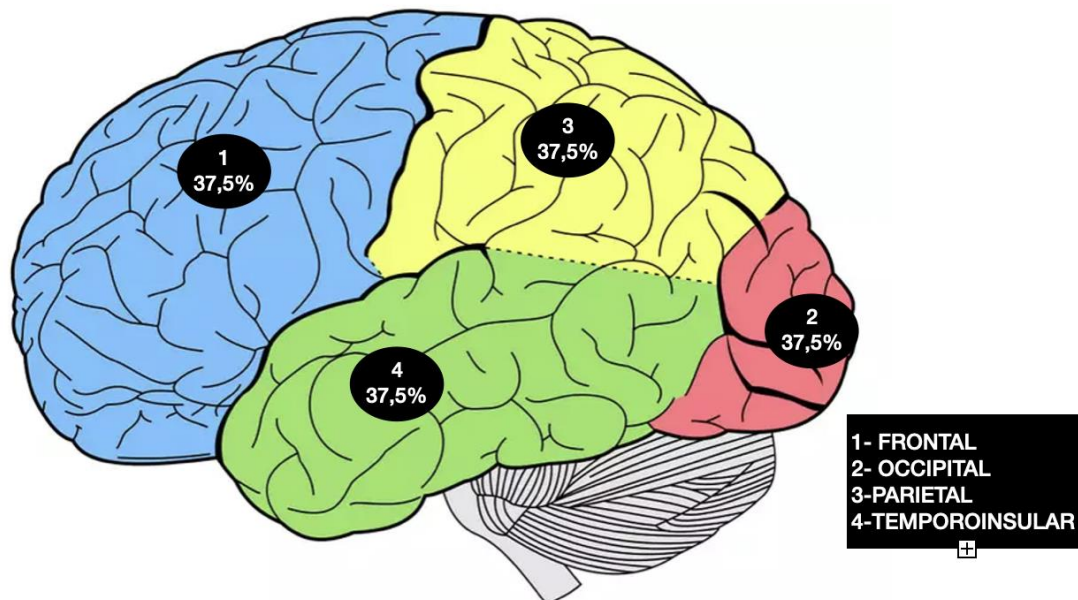


Figura 6. As quatro localizações mais prevalentes de acordo com o lobo cerebral dos tumores cerebrais estudados na amostra, representado por sua porcentagem.

Dos 16 pacientes estudados, nove pacientes apresentaram em seu histopatológico glioblastoma com *IDH 1* negativo e com marcadores histopatológicos e imunohistoquímico para GBM (selvagem), e três pacientes apresentam características de glioma de alto grau *IDH* positivo (Tabela 4).

Tabela 4: Características tumorais da biópsia sólida (histopatologia) dos pacientes

Paciente	Idade	Sexo	Histopatológico	Imunohistoquímico	Coleta
1	61	M	Neoplasia maligna	Linfoma Cel. T	Lcr
2	46	M	Glioma Difuso	GBM/ <i>IDH 1</i> negativo	Lcr
3	38	F	Glioma Grau IV	GBM/ <i>IDH 1</i> negativo	Lcr
4	67	F	Metástase de Colón	-	Lcr
5	18	M	Craniofaringioma	-	Lcr
6	60	M	Glioma	GBM/ <i>IDH 1</i> negativo	Lcr
7	46	F	Glioma	GBM/ <i>IDH 1</i> negativo	Lcr
8	54	M	Glioma	GBM/ <i>IDH 1</i> negativo	Lcr

9	62	F	Glioma	GBM/ <i>IDH</i> 1 positivo	Lcr
10	66	M	Glioma	GBM/ <i>IDH</i> 1 positivo	Lcr
11	64	M	Glioma	GBM/ <i>IDH</i> 1 positivo	Lcr
12	61	M	Glioma	GBM/ <i>IDH</i> 1 negativo	Lcr
13	69	M	Glioma	GBM/ <i>IDH</i> 1 negativo	Lcr + plasma+ tecido
14	22	M	Glioma	GBM/ <i>IDH</i> 1 negativo	Lcr + plasma+ tecido
15	45	F	Glioma		Lcr + plasma+ tecido
16	55	F	Glioma	GBM/ <i>IDH</i> 1 negativo	Lcr + plasma+ tecido

5.2 – Análise da sobrevida dos pacientes com glioma

Dos 16 pacientes estudados no trabalho, 13 foram diagnosticados com gliomas encefálicos, sendo nove pacientes com *IDH* negativo, três com *IDH* positivo e um paciente não testado para o marcador *IDH* (Tabela 5).

Tabela 5. Participantes com gliomas cerebrais, Status do *IDH* e o tempo de sobrevida até o óbito

Pacientes	Status <i>IDH</i>	Sobrevida até óbito
2	-	2 meses
3	-	3 meses
6	-	1 mês
7	-	1 mês
8	-	11 meses*
9	+	13 meses
10	+	12 meses
11	+	14 meses*
12	-	5 meses
13	-	6 meses*
14	-	7 meses
15	NT	1 mês
16	-	1 mês

*Pacientes vivos até agosto/2024 NT: Não testado

Levando em consideração que a curva de Kaplan-Meier se caracteriza como o tempo de ocorrência de um determinado evento, ou seja, evento/desfecho, no nosso trabalho, dos 13 pacientes com gliomas cerebrais, metade foram a óbito em praticamente cinco meses após o diagnóstico. Figura 7

