

**Ana Caroline Neuber**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS  
CRIOPRESERVADAS: 13 ANOS DE HISTÓRIA DO BIOBANCO-HCB**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Márcia M. C. M. Silveira

Coorientador: Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

BARRETOS, SP  
2021

N478a Neuber, Ana Caroline.

Avaliação da qualidade de amostras biológicas humanas criopreservadas:  
13 anos de história do Biobanco-HCB. / Ana Caroline Neuber. - Barretos, SP  
2021.

141 f. : il.

Orientadora: Márcia Maria Chiquetelli Marques Silveira.  
Coorientador: Cristovam Scapulatempo Neto.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de  
Câncer de Barretos, 2021.

1. Biobanco. 2. Pesquisa translacional. 3. Pré-analíticos. 4. Controle  
de qualidade. 5. Criopreservação. 6. Tempo de armazenamento. I. Autor.  
II. Título.

CDD 571.638

#### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570  
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos



**INSTITUTO DE ENSINO & PESQUISA**

Rua Antenor Duarte Villela, 1331  
Bairro Dr. Paulo Prata  
Barretos (SP), Brasil  
CEP: 14.784-400  
Telefone: +55 (17) 3321-6600

## FOLHA DE APROVAÇÃO



**Ana Caroline Neuber**

Título: "AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS  
CRIOPRESERVADAS: 13 ANOS DE HISTÓRIA DO BIOBANCO-HCB"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer  
de Barretos para obtenção do Título de Mestre/Doutor em Ciências da Saúde - Área de  
Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 28/04/2021

Banca Examinadora:

Dra. Miyuki Uno

Instituição: Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer do Estado  
de São Paulo, ICESP.

Dr. Claudio Gustavo Stefanoff

Instituição: Instituto nacional de câncer José Alencar Gomes.

Dr. Vinicius Duval

Presidente e Suplente

Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

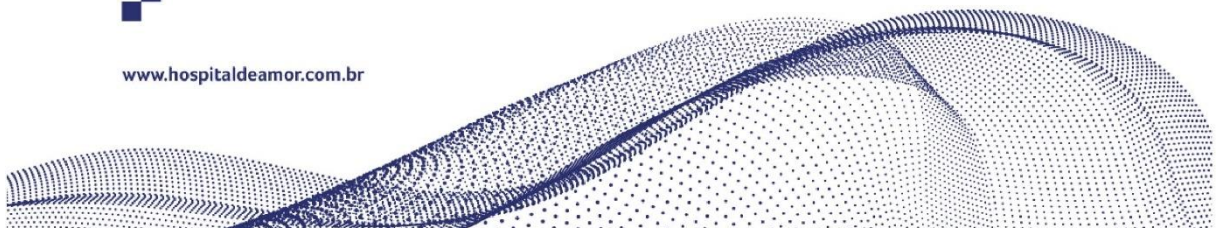
Orientadora

Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

Coorientador



[www.hospitaldeamor.com.br](http://www.hospitaldeamor.com.br)



“Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.”



Dedico este trabalho aos meus pais, Agda e Ismar, pelo amor, apoio, educação e incentivo aos estudos.

A minha avó materna Lenir, exemplo de força e garra, pelo cuidado e amor incondicional.

A minha irmã Fernanda e meu afilhado Miguel, pelo apoio, amor e alegria que me transmitem diariamente.

Ao meu noivo Igor, pelo amor, compreensão, incentivo e incansável apoio ao longo da elaboração desta tese.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Prof<sup>a</sup> Dra Márcia M. M. Chiquiteli Marques Silveira**, pela oportunidade em executar esse trabalho, confiança e aprendizados. Agradeço pela contribuição em meu desenvolvimento acadêmico bem como pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador, **Dr. Cristovam Scapulatempo Neto**, pelo incentivo, alegria que transmite e confiança ao me contratar para trabalhar no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos, oportunidade que me abriu diversos caminhos.

Ao **Hospital de Câncer de Barretos**, pela oportunidade e incentivo á pesquisa, bem como apoio financeiro para participação de congressos, eventos científicos e execução desta tese.

Ao diretor executivo e científico do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer Barretos, **Dr. Rui Manuel Reis**, pelo apoio e incentivo para elaboração deste projeto.

Aos membros da minha banca de acompanhamento, **Dr. Claudio Gustavo Stefanoff, Dra Rozany Dufloth e Dr. Vinícius Duval da Silva**, pela disponibilidade e pelas excelentes sugestões dadas.

Ao patologista **Dr. Eduardo Caetano Albino da Silva**, pela disponibilidade, sugestões e análise das lâminas.

Ao bioestatístico, **Marco Antônio Oliveira**, pela paciência, disponibilidade, análises estatísticas, aprendizado e sugestões que contribuíram significativamente para o desenvolvimento do projeto.

À equipe do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos, **Cássio Hoft Tostes, Thyago Matheus e Caroline Rogeri**, pelo apoio, ajuda e compreensão às minhas ausências.

