



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Gabriel Araujo Kurokawa

**Presença de meningioma e vias metabólicas refletidas em
análise de biópsia líquida**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Fisiopatologia em Clínica
Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima
Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

**Botucatu
2023**

Gabriel Araujo Kurokawa

Presença de meningioma e vias metabólicas
refletidas em análise de biópsia líquida

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre
em Fisiopatologia em Clínica
Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima
Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Kurokawa, Gabriel Araújo.

Presença de meningioma e vias metabólicas refletidas em
análise de biópsia líquida / Gabriel Araújo Kurokawa. -
Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Estela de Oliveira Lima
Coorientador: Adriana Camargo Ferrasi
Capes: 40101045

1. Biópsia Líquida. 2. Marcadores bioquímicos.
3. Meningioma. 4. Metabolômica. 5. Genes p53.

Palavras-chave: Biópsia líquida; Biomarcadores; Meningioma;
Metabolômica; TP53.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GABRIEL ARAUJO KUROMAWA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 12 dias do mês de dezembro do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GABRIEL ARAUJO KUROMAWA, intitulada **Investigação de biomarcadores para biópsia líquida e prognóstico de meningiomas**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. ESTELA DE OLIVEIRA LIMA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. PEDRO TADAO HAMAMOTO FILHO (Participação Virtual) do(a) Depto. de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN (Participação Virtual) do(a) Depto. de Tocoginecologia / FCM/Campinas - Unicamp. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. ESTELA DE OLIVEIRA LIMA

 unesp
Digitally signed by Estela De
Oliveira Lima:05989880685
Date: 2023.12.12 14:51:28
-06'00'

Registro do Impacto Esperado

Espera-se, com o presente estudo, contribuir com a compreensão e elucidação das possíveis vias metabólicas que se encontram alteradas nos pacientes portadores de meningioma quando comparadas a indivíduos saudáveis, através da identificação de moléculas representativas do estado patológico em questão.

With the following study, we hope to contribute with the comprehension and elucidation of the metabolic pathways that might be altered in meningioma patients when compared to healthy individuals, through the identification of the representative molecules of the referred pathological state.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Raquel e Sergio, por todo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos, pela presença nas derrotas e nas conquistas, pelas conversas e conselhos. Amo vocês acima de tudo!

Aos grandes amigos que fiz durante essa jornada, espalhados pelo Brasil e pelo mundo, que choram minhas tristezas e sorriem minhas alegrias. Vocês foram e são fundamentais para que eu possa seguir em frente.

A todos os professores que passaram pela minha vida e me ensinaram sobre a importância da educação. Como disse Rubem Alves: “Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais.”; por isso, levarei cada um de vocês comigo até meus últimos dias.

AGRADECIMENTOS

À toda a equipe do Laboratório de Análises Moleculares e Neuro-Oncologia, em especial minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Estela de Oliveira Lima, e coorientadora, Prof^a. Dr^a. Adriana Camargo Ferrasi, por me ensinarem a fazer ciência e por sempre estarem presentes durante minha formação.

À Faculdade de Medicina de Botucatu, pela disponibilidade dos excelentes recursos técnicos, acadêmicos e financeiros necessários durante todo o processo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento fornecido durante o Mestrado.

“Eu não quero acreditar, eu quero saber.”

Carl Sagan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise dos marcadores por PLS-DA	18
Figura 2 – VIP (Variable Importance in Projection) Score	19
Figura 3 – Volcano Plot.....	21
Figura 4 – Curva ROC para os metabólitos selecionados	22
Figura 5 – Amplificação por tetra-primer ARMS-PCR e eletroforese.....	24
Figura 6 – Análise dos polimorfismos R248Q e R273H em p53.....	25
Figura 7 – Análise da acurácia do metabólito 5-hidroximetiluracil	27
Figura 8 – Análise da acurácia do metabólito 3-O-sulfogalactosilceramida.....	29
Figura 9 – Análise da acurácia do metabólito gangliosídeo GA2	31
Figura 10 – Análise da acurácia dos metabólitos identificado.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características epidemiológicas.....17

Tabela 2 – Fold Change, Log2(FC) e VIP dos metabólitos selecionados20

Tabela 3 – Marcadores plasmáticos indicativos de presença de meningioma..... 23

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. <i>Meningiomas</i>	1
1.2. <i>Metabolômica</i>	5
1.3. <i>Metabolismo e TP53</i>	6
2. Hipótese	10
3. Justificativa	11
4. Objetivos	12
4.1. <i>Gerais</i>	12
4.2. <i>Específicos</i>	12
5. Materiais e Métodos	13
5.1. <i>Casuística</i>	13
5.2. <i>Critérios de inclusão</i>	13
5.3. <i>Critérios de exclusão</i>	13
5.4. <i>Preparo da amostra</i>	14
5.5. <i>Análise do perfil de metabólitos por espectrometria de massas</i>	14
5.6. <i>Análise estatística</i>	15
5.7. <i>Análise de polimorfismos em p53</i>	15
6. Resultados	16
6.1. <i>Características epidemiológicas</i>	16
6.2. <i>Perfil diferencial de metabólitos</i>	17
6.3. <i>Deteção de polimorfismos em p53</i>	23
7. Discussão	26
7.1. <i>5-Hidroximetiluracil</i>	26
7.2. <i>3-O-Sulfogalactosilceramida (d18:1/24:0)</i>	27
7.3. <i>Gangliosídeo GA2 (d18:1/18:0)</i>	29
7.4. <i>Polimorfismos em p53</i>	33
8. Conclusão	34
9. Referências	35
10. Anexos	44
10.1. <i>Anexo I</i>	45
10.2. <i>Anexo II</i>	55

RESUMO

Os meningiomas (MGM) representam o tipo mais comum de tumor primário do SNC, abrangendo cerca de 36% dos casos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, são histologicamente classificados em tumores graus 1, 2 e 3 de acordo com seu grau de malignidade, além da incorporação de marcadores moleculares que auxiliam no diagnóstico, prognóstico e graduação dos meningiomas. O presente estudo foi realizado com o intuito de identificar biomarcadores capazes de indicar a presença da doença, bem como complementar as análises metabolômicas através da análise de mutações em p53, visando a identificação de marcadores que possam estar associados a tumores recidivantes. Para as análises metabolômicas, foram coletadas amostras de plasma de 51 pacientes portadores de meningioma e 50 indivíduos saudáveis devidamente pareados por idade e sexo. De acordo com os valores de massa/carga (m/z), as moléculas foram identificadas através da busca em bancos de dados de metabólitos e pesquisa na literatura científica. Dessa forma, os metabólitos selecionados com potencial para atuar como marcadores indicativos de meningioma incluem hidroximetiluracil (m/z 143), sulfatídeo (m/z 931) e gangliosídeo (m/z 1116). As análises dos valores de área sob a curva (AUC – *Area Under the Curve*) ROC para as moléculas identificadas mostraram um excelente potencial do metabólito hidroximetiluracil (AUC = 0,93) em indicar a presença de meningioma. Para as análises de polimorfismos em p53, foi utilizada a técnica tetra-primer ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*) para detecção das mutações R248Q e R273H, visando estabelecer uma possível correlação entre os polimorfismos e a recidiva tumoral. Todos os pacientes analisados apresentaram genótipo homozigoto G/G (selvagem) para ambos os polimorfismos estudados, sugerindo o não envolvimento das mutações nas recidivas da doença.

ABSTRACT

Meningiomas (MGM) represent the most common primary central nervous system tumors, accounting for around 36% of all cases. According to the World Health Organization, meningiomas are histologically classified according to their malignancy levels in tumoral grades 1, 2 and 3, besides the incorporation of molecular biomarkers to aid meningiomas diagnosis, prognosis, and classification. The present study aimed to identify potential tumor related biomarkers, as well as biomarkers that might be associated with tumor recurrence through analysis of p53 mutations in meningioma patients. For the metabolomics analysis, blood plasma was collected from 51 meningiomas patients and 50 healthy individuals properly matched by gender and age. According to the mass-to-charge (m/z) ratios, the molecules were identified through research at the metabolites databases and the scientific literature. The selected metabolites with potential to act as meningioma biomarkers include hydroxymethyluracil (m/z 143), sulfatide (m/z 931), and ganglioside (m/z 1116). The analyses of the area under the ROC curves of the identified molecules suggested an excellent potential for hydroxymethyluracil (AUC = 0.93) to indicate presence of meningioma. For the p53 polymorphisms analysis, a tetra-primer ARMS-PCR method was performed for the detection of R248Q and R273H mutations, aiming to establish the potential role of the polymorphisms at tumor recurrence. All patients analyzed presented a homozygous G/G genotype (wild-type) for both polymorphisms, suggesting no involvement of the mutations in tumor recurrence.

1. Introdução

1.1. *Meningiomas*

Os meningiomas representam o tipo de tumor primário intracraniano mais comum, correspondendo a cerca de 36% dos casos (BENSON et al., 2008; FATHI; ROELCKE, 2013; WANG; OSSWALD, 2018). Originam-se a partir das células aracnoides das leptomeninges (MASHAYEKHI; SABERI; MASHAYEKHI, 2018; WIEMELS; WRENSCH; CLAUS, 2010), sendo a maioria benigno (FATHI; ROELCKE, 2013; MAROSI et al., 2008) e de crescimento lento (BENSON et al., 2008; BUERKI et al., 2018). Ocorrem principalmente entre os 60 e 70 anos (LAMSZUS, 2004; MAROSI et al., 2008; WANG; OSSWALD, 2018), aumentando a probabilidade de desenvolvimento com o aumento da idade (WIEMELS; WRENSCH; CLAUS, 2010). Geralmente, são tumores altamente vascularizados, com maior predisposição de ocorrer em mulheres (BENSON et al., 2008; BUERKI et al., 2018; FATHI; ROELCKE, 2013; LAMSZUS, 2004; MAROSI et al., 2008; WANG; OSSWALD, 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os meningiomas são classificados em graus 1, 2 e 3 a partir de critérios histológicos. Os meningiomas grau 1, também chamados de benignos, correspondem a 80-90% dos casos de meningioma (FATHI; ROELCKE, 2013; MASHAYEKHI; SABERI; MASHAYEKHI, 2018) e costumam apresentar crescimento lento (BENSON et al., 2008; MAROSI et al., 2008), podendo haver mitoses ocasionais e núcleos pleomórficos (LAMSZUS, 2004). Apresentam bom prognóstico, com taxa de recorrência entre 7% e 25% (LAMSZUS, 2004; WANG; OSSWALD, 2018), e baixo risco de apresentar comportamento agressivo. Nos meningiomas grau 2, ou atípicos, são observados atividade mitótica aumentada ou pelo menos três dos seguintes critérios patológicos: aumento da celularidade, células pequenas com elevada razão núcleo/citoplasma, nucléolo proeminente, focos de necrose espontânea e laminação. Porém, caso haja invasão do tecido cerebral, mesmo na ausência das demais características, o tumor pode ser classificado como grau 2. As taxas de prevalência e recorrência dos meningiomas grau 2 são, respectivamente, 20-25% e 29-52%. Por fim, os meningiomas grau 3, ou anaplásicos, apresentam

atividade mitótica excessivamente elevada, necrose extensiva, metástase, altas taxas de invasão cerebral e características de malignidade muito além das anormalidades dos tumores atípicos. São tumores malignos, com prognóstico desfavorável e representam de 1 a 3% dos meningiomas, com recorrência entre 50 e 94% dos casos (FATHI; ROELCKE, 2013; LAMSZUS, 2004; MAROSI et al., 2008; WANG; OSSWALD, 2018). Apesar de serem tumores predominantemente benignos, os meningiomas de alto grau apresentam taxas de mortalidade relativamente elevadas, com estimativas de 10 anos de sobrevida em torno de 53% para tumores anaplásicos e 0% para tumores malignos (MAGGIO et al., 2021), ressaltando a importância do diagnóstico assertivo e da correta caracterização dos graus da doença para o prognóstico dos pacientes.

Além dos critérios anatomopatológicos, foram incorporados biomarcadores moleculares à última classificação dos tumores de Sistema Nervoso Central provida pela OMS (LOUIS et al., 2021), auxiliando tanto na classificação mais acurada dos tumores quanto no fornecimento de informações diagnósticas e prognósticas mais precisas a respeito da doença. De acordo com a nova classificação, entre os principais marcadores moleculares que podem ser utilizados no diagnóstico e graduação dos meningiomas estão NF2, SMARCE1, BAP1, mutações KLF4/TRAF7, perfil de metilação do DNA, mutação do promotor TERT e deleção homozigota de CDKN2A/B (LOUIS et al., 2021). Dentre os marcadores moleculares, dois apresentam evidências que permitem a associação com o grau histológico do tumor e prognóstico do paciente: mutação do promotor TERT e deleção homozigota de CDKN2A/B, sendo a detecção de um deles suficiente para o diagnóstico de meningioma maligno (NASRALLAH; ALDAPE, 2023).

O gene TERT codifica a subunidade catalítica da telomerase, cuja atividade permanece silenciada na maioria dos tecidos (BELL et al., 2016). Porém, mutações em sua região promotora aumentam a expressão do gene e, consequentemente, contribuem com a imortalização de células cancerígenas através da elongação constante de seus telômeros (SAHM et al., 2016), uma das principais características da tumorigênese (HEIDENREICH; KUMAR, 2017). Mutações na região promotora de TERT já foram associadas à maiores probabilidades de recidiva, tanto

em pacientes portadores de meningiomas graus 1 e 2 quanto naqueles portadores de meningiomas malignos, revelando uma prognosticação independente dos critérios histológicos adotados pela Organização Mundial da Saúde (MIRIAN et al., 2020; SAHM et al., 2016), além de estarem diretamente associadas a maiores riscos de progressão tumoral (GOUTAGNY et al., 2014) e menor sobrevivência (MIRIAN et al., 2020), com a frequência das mutações aumentando de acordo com a idade e o grau de malignidade da doença (KOELSCHE et al., 2013). Dessa forma, o status do promotor TERT apresenta bom potencial para ser utilizado como ferramenta prognóstica nos meningiomas, atuando na identificação de subgrupos com menor tempo para recorrência e sobrepondo-se às limitações intrínsecas à classificação histológica dos tumores (SAHM et al., 2016).

Os genes CDKN2A e CDKN2B, localizados no cromossomo 9p21, são importantes supressores tumorais frequentemente mutados em diversos cânceres humanos e responsáveis por codificar as proteínas p16 e p15, respectivamente, que atuam como reguladoras da transição G₁/S no ciclo celular (BOSTROM et al., 2001; RUAS; PETERS, 1998). Deleções homozigotas em CDKN2A/B são frequentemente encontradas em meningiomas anaplásicos e raramente presentes nos tumores benignos e atípicos, revelando uma possível participação na progressão da doença (BOSTROM et al., 2001; GOUTAGNY et al., 2010; PERRY et al., 2002; WEBER et al., 1997). Ainda, a alterações genômica em questão já foi associada a tumores com caráter de maior malignidade e, consequentemente, pior prognóstico, como maiores probabilidades de recidivas e menor sobrevivência (GUYOT et al., 2019; PERRY et al., 2002; SIEVERS et al., 2020). Dessa forma, a detecção de mutações em 9p21 tem potencial para atuar como um marcador prognóstico independente na identificação de meningiomas mais agressivos e com tendência a recidivas mais precoces (SIEVERS et al., 2020). Assim, com essa nova abordagem histopatológica e molecular para aplicação clínica, observa-se que a busca por marcadores moleculares mais assertivos e de fácil análise se torna cada vez mais necessária.

Além dos métodos analíticos laboratoriais supracitados para classificação tumoral, os principais métodos radiológicos para diagnóstico de meningioma são a

ressonância magnética (RM) e a tomografia computadorizada (TC). Devido à alteração da barreira hematoencefálica nos meningiomas, as imagens obtidas por RM apresentam forte contraste; porém, não permitem determinar o grau histológico e o potencial de crescimento tumoral. Já nas imagens por TC, são obtidas informações sobre a hiperostose, destruição óssea e infiltração causadas pela doença, além de detectar calcificação tumoral, um prognóstico de crescimento lento, especialmente em pacientes mais velhos. Portanto, para um bom planejamento a respeito da melhor opção de tratamento, a combinação de ambos os métodos parece ser a melhor escolha (BUERKI et al., 2018; FATHI; ROELCKE, 2013; MAROSI et al., 2008; WANG; OSSWALD, 2018).

Meningiomas assintomáticos são, na maioria, descobertos de forma incidental, e geralmente são acompanhados através de exames rotineiros de imagem. São direcionados para tratamento quando surgem os primeiros sintomas, ou quando se detecta crescimento considerável ou invasão de tecidos adjacentes, situações em que o tratamento recomendado é a ressecção cirúrgica e/ou radioterapia. Outra opção de tratamento é a terapia sistêmica, recomendada apenas para meningiomas recidivos quando cirurgia e radioterapia não são possíveis. Devido à alta vascularização, uma opção de tratamento sistêmico promissor é a inibição da angiogênese pelo interferon (IFN), capaz de inibir a proliferação das células do meningioma in vitro (BUERKI et al., 2018; MAROSI et al., 2008; WANG; OSSWALD, 2018).

Embora as opções de tratamento, de forma geral, sejam capazes de ajudar os pacientes, as chances de cura aumentam quanto mais precoce for o diagnóstico. Porém, as técnicas atualmente disponíveis para diagnóstico e identificação de graus de tumores são dispendiosas e podem não indicar precocemente a progressão da doença para estágios de maior malignidade (BUERKI et al., 2018; NOWOSIELSKI et al., 2017). Visando o entendimento das alterações metabólicas que possam estar associadas ao processo de formação de meningiomas, a identificação de biomarcadores surge como uma possível ferramenta com potencial para indicar presença da doença, os quais podem ser detectados através de diferentes técnicas, dentre elas a metabolômica.

1.2. *Metabolômica*

Metabólitos são moléculas de baixo peso molecular (< 1500 Da) produzidas pelo metabolismo das células dos sistemas biológicos e responsáveis por desempenhar diversas funções, como transdução de sinais e produção de energia, por exemplo. Por serem capazes de fornecer informações sobre os organismos e definirem seus fenótipos frente a mudanças genéticas ou ambientais, há o interesse em determinar suas funções específicas e entender seus papéis biológicos (JOHNSON; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016; KIM et al., 2016). O estudo do conjunto de metabólitos que compõem as células, tecidos e fluidos biológicos (metaboloma) é denominado Metabolômica. Quando comparados aos genes e proteínas, os metabólitos apresentam maior facilidade para serem rastreados devido às suas características estruturais mais simples e pelo fato de estarem prontamente disponíveis para detecção, graças à ampla disponibilidade dessas moléculas nos organismos (GUIJAS et al., 2018). Além disso, por basear-se na análise de metabólitos, a metabolômica representa a ciência “ômica” que mais se aproxima dos fenótipos dos organismos estudados (GUIJAS et al., 2018). Trata-se de uma técnica rápida e eficaz na seleção de metabólitos envolvidos em doenças humanas, o que os torna biomarcadores com potencial para a detecção de distúrbios, até mesmo no estágio pré-doença. A técnica já vem sendo usada para identificação de moléculas em diferentes situações, tanto para estudos de biologia de sistemas, quanto para detecção de biomarcadores que possam estar relacionados a determinadas doenças metabólicas (LI et al., 2017), como diabetes (WANG et al., 2011), obesidade (NI et al., 2015) e cânceres (MEDINA et al., 2014). A partir da identificação de biomarcadores pela metabolômica, abrem-se novas oportunidades para o desenvolvimento de diferentes alternativas em saúde, como novos testes diagnósticos, novos fármacos e terapias para prevenção de doenças crônicas, bem como tratamentos individuais e personalizados de acordo com os fenótipos dos pacientes, buscando a melhor resposta metabólica do organismo (JOHNSON; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016; MEDINA et al., 2014).

Na tentativa de identificar novos biomarcadores, a metabolômica exploratória (ou metabolômica sem alvo específico) vem contribuir com a identificação da maior

quantidade possível de metabólitos, visando a seleção de moléculas importantes de acordo com a condição de cada amostra. Para tais análises, a principal ferramenta analítica utilizada é a espectrometria de massas, uma técnica bastante sensível para detecção de moléculas em amostras biológicas, como urina ou plasma/soro sanguíneos, os quais podem ser obtidos por meios minimamente invasivos e que apresentam grandes quantidades de metabólitos detectáveis (CHEN et al., 2023; GUIJAS et al., 2018; KIM et al., 2016; MEDINA et al., 2014). Particularmente, o plasma/soro sanguíneo, por irrigarem a maioria dos tecidos, apresenta moléculas representativas de diversas patologias que ainda não se manifestaram clinicamente, evidenciado um ótimo exemplo do potencial de aplicação das análises em biópsia líquida na rotina laboratorial. A espectrometria, trata-se, portanto, de uma técnica útil para identificar biomarcadores e gerar hipóteses, sendo que os marcadores poderão ser futuramente utilizados no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos ou até mesmo se tornar alvos terapêuticos.

1.3. *Metabolismo e TP53*

Alterações metabólicas são muito comuns em células tumorais e apresentam um importante papel na manutenção do câncer, através da ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais. Diante disso, o estudo de como as vias bioquímicas são controladas vem revelando contribuições interessantes de oncoproteínas e proteínas supressoras tumorais bem conhecidas, como a p53. O gene TP53 é o gene mais comumente mutado nos cânceres humanos (~50%) e suas principais funções incluem a regulação da divisão celular, manutenção da estabilidade genômica e indução de apoptose e senescência, desempenhando, portanto, um importante papel na regulação metabólica das células (LIU et al., 2019; MAO; JIANG, 2023; WANG; STRASSER; KELLY, 2022). Nesse contexto, alterações no gene TP53 que levem à disfunção da proteína são as mais comumente encontradas nos cânceres humanos (LEVINE, 2020). Cerca de 70% das mutações observadas em TP53 são mutações *missense*, ou seja, a substituição de um único nucleotídeo dentro da sequência codificadora da proteína (KLEMKE et al., 2021), resultando na regulação dominante negativa da proteína p53 selvagem pela proteína

mutada (DONEHOWER et al., 2019). Além disso, algumas mutações *missense* em p53 foram associadas a ganho de funções oncogênicas (MULLER; VOUSDEN, 2013, 2014).