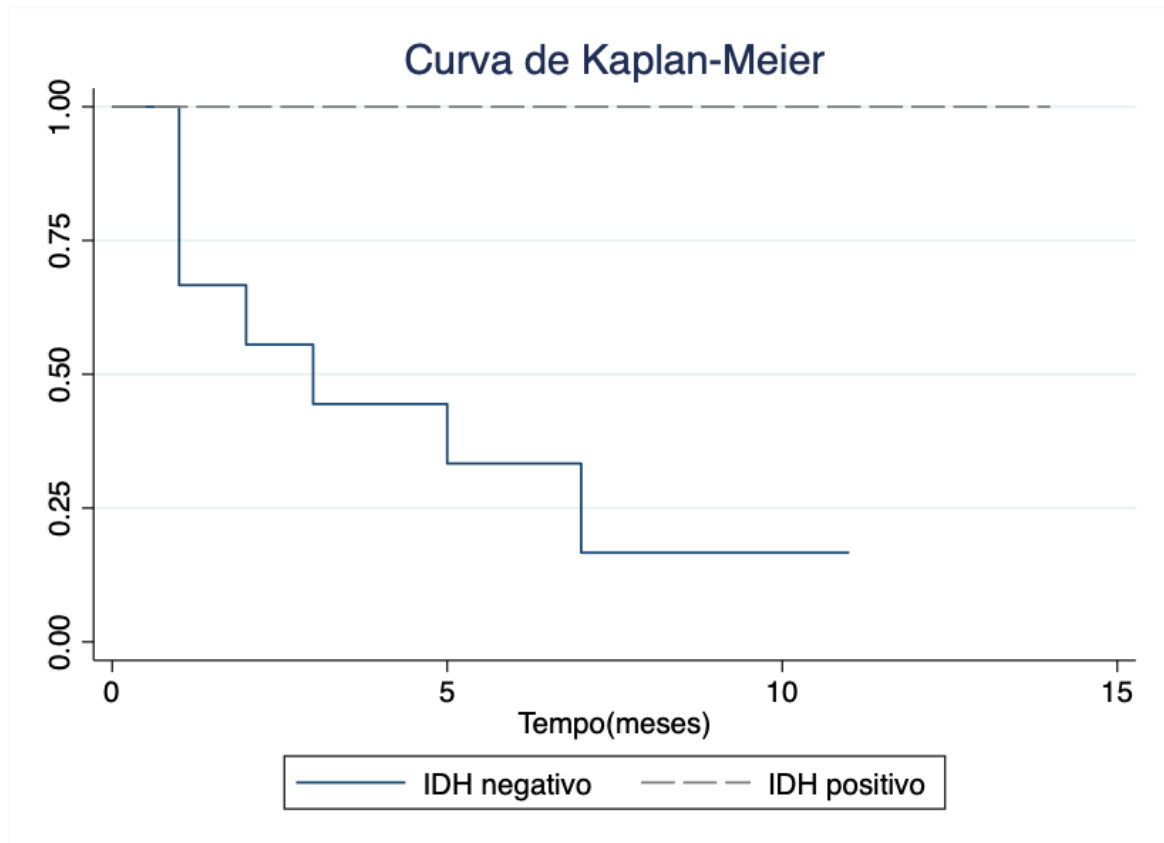


Figura 7: Curva de Kaplan-Meier dos pacientes diagnosticados com glioma encefálico até o desfecho óbito

Quando analisamos a variável *IDH*, o principal marcador biológico do glioma encefálico, cuja sua ausência (negatividade), configura pior prognóstico, pode-se observar que os pacientes com *IDH* negativo (tipo selvagem), apresentaram tempo de sobrevida menores em comparação dos pacientes com *IDH* positivo ($p=0,03$) (Gráfico 4).