Cerca de 80% das mutações *missense* da proteína p53 ocorrem no domínio de ligação ao DNA, sendo que 25% delas são encontradas nos códons 175, 245, 273, 248 e 249 (FULCI; VAN MEIR, 1999; SUN et al., 2020). Os polimorfismos de interesse, localizados nos códons *hotspots* 248 e 273, são ambos bem estudados em diversos tumores e já tendo sido associados a características de maior malignidade e agressividade, como proliferação, maior predisposição à metástase, migração, caráter invasivo, resistência contra fármacos e diminuição da sobrevivência (GAO et al., 2022; KLEMKE et al., 2021; LI et al., 2014; NAKAZAWA et al., 2019; SCHULZ-HEDDERGOTT et al., 2018; SUN et al., 2020; WANG et al., 2015).

Embora estudos a respeito do papel de p53 em meningiomas sejam escassos, diferentes autores relataram a superexpressão da proteína nesses tumores, podendo haver uma relação direta entre a expressão de p53, o grau histológico e a taxa de recorrência do tumor (AMATYA et al., 2001; CHO et al., 1999; CHOZICK et al., 1996; KAMEI et al., 2000; OHKOUDO et al., 1998; RAO et al., 2009), indicando a possibilidade da proteína p53 ser utilizada como um marcador para transformação maligna em meningiomas (WANG et al., 1995). Além disso, a expressão de p53 também se mostrou útil para identificação de meningiomas que, apesar de serem classificados histologicamente como benignos, apresentaram recidivas tumorais associadas à superexpressão da proteína e características de malignidade (RAO et al., 2009). Embora a possível mutação não tenha sido investigada nesses casos, a proteína pode se acumular por se tratar de uma molécula anormal e estável, provocado possivelmente por mutação no gene TP53 (PAVELIN et al., 2013; RAO et al., 2009). A proteína p53 mutada pode apresentar maior estabilidade devido à ligação com proteínas do maquinário das chaperonas, que inativam outras proteínas envolvidas na degradação mediada por proteassomos, como a MDM2. Dessa forma, há o acúmulo de p53 mutada com funções oncogênicas (MANTOVANI; COLLAVIN; DEL SAL, 2019; SCHULZ-HEDDERGOTT; MOLL, 2018; WIECH et al., 2012). Logo, o acúmulo da proteína pode ser uma indicação de mutação em

TP53.

Além das alterações quantitativas e constitutivas representarem fatores importantes no câncer, também podem impactar a resposta e a regulação celular frente a situações de estresse metabólico, ou até mesmo contribuir para alterações em vias metabólicas associadas à tumorigênese, pois a p53 também tem surgido como um importante protagonista no metabolismo celular (VOUSDEN; RYAN, 2009). Resultados do nosso grupo de pesquisa (KUROKAWA et al., 2023 – **Anexo II**) sugerem que alterações no metabolismo das ceramidas estão associadas à pior prognóstico em pacientes com meningioma (MGM), as quais foram encontradas em indivíduos MGM graus 2 e 3. Alguns pesquisadores têm investido esforços para desvendar a possível associação entre a proteína p53 e a ceramida. De fato, os níveis intracelulares de ceramida parecem ser regulados de forma dependente de p53 (DBAIBO et al., 1998). Ainda, a formação de ceramida e consequente indução de morte celular parecem depender da proteína p53 funcional (KIM et al., 2002; SAWADA et al., 2001), indicando que mutações *missense* em p53 podem prejudicar os processos de formação de ceramida e de indução de apoptose de células tumorais. Sendo assim, a superexpressão da proteína selvagem aparenta estar relacionada ao acúmulo do lipídio, desempenhando assim uma função supressora mais intensa (SAWADA et al., 2001). Se assim o for, resultados preliminares sugerem que TP53 possa apresentar mutações associadas ao menor controle do metabolismo de ceramidas, já que os resultados indicam perda de ceramidas nos maiores graus do tumor.

Considerando que o papel exato dos polimorfismos na fisiopatologia da doença e reincidência dos meningiomas ainda não está bem estabelecido, ressalta-se a importância desses dados para o entendimento da evolução da doença, uma vez que a detecção dessas mutações pode apresentar potencial como marcador de prognóstico para os pacientes. Portanto, as análises moleculares para detecção dos polimorfismos em *hotspots* de p53 nos indivíduos portadores de meningioma podem complementar as análises metabolômicas do plasma dos pacientes na busca por marcadores que indiquem a possibilidade de recidiva tumoral. A partir dessa verificação, é possível, em caso de correlação positiva, propor o uso de técnicas

moleculares para análise de mutação e potencial ferramenta prognóstica para meningiomas.

2. Hipótese

Pacientes portadores de meningioma apresentam alterações metabólicas relacionadas ao desenvolvimento da doença, as quais podem ser detectadas através de análises metabolômicas do plasma desses indivíduos, resultando na identificação de biomarcadores diferenciais indicativos da presença de meningioma. Além disso, mutações *missense* no gene TP53 podem estar associadas a maiores chances de recidivas nesses pacientes.

3. Justificativa

Considerando que o diagnóstico assertivo e a correta identificação dos graus de malignidade dos tumores do Sistema Nervoso Central são fundamentais para melhor definir a abordagem terapêutica, melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevida do paciente, métodos mais acessíveis, minimamente invasivos e capazes de identificar as fases iniciais do desenvolvimento da doença, bem como identificar assertivamente seu grau histopatológico, são necessários para o sistema de saúde. Para atender a esses critérios, a identificação de novos biomarcadores moleculares que indiquem a presença de meningioma é essencial para o entendimento das vias metabólicas que se encontram alteradas nos pacientes.

4. Objetivos

4.1. *Gerais*

Determinar o perfil de metabólitos diferenciais de pacientes portadores de meningioma comparado a um grupo de indivíduos saudáveis, visando a busca de marcadores capazes de indicar a presença da doença, possibilitando o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença. Ainda, detectar polimorfismos em p53, com o intuito de estabelecer possíveis correlações entre as mutações e o processo de recidiva dos tumores.

4.2. *Específicos*

- Análise do perfil de metabólitos em amostras de plasma de pacientes portadores de meningioma e de doadores saudáveis;
- Seleção e identificação dos principais marcadores diferenciais entre os grupos;
- Proposição das vias bioquímicas possivelmente envolvidas na fisiopatologia da doença;
- Detecção de polimorfismos em *hotspots* de TP53 nos pacientes portadores de meningioma e, em caso positivo, correlacioná-los com o processo de recidiva dos tumores.

5. Materiais e Métodos

5.1. *Casuística*

O presente estudo faz parte de um estudo prévio que já se encontra aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (parecer 4.896.170 – **Anexo I**). Para esta pesquisa, foram analisadas amostras de sangue periférico de 50 doadores saudáveis e 51 pacientes portadores de diferentes graus de meningioma (grau 1 = 43; grau 2 = 5; grau 3 = 3), pareados por idade e sexo, para a comparação dos perfis de metabólitos diferenciais. Além do sangue, o estudo propõe a análise por biologia molecular de tecido tumoral (n = 45) proveniente de biópsia durante a cirurgia de ressecção.

5.2. *Critérios de inclusão*

I – Presença ou suspeição de meningiomas com indicação neurocirúrgica formal; **II** – possibilidade de coleta de 4 mL de sangue total do paciente durante procedimento cirúrgico, sem prejuízo ao paciente ou outros exames necessários; **III** – possibilidade de coleta de fragmentos tumorais (3 mm³) durante o procedimento cirúrgico, sem que haja qualquer prejuízo ao exame histopatológico ou a outros que porventura sejam necessários; **IV** – expresso entendimento e concordância em participar do estudo, manifestada pelo paciente ou pelo seu responsável legal, previamente à cirurgia, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.3. *Critérios de exclusão*

I – Pacientes que reconhecidamente apresentarem neoplasias de origens diversas às previamente estabelecidas; **II** – pacientes com tumores primários do SNC recidivantes previamente tratados com radioterapia e/ou quimioterapia de qualquer modalidade; **III** – pacientes com tumores pequenos, dos quais se obtenha material escasso ou insuficiente para o estudo histopatológico e/ou outros exames necessários; **IV** – pacientes ou responsáveis legais que não tenham conseguido compreender suficientemente as diretrizes da pesquisa ou que tenham se negado a participar do estudo, conforme estabelecido no Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLE).

5.4. *Preparo da amostra*

Para a análise metabolômica, o sangue dos participantes foi coletado em tubo contendo EDTA (1,5 mg/mL de sangue) e submetido à centrifugação para coleta do plasma. Em seguida, o plasma foi submetido à extração dos metabólitos, sendo que 20 µL de cada amostra foram diluídos em 200 µL de Tetrahidrofurano (THF) e 780 µL de Metanol grau HPLC. Essa solução foi centrifugada e o sobrenadante novamente diluído na proporção de 1:9 em Metanol grau HPLC (q.s.p. 500 µL) e homogeneizada. Para a ionização química desta solução final foi adicionado ácido fórmico (grau analítico) a 0,1%, conforme descrito por MELO et al. (2017).

5.5. *Análise do perfil de metabólitos por espectrometria de massas*

Após a extração dos metabólitos e ionização, as amostras foram diretamente injetadas no equipamento ESI-LTQ-XL (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) de acordo com os seguintes parâmetros: fluxo da amostra de 10 µL/min, temperatura do capilar de 180 °C, 7kV de tensão no spray e gás de arraste em 2 unidades arbitrárias. A análise foi realizada no modo positivo, sendo que a faixa de massa utilizada abrangeu 100-1400 m/z e foram feitas 10 replicatas analíticas para cada replicata biológica. Para a aquisição e processamento dos dados no espectrômetro, foi utilizado o software XCalibur (v. 2.4, Thermo Scientific, San Jose, CA). A partir da seleção das relações massa/carga pela análise estatística, os marcadores foram submetidos à fragmentação (espectrometria de massas *in tandem*) para verificação estrutural, utilizando para tal o software Mass Frontier (v. 6.0, Thermo Scientific, San Jose, CA). Esta análise foi a base para a verificação da identidade molecular, definida a partir de consultas a bancos de dados especializados, como METLIN, *Human Metabolome Database* (HMDB) e LIPID MAPS, e consultas à literatura científica, permitindo a proposição de vias bioquímicas relacionadas à fisiopatologia da doença e o melhor entendimento dos processos fisiopatológicos responsáveis pelo desenvolvimento dos meningiomas.

5.6. Análise estatística

Devido às diferenças de metabólitos entre os grupos, as amostras foram analisadas *in silico* utilizando ferramentas de biologia de sistemas, dentre elas a plataforma MetaboAnalyst 5.0 (PANG et al., 2021). O poder preditivo dos marcadores foi determinado utilizando a ferramenta estatística PLS-DA, que visa a separação dos grupos de acordo com os marcadores diferenciais. A seleção dos marcadores foi realizada com base nos valores de $p < 0,05$ (definido para o teste-T), *VIP* Score e de Fold Change (FC). A partir da curva ROC gerada para o grupo de metabólitos identificados foi possível confirmar o potencial discriminatório dos mesmos através da análise dos valores de área sob a curva (AUC – *Area Under the Curve*), interpretados da seguinte maneira (NAHM, 2022):

$AUC = 0,5$	➔	resultado aleatório; não há discriminação;
$0,6 \leq AUC < 0,7$	➔	baixo poder discriminatório;
$0,7 \leq AUC < 0,8$	➔	poder discriminatório razoável;
$0,8 \leq AUC < 0,9$	➔	bom poder discriminatório;
$0,9 \leq AUC \leq 1$	➔	poder discriminatório excelente.

5.7. Análise de polimorfismos em p53

O tecido tumoral ($n = 45$) dos pacientes cujas amostras de plasma foram analisadas pelas técnicas metabolômicas foi submetido à extração de DNA utilizando o kit DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi avaliado quanto à pureza e concentração através de espectrofotometria por meio de NanoDrop ND-1000. Os polimorfismos G743A e G818A (nucleotídeos 743 e 818, com alteração de uma guanina para um adenina) presentes, respectivamente, nos *hotspots* R248Q [NM_000546.6(TP53):c.743G>A (p.Arg248Gln)] e R273H [NM_000546.6(TP53):c.818G>A (p.Arg273His)] (aminoácidos 248 e 273, com alteração de arginina para, respectivamente, glutamina e histidina) foram avaliada pela técnica tetra primer ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*).

Para R248Q, os primers externos (outer) Forward –	
5'ACTCCAGCCTGGGCGACAG3'	e Reverse –

5'TAAGAGGTGGGCCCAGGGG 3' amplificaram um segmento comum a todas as amostras de DNA de 313 pb, atuando como o controle positivo para a reação. Já os primers internos (*inner*) *Forward* – 5'CATGGGCGGCATGAAACG 3' e *Reverse* – 5' ATGGTGAGGATGGGCCGCT 3' amplificaram fragmentos alelo-específicos de, respectivamente 140 pb em indivíduos selvagens (alelo G) e 210 pb em indivíduos mutados (alelo A). A PCR foi realizada em volume final de reação de 20 µL, contendo 1 pmol de cada primer externo, 10 pmol de cada primer interno, 0,15 mM de dNTP, 1,875 mM de MgCl₂ e 0,75 U de *Taq* polimerase. A solução foi incubada por 2 minutos a 95 °C, seguido por 36 ciclos de 1 minuto de desnaturação (95 °C), 1 minuto de anelamento (62 °C) e 1 minuto de extensão (72 °C), além de uma etapa adicional de extensão por 2 minutos a 72 °C.

Da mesma forma, para R273H, os primers externos *Forward* – 5'TCCTTACTGCTCCCACTCAG 3' e *Reverse* – 5'GCATAACTGCACCCTTGGT 3' amplificaram fragmentos comuns de 392 pb, enquanto os primers internos *Forward* – 5'GGAACAGCTTTGAGGTTTCG 3' e *Reverse* – 5'CCAGGACAGGCACAAAAT 3' amplificaram fragmentos de 172 pb e 258 pb, respectivamente. A PCR foi realizada em volume final de reação de 20 µL, contendo 1 pmol de cada primer externo, 5 pmol de cada primer interno, 0,15 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂ e 0,75 U de *Taq* polimerase. A solução foi incubada por 2 minutos a 95 °C, seguido por 37 ciclos de 1 minuto de desnaturação (95 °C), 1 minuto de anelamento (60 °C) e 1 minuto de extensão (72 °C), além de uma etapa adicional de extensão por 2 minutos a 72 °C.

Após a ciclagem, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) para visualização dos padrões de bandas. Os dados das mutações foram analisados com estatística descritiva, com dados de frequência e porcentagem para as variáveis qualitativas.

6. Resultados

6.1. Características epidemiológicas

Os dados epidemiológicos dos grupos estudados estão dispostos na **Tabela 1**. O grupo CT foi composto por 50 indivíduos saudáveis entre 18 e 64 anos (média de

37 anos), sem comorbidades. O grupo MGM foi composto por 18 (35,3%) pacientes do sexo masculino e 33 (64,7%) pacientes do sexo feminino entre 27 e 85 anos (média de 52,8 anos), portadores de diferentes graus de meningioma. Dentre os 51 pacientes, 42 (82,4%) eram portadores de meningioma grau 1, 6 (11,8%) apresentavam meningioma grau 2, e 3 (5,8%) pacientes eram portadores de meningioma grau 3. A incidência de meningioma foi 1,8 vez maior nos indivíduos do sexo feminino do que nos indivíduos do sexo masculino.

Tabela 1. Características epidemiológicas dos grupos meningioma (MGM) e controle (CT).

	<i>MGM (%)</i>	<i>CT (%)</i>
<i>Sexo masculino</i>	18 (35,3)	33 (66)
<i>Sexo feminino</i>	33 (64,7)	17 (34)
<i>Média de idade (anos)</i>	52,8	37

6.2. *Perfil diferencial de metabólitos*

Visando a seleção de biomarcadores diferenciais com potencial para indicar a presença da doença, a análise dos dados de espectrometria de massas por PLS-DA permitiu estabelecer uma clara separação entre os pacientes portadores de meningioma (MGM) dos indivíduos saudáveis (CT) (**Figura 1**).

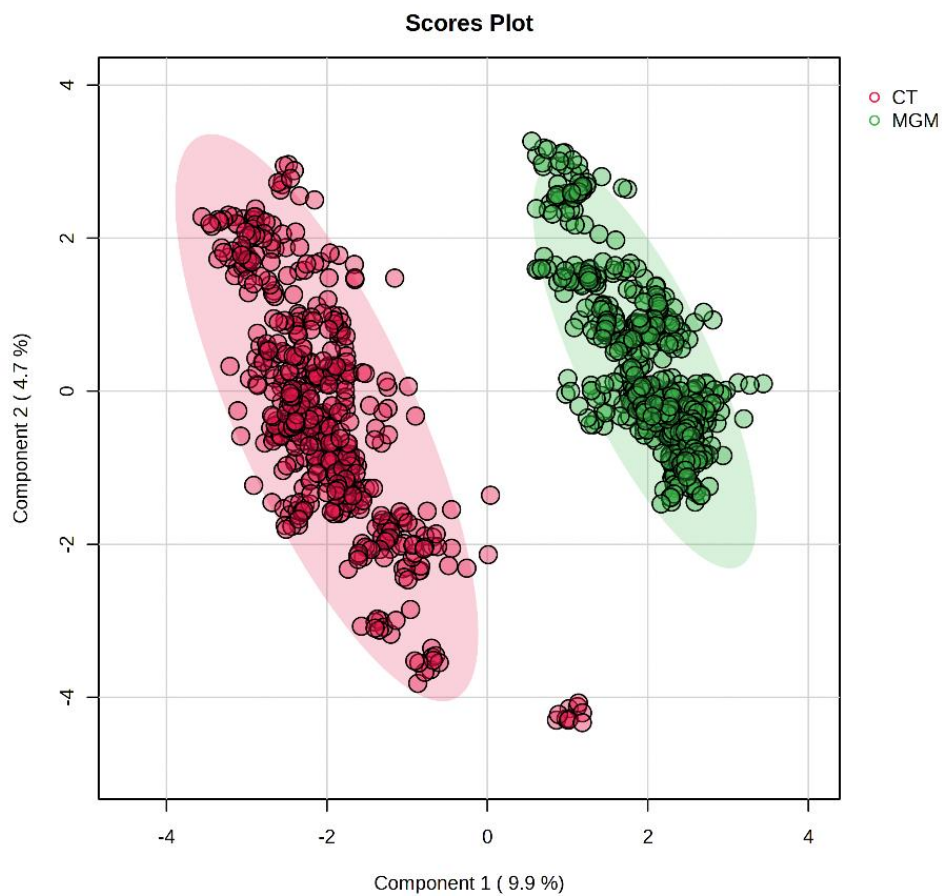


Figura 1. Análise dos marcadores por PLS-DA mostrando uma clara separação entre indivíduos portadores de meningioma (MGM) e indivíduos controle saudáveis (CT).

Ainda, foi possível identificar os marcadores responsáveis pela diferenciação dos grupos com base no *VIP Score* (**Figura 2**), ou seja, aqueles marcadores que apresentaram maior importância na distinção dos pacientes entre indivíduos com a doença e indivíduos saudáveis controle, em que *VIP Score* $\geq 2,5$. Os valores de *m/z* dos metabólitos mais relevantes para o grupo MGM correspondem a 143, 1116, 102, 819, 931 e 181.

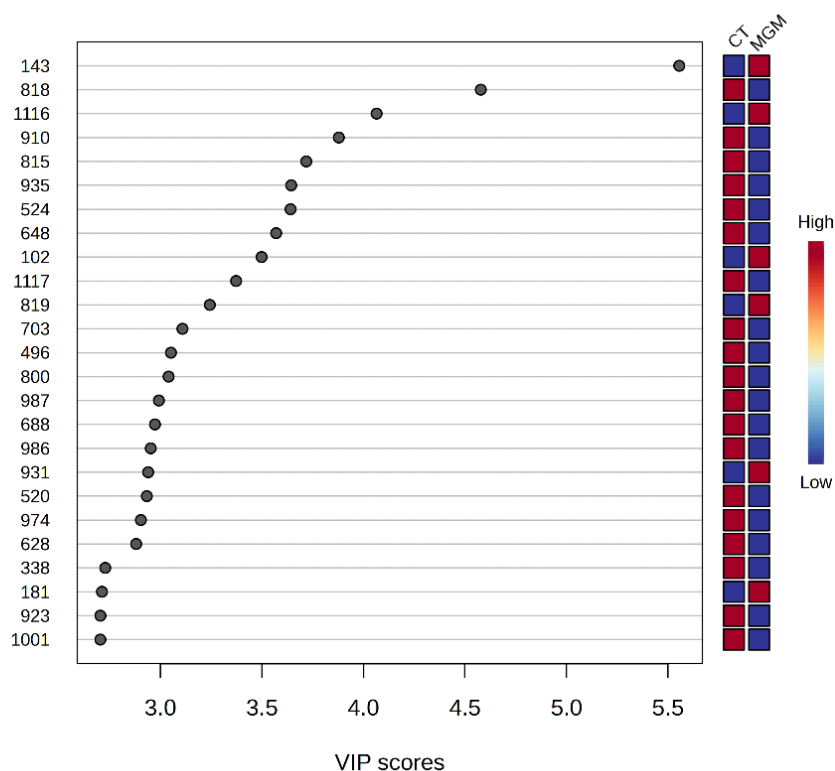


Figura 2. Marcadores selecionados pela análise de PLS-DA, de acordo com o *VIP Score* (Variable Importance in Projection Score). De acordo com o espectro de cores lateral, os marcadores mais relevantes para cada um dos grupos estão marcados em vermelho, e aqueles menos importantes, em azul.

Os metabólitos também foram selecionados de acordo com a medida de Fold Change (FC) entre indivíduos portadores de meningioma e indivíduos controle (MGM/CT). O Fold Change representa a razão das intensidades dos metabólitos entre os grupos de interesse, nesse caso, indivíduos portadores de meningioma e indivíduos saudáveis (MGM/CT) (PACHOLEWSKA, 2017). Ou seja, essa medida indica quantas vezes a intensidade de um determinado metabólito encontra-se aumentada ou diminuída nos indivíduos doentes em relação aos indivíduos

saudáveis. Foram escolhidos os marcadores com $\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 2$, ou seja, aqueles marcadores cujas intensidades eram pelo menos quatro vezes maiores ($\text{FC} \geq 4$) nos indivíduos portadores de meningioma do que naqueles que não portavam a doença. Os valores de m/z selecionados foram: 172, 102, 124, 180, 1116, 168 e 999. Os valores de FC, $\text{Log}_2(\text{FC})$ e VIP Score, tanto dos marcadores selecionados com base no VIP ($\text{VIP} \geq 2,5$) quanto daqueles selecionados utilizando o Fold Change ($\text{FC} \geq 4$), estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Valores de Fold Change, $\text{Log}_2(\text{FC})$ e VIP Score das moléculas com potencial para indicar presença de meningioma. Inicialmente, foram selecionados como possíveis marcadores diferenciais aqueles com $\text{VIP} \geq 2,5$ e/ou Fold Change $\geq 4,0$.