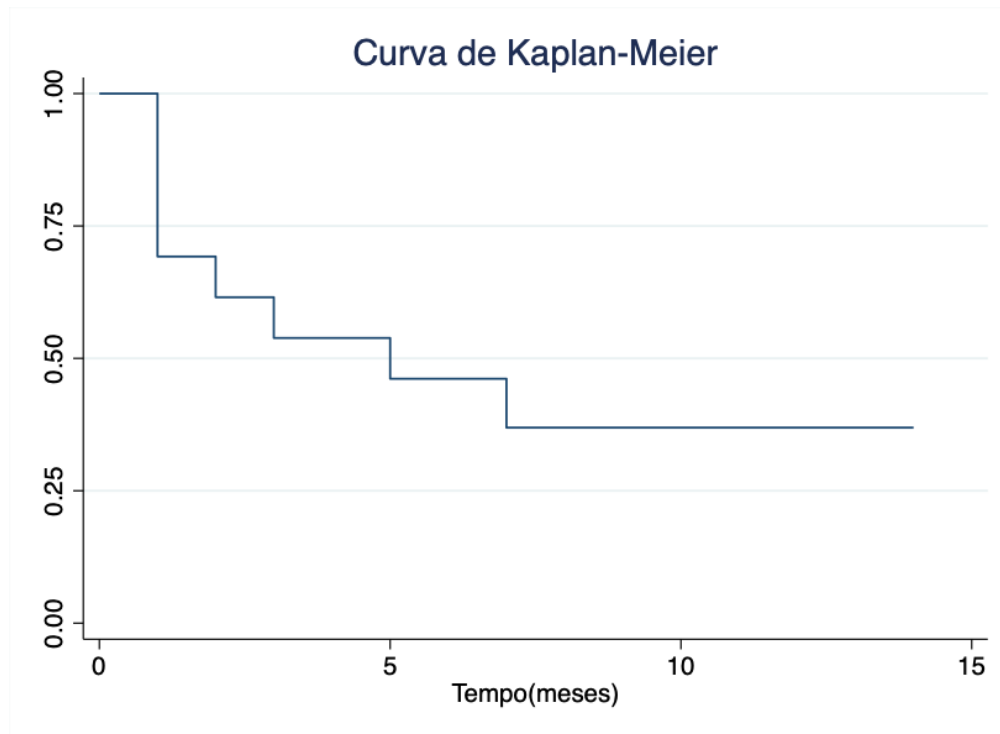
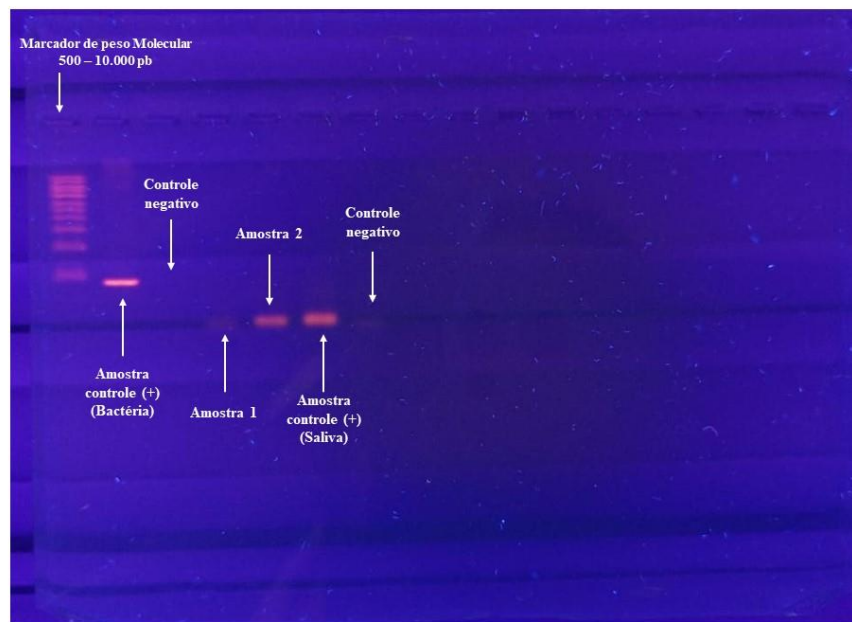


Figura 8: Curva de Kaplan-Meier dos pacientes diagnósticos com glioma encefálico e do status do *IDH* como análise de sobrevida.

5.3– Extração do DNA circulante

Em ambos os métodos de extração de DNA a partir do LCR foram encontrados DNAs totais, porém, em concentrações baixas, com média de 0,7 ng/uL nas amostras extraídas com o kit comercial DNeasy da Qiagen e 1,4ng/uL com o método Fenol-Clorofórmio. Mesmo em baixas concentrações, foi realizada uma PCR convencional para o gene controle housekeeping U6 (forward - 5' GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT 3' e reverse - 5' CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT 3') gerando um aplicom de 89 nucleotídeos, conforme mostrado na figura 9.



Amostra controle + Bactéria = Amplicon de 400pb de 16S de *E. coli*, usado como controle positivo da reação;
Controle Negativo = Todos os reagentes da PCR de 16S exceto o DNA de *E. coli*;
Amostra 1 = Amplicon da amostra extraída com o kit DNeasy da Qiagen (~0,7 ng/uL de DNA total extraído);
Amostra 2 = Amplicon da amostra extraída com o Fenol-Clorofórmio (~1,4 ng/uL de DNA total extraído);
Amostra controle + Saliva = Amplicon de amostra de DNA humano extraído a partir de saliva;
Controle Negativo = Todos os reagentes da PCR exceto o DNA humano.

Figura 9: PCR convencional do LCR.

6 - DISCUSSÃO

A ideia que o LCR circula pelo SNC e apresenta grande interface com o cérebro e com eventuais doenças que o afligem como tumores malignos vem, cada vez mais, ganhando evidência, principalmente pelo fato de que o LCR tem potencial para transportar DNAcf tumoral e células tumorais (PAN et al., 2015).

Estudos recentes também demonstraram grande potencial para o uso de DNA livre de células circulantes no sangue para diagnóstico, prognóstico e tratamento direcionado do câncer. A crítica que se faz a utilização do plasma para obtenção de amostras de biópsia líquida cerebral é que embora o DNAcf circulante derivado de tumor tenha sido detectado em uma variedade

de cânceres, raramente é encontrado em pacientes com tumores cerebrais isolados, presumivelmente devido a barreira hematoencefálica (PAN et al., 2015).

De todo modo, a amostragem do LCR poderia, portanto, servir como uma “biópsia líquida”, caracterizando as aberrações genômicas de certos tumores cerebrais primários e metastáticos.

Diferentemente do nosso estudo que utilizou metodologias de baixo custo, a maioria dos trabalhos atuais utilizam metodologias de alto custo para extração e análise do DNA tumoral, como sequenciamento de nova geração, sequenciamento de amplificação direcionada, sequenciamento de todo o genoma e outras metodologias. Atualmente não há literatura atual metodologias que visam baratear a biópsia líquida cerebral.

Em relação a sobrevida do GBM é válido ressaltar que independentemente da idade, mesmo quando tratados agressivamente com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida média é de cerca de 15 meses. A análise de Kaplan-Meier do nosso estudo revelou uma alta mortalidade entre os pacientes com gliomas, com apenas 46,2% de sobrevida em 5 meses.

No estado do Amazonas ainda são escassos centros de referência multidisciplinares no tratamento oncológico do paciente com GBM, bem como todo o cuidado horizontal do atendimento inicial, até a alta hospitalar da neurocirurgia e o início precoce do tratamento adjuvante como a radio e quimioterapia.

Muitos dos nossos pacientes foram submetidos a ressecção cirúrgica do tumor, porém não conseguiram acompanhamento assistencial tanto domiciliar do tipo home care, bem como o próprio exame de imunohistoquímico do tumor cerebral, que por anos na nossa região só era possível de forma particular. Desse modo, surge também a importância da biópsia líquida em tumores cerebrais com método acessível para a população.

Em situações que há um avanço do tumor cerebral de forma extensa, ou devido as comorbidades do próprio paciente, a neurocirurgia para ressecção tumoral ou biópsia do tumor é contraindicada e o paciente invariavelmente morrerá debilitado em um leito hospitalar. A ideia da biópsia líquida abrange esses pacientes, pois é um método não invasivo e praticamente sem complicações, sendo possível pelo menos diagnosticar o tipo de tumor e oferecer ao paciente a possibilidade do tratamento, acompanhamento e prognóstico.

É válido ressaltar que no Brasil, apenas um grande centro (localizado em Campinas-SP) trabalha atualmente com biopsia líquida em pacientes com GBM, cujo projeto ainda se encontra incipiente e em análise da aprovação do comitê de ética. Há 3 meses fechamos parceria com esse centro afim de unirmos forças e conhecimento para a realização de biopsia líquida no tumor cerebral.

Desse modo, é razoável supor no Brasil, não há registros de tentativas anteriores ao nosso estudo de extração de DNAct a partir do líquido em pacientes com gliomas, representando uma lacuna significativa no manejo molecular desses tumores.

Nosso trabalho apresentou limitações desde a aprovação do comitê de ética (longo período de aprovação devido a utilização de material biológico), até a dificuldade técnica da falta do equipamento para armazenamento da amostra nos hospitais (freezer a -80 graus) logo após a coleta.

No nosso estudo, não foi possível detectar amplicons nas reações de PCR realizadas com as estratégias inicialmente propostas. Acreditamos que essa ausência de detecção possa ser decorrente da baixa concentração de DNA total extraído, o que comprometeu a eficiência da amplificação. Para superar essa limitação, optamos por adotar o QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) para extração de DNA, um kit reconhecido pela sua maior sensibilidade.

Adicionalmente, planejamos a execução de ensaios de PCR digital, para isso recentemente adquirimos sondas TaqMan específicas para a identificação da mutação R132H em IDH1 (#SNP ID: rs121913500 - ThermoScientific). Esses ensaios serão conduzidos no Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz Amazônia), em colaboração com o Dr. Felipe Gomes Naveca, coordenador do Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, que dispõe de infraestrutura adequada para a realização de PCR digital.

6 - CONCLUSÕES

Este estudo representou a primeira tentativa no Brasil de extrair e analisar DNA tumoral circulante (DNAct) no líquido de pacientes com gliomas de alto grau, abordando uma lacuna significativa na pesquisa nacional. Embora os protocolos de extração de DNAct não tenham gerado resultados positivos nesta fase inicial, o trabalho contribuiu significativamente para o entendimento dos desafios técnicos e metodológicos envolvidos nesse processo.

A criação de um banco de material biológico, composto por amostras de líquido, plasma e tecido tumoral cerebral, é um recurso estratégico que permitirá a continuidade das pesquisas com a aplicação de técnicas mais sensíveis no futuro. A análise de sobrevivência utilizando a curva de Kaplan-Meier revelou a alta mortalidade associada aos gliomas de alto grau, reforçando a necessidade de desenvolver abordagens moleculares mais eficazes para o diagnóstico precoce e o manejo desses tumores.

Este trabalho também destaca a importância de investimentos em tecnologias avançadas e em colaborações interdisciplinares para superar as limitações técnicas enfrentadas. As lições aprendidas e os recursos gerados por este estudo fornecerão uma base sólida para futuras investigações, com o potencial de validar a biópsia líquida como uma ferramenta crucial na prática neuro-oncológica.

7- REFERÊNCIAS

YUSOFF, A.Z.M. Role of mitochondrial DNA mutations in brain tumors: A mini-review. ICRT, Malaysia, v.11, n.3, p.535-544, 2015.

Instituto Nacional do Câncer. Câncer do sistema nervoso central. 2023, disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central>. Acesso: 15 jun. 2021.

PIPERI, et al. Pivotal Role of STAT3 in Shaping Glioblastoma Immune Microenvironment. Cells, v. 8, e1398, 2019.

BIELLI, P. et al. Splicing Dysregulation as Oncogenic Driver and Passenger Factor in Brain Tumors. Cells, v. 9, n 10. 2020.

OSUKA, S. et al. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: The way forward. J. Clin. Investig, v. 27, p. 415–426, 2017.

YEKULA A, MURALIDHARAN, ROSH ZS, YOUNGKIN AE, KANG KM, BALAJ, CARTER BS. Liquid Biopsy Strategies to Distinguish Progression from Pseudoprogression and Radiation Necrosis in Glioblastomas. Adv Biosyst. 2020 Dec;4(12):e2000029. doi: 10.1002/adbi.202000029.

GINER, FC, et al. Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations. Diagnosis, v. 8, n. 31, 2018.

KWAPISZ, D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? Ann Transl Med, v. 5, N. 3, 43, 2017.