Massa/Carga (m/z)	Fold Change (FC)	$\text{Log}_2(\text{FC})$	VIP Score
172	10,997	3,459	2,5475
102	10,597	3,4056	3,4985
124	9,2958	3,2166	2,3053
180	6,4969	2,6998	0,40341
1116	5,235	2,3882	4,0649
168	4,9673	2,3125	1,1087
999	4,4057	2,1394	2,0814
931	3,9678	1,9883	2,9398
143	2,5443	1,3473	5,5556
819	2,435	1,2839	3,2434
181	2,0098	1,0071	2,7122

Para analisar a significância estatística dos marcadores selecionados com base nos valores de VIP e FC, foi gerado um gráfico Volcano Plot (**Figura 3**; $p < 0,05$; Fold Change $\geq 2,5$) através da plataforma MetaboAnalyst 5.0. O Volcano Plot tem como finalidade demonstrar visualmente se há diferenças significativas em grandes conjuntos de dados gerados por experimentos repetidos, com os pontos de maior interesse estatístico localizados na parte superior do gráfico e mais distantes do centro (CUI; CHURCHILL, 2003; FERRETTI, 2015; LI, 2012). Uma vez que os marcadores foram analisados com base nas suas intensidades em indivíduos portadores de meningioma em relação aos indivíduos saudáveis (MGM/CT), os valores de m/z localizados à direita representam os marcadores de maior importância para o grupo MGM, dos quais foram destacados aqueles com valor de $p < 0,05$ e $\text{FC} \geq 2,5$.

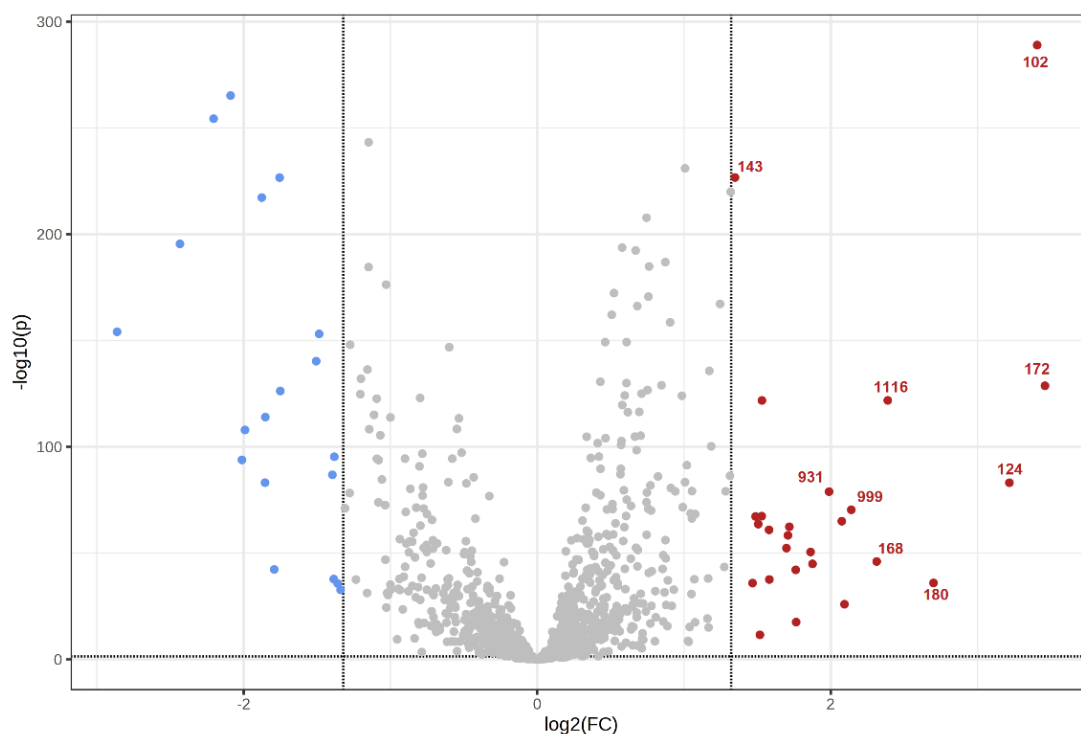


Figura 3. Gráfico Volcano Plot para os valores de m/z selecionados como potenciais marcadores para meningioma. Foram destacados aqueles em que $p < 0,05$; Fold Change $\geq 2,5$; $\text{Log}_2(FC) \geq 1,322$.

A fim de selecionar os principais marcadores diferenciais e verificar seu potencial em distinguir assertivamente pacientes portadores de MGM dos indivíduos saudáveis, gerou-se a curva ROC com intervalo de confiança de 95% (**Figura 4**) para os marcadores com $VIP > 2,5$ e $FC > 2,5$, sendo seus valores de massa/carga: 172, 102, 1116, 931 e 143.

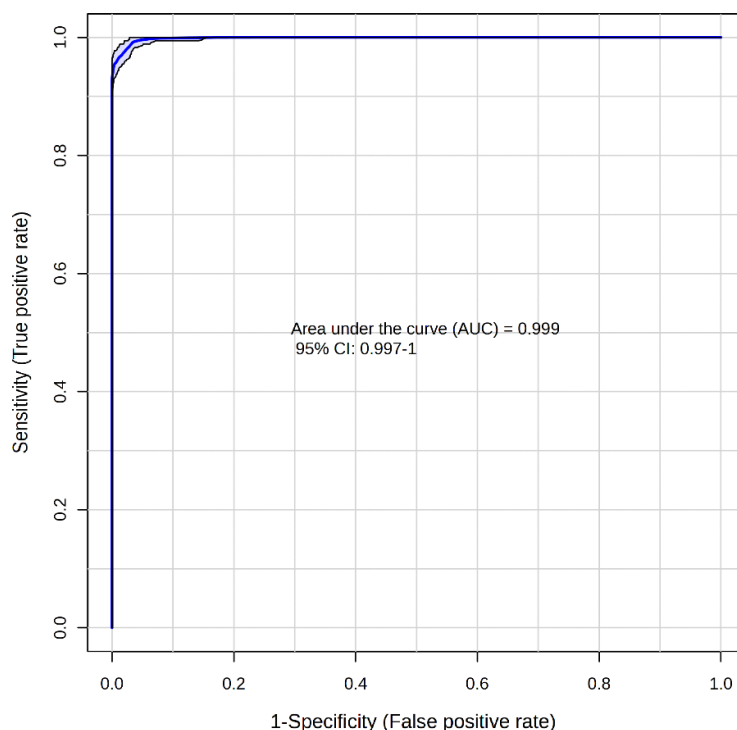


Figura 4. Curva ROC com intervalo de 95% de confiança para os metabólitos selecionados com base no $VIP > 2,5$ e $FC > 2,5$. Foram selecionados os marcadores com m/z 172, 102, 1116, 931 e 143.

Através da busca em bancos de dados especializados de metabólitos, como METLIN, LIPID MAPS e *Human Metabolome Database* (HMDB), e da pesquisa na literatura científica, foi possível determinar as possíveis identidades dos metabólitos a partir de seus valores de m/z selecionados. Por fim, realizou-se a análise por espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS), onde os metabólitos foram submetidos a fragmentação molecular e seus fragmentos foram comparados a fim de se certificar a respeito das identidades das moléculas selecionadas. A lista contendo as possíveis identidades dos metabólitos selecionados com potencial para indicar presença de meningioma, bem como seus padrões de fragmentação, estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Marcadores plasmáticos indicativos de presença de meningioma selecionados com base no VIP Score e Fold Change.

Massa (m/z)	ID Base de Dados	Metabólito	Fórmula	Adutos	MS/MS
172	-----	Não identificado	-----	-----	-----
102	-----	Não identificado	-----	-----	-----
1116	MID7148	Ganglioside GA2 (d18:1/18:0)*	C ₅₆ H ₁₀₄ N ₂ O ₁₈	[M + Na] ⁺	338-804-523-321-112/113
931	HMDB0000024	3-O-Sulfogalactosylceramide (d18:1/24:0)*	C ₄₈ H ₉₃ NO ₁₁ S	[M + K] ⁺	310-109-121-720-328-357-410-184
143	MID5456	5-Hydroxymethyluracil	C ₅ H ₆ N ₂ O ₃	[M + H] ⁺	116-111-117-97-125

Legenda: ID – identificador das bases de dados utilizadas para pesquisa de metabólitos. MID: METLIN; HMDB: *Human Metabolome Database*.
*(número de carbonos : ligações duplas).

6.3. Detecção de polimorfismos em p53

Dentre os 51 pacientes envolvidos no estudo, 6 não apresentaram tecido tumoral suficiente para extração do material genético; logo, foram excluídos da etapa de detecção de polimorfismos em p53. As demais amostras de tecido tumoral (n = 45) foram submetidas à amplificação pela técnica tetra-primer ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*) para detecção das mutações R248Q [NM_000546.6(TP53):c.743G>A (p.Arg248Gln)] e R273H [NM_000546.6(TP53):c.818G>A (p.Arg273His)], seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) para análise dos padrões de bandas e genotipagem dos indivíduos (**Figura 5**).

Das amostras de tecido tumoral analisadas para a presença dos polimorfismos R248Q e R273H no gene TP53, 45 (100%) apresentaram genótipo homozigoto G/G para ambos os polimorfismos, ou seja, todos os pacientes possuem o alelo selvagem, indicando a ausência das mutações de interesse na proteína p53. Representações das análises dos polimorfismos podem ser encontradas na **Figura 6**.

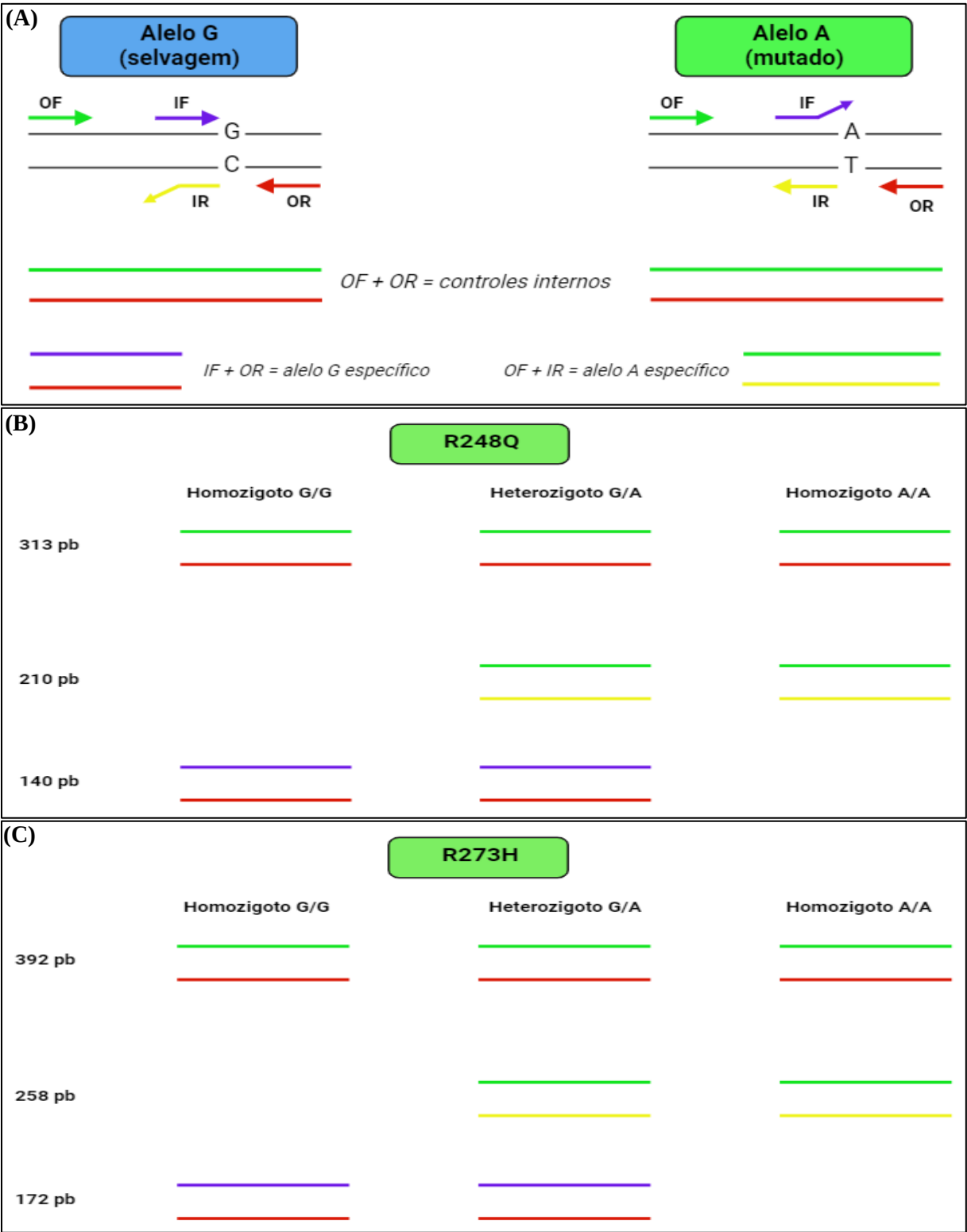


Figura 5. (A) Reação de amplificação por tetra-primer ARMS-PCR. Incompatibilidades (*mismatches*) intencionais nas extremidades 3' dos primers internos os tornam alelo-específicos, possibilitando a genotipagem dos indivíduos através da eletroforese em gel de poliacrilamida para presença ou ausência dos polimorfismos (B) R248Q e (C) R273H. **Abreviações:** OF: Outer Forward; OR: Outer Reverse; IF: Inner Forward; IR: Inner Reverse.

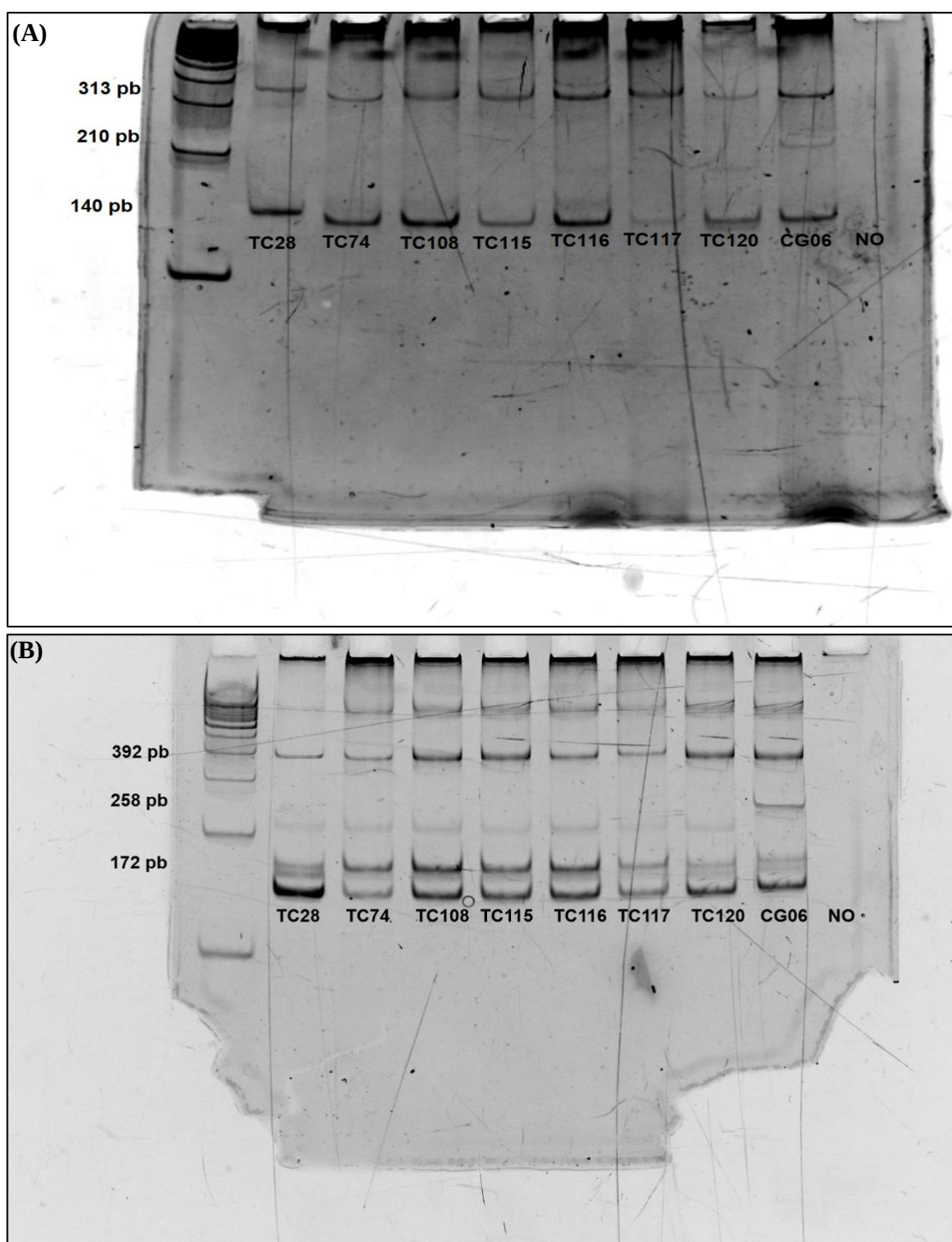


Figura 6. Gel de poliacrilamida (7%) para análise dos polimorfismos **(A)** R248Q e **(B)** R273H em p53. Da esquerda para a direita: DNA Ladder 100 pb; DNA amplificado a partir de amostras de meningioma (grau 1: TC120; grau 2: TC108, TC115, TC116 e TC117; e grau 3: TC28 e TC74); DNA amplificado de amostra de câncer gástrico (CG06) heterozigota para o polimorfismo (controle positivo); controle negativo da reação (NO).

7. Discussão

7.1. 5-Hidroximetiluracil

Dentre os metabólitos identificados com potencial para indicar presença de meningioma está o 5-hidroximetiluracil (5-hmU; $m/z = 143$), um metabólito gerado principalmente pela interação de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da **I**) oxidação/hidroxilação da timina, resultando na formação de 5-hmU pareada com adenina; e **II**) processos de desmetilação do DNA através da desaminação de 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), gerando 5-hmU mal pareada com guanina (OLINSKI; STARCZAK; GACKOWSKI, 2016). A formação de 5-hmU é um processo comum de lesão oxidativa causada por ROS; porém, sob condições fisiológicas, os mecanismos de reparo do DNA garantem baixas concentrações do metabólito (PAPALUCA et al., 2018) através do reconhecimento e remoção da 5-hmU por enzimas de reparo do DNA, como a 5-hmU-DNA glicosilase, restaurando o pareamento normal das bases e garantindo a integridade genética (BOORSTEIN; LEVY; TEEBOR, 1987; HOLLSTEIN et al., 1984; OLINSKI; STARCZAK; GACKOWSKI, 2016; PAPALUCA et al., 2018). Entretanto, esses processos podem levar a alterações mutagênicas importantes para o processo da tumorigênese, como a inativação da proteína p53 (ZUO; BOORSTEIN; TEEBOR, 1995), além de atuarem como marcadores epigenéticos (OLINSKI; STARCZAK; GACKOWSKI, 2016).

De fato, estudos sugerem o envolvimento do metabólito com o desenvolvimento de mutações genômicas uma vez que a ação da 5-hmU-DNA glicosilase mostrou-se de magnitude similar à atividade de outras enzimas atuantes no reparo de lesões potencialmente mutagênicas (BOORSTEIN; LEVY; TEEBOR, 1987). Além disso, foram constatados aumentos dos níveis séricos de 5-hmU em mulheres com maior predisposição para o desenvolvimento de cânceres de mama e colorretal (DJURIC et al., 2001; FRENKEL et al., 1998), bem como em mulheres portadoras de câncer de mama (DJURIC et al., 1996). Ainda, dados de metabolômica mostraram níveis plasmáticos aumentados do metabólito em pacientes portadores de glioblastoma quando comparados com o plasma de indivíduos sem o tumor (FERRASI et al., 2023). Juntos, esses dados suportam a hipótese do 5-hidroximetiluracil como

indicador de instabilidade genômica, destacando seu potencial para atuar como biomarcador plasmático para presença de meningiomas.

A curva ROC gerada para avaliar o modelo levando como base o metabólito 5-hidroximetiluracil é apresentada na **Figura 7A**, assim como a matriz de confusão (**Figura 7B**) e o poder preditivo do biomarcador (**Figura 7C**).