PERAKIS, S, et al. Speicher, M.R. Emerging concepts in liquid biopsies. BMC Med, v. 15, p. 75, 2017.

OSTROM QT, PRICE M, NEFF C, CIOFFI G, WAITE KA, KRUCHKO C, SLOAN JSB. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016-2020. *Neuro Oncol.* Oct ;25(S4), iv1-iv99. 2023.

LOUIS DN, PERRY A, WESSELING P, BRAT DJ, CREE IA, FIGARELLA-BRANGER D, HAWKINS C, NG HK, PFISTER SM, REIFENBERGER G, SOFFIETTI R, VON DEIMLING A, ELISSON DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* Aug 2;23(8):1231-1251. 2021.

REIFENBERGER G, WIRSCHING HG, KNOBBE-THOMSEN CB, WELLER M. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* Jul;14(7):434-452. 2017.

GREENBERG, MARK S. *Handbook of Neurosurgery* 9th ed. New York: Thieme, 2020.

ACETO, N.; BARDIA, A.; MIYAMOTO, DT.; DONALDSON, MC., WITTNER, BS.; SPENCER, JA.; YU, M.; PELY, A.; ENGSTROM, A.; ZHU, H. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell.* 2014 Aug. 158, 1110-1122.

WAN, JCM.; MASSIE, C.; GARCIA-CORBACHO, J.; MOULIERE, F.; BRENTON, JD.; CALDAS, C.; PACEY, S.; BAIRD, R.; ROSENFELD, N. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017 Apr;17(4):223-238.

ALIX-PANABIÈRES, C.; PANTEL, K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov.* 2016 May;6(5):479-91.

JIANG, P.; LO, Y.M.D. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* **2016**, 32, 360–371.

MA, S.; MURPHY, T.W.; LU, C. Microfluidics for genome-wide studies involving next generation sequencing. *Biomicrofluidics.* 2017;11:021501.

HONG, X.; SULLIVAN, RJ.; KALINICH, M.; KWAN, T.T.; GIOBBIE-HURDER, A.; PAN, S.; LICAUSI, J.A.; MILNER, J.D.; NIEMAN, L.T.; WITTNER, B.S. Molecular signatures of circulating melanoma cells for monitoring early response to immune checkpoint therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115:2467–2472.

YU, M.;BARDIA, A.; ACETO, N.;BERSANI, F.; MADDEN, M.W.; DONALSON, M.C.; DESAI, R.; ZHU, H.; COMAILLS, V.; ZHENG, Z. . Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*. 2014;345:216–220.

GAO, D.; VELA, I.; SBONER, A.; IAQUINTA, P.J.;KARTHAUS, W.R.;GOPALAN, A.;DOWLING, C.;WANJALA, J.N.;UNDVALL, E.A.; ARORA, V.K, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*. 2014;159:176–187.

MAZEL, M.;JACOT, W.;PANTEL,K.;BARTKOWIAK, K.;TOPART, D.;CAYREFOURCQ, L.;ROSSILLE, D.;MAUDELONDE, T.;FEST, T.;FEST, T.;ALIX-PANABIÈRES, C. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*. 2014;159:176–187.

ZHAO, Y.; HE, JY.; ZOU, YL, et al. Evaluating the cerebrospinal fluid ctDNA detection by next-generation sequencing in the diagnosis of meningeal Carcinomatosis. *BMC Neurol* 19, 331 (2019).

DAWSON, S.J.;TSUI, D.W.;MURTAZA, M.;BIGGS, H.;RUEDA, O.M.;CHIN, S.F.;DUNNING, M.J.;GALE, D.;FORSHEW, T.;MAHLER-ARAUJO, B., et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med*. 2013;368:1199–1209.

DIAZ, L.A.;WILLIAMS, R.T.;WU, J.;KINDE, I.; HECHT, J.R.;BERLIN, J.;ALLEN, B.;BOZIC, I.;REITER, J.G.;NOWAK, M.A, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486:537–540.

BETTEGOWDA, C.;SAUSEN, M.;LEARY, R.J.;KINDE, I.;WANG, Y.;AGRAWAL, N.;BARTLETT, B.R.;WANG, H.;LUBER, B.;ALANI, R.M et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med*. 2014;6:224ra224.

PAN, W.;GU, W.;NAGPAL, S .;GEPHART, M.H.;QUAKE, SR. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clin Chem*. 2015 Mar;61(3):514-22. doi: 10.1373/clinchem.2014.235457. Epub 2015 Jan 20.

BAUMAN,MMJ; BOUCHAL,SM.; MONIE, DD.;AIBAIDULA,A.;SINGH,R.;PARNEY, IF. Strategies, considerations, and recent advancements in the development of liquid

biopsy for glioblastoma: a step towards individualized medicine in glioblastoma. *Neurosurg Focus*. 2022 Dec;53(6):E14.

WANG Y, SPRINGER S, ZHANG M, MCMAHON KW, KINDE I, DOBBYN L, PTAK J, BREM H, CHAICHANA K, GALLIA GL, GOKASLAN ZL, GROVES ML, JALLO GI, LIM M, OLIVI A, QUINONES-HINOJOSA A, RIGAMONTI D, RIGGINS GJ, SCIUBBA DM, WEINGART JD, WOLINSKY JP, YE X, OBA-SHINJO SM, MARIE SK, HOLDHOFF M, AGRAWAL N, DIAZ LA JR, PAPADOPOULOS N, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, BETTEGOWDA C. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Aug 4;112(31):9704-9. doi: 10.1073/pnas.1511694112. Epub 2015 Jul 20. PMID: 26195750; PMCID: PMC4534284.