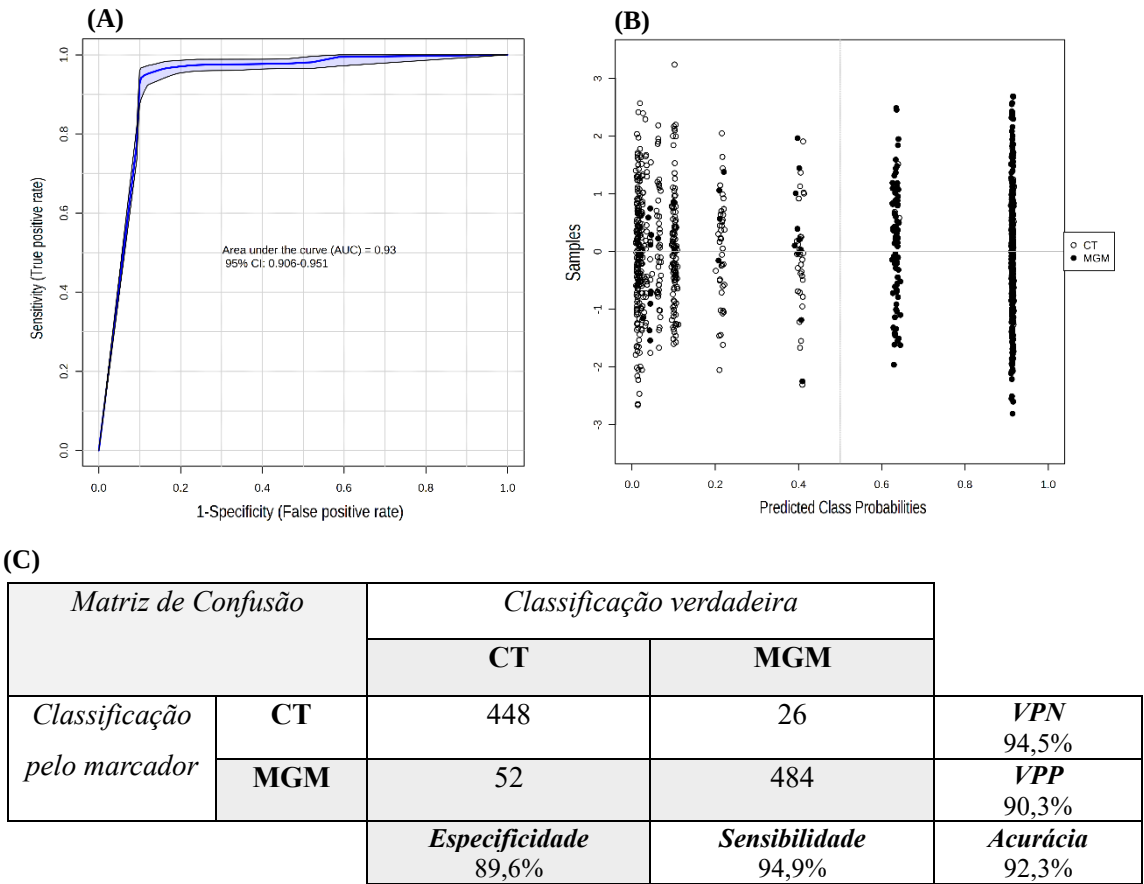


Figura 7. Análise da acurácia do metabólito 5-hidroximetiluracil para atuar como biomarcador indicativo de presença de meningioma. **(A)** Curva ROC com intervalo de confiança de 95%; **(B)** gráfico demonstrativo das probabilidades das classificações previstas para cada replicata (n = 10), onde os pontos pretos representam as replicatas das amostras de MGM, e os pontos brancos, as replicatas de cada CT; e **(C)** matriz de confusão mostrando os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia do metabólito para indicar presença do tumor.

7.2. 3-O-Sulfogalactosilceramida (d18:1/24:0)

Outro metabólito identificado, um sulfatídeo ($m/z = 931$), é uma molécula proveniente do metabolismo da ceramida, lipídio que, além de desenvolver funções estrutural e reguladora (OGRETMEN; HANNUN, 2004; SADDOUGH; I;

OGRETMEN, 2013), atua como supressor tumoral através da ativação de cascatas de sinalização que levam à morte celular (OGRETMEN; HANNUN, 2001; RYLAND et al., 2011). Assim, a metabolização da ceramida pode funcionar como uma rota de escape utilizada pelas células tumorais como forma de inibir a apoptose e, conseqüentemente, favorecer o crescimento celular (MORAD; CABOT, 2013).

Uma das vias propostas como possível rota de escape utilizada pelo maquinário das células tumorais é a conversão da ceramida em Galactosilceramida (GalCer), pela atividade da enzima ceramida galactosiltransferase (UGT8) (BEIER; GÖRÖGH, 2005; SPRONG et al., 1998). Estudos envolvendo a enzima demonstraram relação direta entre a expressão de UGT8 e o grau de malignidade de células tumorais (DZIĘGIEL et al., 2010; OWCZAREK et al., 2013).

Após a glicosilação da ceramida, a enzima galactosilceramida sulfotransferase atua na sulfonação da GalCer, convertendo-a em 3-O-Sulfogalactosilceramida ($m/z = 931$) (GASA et al., 1990). Estudos apontaram para níveis aumentados da enzima no soro de pacientes portadores de carcinoma renal (GASA et al., 1990) e carcinoma hepatocelular (GASA et al., 1991). Células com grande potencial metastático, quando comparadas com células com menor potencial para desenvolvimento de metástases, também apresentaram maior expressão da enzima (SHI et al., 2005). Além disso, o metabólito em questão mostrou potencial para atuar como biomarcador de progressão tumoral em pacientes portadores de meningioma (KUROKAWA et al., 2023), bem como um possível marcador para agressividade e invasão do tecido cerebral adjacente (FERRASI et al., 2023). Juntos, esses dados apontam para a possibilidade da 3-O-Sulfogalactosilceramida atuar como marcador plasmático adjuvante de presença de diferentes tumores, dentre eles o meningioma.

A curva ROC gerada para avaliar o modelo levando como base o metabólito 3-O-Sulfogalactosilceramida é apresentada na **Figura 8A**, assim como a matriz de confusão (**Figura 8B**) e o poder preditivo do biomarcador (**Figura 8C**).

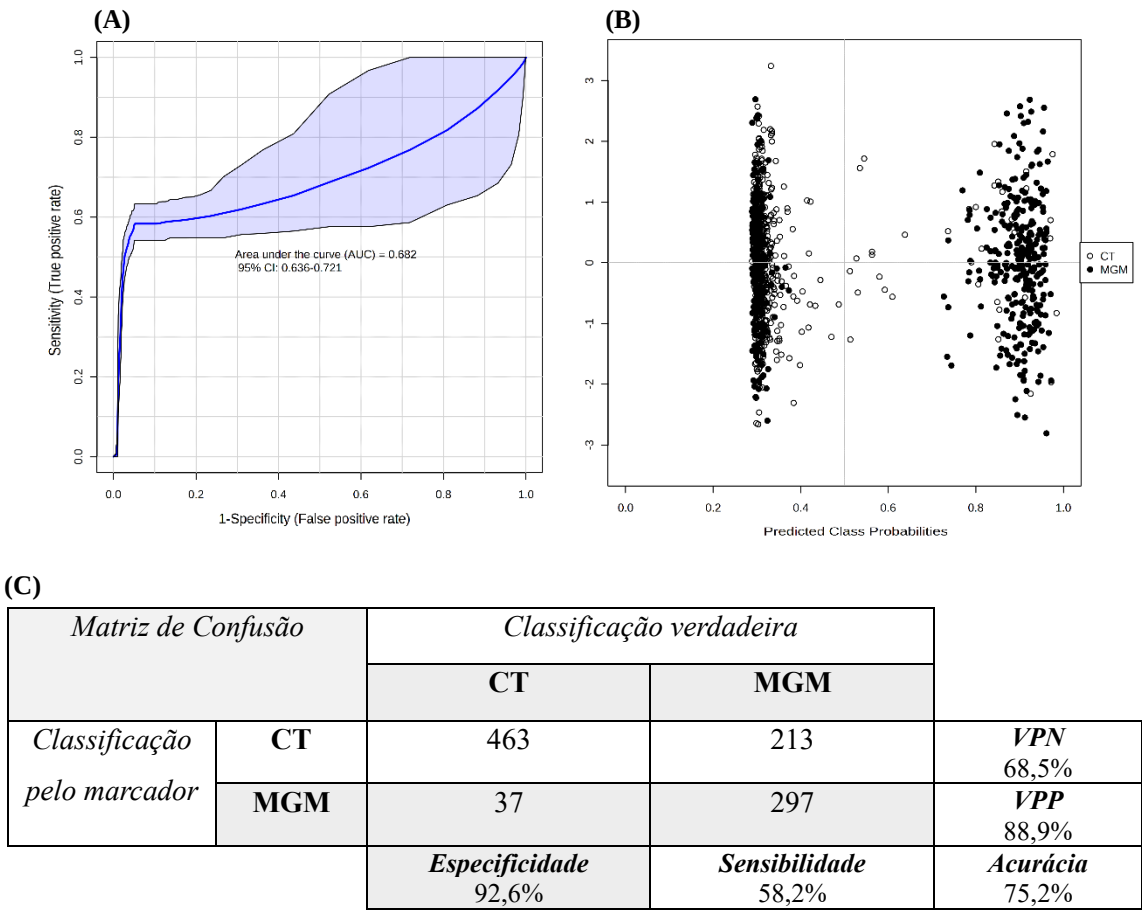


Figura 8. Análise da acurácia do metabólito 3-O-sulfogalactosilceramida para atuar como biomarcador indicativo de presença de meningioma. **(A)** Curva ROC com intervalo de confiança de 95%; **(B)** gráfico demonstrativo das probabilidades das classificações previstas para cada replicata (n = 10), onde os pontos pretos representam as replicatas das amostras de MGM, e os pontos brancos, as replicatas de cada CT; e **(C)** matriz de confusão mostrando os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia do metabólito para indicar presença do tumor.

7.3. Gangliosídeo GA2 (d18:1/18:0)

Por fim, foi identificado um gangliosídeo (*m/z* 1116). Os gangliosídeos são uma subclasse de glicoesfingolipídios caracterizados pela presença de um ou mais resíduos de ácido siálico e participam como reguladores de diversos processos fisiológicos, como adesão celular, comunicação célula-célula, migração, proliferação e apoptose, bem como em processos patológicos, como o câncer (DANIOTTI; LARDONE; VILCAES, 2016; GROUX-DEGROOTE; GUÉRARDEL; DELANNOY, 2017; SARBU; ICA; ZAMFIR, 2022). Estão localizados no folheto externo da membrana plasmática, sendo ubiquamente

encontrados nos tecidos e fluidos (GROUX-DEGROOTE; GUÉRARDEL; DELANNOY, 2017; SARBU; ICA; ZAMFIR, 2022).

Além das funções exercidas no contexto fisiológico, os gangliosídeos possuem potencial imunomodulatório, atuando na supressão das respostas imunes inata e adaptativa, possibilitando o escape tumoral e, conseqüentemente, contribuindo com o processo de tumorigênese (DANIOTTI; LARDONE; VILCAES, 2016).

Diversos estudos têm mostrado aumento dos níveis de gangliosídeos em pacientes portadores de diferentes cânceres do sistema nervoso (BERRA et al., 1983; BERRA; GAINI; RIBONI, 1985; DAVIDSSON et al., 1990; LADISCH et al., 1997), ressaltando seu potencial para atuar como marcador indicativo de presença da doença. Além disso, o metabólito mostrou-se diferentemente expresso em diferentes tipos histológicos de tumores do Sistema Nervoso Central (SHINOURA et al., 1992), estando relacionado com o processo de desenvolvimento e progressão tumoral, bem como a um pior prognóstico (BATTULA et al., 2012; VALENTINO et al., 1990). Juntos, esses estudos suportam a hipótese de que gangliosídeos possam ser peças fundamentais para o desenvolvimento de diferentes cânceres, bem como seu potencial para atuar como biomarcador indicativo de presença desses tipos tumorais.

A curva ROC gerada para avaliar o modelo levando como base o metabólito gangliosídeo GA2 (d18:1/18:0) é apresentada na **Figura 9A**, assim como a matriz de confusão (**Figura 9B**) e o poder preditivo do biomarcador (**Figura 9C**).

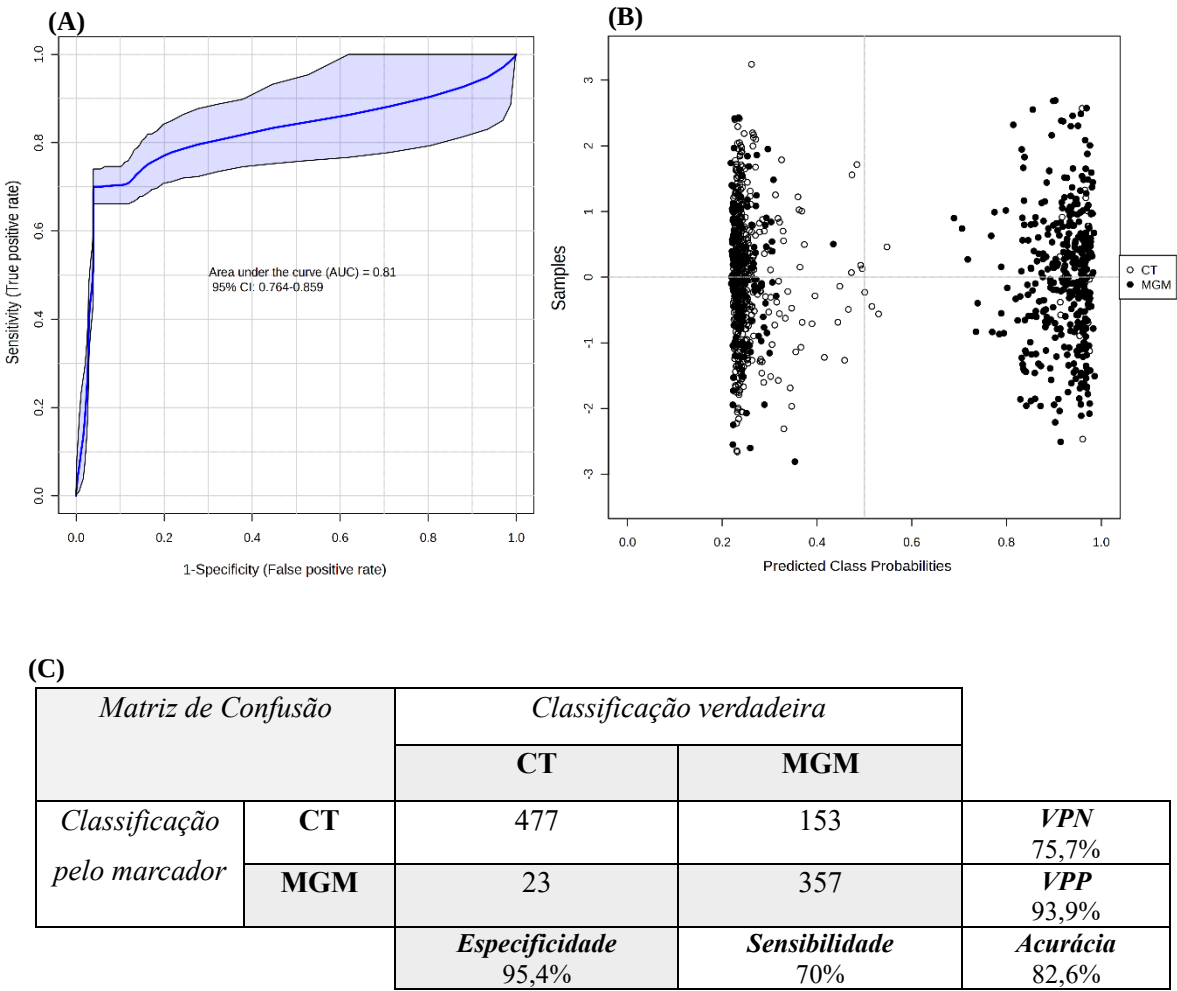


Figura 9. Análise da acurácia do metabólito gangliosídeo GA2 (d18:1/18:0) para atuar como biomarcador indicativo de presença de meningioma. **(A)** Curva ROC com intervalo de confiança de 95%; **(B)** gráfico demonstrativo das probabilidades das classificações previstas para cada replicata (n = 10), onde os pontos pretos representam as replicatas das amostras de MGM, e os pontos brancos, as replicatas de cada CT; e **(C)** matriz de confusão mostrando os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia do metabólito para indicar presença do tumor.

Por fim, com o objetivo de analisar o potencial dos metabólitos identificados em diferenciar indivíduos saudáveis daqueles portadores de meningioma, gerou-se a curva ROC em conjunto para os marcadores com *m/z* 143, 931 e 1116, bem como o gráfico das probabilidades de classificação e a matriz de confusão. Os dados, dispostos na **Figura 10**, revelam um excelente potencial dos metabólitos selecionados e identificados no presente estudo para indicar presença de meningioma, sugerindo um possível envolvimento das moléculas em questão com a fisiopatologia da referida doença.

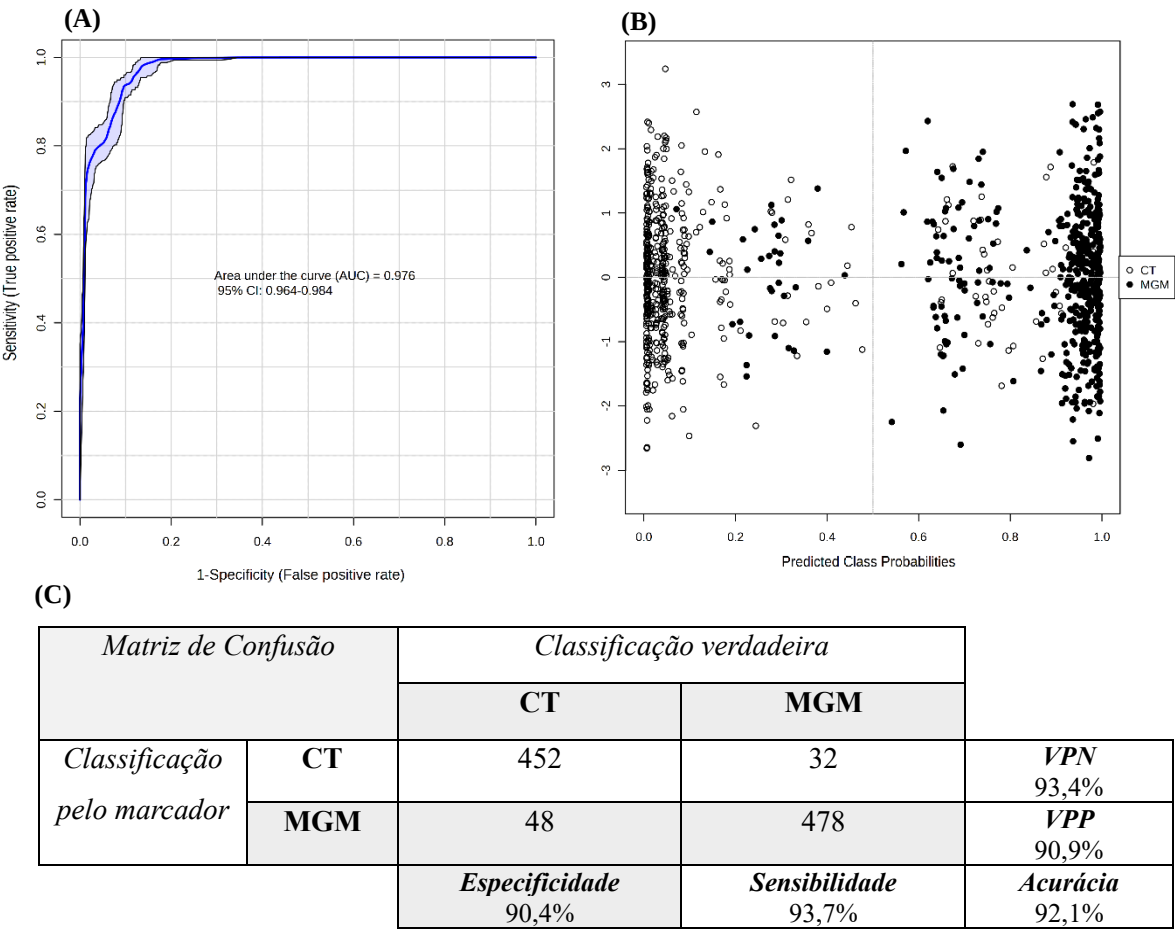


Figura 10. Análise em conjunto da acurácia dos metabólitos com *m/z* 143, 931 e 1116 para atuarem como biomarcadores indicativos de presença de meningioma. **(A)** Curva ROC com intervalo de confiança de 95%; **(B)** gráfico demonstrativo das probabilidades das classificações previstas para cada replicata (*n* = 10), onde os pontos pretos representam as replicatas das amostras de MGM, e os pontos brancos, as replicatas de cada CT; e **(C)** matriz de confusão mostrando os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia dos metabólitos para indicar presença do tumor.

7.4. Polimorfismos em p53

A proteína p53 é uma proteína supressora tumoral sintetizada a partir do gene TP53, localizado no braço curto do cromossomo 17, e desempenha importantes papéis antiproliferativos, como manutenção da estabilidade genômica, regulação da divisão celular, reparo do material genético e indução de apoptose (FULCI; VAN MEIR, 1999; VERHEIJEN et al., 2002). Alterações no gene TP53 associadas à disfunção da proteína são as mais comumente encontradas nos cânceres humanos (LEVINE, 2020), podendo também resultar em ganhos de funções oncogênicas (MULLER; VOUSDEN, 2013, 2014). Além disso, por apresentar maior estabilidade, a proteína mutada tende a se acumular (MANTOVANI; COLLAVIN; DEL SAL, 2019), casos em que a maior expressão da proteína já foi associada à progressão maligna (WANG et al., 1995), características de tumores mais agressivos (RAO et al., 2009) e recorrência (CHO et al., 1999; NAGAHAMA et al., 2021; OHKOUDO et al., 1998) em meningiomas. Sabendo disso, a busca por mutações em p53 nos pacientes portadores de meningioma pode apresentar potencial para ser utilizada como marcador indicativo de possibilidade de recidiva tumoral, complementando o grupo de biomarcadores identificados através das análises metabolômicas, dada a aparente relação entre a proteína, os níveis de ceramida e o desempenho das funções antitumorais do lipídio (DBAIBO et al., 1998; KIM et al., 2002; SAWADA et al., 2001).

No presente estudo, os polimorfismos R248Q e R273H não foram detectados no gene TP53 em nenhum dos 45 pacientes testados, ou seja, todos os pacientes apresentaram genótipo G/G (selvagem) para os polimorfismos de interesse. Embora alguns estudos tenham sugerido o possível envolvimento de mutações em TP53 com tumores mais agressivos e recorrência em meningiomas, grande parte desses estudos basearam-se na análise da expressão de p53, e não na detecção de polimorfismos na proteína. Nos casos em que foram analisados os polimorfismos em p53, não houve associações significativas entre a presença desses polimorfismos e a etiologia de meningiomas (MALMER et al., 2005, 2007; VERHEIJEN et al., 2002).

8. Conclusão

Em conclusão, as análises metabolômicas realizadas a partir de amostras de plasma de pacientes portadores de meningioma, quando comparadas àquelas coletadas de indivíduos saudáveis, permitiram a seleção e identificação de um grupo de metabólitos diferenciais com potencial para indicar presença do tumor com alta relevância estatística ($AUC = 0,976$), revelando um possível envolvimento das moléculas em questão com a fisiopatologia dos meningiomas.

Já as análises realizadas por técnicas de biologia molecular de DNA extraído a partir de amostras de tecido tumoral, bem como demais estudos envolvendo a análise de polimorfismos no gene TP53, apontam para o não envolvimento dos polimorfismos R248Q e R273H em p53 na recidiva dos meningiomas. Entretanto, ressalta-se a necessidade de novas análises nos demais *hotspots* da proteína que possam estar associados à fisiopatologia da doença e recorrência tumoral.