LOPES, Cleiton Mendes et al. Análises dos genes TP53, PTEN, IDH1 e IDH2 em tumores não gliais do sistema nervoso humano. 2016.

8- APÊNDICES



8.1- EQUIPE DE PESQUISADORES

EQUIPE	FUNÇÃO	Vínculo institucional
Prof.Dr.Robson Luís Oliveira de Amorim	Pesquisador/ Médico pesquisador	UFAM
Prof.Dr. Spartaco Astolfi Filho	Pesquisador	UFAM
Paloam Cardoso Nôvo	Aluno de especialização	UFAM/HUGV
Whendel Mesquita	Aluno de Doutorado	UFAM
Jimmy Gledson Hayden Pontes Linhares	Aluno de Graduação	UFAM
Victor Rodrigo Félix dos Santos	Aluno de Graduação	UEA

Legenda: UFAM – Universidade Federal do Amazonas.; HUGV – Hospital Universitário Getúlio Vargas; UEA – Universidade do Estado do Amazonas.

9-ANEXOS

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

	Universidade Federal do Amazonas – UFAM Hospital Universitário Getúlio Vargas - HUGV	
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO		
<p>O(A) Sr(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulada em “REALIZAÇÃO DE BIOPSIA LÍQUIDA PARA EXTRAÇÃO DE DNA TUMORAL NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR) EM PACIENTES COM TUMOR CEREBRAL”, cujo pesquisador responsável é Paloam Cardoso Nôvo, orientador Robson Luís Oliveira Amorim e coorientador Spartaco Astolfi Filho. Os objetivos do projeto são: Realizar a biopsia líquida (punção lombar) no LCR de paciente com tumores cerebrais para análise molecular do tumor, em paciente com programação neurocirúrgica. O(A) Sr(a) está sendo convidado por que preenche os critérios de inclusão no trabalho (Paciente com tumor cerebral e que será operado no serviço de neurocirurgia da UFAM/HUGV, idade acima de 18 anos).</p>		
<p>O(A) Sr(a) tem de plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma para o tratamento que recebe neste serviço de Neurocirurgia UFAM/HUGV.</p>		
<p>Caso aceite participar sua participação consiste em autorizar a coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR), que será coletado no dia da sua cirurgia, cuja amostra será transportada com armazenamento adequado para a análise no Laboratório de Tecnologias de DNA da Divisão de Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar – UFAM, onde será analisada e processada, com intuito de realizar a extração do DNA tumoral total circulante (ctDNA). É importante salientar que essa coleta do LCR é de rotina institucional em todos os pacientes que fazem esse tipo de cirurgia, dessa forma o senhor(a) não será submetido a procedimentos adicionais. A proposta desta pesquisa é fazer uma análise sobre o DNA tumoral utilizando amostras do LCR.</p>		
<p>Toda pesquisa com seres humanos envolve riscos aos participantes. Nesta pesquisa os riscos para o(a) Sr.(a) são:</p>		
<ul style="list-style-type: none"> - Cefaleia pós-punção; - Infecção; 		
Rubricas _____ (Participante)	Página 1 de 4	
_____ (Pesquisador)		



Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Hospital Universitário Getúlio Vargas - HUGV



- Sangramentos no local da punção lombar.

No caso de eventuais complicações, o paciente será devidamente tratado no próprio hospital universitário Getúlio Vargas, juntamente com a equipe de neurocirurgia responsável pelo procedimento neurocirúrgico, sob orientação do prof. Dr. Robson Amorim e Dr. Paloam C. Novo.

Além do mais, será realizado um acompanhamento regular (agendado para todas as quarta-feira, as 10h, consultório 12 do ambulatório de Araújo Lima – preceptor responsável: Dr. Robson Amorim) com fins para suporte e avaliação após alta hospitalar de todos os pacientes participantes da pesquisa, independente se houver complicação ou não. A primeira consulta sendo agendada sete dias após alta hospitalar ou eventualmente, conforme a necessidade, antes dos sete dias.

Os benefícios esperados da pesquisa e da sua participação é a possibilidade de identificar através da biopsia líquida (punção lombar) marcadores tumorais que possibilite o diagnóstico de tumor cerebral de forma mais rápida e menos invasiva, o que poderá nortear tanto as condutas neurocirúrgicas como terapêuticas no paciente com câncer cerebral altamente invasivos e muitas vezes inoperável. Além disso, com o acompanhamento através da biopsia líquida é possível, no futuro, registrar de forma menos invasiva a evolução do tumor, sem precisar de uma nova intervenção neurocirúrgica.

Se julgar necessário, o(a) Sr(a) dispõe de tempo para que possa refletir sobre sua participação, consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-los na tomada de decisão livre e esclarecida.

Garantimos ao(à) Sr(a), e seu acompanhante quando necessário, o ressarcimento das despesas devido sua participação na pesquisa, ainda que não previstas inicialmente. (custeio de medicamentos e assistência à saúde às complicações que possam existir no trabalho como acima citado).

Também estão assegurados ao(à) Sr(a) o direito a pedir indenizações e a cobertura material para reparação a dano causado pela pesquisa ao participante da pesquisa

Rubricas _____ (Participante)

Página 2 de 4

(Pesquisador)



Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Hospital Universitário Getúlio Vargas - HUGV



Asseguramos ao(à) Sr(a) o direito de assistência integral gratuita devido a danos diretos/indiretos e imediatos/tardios decorrentes da participação no estudo ao participante, pelo tempo que for necessário.