A pequena quantidade de amostras de meningiomas graus 2 e 3 ($n = 5$ e $n = 3$, respectivamente) também representa uma importante limitação do presente estudo, sendo necessária a incorporação de um maior número de pacientes, bem como a comparação dos perfis metabólicos de pacientes portadores de diferentes tumores do sistema nervoso central a fim de validar os marcadores identificados. Além disso, a semelhança entre determinados metabólitos identificados como possíveis biomarcadores para meningioma (KUROKAWA et al., 2023) e glioblastoma (FERRASI et al., 2023) pode estar relacionada à metabolização de fármacos administrados aos pacientes. Dessa forma, há de se ter cautela antes de extrapolar os resultados para a prática clínica.

As próximas etapas do presente estudo incluem a validação dos metabólitos identificados através de técnicas de metabolômica alvo, bem como a comparação de perfis metabólicos de diferentes tumores do sistema nervoso central a fim de assegurar que os marcadores encontrados são específicos para os tumores de interesse. Por fim, realizar a identificação de metabólitos característicos de tumores recidivantes, visando a detecção precoce de recidivas tumorais e, consequentemente, garantindo um melhor prognóstico aos pacientes.

9. Referências

- AMATYA, V. J. et al. Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. **Human pathology**, v. 32, n. 9, p. 970–975, 2001.
- BATTULA, V. L. et al. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2066–2078, 2012.
- BEIER, U. H.; GÖRÖGH, T. Implications of galactocerebrosidase and galactosylcerebroside metabolism in cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 115, n. 1, p. 6-10, 2005.
- BELL, R. J. A. et al. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. **Molecular Cancer Research: MCR**, v. 14, n. 4, p. 315-323, 2016.
- BENSON, V. S. et al. Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 1, p. 185-190, 2008.
- BERRA, B.; GAINI, S. M.; RIBONI, L. Correlation between ganglioside distribution and histological grading of human astrocytomas. **International Journal of Cancer**, v. 36, n. 3, p. 363–366, 1985.
- BERRA, B.; RIBONI, L.; DE GASPERI, R.; GAINI, S. M.; RAGNOTTI, G. Modifications of Ganglioside Patterns in Human Meningiomas. **Journal of Neurochemistry**, v. 40, n. 3, p. 777–782, 1983.
- BOORSTEIN, R. J.; LEVY, D. D.; TEEBOR, G. W. 5-Hydroxymethyluracil-DNA glycosylase activity may be a differentiated mammalian function. **Mutation Research DNA Repair Reports**, v. 183, n. 3, p. 257–263, 1987.
- BOSTROM, J. et al. Alterations of the Tumor Suppressor Genes CDKN2A (p16^{INK4a}), p14^{ARF}, CDKN2B (p15^{INK4b}), and CDKN2C (p18^{INK4c}) in Atypical and Anaplastic Meningiomas. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 2, p. 661-669, 2001.
- BUERKI, R. A. et al. An overview of meningiomas. **Future oncology**, v. 14, n. 21, p. 2161- 2177, 2018.
- CHEN, L. et al. Metabolite discovery through global annotation of untargeted

metabolomics data. **Nature Methods**, v. 18, n. 11, p. 1377-1385, 2023.

CHO, H. et al. Role of p53 gene mutation in tumor aggressiveness of intracranial meningiomas. **Journal of Korean medical science**, v. 14, n. 2, p. 199–205, 1999.

CHOZICK, B. S. et al. Immunohistochemical evaluation of erbB-2 and p53 protein expression in benign and atypical human meningiomas. **Journal of neuro-oncology**, v. 27, n. 2, p. 117–126, 1996.

CUI, X.; CHURCHILL, G. A. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. **Genome Biology**, v. 4, n. 4, 2003.

DANIOTTI, J. L.; LARDONE, R. D.; VILCAES, A. A. Dysregulated expression of glycolipids in tumor cells: From Negative Modulator of Anti-tumor Immunity to Promising Targets for Developing Therapeutic Agents. **Frontiers in Oncology**, v. 5, p. 1–11, 2016.

DAVIDSSON, P.; FREDMAN, P.; VON HOLST, H.; WIKSTRAND, C. J.; HE, X.; BIGNER, D. D.; SVENNERHOLM, L. Circulating glycoconjugates in CSF of meningioma patients. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 82, n. 3, p. 203–208, 1990.

DBAIBO, G. S. et al. p53-dependent ceramide response to genotoxic stress. **The Journal of clinical investigation**, v. 102, n. 2, p. 329–339, 1998.

DJURIC, Z.; HEILBRUN, L. K.; SIMON, M. S.; SMITH, D.; LUONGO, D. A.; LORUSSO, P. M.; MARTINO, S. Levels of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in DNA from blood as a marker of breast cancer. **Cancer**, v. 77, n. 4, p. 691–696, 1996.

DJURIC, Z.; HEILBRUN, L. K.; LABABIDI, S.; BERZINKAS, E.; SIMON, M. S.; KOSIR, M. A. Levels of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in DNA from blood of women scheduled for breast biopsy. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 10, n. 2, p. 147–149, 2001.

DONEHOWER, L. A. et al. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. **Cell reports**, v. 28, n. 5, p. 1370- 1384.e5, 2019.

DZIEGIEL, P. et al. Ceramide galactosyltransferase (UGT8) is a molecular marker of breast cancer malignancy and lung metastases. **British Journal of Cancer**, v.

103, n. 4, p. 524–531, 10 ago. 2010.

FATHI, A. R.; ROELCKE, U. Meningioma. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 4, p. 1-8, 2013.

FERRASI, A. C. et al. Metabolomics Approach Reveals Important Glioblastoma Plasma Biomarkers for Tumor Biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, 2023.

FERRETTI, Y. **Ferramenta Computacional para Análise Integrada de Dados Clínicos e Biomoleculares**. Tese (Mestrado em Bioinformática) - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA. Ribeirão Preto, 2015.

FRENKEL, K.; KARKOSZKA, J.; GLASSMAN, T.; DUBIN, N.; TONIOLO, P.; TAIOLI, E.; MOONEY, L. A.; KATO, I. Serum autoantibodies recognizing 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, an oxidized DNA base, as biomarkers of cancer risk in women. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 7, n. 1, p. 49–57, 1998.

FULCI, G.; VAN MEIR, E. G. p53 and the CNS: tumors and developmental abnormalities. **Molecular neurobiology**, v. 19, n. 1, p. 61–77, 1999.

GAO, X. et al. Deficient or R273H and R248W Mutations of p53 Promote Chemoresistance to 5-FU via TCF21/CD44 Axis-Mediated Enhanced Stemness in Colorectal Carcinoma. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, 2022.

GASA, S. et al. Presence and characterization of glycolipid sulfotransferase in human cancer serum. **European journal of biochemistry**, v. 189, n. 2, p. 301–306, 1990.

GASA, S. et al. Elevated serum level of glycolipid sulfotransferase in patients with hepatocellular carcinoma. **Cancer letters**, v. 59, n. 1, p. 19–24, 26 jul. 1991.

GOUTAGNY, S. et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of meningioma malignant progression dependent on the underlying NF2 status. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 16, p. 4155-4164, 2010.

GOUTAGNY, S. et al. High incidence of activating TERT promoter mutations in meningiomas undergoing malignant progression. **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 24, n. 2, p. 184-189, 2014.

GROUX-DEGROOTE, S.; GUÉRARDEL, Y.; DELANNOY, P. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. **ChemBioChem**, v. 18, n. 13, p. 1146–1154, 2017.

GUIJAS, C. et al. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 316-320, 2018.

GUYOT, A. et al. Analysis of CDKN2A gene alterations in recurrent and non-recurrent meningioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 145, n. 3, p. 449-459, 2019.

HEIDENREICH, B.; KUMAR, R. TERT promoter mutations in telomere biology. **Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 15-31

HOLLSTEIN, M. C.; BROOKS, P.; LINN, S.; AMES, B. N. Hydroxymethyluracil DNA glycosylase in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 13, p. 4003–7, 1984.

JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC J.; SIUZDAK, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 7, p. 451-459, 2016.

KAMEI, Y. et al. Prognostic significance of p53 and p21WAF1/CIP1 immunoreactivity and tumor micronecrosis for recurrence of meningiomas. **Journal of neuro-oncology**, v. 46, n. 3, p. 205–213, 2000.

KIM, S. J. et al. Understanding Metabolomics in Biomedical Research. **Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 1, p. 7-16, 2016.

KIM, S. S. et al. P53 mediates ceramide-induced apoptosis in SKN-SH cells. **Oncogene**, v. 21, n. 13, p. 2020–2028, 2002.

KLEMKE, L. et al. The Gain-of-Function p53 R248W Mutant Promotes Migration by STAT3 Deregulation in Human Pancreatic Cancer Cells. **Frontiers in oncology**, v. 11, 2021.

KOELSCHE, C. et al. Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 126, n. 6, p. 907-915, 2013.

KUROKAWA, G. et al. Differential Plasma Metabolites Between High- and Low-Grade Meningioma Cases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, 2023.

- LADISCH, S.; CHANG, F.; LI, R.; COGEN, P.; JOHNSON, D. Detection of medulloblastoma and astrocytoma-associated, ganglioside G(D3) in cerebrospinal fluid. **Cancer Letters**, v. 120, n. 1, p. 71–78, 1997.
- LAMSZUS, K. Meningioma pathology, genetics, and biology. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 63, n. 4, p. 275-286, 2004.
- LEVINE, A. J. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. **Nature reviews. Cancer**, v. 20, n. 8, p. 471–480, 2020.
- LI, B. et al. Novel Applications of Metabolomics in Personalized Medicine: A Mini-Review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 7, p. 1–10, 2017.
- LI, J. et al. Mutants TP53 p.R273H and p.R273C but not p.R273G enhance cancer cell malignancy. **Human mutation**, v. 35, n. 5, p. 575–584, 2014.
- LI, W. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 10, n. 6, 2012.
- LIU, J. et al. Tumor suppressor p53 and metabolism. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 4, p. 284-292, 2019.
- LOUIS, D. N. et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.
- MAGGIO, I. et al. Meningioma: not always a benign tumor. A review of advances in the treatment of meningiomas. **CNS oncology**, v. 10, n. 2, 2021.
- MALMER, B. et al. p53 Genotypes and risk of glioma and meningioma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 9, p. 2220-2223, 2005.
- MALMER, B. S. et al. Genetic variation in p53 and ATM haplotypes and risk of glioma and meningioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 82, n. 3, p. 229-237, 2007.
- MANTOVANI, F.; COLLAVIN, L.; DEL SAL, G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. **Cell death and differentiation**, v. 26, n. 2, p. 199–212, 2019.
- MAO, Y.; JIANG, P. The crisscross between p53 and metabolism in cancer. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 55, n. 6, p. 914-922, 2023.
- MAROSI, C. et al. Meningioma. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 67, n. 2, p. 153-171, 2008.
- MASHAYEKHI, F.; SABERI, A.; MASHAYEKHI, S. Serum TIMP1 and TIMP2

concentration in patients with different grades of meningioma. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 170, p. 84-87, 2018.

MEDINA, S. et al. Metabolomics and the Diagnosis of Human Diseases -A Guide to the Markers and Pathophysiological Pathways Affected. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 823–848, 2014.

MELO, C. F. O. R. et al. Serum Metabolic Alteration Upon Zika Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-10, 2017.

MIRIAN, C. et al. Poor prognosis associated with TERT gene alterations in meningioma is independent of the WHO classification: an individual patient data meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 91, n. 4, p. 378-387, 2020.

MORAD, S. A. F.; CABOT, M. C. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 1, p. 51-65, jan. 2013.

MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. **Nature cell biology**, v. 15, n. 1, p. 2–8, 2013.

MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. **Cancer cell**, v. 25, n. 3, p. 304–317, 2014.

NAGAHAMA, A. et al. Combination of p53 and Ki67 as a Promising Predictor of Postoperative Recurrence of Meningioma. **Anticancer Research**, v. 41, n. 1, p. 203-210, 2021.

NAHM, F. S. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 75, n. 1, p. 25–36, 2022.

NAKAZAWA, S. et al. Dominant-negative p53 mutant R248Q increases the motile and invasive activities of oral squamous cell carcinoma cells. **Biomedical research (Tokyo, Japan)**, v. 40, n. 1, p. 37– 49, 2019.

NASRALLAH, M. P.; ALDAPE, K. D. Molecular classification and grading of meningioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 161, n. 2, p. 373-381, 2023.

NI, Y. et al. Circulating Unsaturated Fatty Acids Delineate the Metabolic Status of Obese Individuals. **EBioMedicine**, v. 2, n. 10, p. 1513–1522, 2015.

NOWOSIELSKI, M. et al. Diagnostic challenges in meningioma. **Neuro-oncology**, v. 19, n. 12, p. 1588– 1598, 2017.

- OGRETMEN, B.; HANNUN, Y. A. Updates on functions of ceramide in chemotherapy-induced cell death and in multidrug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 6, p. 368-377, 2001.
- OGRETMEN, B.; HANNUN, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 604-616, 2004.
- OHKOUDO, M. et al. Expression of p53, MDM2 protein and Ki-67 antigen in recurrent meningiomas. **Journal of neuro-oncology**, v. 38, n. 1, p. 41-49, 1998.
- OLINSKI, R.; STARCZAK, M.; GACKOWSKI, D. Enigmatic 5-hydroxymethyluracil: Oxidatively modified base, epigenetic mark or both? **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 59-66, 2016.
- OWCZAREK, T. B. et al. Galactosylceramide affects tumorigenic and metastatic properties of breast cancer cells as an anti-apoptotic molecule. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 31 dez. 2013.
- PACHOLEWSKA, A. “Loget” – a Uniform Differential Expression Unit to Replace “logFC” and “log2FC”. **Science Matters**, 2017.
- PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic acids research**, v. 49, 2021.
- PAPALUCA, A.; WAGNER, J. R.; SARAGОВI, H. U.; RAMOTAR, D. UNG-1 and APN-1 are the major enzymes to efficiently repair 5-hydroxymethyluracil DNA lesions in *C. elegans*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.
- PAVELIN, S. et al. Expression of Ki-67 and p53 in meningiomas. **Neoplasma**, v. 60, n. 5, p. 480-485, 2013.
- PERRY, A. et al. A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas. **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 12, n. 2, p. 183-190, 2002.
- RAO, S. et al. Characterization of morphologically benign biologically aggressive meningiomas. **Neurology India**, v. 57, n. 6, p. 744-748, 2009.
- RUAS, M.; PETERS, G. The p16^{INK4a}/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1378, n. 2, p. F115-F177, 1998.
- RYLAND, L. K. et al. Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. **Cancer Biology and Therapy**, v. 11, n. 2, p. 138-149, 15 jan. 2011.

SADDOUGHI, S. A.; OGRETMEN, B. Diverse Functions of Ceramide in Cancer Cell Death and Proliferation. **Advances in Cancer Research**, v. 117, p. 37–58, 2013.

SAHM, F. et al. TERT Promoter Mutations and Risk of Recurrence in Meningioma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 5, 2016.

SARBU, M.; ICA, R.; ZAMFIR, A. D. Gangliosides as Biomarkers of Human Brain Diseases: Trends in Discovery and Characterization by High-Performance Mass Spectrometry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, 2022.

SAWADA, M. et al. p53 regulates ceramide formation by neutral sphingomyelinase through reactive oxygen species in human glioma cells. **Oncogene**, v. 20, n. 11, p. 1368–1378, 2001.

SCHULZ-HEDDERGOTT, R.; MOLL, U. M. Gain-of-Function (GOF) Mutant p53 as Actionable Therapeutic Target. **Cancers**, v. 10, n. 6, 2018.

SCHULZ-HEDDERGOTT, R. et al. Therapeutic Ablation of Gain-of-Function Mutant p53 in Colorectal Cancer Inhibits Stat3-Mediated Tumor Growth and Invasion. **Cancer cell**, v. 34, n. 2, p. 298–314.e7, 2018.

SHI, B. Z. et al. Gal3ST-2 involved in tumor metastasis process by regulation of adhesion ability to selectins and expression of integrins. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 332, n. 4, p. 934–940, 15 jul. 2005.

SHINOURA, N.; DOHI, T.; KONDO, T.; YOSHIOKA, M.; TAKAKURA, K.; OSHIMA, M. Ganglioside composition and its relation to clinical data in brain tumors. **Neurosurgery**, v. 31, n. 3, p. 541–9, 1992.

SIEVERS, P. et al. CDKN2A/B homozygous deletion is associated with early recurrence in meningiomas. **Acta Neuropathologica**, v. 140, n. 3, p. 409–413, 2020.

SPRONG, H. et al. UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25880–25888, 2 out. 1998.

SUN, S. et al. Hotspot mutant p53-R273H inhibits KLF6 expression to promote cell migration and tumor metastasis. **Cell death & disease**, v. 11, n. 7, 2020.

VALENTINO, L.; MOSS, T.; OLSON, E.; WANG, H. J.; ELASHOFF, R.; LADISCH, S. Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma.

Blood, v. 75, n. 7, p. 1564–1567, 1990.

VERHEIJEN, F. M. et al. TP53 mutations in human meningiomas. **The International journal of biological markers**, v. 17, n. 1, p. 42–48, 2002.

VOUSDEN, K. H.; RYAN, K. M. p53 and metabolism. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 10, p. 691–700, 2009.

WANG, H. et al. Mutant p53 (p53-R248Q) functions as an oncogene in promoting endometrial cancer by up-regulating REGγ. **Cancer letters**, v. 360, n. 2, p. 269–279, 2015.

WANG, J. L. et al. Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. **International journal of cancer**, v. 64, n. 4, p. 223–228, 1995.

WANG, N; OSSWALD, M. Meningiomas: Overview and New Directions in Therapy. **Seminars in Neurology**, v. 38, n. 1, p. 112–120, 2018.

WANG, T. J. et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. **Nature Medicine**, v. 17, n. 4, p. 448–453, 2011.

WANG, Z.; STRASSER, A.; KELLY, G. L. Should mutant p53 be targeted for cancer therapy? **Cell Death and Differentiation**, v. 29, n. 5, p. 911–920, 2022.

WEBER, R. G. et al. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 26, p. 14719–14724, 1997.

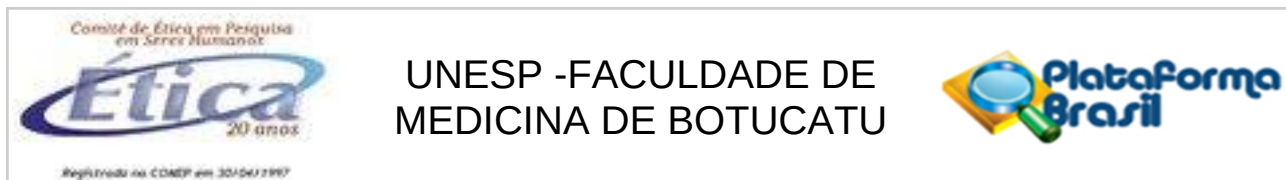
WIECH, M. et al. Molecular mechanism of mutant p53 stabilization: the role of HSP70 and MDM2. **PloS one**, v. 7, n. 12, 2012.

WIEMELS, J.; WRENSCH, M.; CLAUS, E. B. Epidemiology and etiology of meningioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 99, n. 3, p. 307–314, 2010.

ZUO, S.; BOORSTEIN, R. J.; TEEBOR, G. W. Oxidative damage to 5-methylcytosine in DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 16, p. 3239–3243, 1995.

10. Anexos

10.1. Anexo I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de dispositivo microfluídico para biopsia líquida de células tumorais circulantes: Tumores do Sistema Nervoso Central

Pesquisador: Adriana Camargo Ferrasi

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47991921.0.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.896.170

Apresentação do Projeto:

As informações descritas nos campos foram retiradas dos documentos e arquivo - Informações Básicas do Projeto.

Os pesquisadores pretendem desenvolver dispositivo microfluídico para detecção e isolamento células tumorais circulantes (CTCs) provenientes de tumores do sistema nervoso central (SNC) a partir de amostras de sangue periférico, com alta seletividade e sensibilidade, com potencial de utilização no diagnóstico e/ou no monitoramento da doença. As etapas principais do projetos serão: (i) desenvolvimento da plataforma de detecção, de baixo custo; (ii) estudo dos marcadores de superfície celular tumoral (por exemplo o EpCAM); (iii) validação da sensibilidade e especificidade do dispositivo em amostras sanguíneas de pacientes acometidos por tumores do SNC e doadores saudáveis de sangue.

Critérios de elegibilidade adequados

Serão incluídas cerca de 400 participantes caracterizados por Grupo Caso (200 participantes acometidos por tumores do SNC); Grupo Controle (200 indivíduos saudáveis).

Amostras a serem coletadas: Grupo Caso: 4 mL de sangue periférico + 2 fragmentos (3mm³) do tumor; Grupo Controle: 4 mL de sangue periférico;

- Construção do Dispositivo Microfluídico: Confecção de um molde em PDMS (Dimetil Polissiloxano) e acoplamento em uma lâmina de vidro, conforme descrito em Zhang et al (2016). A princípio, o sistema será baseado na afinidade das CTCs com anticorpos imobilizados (anti-

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 4.896.170

EpCAM, anti -Human CD326), contudo, outros marcadores tumorais poderão ser testados, de acordo com o tipo de tumor do SNC.

- A validação do dispositivo ocorrerá por testes com amostras sanguíneas de pacientes acometidos por tumores do SNC (grupo controle) e aqueles que não estão com a doença (grupo controle). - Análises de novos Marcadores Tumorais: Serão estudados novos marcadores de superfície celular que possam ser utilizados especificamente para os diferentes tumores do SNC coletados.

INTRODUÇÃO

Seguramente, um dos maiores desafios na saúde humana está relacionado à morbidade e mortalidade dos cânceres no sistema nervoso central. Portanto são necessários recursos diagnósticos, cuidados médicos e cirúrgicos altamente especializados, além de tratamento e seguimento em longo prazo. Os sintomas são inespecíficos e podem ser confundidos facilmente com outras comorbidades comuns, prolongando o tempo até que diagnóstico definitivo seja alcançado e aumentando o risco de morte desses pacientes. Atualmente, nenhum teste simples de rastreamento populacional está disponível para câncer do SNC, o diagnóstico requer o uso de modalidades de imagem avançadas e caras, não facilmente acessíveis a todos. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma técnica simples, sensível e barata permitiria o acesso a um indicador precoce de células tumorais circulantes (CTCs), reduzindo o prazo do diagnóstico, melhorando o prognóstico e aumentando a sobrevida do paciente. Além disso, a detecção das células tumorais circulantes (CTCs) por meio de biópsias líquidas é particularmente importante em doenças malignas do SNC devido ao potencial de acompanhar a progressão da doença com um exame de sangue, sem repetir procedimentos neurocirúrgicos que apresentam risco de morbidade do paciente.