A amostra coletada (líquor), será identificada com algoritmos arábicos (de 1 ao número 10), afim de preservar a identificação do participante. A amostra será armazenada no Laboratório de Tecnologias de DNA da Divisão de Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar – UFAM, e após o processamento para a extração do DNA tumoral e DNA circulante livre de células, será descartado em local específico não sendo reaproveitado ou realizado para possível banco de amostras futuras, levando um tempo de aproximadamente 24 a 48h após a coleta para análise.

Garantimos ao(à) Sr(a) a manutenção do sigilo e da privacidade de sua participação e de seus dados durante todas as fases da pesquisa e posteriormente na divulgação científica, assegurando assim a confidencialidade dos dados.

O(A) Sr(a). pode entrar em contato com os pesquisadores responsáveis: Paloam Cardoso, orientador Robson Amorim e coorientador Spartaco Astolfi Filho a qualquer tempo para informação adicional no endereço R.Tomas de vila nova, N 04, Bairro Nossa Senhora das Graças CEP 69020-170, Telefone 3305-4764, bem como os telefones: 99271-3115 // 99403-4101// 99248-3161, email: paloamcardosonovo@gmail.com // amorim.robson@gmail.com // spartaco.biotec@gmail.com

O(A) Sr(a). também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Getúlio Vargas (CEP-HUGV n 9167), e com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), quando pertinente. O CEP/HUGV fica na localizado no HUGV-Ebserh, endereço rua Tomás de Vila Nova, n 4, Praça 14 de Janeiro, – Manaus – AM, Fone: (92) 3305-4707, E-mail: hugvcep@gmail.com. O CEP/HUGV é um colegiado multi e transdisciplinar, independente, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Este documento (TCLE) será elaborado em duas VIAS, que serão rubricadas em todas as suas páginas, exceto a com as assinaturas, e assinadas ao seu término pelo(a)

Rubricas _____ (Participante)

Página 3 de 4

(Pesquisador)



Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Hospital Universitário Getúlio Vargas - HUGV



Sr(a), ou por seu representante legal, e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Li e concordo em participar da pesquisa.

Manaus- AM, ____/____/____

Assinatura do Participante



IMPRESSÃO DIGITALIZADA

Assinatura do Pesquisador Responsável

Rubricas _____ (Participante)

(Pesquisador)

Página 4 de 4

ANEXO B – CARTA DE ANUÊNCIA HUGV



Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Hospital Universitário Getúlio Vargas - HUGV



TERMO DE ANUÊNCIA

Eu, ADRIANA NOGUEIRA DINIZ, na qualidade de chefe da Unidade do Sistema Neurológico do Hospital Universitário Getúlio Vargas, HUGV/UFAM, autorizo a realização da pesquisa intitulada **REALIZAÇÃO DE BIOPSIA LÍQUIDA PARA EXTRAÇÃO DE DNA TUMORAL NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR) EM PACIENTES COM TUMOR CEREBRAL**, a ser conduzida sob a responsabilidade dos pesquisadores, Paloam Cardoso Novo e Robson Luís Oliveira Amorim e declaro que esta instituição apresenta as condições necessárias à realização da referida pesquisa. Este termo é válido apenas no caso de haver parecer favorável do Comitê de Ética avaliador do estudo.

Manaus, 16 de agosto de 2022.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GETÚLIO VARGAS

Enf.ª Adriana Diniz / COREN - AM 287310
Chefe da Unidade de Sistema Neurológico

Chefe da Unidade do Sistema Neurológico HUGV/UFAM
Adriana Nogueira Diniz

ANEXO C – CARTA DE ANUÊNCIA LABORATÓRIO



Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Divisão de Biotecnologia

TERMO DE ANUÊNCIA

Eu, SÔNIA MARIA DA SILVA CARVALHO, na qualidade de chefe da Divisão de Biotecnologia do CAM (Centro de Apoio Multidisciplinar) – UFAM, autorizo a realização da pesquisa intitulada REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA LÍQUIDA PARA EXTRAÇÃO DE DNA TUMORAL NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR) EM PACIENTES COM TUMOR CEREBRAL, a ser conduzida sob a responsabilidade dos pesquisadores, Palom Cardoso Novo, Robson Luís Oliveira Amorim e Spartaco Astolfi Filho, e declaro que esta instituição apresenta as condições necessárias à realização da referida pesquisa. Este termo é válido apenas no caso de haver parecer favorável do Comitê de Ética avaliador do estado.

Respeitosamente,

Manaus, 13 de setembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por Sônia Maria da Silva Carvalho, Chefe de Divisão, em 13/09/2022, às 16:05, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?action=documento_conferir&id_orqao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1162637 e o código CRC 6105910F.

ANEXO D – PARECER CEP

UFAM - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO
VARGAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA LÍQUIDA PARA EXTRAÇÃO DE DNA TUMORAL NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO (LCR) EM PACIENTES COM TUMOR CEREBRAL

Pesquisador: PALOAM CARDOSO NOVO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61914021.0.0000.9167

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES - EBSERH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.675.622

Apresentação do Projeto:

Segundo o arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1874429.pdf, postado em 26/09/2022 20:53:44, traz as seguintes informações:

"Trata-se de um estudo prospectivo, que pretende realizar biópsia líquida com extração de DNA tumoral circulante e materiais tumorais em paciente com tumores cerebrais diagnosticados e que irão realizar neurocirurgia para exérese do tumor no período de outubro de 2021 a setembro de 2023. O estudo será realizado no serviço de neurocirurgia do Hospital Universitário Getúlio Vargas – HUGV/UFAM, onde será realizado o procedimento neurocirúrgico dos pacientes com tumores cerebrais. Os pacientes selecionados pelo estudo serão submetidos a punção lombar para obtenção do líquor, as amostras serão transportadas com armazenamento adequado para a análise no Laboratório de Tecnologias de DNA da Divisão de Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar – UFAM"

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Realizar a biópsia líquida no LCR de pacientes com tumores cerebrais para análise molecular do tumor.