Objetivo da Pesquisa:

As informações descritas nos campos foram retiradas dos documentos e arquivo - Informações Básicas do Projeto.

Objetivo da pesquisa:

OBJETIVOS GERAIS: Construção de um sistema microfluídico para a detecção e separação de CTCs no sangue periférico de pacientes acometidos por tumores do sistema nervoso central, com alta seletividade e sensibilidade, com potencial de utilização no diagnóstico e/ou no monitoramento da doença.

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 4.896.170

ESPECÍFICOS: a) Desenvolvimento de sistema microfluídico b) Funcionalização do microdispositivo e validação da metodologia c) Detecção de células tumorais circulantes em sangue periférico d) Validação dos dispositivos em amostras de sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis e) verificação da expressão gênica de biomarcadores de membrana que possam ser utilizados como alvos de superfície.

METODOLOGIA:

4.1 Casuística O grupo “caso” será composto por 200 pacientes, com idade igual ou superior a 18 anos, acometidos por tumores primários do sistema nervoso central e o grupo “controle” será composto por 200 indivíduos saudáveis, com idade igual ou superior a 18 anos, todos participantes voluntários. Serão convidados a participar do estudo, pacientes atendidos pelo Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC/FMB). Serão convidados a participar do estudo, doadores voluntários de sangue periférico do Hemocentro de Botucatu (HC/FMB).

4.2 Seleção dos Participantes Grupo Caso Critérios de inclusão no estudo:

I- Presença ou suspeição de tumores do sistema nervoso central com indicação neurocirúrgica formal, incluindo casos de recidivas;

II- Possibilidade de coleta de 4mL de sangue total do paciente durante o procedimento cirúrgico, sem prejuízo ao paciente ou a outros exames necessários;

III- Possibilidade de coleta de fragmentos tumorais (3mm³) durante o procedimento cirúrgico, sem que haja qualquer prejuízo ao exame histopatológico ou a outros que porventura sejam necessários;

IV- Expresso entendimento e concordância em participar do estudo, manifestada pelo paciente ou pelo seu responsável legal previamente à cirurgia através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão do estudo:

I- Pacientes que reconhecidamente apresentarem neoplasias de origem diversa às previamente estabelecidas;

II- Pacientes com tumores primários do SNC redicivantes previamente tratados com radioterapia e/ou quimioterapia de qualquer modalidade;

III- Pacientes com tumores pequenos, dos quais se obtenha material escasso ou insuficiente para o estudo histopatológico e/ou outros exames necessários;

IV- Pacientes ou responsáveis legais que não tenham conseguido compreender suficientemente as

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 4.896.170

diretrizes da pesquisa ou que tenham se negado a participar do estudo, conforme estabelecido no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Grupo Controle Doadores de Sangue Critérios de inclusão no estudo:

- I- Indivíduos saudáveis, com idade igual ou superior a 18 anos, aptos a doação voluntária de sangue;
- II- Possibilidade de coleta de 4mL de sangue total, sem prejuízos para a sua doação ao banco de sangue ou para outros exames necessários;
- III- Expresso entendimento e concordância em participar do estudo, manifestada pelo paciente através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão do estudo:

- I- Presença ou suspeição de qualquer tipo de neoplasia;
- II- Pacientes que foram tratados com radioterapia e/ou quimioterapia de qualquer modalidade;
- III- Indivíduos que não tenham conseguido compreender suficientemente as diretrizes da pesquisa ou que tenham se negado a participar do estudo, conforme estabelecido no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3 Amostras Grupo Caso Sangue Periférico

A alíquota contendo aproximadamente 4mL de sangue total será coletada durante o procedimento cirúrgico, em tubo contendo anticoagulante (EDTA). **Fragmento Tumoral** As amostras de tecido tumoral (de aproximadamente 3mm³) serão coletadas após a retirada cirúrgica da massa tumoral do paciente, não interferindo com o tempo de anestesia e de cirurgia. Após a coleta, as amostras serão depositados imediatamente em criotubos contendo 300µL de conservante e congeladas em freezer -80°C. Grupo Controle Sangue Periférico A alíquota contendo aproximadamente 4mL de sangue total será coletada em tubo contendo anticoagulante (EDTA).

4.4 Métodos Todas as amostras serão registradas de maneira que os dados dos participantes da pesquisa sejam anonimizados. As análises laboratoriais serão realizadas no laboratório de biologia molecular da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Desenvolvimento do sistema microfluídico Para a formação dos microdispositivos, os mesmos serão confeccionados num molde em PDMS (Dimetil Polissiloxano) e acoplados a uma lâmina de vidro. A Figura 1 demonstra o modelo proposto. Primeiro será fabricado o desenho da estrutura microfluídica com a utilização da ferramenta computacional AutoCAD (Computer Aided Design). O arquivo CAD será o enviado para uma empresa para impressão de transparências e todo o processo será realizado conforme descrito em

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Zhang et al (2016). 36 Para a fabricação do molde de silício, uma máscara impressa será utilizada. O padrão na máscara será transferido por um fotoreistor com 2 m de espessura em uma placa de silício, utilizando fotolitografia. Após a confecção do molde, o substrato de PDMS será fabricado por litografia macia. O molde contendo PDMS será então curado durante 3 horas à 65°C, numa estufa. Após este processo, retira-se o PDMS do molde, e, após o seu endurecimento, este é encaixado sobre uma lâmina de microscópio perfurada para entrada e na saída do fluxo. Para o acoplamento do PDMS à lâmina de microscópio, será realizado um tratamento com ozônio durante 5 minutos, formando ligações epóxi. O microdispositivo terá um canal na forma de serpentina com incorporação de filtros laterais. O sistema proposto neste projeto será baseado em afinidade de CTCs com contato direto entre os anticorpos imobilizados (anti-EpCAM, anti-Human CD326) e as paredes do microdispositivo. O aumento da área das estruturas internas pode aumentar a probabilidade da interação entre os anticorpos e as CTCs. Espera-se que o contato direto entre as CTCs seja inevitável, devido a diminuição dos espaços.

Figura 1 – Modelo de Sistema Microfluídico para captura de CTCs. A) O sistema compreende de 4 canais principais em serpentina com uma matriz de filtros laterais incorporados em cada canal. Os filtros laterais são divididos em 10 zonas com base no tamanho do filtro. Cada zona de filtro consiste em 10 colunas de filtros laterais de mesmo tamanho.

A maior zona de filtro (zona de filtro de 25 m) está localizada perto da entrada do dispositivo. A zona de filtro menor (zona de filtro de 12 m) está localizada perto da saída. O comprimento do canal serpentino será $L = 5000$ m. B) A largura do canal serpentino é $W = 300$ m; O comprimento do filtro $L1 = 50$ m; o tamanho do filtro $W1$ varia de 10 a 25 m. A distância entre os filtros laterais $W2$ pode ser 50 m ou 100 m dependendo do número de filtros. Como mostrado na Figura 1, o tamanho do filtro destina-se a ter o tamanho de uma única CTC. Ao entrar no filtro, o fluxo é regulado de modo que apenas uma única CTC possa atravessar o filtro. Isso impede que a CTC seja emaranhada por outras células sanguíneas, aumentando assim de forma significativa o contato direto. Para evitar que haja um entupimento pelo excesso de células, um canal principal será concebido na forma de serpentina para dar vazão ao fluxo. Quando uma célula flui através do microdispositivo, haverá dois componentes de velocidade que são a direção do canal principal e a direção dos filtros. Além disso, o canal principal mais largo reduz a resistência hidrodinâmica geral do dispositivo e reduz a velocidade do fluxo nos filtros, aumentando assim a probabilidade de captura da CTC. Logo esta estrutura foi planejada para evitar entupimento dos canais e obter-se uma maior taxa de captura. Os microdispositivos serão

Endereço: Chácara Butignolli, s/n**Bairro:** Rubião Junior**CEP:** 18.618-970**UF:** SP**Município:** BOTUCATU**Telefone:** (14)3880-1609**E-mail:** cep@fmb.unesp.br

analisados por microscopia eletrônica de varredura para confirmar o tamanho dos caminhos depositados. Funcionalização do microdispositivo Inicialmente, o microdispositivo será funcionalizado com anti-EpCAM (Anti-Human CD326). Primeiro os microdispositivos serão lavados com etanol e em seguida, solução salina tamponada de fosfato (PBS). Todos estes procedimentos serão feitos em fluxo utilizando uma bomba de seringa. Será então injetado avidina com a concentração de 1 mg/mL a qual será incubada por 15 minutos. Avidina será imobilizada no dispositivo por meio de adsorção física. Então será injetado PBS para remover o excesso de moléculas de avidina. Solução de anti-EpCAM biotinalizado será injetada em diferentes concentrações e incubada por 15 minutos. Aqui serão estudadas diferentes concentrações de anticorpos para se definir a melhor concentração para uso. O anti-EpCAM será ligado com avidina via reação biotina-avidina. Finalizando a modificação proposta, o microdispositivo será passivado com uma solução tampão PBS contendo 1% de BSA (albumina de soro de bovino) para impedir a captura não específica. Aqui também será estudada a captura não seletiva de CTCs. Nestes experimentos não iremos modificar a microdispositivo com anticorpo para avaliar a captura não seletiva de CTCs. Toda a metodologia será validada mediante avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, sensibilidade, faixa linear, linearidade, repetibilidade e estudo de interferentes. Serão realizados estudos da interação anticorpo-célula utilizando a metodologia de ressonância plasmônica de superfície SPR, que irá fornecer informações sobre cinéticas de interações moleculares, adsorção e dessorção de todo processo, especialmente entre o anticorpo/célula com um alto grau de sensibilidade e especificidade. Para obtenção e confirmação dos resultados, todos os experimentos serão realizados em triplicatas. Caso o marcador EpCAM não seja suficientemente sensível e específico para os tumores do sistema nervoso central estudados, outros marcadores de superfície poderão ser estudados para a viabilização do dispositivo. Validação em amostras sanguíneas. As análises de validação do dispositivo serão conduzidas em amostra de sangue periférico de pacientes acometidos por tumores do sistema nervoso central (Grupo Caso) e participantes saudáveis (Grupo Controle). Para cada amostra clínica, um volume de 0,5 ml de sangue periférico será analisado. Após a injeção da amostra, um volume de 100 μ L de paraformaldeído com uma concentração de 4% será adicionado através do microdispositivo para fixação celular. Depois será lavado com 200 mL de PBS e posterior injeção de solução de Triton X-100 para a permeabilização celular. Em seguida, injeta-se 200 mL de PBS para remoção do excesso de triton X-100. Para a marcação celular será utilizado um cocktail de corante de fluorescência, incluindo DAPI, anti-citoqueratina-FITC (CK), e anti-CD45-PE, com posterior incubação por 25 minutos para marcação das células capturadas. Por fim injeta-se PBS após a

Endereço: Chácara Butignolli, s/n**Bairro:** Rubião Junior**CEP:** 18.618-970**UF:** SP**Município:** BOTUCATU**Telefone:** (14)3880-1609**E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 4.896.170

marcação das células, para remoção do excesso de corantes. As células capturadas serão então contadas sob um microscópio de fluorescência (Olympus IX71). CTCs serão detectadas como positivo para DAPI, CK e negativo para CD45, enquanto que os leucócitos (células brancas do sangue) serão detectados como positivos para DAPI, CD45 e negativa para CK, células triplo-positivas serão consideradas como sinais falsos positivos, consequentes de impurezas. qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo) em Tempo Real A partir de buscas em bancos genômicos de dados públicos (por exemplo, Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)) serão selecionados novos marcadores de superfície expressos em células tumorais do SNC, que possam contribuir com a sensibilidade e especificidade dos dispositivos de detecção das CTCs. Extração, quantificação e preparo do RNA: O RNA total será extraído dos fragmentos de tecido tumoral utilizando o RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, Texas), segundo especificações do fabricante. A concentração de RNA total extraído será quantificada com o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit Qubit® RNA HS Assay, a pureza da amostra será determinada pelas relações 280/230 e 260/230 (proteínas e solventes orgânicos) em Espectrofotômetro Nanodrop Modelo ND-1000. Produção de cDNA: O RNA extraído será submetido a transcrição reversa com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, ThermoFisher, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Análise de Expressão: A partir do cDNA será feita a análise de expressão dos potenciais marcadores de superfície selecionados. Serão desenhados primers específicos para cada um dos marcadores (genes) a ser analisado. A qPCR será realizada no ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, ThermoFisher, CA, EUA), utilizando a GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Para garantir a normalização da concentração do RNA, pelo menos dois genes endógenos serão utilizados como referência ativa. Tais genes serão definidos após revisão na literatura e testes laboratoriais para definir a adequação aos genes alvos e as amostras biológicas. Os primers para cada marcador testado serão desenhados utilizando a ferramenta Primer3Plus36, disponível em <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As informações descritas nos campos foram retiradas dos documentos e arquivo - Informações Básicas do Projeto.

RISCOS: Os riscos para participação no estudo são mínimos. Para os doadores de sangue periférico, o participante sentirá um pequeno incômodo com a picada no local da inserção da agulha de coleta e, após, poderá ficar uma pequena manchinha (hematoma) no local da picada.

BENEFÍCIOS: Não existem benefícios imediatos e diretos atribuídos aos participantes voluntários

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 4.896.170

desse estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de Adriana Camargo Ferrasi, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu-FMB- Unesp, cujo objetivo é desenvolver dispositivo microfluídico para detecção e isolamento células tumorais circulantes (CTCs) provenientes de tumores do sistema nervoso central. O projeto está escrito de forma clara e apresenta todos os dados de identificação dos autores, identificação de onde será realizado, descrição dos objetivos, detalhamento da metodologia, bem como as referências que fundamentam e justificam a importância do desenvolvimento do tema abordado. Trata-se de um projeto factível. O pesquisador informa que haverá um custo de R\$ 37.000,00. Haverá financiamento próprio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: presente e adequadamente assinada
- Termo de anuência institucional: presente e adequada
- Projeto na íntegra
- Cronograma adequado e apresenta coerência entre brochura e plataforma, com data prevista para coleta de dados a partir de 02/08/2021.
- Biorepositório adequado
- Questionários adequadamente anexados
- TCLE adequado em forma de convite, com linguagem acessível garantindo o anonimato e a garantia do sigilo e paginado.
- Carta resposta

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO ORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o Projeto de Pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO ORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, realizada em 02/08/2021, o Projeto de Pesquisa apresentado encontra-se APROVADO. O Pesquisador deverá enviar Relatório Final de Atividades ao final da pesquisa.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 4.896.170

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1762214.pdf	08/07/2021 00:04:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final_revisado.pdf	08/07/2021 00:03:00	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Outros	Resposta_Pendencia.pdf	07/07/2021 23:59:40	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaHcfmbSipe1752021.pdf	14/06/2021 10:11:03	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	14/06/2021 10:09:17	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.pdf	14/06/2021 10:08:18	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/06/2021 10:06:50	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final.pdf	14/06/2021 10:06:23	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	14/06/2021 09:43:29	Adriana Camargo Ferrasi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 4.896.170

BOTUCATU, 10 de Agosto de 2021

**Assinado por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador(a))**

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Article

Differential Plasma Metabolites between High- and Low-Grade Meningioma Cases

Gabriel A. Kurokawa ¹, Pedro T. Hamamoto Filho ^{1,2}, Jeany Delafiori ³, Aline F. Galvani ¹, Arthur N. de Oliveira ³, Flávia L. Dias-Audibert ³, Rodrigo R. Catharino ³, Maria Inês M. C. Pardini ¹, Marco A. Zanini ², Estela de O. Lima ^{1,*} and Adriana C. Ferrasi ^{1,†}

¹ Laboratory of Molecular Analysis and Neuro-oncology, Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu 18618-970, Brazil

² Department of Neurology, Psychology and Psychiatry, Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu 18618-970, Brazil

³ Innovare Biomarkers Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas 13083-877, Brazil

* Correspondence: estela.lima@unesp.br; Tel.: +55-14-3880-1453

† These authors have contributed equally to this work and share last authorship.

Abstract: Meningiomas (MGMs) are currently classified into grades I, II, and III. High-grade tumors are correlated with decreased survival rates and increased recurrence rates. The current grading classification is based on histological criteria and determined only after surgical tumor sampling. This study aimed to identify plasma metabolic alterations in meningiomas of different grades, which would aid surgeons in predefining the ideal surgical strategy. Plasma samples were collected from 51 patients with meningioma and classified into low-grade (LG) (grade I; n = 43), and high-grade (HG) samples (grade II, n = 5; grade III, n = 3). An untargeted metabolomic approach was used to analyze plasma metabolites. Statistical analyses were performed to select differential biomarkers among HG and LG groups. Metabolites were identified using tandem mass spectrometry along with database verification. Five and four differential biomarkers were identified for HG and LG meningiomas, respectively. To evaluate the potential of HG MGM metabolites to differentiate between HG and LG tumors, a receiving operating characteristic curve was constructed, which revealed an area under the curve of 95.7%. This indicates that the five HG MGM metabolites represent metabolic alterations that can differentiate between LG and HG meningiomas. These metabolites may indicate tumor grade even before the appearance of histological features.

Keywords: biomarkers; grading; meningioma; metabolomics; plasma samples; screening



Citation: Kurokawa, G.A.; Hamamoto Filho, P.T.; Delafiori, J.; Galvani, A.F.; de Oliveira, A.N.; Dias-Audibert, F.L.; Catharino, R.R.; Pardini, M.I.M.C.; Zanini, M.A.; Lima, E.d.O.; et al. Differential Plasma Metabolites between High- and Low-Grade Meningioma Cases. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 394. <https://doi.org/10.3390/ijms24010394>

Academic Editor: Peter Hau

Received: 17 November 2022

Revised: 2 December 2022

Accepted: 9 December 2022

Published: 26 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Meningiomas (MGMs), which are the most common intracranial primary tumors, represent approximately 36% of intracranial primary tumors [1–3]. Women aged approximately 60–70 years are susceptible to MGMs [3–5] and the incidence of MGM increases with age [1,6]. Most MGMs, which originate from the arachnoid meningeal cells [6,7], exhibit the characteristics of slow-growing benign tumors [1,2,5,8]. According to the World Health Organization (WHO), MGMs are classified into grades I, II, and III. Grade I MGMs are benign tumors, account for 80–90% of the cases [2,7], and exhibit slow growth [1,5] with occasional mitoses and pleomorphic nuclei [4]. Grade II or atypical MGMs account for 5–7% of all MGMs and exhibit increased mitotic activity. Additionally, grade II MGMs exhibit at least three of the following features: small cells with a high nucleus/cytoplasm ratio; prominent nucleoli; increased cellularity; necrotic foci; and uninterrupted, patternless, or sheet-like growth. However, the criterion for classifying MGM as a grade II tumor is brain invasion, even in the absence of these features. In contrast to that of grade I MGM, the recurrence rate of atypical meningioma is 29–52%. Grade III or anaplastic MGMs

exhibit significantly increased mitotic activity, high brain invasion rate, extensive necrosis, and malignancy features that are more severe than those in atypical MGMs. Although grade III MGMs account for 1–3% of MGMs, the prognosis is poor with recurrence rates of 50–94% [2–5].

Currently, the initial diagnosis of MGM is based on imaging techniques, such as magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT) [2,5,8]. Additionally, tumor grade and prognosis are evaluated using histopathological analysis [9]. However, these approaches are not recommended for all patients. In the cases of patients with pacemakers, or asymptomatic MGMs, a “wait and see” approach is commonly used, and a biopsy is not performed [3]. The absence of imaging follow-up and/or histological analysis hampers tumor classification, negatively impacting diagnosis and prognosis. Although MRI, CT, and histology are useful to classify MGMs, they cannot accurately define the prognosis [10]. The identification of grades is fundamental for determining the prognosis of patients, especially for those with grades II and III tumors. Hence, the development of practical, minimally invasive, and accurate techniques is critical for the healthcare system [3,11]. To improve the accuracy of MGM prognosis prediction, the correlation between molecular features, especially those of plasma, can potentially aid MGM cases, including asymptomatic and imaging-ineligible cases. Thus, the identification of distinct biomarkers for individual MGM grades can aid in the development of an integrated diagnostic protocol with improved accuracy, powerful predictive value for recurrence and outcomes, and the most effective treatment for each case. For patients who will undergo surgical resection, preoperative information on the tumor grade will aid in planning an aggressive or conservative resection.

Untargeted metabolomic studies can contribute to the identification of differential metabolites between MGM grades. Mass spectrometry (MS) is the most sensitive technique for metabolomic studies and can detect metabolites in different biological samples, such as urine, cerebrospinal fluid, and plasma/blood serum [12–14]. Furthermore, MS is a useful technique because it is less invasive and highly accurate in identifying the plasma metabolite biomarkers in different tumor grades. Therefore, this study aimed to identify differential plasma metabolites between low-grade (LG; grade I) and high-grade (HG; grades II and III) MGMs, and evaluate the potential of HG MGM metabolites as tumor grade biomarkers.

2. Results

2.1. Patients

Among the patients enrolled in the study, 33 (64.7%) and 18 (35.3%) were women and men, respectively. The median and mean ages of participants were 53 (range: 27–85 years) and 53.1 years, respectively. The mean ages of patients with LG and HG tumors were 54.6 and 44.8 years, respectively.

2.2. Metabolites

Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) revealed a clear separation between LG and HG MGM cases (Figure 1). Volcano plot analysis was performed to select the significant metabolites with m/z ratios with $p < 0.05$ and fold change ≥ 1.5 ($\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 0.585$) (Figure 2). In total, nine differential biomarkers (four for LG MGMs and five for HG MGMs) were selected. The four LG MGM biomarkers were represented by m/z nominal values of 1294, 710, 577, and 1245. For HG MGM biomarkers, the selected m/z values were 294, 908, 800, 910, and 985. A heatmap was designed to examine the behavior of these nine biomarkers depending on the tumor grades (Figure 3). The heatmap revealed that the frequency of five HG MGM biomarkers in patients with HG MGM was higher than that in patients with LG MGM, indicating that these five HG MGM metabolites might serve as worse progression markers. To evaluate the potential of these five HG MGM m/z values as differential high-grade MGM metabolites, a receiving operating characteristic (ROC) curve was constructed considering a 95% confidence interval. The area under the curve

(AUC) corresponded to 0.958 (Figure 4). In addition to m/z selection from both groups, this study identified the biomarkers. From the nine selected m/z values, the following seven biomolecules were identified (detailed in Table 1): tyrosine (m/z 294), sulfatide (m/z 908), two phosphatidylserine (PS) molecules (m/z 800 and m/z 910), lactosylceramide (LacCer; m/z 985), phosphatidylethanolamine (PE; m/z 710), and diacylglycerol (DG; m/z 577).

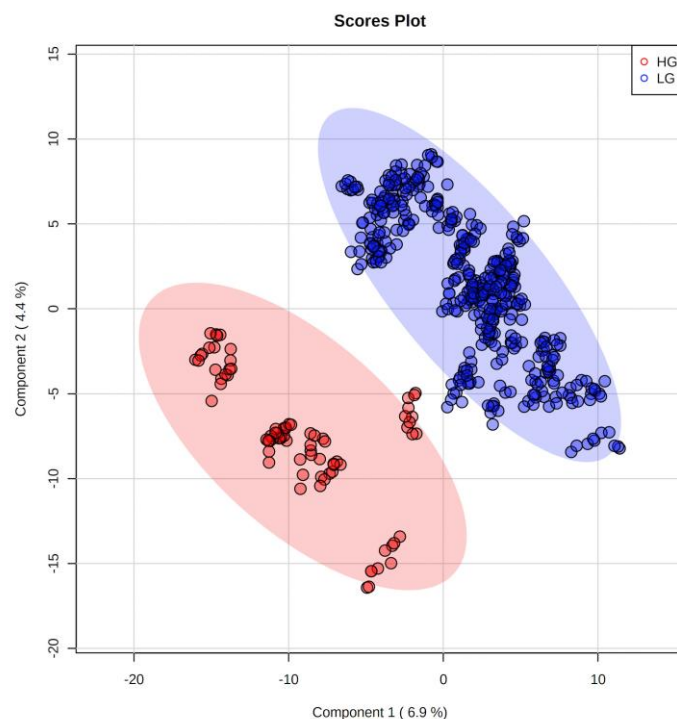


Figure 1. Partial least squares-discriminant analysis of the metabolites revealing the separation between low- and high-grade meningioma cases.

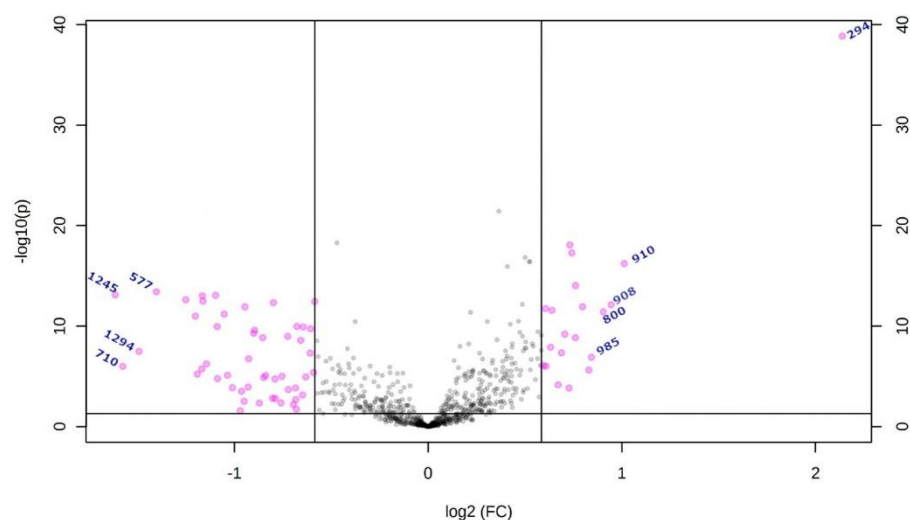


Figure 2. Volcano plot and statistical analysis of the detected metabolites. The m/z values of metabolites with $p < 0.05$; fold change (FC) ≥ 1.5 ; $\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 0.585$ were selected (pink dots). The gray dots correspond to m/z values that does not fit in p and FC threshold values.

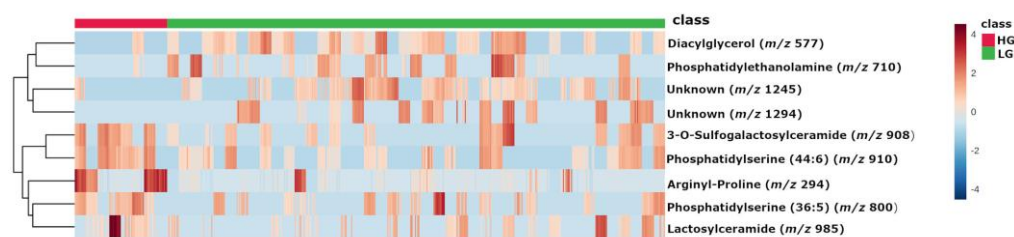


Figure 3. Heatmap analysis of the selected metabolites depending on the meningioma (MGM) group class (represented by the red/green horizontal bar on the top of the graphic). HG, High-grade; LG, Low-grade. The color grade represents the intensity of each biomarker in the patient samples.

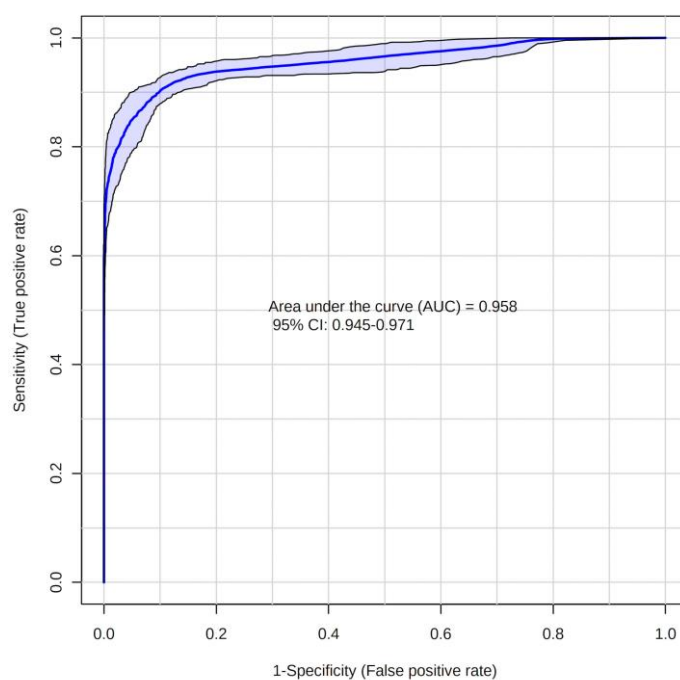


Figure 4. Receiving operating characteristic (ROC) curve analysis to determine the accuracy of the method to designate metabolites that can indicate high-grade meningioma and cancer progression.

Table 1. Low-grade and high-grade meningioma prognostic biomarkers.

	<i>m/z</i>	Database ID	Metabolite	Formula	Adducts	MS/MS	Log ₂ (FC)
High-grade	294	MID85632	Arginyl-Proline	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ O ₃	[M + Na] ⁺	268-254-250-236-266	2.1383
	910	HMDB0116777	PS (44:6) #	C ₅₀ H ₈₆ NO ₁₀ P	[M + NH ₄] ⁺	184-104-125-720-495	1.0127
	908	HMDB0012318	3-O-Sulfogalactosylceramide (42:2) #	C ₄₈ H ₉₁ NO ₁₁ S	[M + NH ₄] ⁺	494-95-81-604-109-184	0.94786
	800	LMGP03010137	PS (36:5) #	C ₄₂ H ₇₂ NO ₁₀ P	[M + NH ₄] ⁺	184-119-368-135-86-437	0.90497
	985	HMDB0011594	LacCer (40:1) #	C ₅₂ H ₉₉ NO ₁₃	[M + K] ⁺	360-338-369-648-437	0.84326

Table 1. Cont.

	<i>m/z</i>	Database ID	Metabolite	Formula	Adducts	MS/MS	Log ₂ (FC)
Low-grade	577	MID58656 MID58684	DG (34:1) #	C ₃₇ H ₇₀ O ₅	[M + H-H ₂ O] ⁺	95-81-57-69- 109-339-121- 419-135	−1.4045
	1294	-	Unknown	-	-	1275-1262- 1243-798	−1.4927
	710	MID40644	PE (32:0) #	C ₃₇ H ₇₄ NO ₈ P	[M + NH ₄] ⁺	661-655-678- 692-674-642- 341-454	−1.5768
	1245	-	Unknown	-	-	112-907-184- 720-338-625- 303	−1.6156

The biomarkers were chosen based on *p* values (*p* < 0.05) and fold change (FC) (FC ≥ 1.5; Log₂(FC) ≥ 0.585). Abbreviations: *m/z*, mass/charge ratio; ID, identifier of the metabolites in the databases researched; MID, METLIN; HMDB, Human Metabolome Database; LMGP, LIPD MAPS; # (carbon number: double bond number); DG, diacylglycerol; LacCer, lactosylceramide; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; MS/MS, tandem mass spectrometry.

3. Discussion

3.1. HG MGM Metabolites

Among the selected plasma metabolites of patients with HG MGM, a sulfatide (*m/z* = 908) and LacCer (*m/z* = 985), which are both byproducts of ceramide metabolism [15], were identified. Ceramide, which is the precursor of several sphingolipids, glycosphingolipids, and gangliosides, exhibits both structural functions in the lipid bilayer and second messenger functions in the signaling and regulation of cellular processes [15,16], such as senescence, apoptosis, differentiation, and cellular growth [17–19].

One of the main roles of ceramide is to activate signaling cascades that lead to cell death, functioning as a tumor suppressor [20,21]. Hence, one of the routes used by cancer cells to escape immune response is the metabolism of ceramide (Figure 5A) to inhibit apoptosis and support cell growth [18–22]. The main escape route used by cellular machinery to suppress this antitumor function is the glycosylation of ceramide to glucosylceramide (GlcCer) by the enzyme GlcCer synthase (GCS; also known as ceramide glucosyltransferase), which transfers glucose to ceramide [18,19,21–23]. This effect was first studied by Liu et al. [24] who evaluated human breast carcinoma cells with increased GCS expression. Breast cancer cells were transfected with a GCS-encoding gene. Compared with that in control cells, the survival rate was higher in transfected cells. In contrast, the inhibition of this pathway increased the ceramide-induced apoptosis rate [19] and attenuated multiple drug resistance [25]. Meanwhile, the overexpression of GCS increased the resistance of cells to antitumor drugs [26].

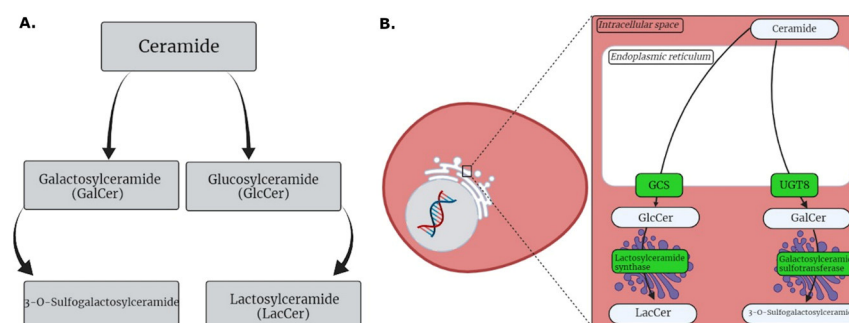


Figure 5. Graphical presentation of sphingolipid metabolism. (A) Ceramide glycosylation pathways adapted from MetaboAnalyst 5.0; (B) The proposed escape routes of tumor cells (lactosylceramide biosynthesis and sulfatide biosynthesis) adapted from KEGG MODULE Database.

In addition to GlcCer production, the inhibition of apoptosis via the ceramide glycosylation pathway was proposed by Beier and Görögh [27]. The authors suggested that the defense

mechanism of tumor cells can involve the activity of ceramide galactosyltransferase (UGT8), an enzyme that catalyzes the transfer of galactose to ceramide to generate galactosylceramide (GalCer) [28]. UGT8 overexpression is reported to be directly correlated with the malignancy grade of tumor cells [29,30]. Additionally, both sphingolipids (GlcCer and GalCer) were correlated with multidrug resistance in colon adenocarcinoma cells [31], indicating that ceramide metabolism is associated with tumor cell survival. As the presence of these molecules can indicate changes in ceramide glycosylation, the biochemical pathways in which they are involved are potential therapeutic targets to control tumor development.

Based on these pathways, two of the selected metabolites in this study were involved in the tumor cell escape pathway. After ceramide glycosylation, GlcCer is converted into LacCer (m/z 985) in the Golgi complex (Figure 5B) [32]. Additionally, the GlcCer levels are upregulated in multidrug-resistant cancer cells [23]. Similarly, the levels of LacCer and LacCer synthase, an enzyme that converts GlcCer into LacCer, are upregulated [33,34]. Increased LacCer levels may be associated with a worse prognosis and an increased risk of metastasis in patients with colorectal cancer [35]. In the Golgi complex, GalCer is sulfonated and converted to 3-O-sulfogalactosylceramide (m/z 908) (Figure 5B) [36]. GalCer sulfotransferase (an enzyme that catalyzes the sulfation of GalCer) was reported to be upregulated in the serum of patients with renal cell carcinoma [36] and hepatocellular carcinoma [37], in addition to the upregulation of a glycolipid sulfotransferase reported in renal carcinoma cells [38]. Moreover, cells with increased metastatic potential exhibit significantly higher expression levels of sulfotransferase than those with decreased metastatic potential [39]. These data support the hypothesis that ceramide byproducts are metabolites that can promote tumor progression and are associated with drug resistance, metastatic potential, and poor prognosis.

Another molecule identified as a potential HG MGM metabolite was arginyl-proline (PR) (m/z 294), which was selected as the most frequent metabolite in the HG MGM group. Several dipeptides function as cancer biomarkers [40,41]. However, studies evaluating the pathophysiological roles of PR are limited. Arginine and proline are among the amino acids considered essential for the growth of cancer cells [42]. Gao et al. demonstrated that the overexpression of pyrroline-5-carboxylate reductase (PYCR; involved in proline biosynthesis) is associated with poor prognosis and cancer proliferation [43]. Additionally, some tumors, such as melanoma and hepatocellular carcinoma, are auxotrophic for arginine and must obtain this amino acid from extracellular sources to survive [44]. This can explain the upregulation of arginine in the plasma samples of patients with HG tumors. To the best of our knowledge, this is the first study to report that PR dipeptide is a potential plasma marker for HG MGM. Based on the importance of PR as a differential biomarker, further studies are required to investigate the predictive value of PR and its role in different grades of MGM.

Finally, the MS/MS profile revealed two PS molecules (m/z 800 and m/z 910). PS, a phospholipid, is predominantly localized to the inner leaflet of the plasma membrane [45]. However, PS transport to the outer leaflet is related to apoptosis, activating the phagocytic biochemical pathway and macrophage recruitment [46–48]. After phagocytosis, apoptotic cells with externalized PS promote the overproduction of anti-inflammatory cytokines such as TGF- β and IL-10, and downregulate proinflammatory cytokines and chemokines [49–51]. Although the tumor microenvironment is not characterized by apoptotic cells, the outer membrane level of PS in cancerous cells is higher than that in healthy cells. Hence, cancer cells use the apoptosis signaling pathway to inactivate the antitumor immune response [52,53]. To escape from immunological defense mechanisms, PS upregulation at the outer leaflet of the tumor cell membrane suppresses inflammation, impairs cellular immunity, and supports tumor growth. Some researchers have suggested that targeting PS (mainly using the monoclonal antibody Bavituximab) is a potential anticancer therapeutic strategy [54–56]. Hence, the plasma levels of PS can indicate cancer progression and are potential therapeutic targets.

In addition to identifying biomarkers, this study evaluated the differential power of the HG biomarkers for tumor progression that can significantly impact clinical and therapeutical decisions. Five HG MGM biomarkers were used to construct a ROC curve to determine their discriminant power (Figure 4). An area under the curve (AUC) of 95.8% was achieved, implying that the five metabolites identified as HG MGM biomarkers can indicate the progression from an LG to an HG tumor. Therefore, these molecules must be further evaluated as targets for MGM progression, which will enable the establishment of a less invasive, more accurate and cost-effective tumor grading system, especially for the most aggressive and lethal HG tumors.

3.2. LG MGM Metabolites

In addition to the HG MGM biomarkers, two metabolites were identified as potential LG MGM biomarkers. PE (m/z 710), a glycerophospholipid, was one of the biomarkers. Similar to PS, PE is asymmetrically distributed in the plasma membrane and localized predominantly at the inner leaflet [57]. A study evaluating PE expression on the cell surface revealed that among 15 cancer cell lines, 12 exhibited downregulated levels of PE on the outer membrane. Hence, PE was selected as an LG MGM biomarker as it was downregulated in HG MGM [58]. Additionally, PE can serve as a biomarker for early tumor development, as the plasma levels of PE in patients with precervical cancer (squamous intraepithelial lesions) displayed potential for distinguishing early-stage cervical cancer from cervical cancer and healthy controls [59]. In addition, the serum PE levels in patients with early-stage hepatocellular carcinoma were higher than those in patients with late-stage hepatocellular carcinoma, indicating that serum PE levels are potential biomarkers for early-stage hepatocellular carcinoma [60]. These findings suggest a potential role of PE in carcinogenesis. Thus, glycerophospholipids can serve as biomarkers for early-stage disease.

Finally, DG (m/z 577), a central molecule involved in the synthesis of lipids, especially phospholipids and triglycerides, was identified as a potential LG MGM metabolite [61,62]. During lipid synthesis, DG can be converted to phosphatidic acid, a reaction catalyzed by DG kinases (DGKs) [63]. Among the enzyme isoforms, DGK α is the most studied and is reported to be associated with the development and progression of different types of cancer [64–66]. Additionally, DGK α is reported to be a potential immunosuppressor [67,68]. Compared with healthy T cells, cytotoxicity and cytokine secretion were higher in T cells in which DGK α expression was inhibited. This indicates the importance of DGK in cancer immune control [69]. Furthermore, studies on silencing and/or pharmacological inhibition of DGK α revealed an apparent correlation between downregulated DGK α expression and antitumor effects, including the inhibition of cell proliferation and invasion, colony formation, and cancer cell viability and the upregulation of apoptosis rates [70–72]. The overexpression of DGK α supports tumor cell proliferation [70,71]. Due to the aggressive behavior of HG MGM [73], lipid synthesis must be upregulated to meet the nutrient requirements of enhanced cell proliferation. Hence, membrane synthesis through DG consumption may be an alternative way to meet the nutrient demands of the HG tumor microenvironment. These findings demonstrate that high concentrations of DG in the blood of patients with LG MGM can indicate a less aggressive tumor. As DGK α is associated with cancer progression and DG is a potential LG MGM biomarker, future studies must investigate the plasma levels of DGK α and DG and their role in cancer development.

This study has several limitations, primarily the sample size of HG MGM cases. Recent epidemiological studies on MGMs have reported that grades II and III MGMs correspond to 8.2% and 0.7% of MGM documented WHO grades, respectively [74]. The present research represents a regional study and achieved a sample size that corresponds to the expected incidence index. Although these results represent a preliminary screening for metabolites of MGM grades in blood samples, they indicate biochemical alterations that may be reflected in the plasma samples of patients. We acknowledge the need for homogeneous groups to perform statistical analysis to extrapolate and apply the results in a real-world setting. In addition to some previously reported metabolites, this study revealed some novel ones. This

indicates the importance of these metabolites in the pathogenesis and progression of MGMs. Therefore, the results of this study revealed molecular indicators of metabolic imbalance, which can improve our understanding of MGM grades. Additionally, this research identified some molecules that can serve as potential therapeutic targets for MGMs.

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Samples

This study was approved by the Ethics Committee on Research of Sao Paulo State University (Protocol 4328-2012). All participants of the study signed individual informed consent forms. Fifty-one meningioma patients from both genders were included and divided into the following two groups: LG MGM (grade I; $n = 43$) and HG MGM (grade II, $n = 5$; grade III, $n = 3$).

4.2. Sample Preparation

All the blood plasma samples were collected on the first day of hospital admission for every patient enrolled in the present study. The blood was collected in EDTA-coated tubes and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The plasma was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Next, the plasma samples (20 μL) were subjected to metabolite extraction and ionization following the methods of Melo et al. [75]. For chemical ionization, formic acid 0.1% (analytical grade) was added to the final solution, which was subjected to MS analysis.

4.3. MS Analysis

After ionization, the samples were directly injected into a mass spectrometer (ESI-LTQ-XL; Thermo Scientific, Bremen, Germany) and analyzed under the following conditions: flow rate, 10 $\mu\text{L}/\text{min}$; capillary temperature, $280\text{ }^{\circ}\text{C}$; spray source voltage, 5 kV; sheath gas, 2 arbitrary units; analysis mode, positive ion mode; mass range, 100–1400 m/z (mass/charge). For each biological sample, 10 analytical replicates were analyzed.

4.4. Statistical Analysis and Molecular Identification

To identify the biochemical differences between HG and LG groups, the MS data were subjected to statistical analysis using the online software MetaboAnalyst 5.0 [76]. Multivariate PLS-DA was performed to evaluate the differences between HG and LG groups. To identify the discriminant biomarkers for each group, univariate analysis was performed and a Volcano plot was constructed. Parameters with $\text{FC} \geq 1.5$ and $p < 0.05$ were used to define the most abundant and significant m/z values for each group. The selected biomarkers were also evaluated using a heatmap with Ward's clustering method and Euclidean distance measurement. Among the m/z values evaluated, five of the selected markers for patients with HG MGM were used to construct a ROC curve and evaluate their potential as HG tumor differential metabolites. The biological molecules corresponding to the selected m/z ratios were identified by searching specialized metabolomic databases, such as the Human Metabolome Database (HMDB), METLIN, and LIPID MAPS. Next, the structure of the molecules was verified using tandem MS analysis. After identification, the biomarkers were subjected to in silico search to identify the biochemical pathways involved in carcinogenesis and tumor progression.