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 300

Bairro: Centro

CEP: 69.020-545

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-4707

E-mail: cep.hugv@ebserh.gov.br

Continuação do Parecer: 5.675.622

Objetivo Secundário:

- Extrair o DNA tumoral circulante, células tumorais circulantes e eventualmente outros materiais derivados do tumor no LCR;
- Realizar o sequenciamento de nova geração (NGS) e análise por bioinformática para identificar alterações no DNA tumoral circulante;
- Avaliar a viabilidade da medição do DNA tumoral circulante e outros materiais derivados do tumor cerebral no LCR de pacientes com tumores cerebrais malignos;
- Quantificar e comparar o tamanho do fragmento de DNA tumoral circulante com o DNA normal livre de células;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Punção lombar apresenta como complicação: infecção, cefaleia pós-procedimento e sangramento no local da punção;

Benefícios:

o trabalho visa identificar através da biópsia líquida (punção lombar) marcadores tumorais que possibilite o diagnóstico de tumor cerebral de forma mais rápida e menos invasiva, o que poderá nortear tanto as condutas neurocirúrgicas como terapêuticas no paciente com câncer cerebral altamente invasivos e muitas vezes inoperável. Além disso, com o acompanhamento através da biópsia líquida é possível, no futuro, registrar de forma menos invasiva a evolução do tumor.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa submetido em sua segunda versão a Plataforma Brasil, caracterizado como de proposta de projeto de Trabalho Mestrado, da faculdade de Medicina da UFAM, tendo como pesquisador responsável PALOAM CARDOSO NOVO, orientado pelo professor doutor ROBSON LUIS OLIVEIRA DE AMORIM, co-orientado pelo professor doutor SPARTACO ASTOLFI FILHO. Título: REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA LÍQUIDA PARA EXTRAÇÃO DE DNA TUMORAL NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR) EM PACIENTES COM TUMOR CEREBRAL.

PENDÊNCIAS NA PRIMEIRA VERSÃO:

Anuência Institucional: Inadequada. Anuência do laboratório assinada pelo coorientador do pesquisador responsável (mestrando), caracterizado o conflito de interesses.

TCLE: Inadequado (ver pendências).

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 300	CEP: 69.020-545
Bairro: Centro	
UF: AM	Município: MANAUS
Telefone: (92)3325-4707	E-mail: cep.hugv@ebserrh.gov.br

UFAM - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO
VARGAS



Continuação do Parecer: 5.675.622

Instrumento de coleta de dados: Não apresentado (ver pendências).

Orçamento: Ausente.

Projeto de pesquisa: Parcialmente adequado, pode deve incluir o orçamento, apresentar o resumo, inserir as hipótese do estudo e descrever os resultados esperados da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

VERSÃO ATUAL:

- TCLE: corrigido, Adequado. (TCLE_OFICIAL.pdf; 26/09/2022 20:52:49)

- Projeto Completo: Adequado. (PROJETO_corrigido.pdf; 26/09/2022 20:52:27)

- Orçamento: Adequado. (PROJETO_corrigido.pdf; 26/09/2022 20:52:27)

- Anuência Institucional: Adequado. (CARTA_ANUENCIA_LABORATORIO.pdf; 26/09/2022 20:53:14 e CARTA_ANUENCIA_HUGV.pdf 21/08/2022 15:38:58)

- Instrumento de coleta de dados: Não apresentado. Porém descrito os parâmetros que serão analisados na metodologia e TCLE. (PROJETO_corrigido.pdf 26/09/2022 20:52:27 e TCLE_OFICIAL.pdf 26/09/2022 20:52:49)

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto de pesquisa respondeu as pendências apresentadas na primeira versão, conforme recomendações deste CEP.

Deve seguir os preceitos éticos conforme as normas vigentes.

O presente projeto de pesquisa respondeu as pendências apresentadas na primeira versão, conforme recomendações deste CEP.

Deve seguir os preceitos éticos conforme a normas vigentes.

Está aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 1874429.pdf	26/09/2022 20:53:44		Aceito

Endereço: Rua Tomás de Vila Nova, 300
 Bairro: Centro CEP: 69.020-545
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3305-4707 E-mail: cep.hugv@ebserh.gov.br

UFAM - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO
VARGAS



Continuação do Parecer: 5.675.622

Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ANUENCIA_LABORATORIO.pdf	26/09/2022 20:53:14	PALOAM CARDOSO NOVO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_OFICIAL.pdf	26/09/2022 20:52:49	PALOAM CARDOSO NOVO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_corrigido.pdf	26/09/2022 20:52:27	PALOAM CARDOSO NOVO	Aceito
Orçamento	ORGAMENTO.pdf	21/08/2022 17:44:38	PALOAM CARDOSO NOVO	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	21/08/2022 15:39:55	PALOAM CARDOSO NOVO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ANUENCIA_HUGV.pdf	21/08/2022 15:38:58	PALOAM CARDOSO NOVO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não