Author Contributions: G.A.K., A.N.d.O., F.L.D.-A. and J.D. performed MS experiments. P.T.H.F., M.A.Z., A.F.G. and A.C.F. performed biofluid collection and selection, and provided clinical support. E.d.O.L., A.C.F., A.F.G. and G.A.K. analyzed the data and prepared the figures. G.A.K., J.D. and E.d.O.L. prepared the manuscript. R.R.C., P.T.H.F. and M.I.M.C.P. revised the manuscript. R.R.C. provided infrastructure and methodological support. E.d.O.L. and A.C.F. designed the study, managed the group, and supervised the research. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Laboratory of Molecular Analysis and Neuro-oncology and Innovare Laboratory thank the Institutional Scientific Initiation Scholarship Program/National Council for Scientific and Techno-

logical Development (PIBIC-CNPq) for the fellowship provided to G.A.K. (process no. 534/1-2020). The authors thank the Coordination of Superior Level Staff Improvement- Brazil (CAPES) for the fellowships provided to A.N.d.O. (Code 88887.513974/2020-00), G.A.K. (Code 88887.661164/2022-00), and A.F.G. (Code 88887.670079/2022-00). Additionally, the authors thank the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) for the fellowship provided to R.R.C. (process no. 2018/14657-5) and J.D. (process no. 2019/05718-3). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee on Research of Sao Paulo State University (Protocol 4328-2012 approved on 3 September 2012).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: The members of the Laboratory of Molecular Neuro-oncology would like to thank Rodrigo Ramos Catharino for kindly providing access to the mass spectrometer and infrastructure for analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Benson, V.S.; Pirie, K.; Green, J.; Casabonne, D.; Beral, V. Lifestyle Factors and Primary Glioma and Meningioma Tumours in the Million Women Study Cohort. *Br. J. Cancer* **2008**, *99*, 185–190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Fathi, A.R.; Roelcke, U. Meningioma. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2013**, *13*, 337. [\[CrossRef\]](#)
3. Wang, N.; Osswald, M. Meningiomas: Overview and New Directions in Therapy. *Semin. Neurol.* **2018**, *38*, 112–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Lamszus, K. Meningioma Pathology, Genetics, and Biology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2004**, *63*, 275–286. [\[CrossRef\]](#)
5. Marosi, C.; Hassler, M.; Roessler, K.; Reni, M.; Sant, M.; Mazza, E.; Vecht, C. Meningioma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2008**, *67*, 153–171. [\[CrossRef\]](#)
6. Wiemels, J.; Wrensch, M.; Claus, E.B. Epidemiology and Etiology of Meningioma. *J. Neurooncol.* **2010**, *99*, 307–314. [\[CrossRef\]](#)
7. Mashayekhi, F.; Saberi, A.; Mashayekhi, S. Serum TIMP1 and TIMP2 Concentration in Patients with Different Grades of Meningioma. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2018**, *170*, 84–87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Buerki, R.A.; Horbinski, C.M.; Kruser, T.; Horowitz, P.M.; James, C.D.; Lukas, R.V. An Overview of Meningiomas. *Future Oncol.* **2018**, *14*, 2161–2177. [\[CrossRef\]](#)
9. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [\[CrossRef\]](#)
10. Ogasawara, C.; Philbrick, B.D.; Cory Adamson, D. Meningioma: A Review of Epidemiology, Pathology, Diagnosis, Treatment, and Future Directions. *Biomedicines* **2021**, *9*, 319. [\[CrossRef\]](#)
11. Goldbrunner, R.; Minniti, G.; Preusser, M.; Jenkinson, M.D.; Sallabanda, K.; Houdart, E.; von Deimling, A.; Stavrinos, P.; Lefranc, F.; Lund-Johansen, M.; et al. EANO Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Meningiomas. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, e383–e391. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Kim, S.J.; Kim, S.H.; Kim, J.H.; Hwang, S.; Yoo, H.J. Understanding Metabolomics in Biomedical Research. *Endocrinol. Metab.* **2016**, *31*, 7–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Gowda, G.A.N.; Zhang, S.; Gu, H.; Asiago, V.; Shanaiah, N.; Raftery, D. Metabolomics-Based Methods for Early Disease Diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2008**, *8*, 617–633. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Medina, S.; Dominguez-Perles, R.; Gil, J.I.; Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A. Metabolomics and the Diagnosis of Human Diseases -A Guide to the Markers and Pathophysiological Pathways Affected. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 823–848. [\[CrossRef\]](#)
15. Ogretmen, B.; Hannun, Y.A. Biologically Active Sphingolipids in Cancer Pathogenesis and Treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 604–616. [\[CrossRef\]](#)
16. Saddoughi, S.A.; Ogretmen, B. *Diverse Functions of Ceramide in Cancer Cell Death and Proliferation*, 1st ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2013; Volume 117. [\[CrossRef\]](#)
17. Grösch, S.; Schiffmann, S.; Geisslinger, G. Chain Length-Specific Properties of Ceramides. *Prog. Lipid. Res.* **2012**, *51*, 50–62. [\[CrossRef\]](#)
18. Morad, S.A.F.; Cabot, M.C. Ceramide-Orchestrated Signalling in Cancer Cells. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 51–65. [\[CrossRef\]](#)
19. Spinedi, A.; Di Bartolomeo, S.; Piacentini, M. Apoptosis Induced by N-Hexanoylsphingosine in CHP-100 Cells Associates with Accumulation of Endogenous Ceramide and Is Potentiated by Inhibition of Glucocerebroside Synthesis. *Cell Death Differ.* **1998**, *5*, 785–791. [\[CrossRef\]](#)
20. Ogretmen, B.; Hannun, Y.A. Updates on Functions of Ceramide in Chemotherapy-Induced Cell Death and in Multidrug Resistance. *Drug Resist. Updat.* **2001**, *4*, 368–377. [\[CrossRef\]](#)

21. Ryland, L.K.; Fox, T.E.; Liu, X.; Loughran, T.P.; Kester, M. Dysregulation of Sphingolipid Metabolism in Cancer. *Cancer Biol.* **2011**, *11*, 138–149. [\[CrossRef\]](#)
22. Bleicher, R.J.; Cabot, M.C. Glucosylceramide Synthase and Apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1585*, 172–178. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Lavie, Y.; Cao, H.T.; Bursten, S.L.; Giuliano, A.E.; Cabot, M.C. Accumulation of Glucosylceramides in Multidrug-Resistant Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19530–19536. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Liu, Y.Y.; Han, T.Y.; Giuliano, A.E.; Ichikawa, S.; Hirabayashi, Y.; Cabot, M.C. Glycosylation of Ceramide Potentiates Cellular Resistance to Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis. *Exp. Cell Res.* **1999**, *252*, 464–470. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Lavie, Y.; Cao, H.T.; Volner, A.; Lucci, A.; Han, T.Y.; Geffen, V.; Giuliano, A.E.; Cabot, M.C. Agents That Reverse Multidrug Resistance, Tamoxifen, Verapamil, and Cyclosporin A, Block Glycosphingolipid Metabolism by Inhibiting Ceramide Glycosylation in Human Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1682–1687. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Gouazé, V.; Yu, J.Y.; Bleicher, R.J.; Han, T.-Y.; Liu, Y.-Y.; Wang, H.; Gottesman, M.M.; Bitterman, A.; Giuliano, A.E.; Cabot, M.C. Overexpression of Glucosylceramide Synthase and P-Glycoprotein in Cancer Cells Selected for Resistance to Natural Product Chemotherapy. *Mol. Cancer* **2004**, *3*, 633–639. [\[CrossRef\]](#)
27. Beier, U.H.; Görögh, T. Implications of Galactocerebrosidase and Galactosylcerebroside Metabolism in Cancer Cells. *Int. J. Cancer* **2005**, *115*, 6–10. [\[CrossRef\]](#)
28. Sprong, H.; Kruithof, B.; Leijendekker, R.; Slot, J.W.; Van Meer, G.; Van Der Sluijs, P. UDP-Galactose: Ceramide Galactosyltransferase is a Class I Integral Membrane Protein of the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25880–25888. [\[CrossRef\]](#)
29. Dziegiel, P.; Owczarek, T.; Plazuk, E.; Gomukiewicz, A.; Majchrzak, M.; Podhorska-Okołów, M.; Driouch, K.; Lidereau, R.; Ugorski, M. Ceramide Galactosyltransferase (UGT8) Is a Molecular Marker of Breast Cancer Malignancy and Lung Metastases. *Br. J. Cancer* **2010**, *103*, 524–531. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Owczarek, T.B.; Suchanski, J.; Pula, B.; Kmiecik, A.M.; Chadalski, M.; Jethon, A.; Dziegiel, P.; Ugorski, M. Galactosylceramide Affects Tumorigenic and Metastatic Properties of Breast Cancer Cells as an Anti-Apoptotic Molecule. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84191. [\[CrossRef\]](#)
31. Kok, J.W.; Veldman, R.J.; Klappe, K.; Koning, H.; Filipescu, C.M.; Müller, M.M. Differential Expression of Sphingolipids in MRP1 Overexpressing HT29 Cells. *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 172–178. [\[CrossRef\]](#)
32. Wegner, M.S.; Gruber, L.; Mattjus, P.; Geisslinger, G.; Grösch, S. The UDP-Glucose Ceramide Glycosyltransferase (UGCG) and the Link to Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1). *BMC Cancer* **2018**, *18*, 153. [\[CrossRef\]](#)
33. Chatterjee, S. Regulation of Synthesis of Lactosylceramide in Normal and Tumor Proximal Tubular Cells. *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* **1993**, *1167*, 339–344. [\[CrossRef\]](#)
34. Hummel, I.; Klappe, K.; Kok, J.W. Up-Regulation of Lactosylceramide Synthase in MDR1 Overexpressing Human Liver Tumour Cells. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3381–3384. [\[CrossRef\]](#)
35. Peng, W.; Tan, S.; Xu, Y.; Wang, L.; Qiu, D.; Cheng, C.; Lin, Y.; Liu, C.; Li, Z.; Li, Y.; et al. LC-MS/MS Metabolome Analysis Detects the Changes in the Lipid Metabolic Profiles of DMMR and PMMR Cells. *Oncol. Rep.* **2018**, *40*, 1026–1034. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Gasa, S.; Casl, M.-T.; Makita, A.; Sakakibara, N.; Koyanagi, T.; Atsuta, T. Presence and Characterization of Glycolipid Sulfotransferase in Human Cancer Serum. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *189*, 301–306. [\[CrossRef\]](#)
37. Gasa, S.; Casl, M.T.; Jin, T.; Kamio, K.; Uehara, Y.; Miyazaki, T.; Makita, A. Elevated Serum Level of Glycolipid Sulfotransferase in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Lett.* **1991**, *59*, 19–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Honke, K.; Tsuda, M.; Hirahara, Y.; Miyao, N.; Tsukamoto, T.; Satoh, M.; Wada, Y. Cancer-Associated Expression of Glycolipid Sulfotransferase Gene in Human Renal Cell Carcinoma Cells. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3800–3805.
39. Shi, B.-Z.; Hu, P.; Geng, F.; He, P.-J.; Wu, X.-Z. Gal3ST-2 Involved in Tumor Metastasis Process by Regulation of Adhesion Ability to Selectins and Expression of Integrins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 934–940. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Wu, M.; Xu, Y.; Fitch, W.L.; Zheng, M.; Merritt, R.E.; Shrager, J.B.; Zhang, W.; Dill, D.L.; Peltz, G.; Hoang, C.D. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Methods for Measuring Dipeptide Abundance in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 2091–2098. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Ozawa, H.; Hirayama, A.; Shoji, F.; Maruyama, M.; Suzuki, K.; Yamanaka-Okumura, H.; Tatano, H.; Morine, Y.; Soga, T.; Shimada, M.; et al. Comprehensive Dipeptide Analysis Revealed Cancer-Specific Profile in the Liver of Patients with Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis. *Metabolites* **2020**, *10*, 442. [\[CrossRef\]](#)
42. Kuo, M.T.; Chen, H.H.W.; Feun, L.G.; Savaraj, N. Targeting the Proline–Glutamine–Asparagine–Arginine Metabolic Axis in Amino Acid Starvation Cancer Therapy. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Gao, Y.; Luo, L.; Xie, Y.; Zhao, Y.; Yao, J.; Liu, X. PYCR1 Knockdown Inhibits the Proliferation, Migration, and Invasion by Affecting JAK/STAT Signaling Pathway in Lung Adenocarcinoma. *Mol. Carcinog.* **2020**, *59*, 503–511. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Dillon, B.J.; Prieto, V.G.; Curley, S.A.; Ensor, C.M.; Holtsberg, F.W.; Bomalaski, J.S.; Clark, M.A. Incidence and Distribution of Argininosuccinate Synthetase Deficiency in Human Cancers: A Method for Identifying Cancers Sensitive to Arginine Deprivation. *Cancer* **2004**, *100*, 826–833. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Krahling, S.; Callahan, M.K.; Williamson, P.; Schlegel, R.A. Exposure of Phosphatidylserine Is a General Feature in the Phagocytosis of Apoptotic Lymphocytes by Macrophages. *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 183–189. [\[CrossRef\]](#)

46. Birge, R.B.; Boeltz, S.; Kumar, S.; Carlson, J.; Wanderley, J.; Calianese, D.; Barcinski, M.; Brekken, R.A.; Huang, X.; Hutchins, J.T.; et al. Phosphatidylserine Is a Global Immunosuppressive Signal in Efferocytosis, Infectious Disease, and Cancer. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 962–978. [\[CrossRef\]](#)
47. Chang, W.; Fa, H.; Xiao, D.; Wang, J. Targeting Phosphatidylserine for Cancer Therapy: Prospects and Challenges. *Theranostics* **2020**, *10*, 9214–9229. [\[CrossRef\]](#)
48. Martin, S.J.; Reutelingsperger, C.P.M.; McGahon, A.J.; Rader, J.A.; Van Schie, R.C.A.A.; LaFace, D.M.; Green, D.R. Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus: Inhibition by Overexpression of BCL-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 1545–1556. [\[CrossRef\]](#)
49. Fadok, V.A.; Bratton, D.L.; Rose, D.M.; Pearson, A.; Ezekewitz, R.A.B.; Henson, P.M. A Receptor for Phosphatidylserine-Specific Clearance of Apoptotic Cells. *Nature* **2000**, *405*, 85–90. [\[CrossRef\]](#)
50. Huynh, M.-L.N.; Fadok, V.A.; Henson, P.M. Phosphatidylserine-Dependent Ingestion of Apoptotic Cells Promotes TGF- β 1 Secretion and the Resolution of Inflammation. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 41–50. [\[CrossRef\]](#)
51. Voll, R.E.; Herrmann, M.; Roth, E.A.; Stach, C.; Kalder, J.R.; Girkontaite, I. Immunosuppressive Effects of Apoptotic Cells. *Nature* **1997**, *390*, 350–351. [\[CrossRef\]](#)
52. Utsugi, T.; Schroit, A.J.; Connor, J.; Bucana, C.D.; Fidler, I.J. Elevated Expression of Phosphatidylserine in the Outer Membrane Leaflet of Human Tumor Cells and Recognition by Activated Human Blood Monocytes. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 3062–3066. [\[PubMed\]](#)
53. Vallabhapurapu, S.D.; Blanco, V.M.; Sulaiman, M.K.; Vallabhapurapu, S.L.; Chu, Z.; Franco, R.S.; Qi, X. Variation in Human Cancer Cell External Phosphatidylserine Is Regulated by Flippase Activity and Intracellular Calcium. *Oncotarget* **2015**, *6*, 34375–34388. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Chalasani, P.; Marron, M.; Roe, D.; Clarke, K.; Iannone, M.; Livingston, R.B.; Shan, J.S.; Stopeck, A.T. A Phase I Clinical Trial of Baviximab and Paclitaxel in Patients with HER2 Negative Metastatic Breast Cancer. *Cancer Med.* **2015**, *4*, 1051–1059. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Cheng, X.; Li, L.; Thorpe, P.E.; Yopp, A.C.; Brekken, R.A.; Huang, X. Antibody-Mediated Blockade of Phosphatidylserine Enhances the Antitumor Effect of Sorafenib in Hepatocellular Carcinomas Xenografts. *Ann. Surg. Oncol.* **2016**, *23* (Suppl. S5), 583–591. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Meyer, J.; Arriaga, Y.; Anandam, J.; Karri, S.; Syed, S.; Verma, U.; Abdelnaby, A.; Raja, G.; Dong, Y.; Beg, M.S.; et al. A Phase I Clinical Trial of the Phosphatidylserine-Targeting Antibody Baviximab in Combination with Radiation Therapy and Capecitabine in the Preoperative Treatment of Rectal Adenocarcinoma. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* **2018**, *41*, 972–976. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Elvas, F.; Stroobants, S.; Wyffels, L. Phosphatidylethanolamine Targeting for Cell Death Imaging in Early Treatment Response Evaluation and Disease Diagnosis. *Apoptosis* **2017**, *22*, 971–987. [\[CrossRef\]](#)
58. Broughton, L.J.; Crow, C.; Maraveyas, A.; Madden, L.A. Duramycin-Induced Calcium Release in Cancer Cells. *Anticancer Drugs* **2016**, *27*, 173–182. [\[CrossRef\]](#)
59. Cheng, F.; Wen, Z.; Feng, X.; Wang, X.; Chen, Y. A Serum Lipidomic Strategy Revealed Potential Lipid Biomarkers for Early-Stage Cervical Cancer. *Life Sci.* **2020**, *260*, 118489. [\[CrossRef\]](#)
60. Lu, Y.; Chen, J.; Huang, C.; Li, N.; Zou, L.; Chia, S.E.; Chen, S.; Yu, K.; Ling, Q.; Cheng, Q.; et al. Comparison of Hepatic and Serum Lipid Signatures in Hepatocellular Carcinoma Patients Leads to the Discovery of Diagnostic and Prognostic Biomarkers. *Oncotarget* **2018**, *9*, 5032–5043. [\[CrossRef\]](#)
61. Goto, K.; Hozumi, Y.; Nakano, T.; Saino-Saito, S.; Martelli, A.M. Lipid Messenger, Diacylglycerol, and Its Regulator, Diacylglycerol Kinase, in Cells, Organs, and Animals: History and Perspective. *Tohoku J. Exp. Med.* **2008**, *214*, 199–212. [\[CrossRef\]](#)
62. Wakelam, M.J.O. Diacylglycerol—When Is It an Intracellular Messenger? *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1436*, 117–126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Fazio, A.; Obeng, E.O.; Rusciano, I.; Marvi, M.V.; Zoli, M.; Mongiorgi, S.; Ramazzotti, G.; Follo, M.Y.; McCubrey, J.A.; Cocco, L.; et al. Subcellular Localization Relevance and Cancer-Associated Mechanisms of Diacylglycerol Kinases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5297. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Filigheddu, N.; Cutrupi, S.; Porporato, P.E.; Riboni, F.; Baldanzi, G.; Chianale, F.; Fortina, E.; Piantanida, P.; De Bortoli, M.; Vacca, G.; et al. Diacylglycerol Kinase Is Required for HGF-Induced Invasiveness and Anchorage-Independent Growth of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 1489–1492. [\[PubMed\]](#)
65. Filigheddu, N.; Sampietro, S.; Chianale, F.; Porporato, P.E.; Gaggianesi, M.; Gregnanin, I.; Rainero, E.; Ferrara, M.; Perego, B.; Riboni, F.; et al. Diacylglycerol Kinase α Mediates 17- β -Estradiol-Induced Proliferation, Motility, and Anchorage-Independent Growth of Hec-1A Endometrial Cancer Cell Line through the G Protein-Coupled Estrogen Receptor GPR30. *Cell Signal* **2011**, *23*, 1988–1996. [\[CrossRef\]](#)
66. Yanagisawa, K.; Yasuda, S.; Kai, M.; Imai, S.; Yamada, K.; Yamashita, T.; Jimbow, K.; Kanoh, H.; Sakane, F. Diacylglycerol Kinase α Suppresses Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis of Human Melanoma Cells through NF- κ B Activation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, *1771*, 462–474. [\[CrossRef\]](#)
67. Prinz, P.U.; Mender, A.N.; Masouris, I.; Durner, L.; Oberneder, R.; Noessner, E. High DGK- α and Disabled MAPK Pathways Cause Dysfunction of Human Tumor-Infiltrating CD8 + T Cells That Is Reversible by Pharmacologic Intervention. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 5990–6000. [\[CrossRef\]](#)

68. Prinz, P.U.; Mendler, A.N.; Brech, D.; Masouris, I.; Oberneder, R.; Noessner, E. NK-Cell Dysfunction in Human Renal Carcinoma Reveals Diacylglycerol Kinase as Key Regulator and Target for Therapeutic Intervention. *Int. J. Cancer* **2014**, *135*, 1832–1841. [\[CrossRef\]](#)
69. Jung, I.-Y.; Kim, Y.-Y.; Yu, H.-S.; Lee, M.; Kim, S.; Lee, J. CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of DGK Improves Antitumor Activities of Human T Cells. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 4692–4703. [\[CrossRef\]](#)
70. Dominguez, C.L.; Floyd, D.H.; Xiao, A.; Mullins, G.R.; Kefas, B.A.; Xin, W.; Yacur, M.N.; Abounader, R.; Lee, J.K.; Wilson, G.M.; et al. Diacylglycerol Kinase α Is a Critical Signaling Node and Novel Therapeutic Target in Glioblastoma and Other Cancers. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 782–797. [\[CrossRef\]](#)
71. Takeishi, K.; Taketomi, A.; Shirabe, K.; Toshima, T.; Motomura, T.; Ikegami, T.; Yoshizumi, T.; Sakane, F.; Maehara, Y. Diacylglycerol Kinase Alpha Enhances Hepatocellular Carcinoma Progression by Activation of Ras-Raf-MEK-ERK Pathway. *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 77–83. [\[CrossRef\]](#)
72. Torres-Ayuso, P.; Daza-Martín, M.; Martín-Pérez, J.; Ávila-Flores, A.; Mérida, I. Diacylglycerol Kinase α Promotes 3D Cancer Cell Growth and Limits Drug Sensitivity through Functional Interaction with Src. *Oncotarget* **2014**, *5*, 9710–9726. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Yew, A.; Trang, A.; Nagasawa, D.T.; Spasic, M.; Choy, W.; Garcia, H.M.; Yang, I. Chromosomal Alterations, Prognostic Factors, and Targeted Molecular Therapies for Malignant Meningiomas. *J. Clin. Neurosci.* **2013**, *20*, 17–22. [\[CrossRef\]](#)
74. Ostrom, Q.T.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro Oncol.* **2021**, *23* (Suppl. S2), III1–III105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Melo, C.F.O.R.; Delafiori, J.; de Oliveira, D.N.; Guerreiro, T.M.; Esteves, C.Z.; Lima, E.O.; Pando-Robles, V.; Catharino, R.R.; Milanez, G.P.; do Nascimento, G.M.; et al. Serum Metabolic Alterations upon ZIKA Infection. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1954, Correction in *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Pang, Z.; Chong, J.; Zhou, G.; de Lima Morais, D.A.; Chang, L.; Barrette, M.; Gauthier, C.; Jacques, P.-É.; Li, S.; Xia, J. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the Gap between Raw Spectra and Functional Insights. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W388–W396. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.