Ao designer, **Caio Fernando de Oliveira**, pela competência e ajuda na elaboração de algumas figuras desta tese.

Ao pesquisador de pós-doutorado, **Dr. Adeyson Guimarães Ribeiro**, pela disponibilidade e capricho no desenvolvimento dos indicadores do Biobanco.

Ao grupo de Genética Molecular do Câncer, **Mariana Balie, Ma. Rhafaela Causin e Ana Julia Aguiar de Freitas**, pela amizade, aprendizado e momentos de descontração.

À minha ex-colega de profissão, que se tornou uma grande amiga pessoal, **Grazielli Cristina Lopes Rafael**, pela oportunidade em conviver e aprender diariamente com uma

excelente profissional e grande pessoa. Agradeço o incentivo, amizade e bom humor, que trouxe alegria e leveza aos meus dias.

Aos funcionários do departamento de patologia, biblioteca, diagnóstico molecular, programa de pós-graduação, núcleo de epidemiologia e bioestatística, eventos, escritório de projetos e inovação tecnológica do Hospital de Câncer de Barretos, pelo auxílio prestado.

Ao meu grande amigo **Celso José de Carvalho**, pela amizade sincera, bondade, generosidade e disposição em me ajudar sempre que precisei. Agradeço a cia nas lindas tardes ensolaradas de pedal que compartilhamos, acompanhadas sempre de uma boa conversa que me inspiraram, trazendo uma visão otimista e contemplativa da vida.

À minha amiga **Angela Neves Oliveira**, pelo lindo e grande coração que possui, é um grande privilégio e aprendizado conviver com você.

À pesquisadora **Dra. Letícia Ferro**, pela amizade, apoio e pelo grande exemplo de profissional e pessoa.

Ao bibliotecário **Me Martins Fideles dos Santos Neto**, pela amizade, generosidade e conversas e por me estender a mão sempre que precisei.

Aos meus queridos amigos, **Gabriella Taques, Tiago Tassinari e Guilherme Datorre**, pelo acolhimento durante e após a residência de vocês, transformando-se em uma grande rede de apoio para mim. Agradeço a cada um de vocês pela amizade, conversas, generosidade, risadas e diversos momentos alegres que pudemos compartilhar.

À minha **família** e meu **noivo**, pelo apoio e compreensão nos momentos em que estive ausente.

A **Deus** por me conceder o dom da vida e poder desfrutá-la com saúde plena e paixão.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“O grande impedimento para as descobertas na história da humanidade não é a ignorância, é a ilusão do conhecimento.”* **Daniel Boorstin**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Biobancos de amostras biológicas humanas</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Infraestrutura e segurança</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2 Aspectos éticos e legais</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3 Tipos de Biobancos</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4 Colaboração e treinamento da equipe interdisciplinar</b>	<b>6</b>
<b>1.1.4.1 O papel central do patologista</b>	<b>7</b>
<b>1.1.5 Fatores pré-analíticos</b>	<b>8</b>
<b>1.1.5.1 Fatores pré-analíticos <i>in vivo</i></b>	<b>8</b>
<b>1.1.5.2 Fatores pré-analíticos <i>in vitro</i></b>	<b>9</b>
<b>1.1.6 Controle de qualidade em biobancos</b>	<b>13</b>
<b>1.1.6.1 Controle de qualidade de ácidos nucleicos</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos</b>	<b>17</b>
<b>1.2.1 Número de amostras e pacientes</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2 Tipos tumorais coletados</b>	<b>19</b>
<b>1.2.3 Tipos de materiais biológicos coletados</b>	<b>20</b>
<b>1.2.4 Equipe e fluxo de trabalho</b>	<b>21</b>
<b>1.2.5 Comitê Biobanco</b>	<b>25</b>
<b>1.2.6 Infraestrutura</b>	<b>25</b>
<b>1.2.7 Procedimentos operacionais padrão</b>	<b>27</b>
<b>1.2.8 Colaborações e uso de amostras em projetos de pesquisa</b>	<b>31</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>35</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Seleção de casos</b>	<b>36</b>

<b>4.2 Macrodissecção dos tecidos tumorais</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Extração de DNA e RNA total de tecidos tumorais</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Extração de DNA de <i>buffy coat</i> e PBMC</b>	<b>41</b>
<b>4.5 Avaliação do rendimento das amostras de DNA e RNA total</b>	<b>41</b>
<b>4.6 Avaliação da integridade das amostras de DNA e do RNA total</b>	<b>42</b>
<b>4.7 Análise de STR</b>	<b>43</b>
<b>4.8 Coleta de dados e análises estatísticas</b>	<b>44</b>
<b>4.9 Aspectos éticos</b>	<b>45</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Seleção de casos</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Macrodissecção dos tecidos tumorais</b>	<b>46</b>
<b>5.3 Avaliação da integridade do DNA/RNA das amostras de tecido tumoral e o tempo de armazenamento</b>	<b>47</b>
<b>5.4 Avaliação da integridade do DNA/RNA das amostras de tecido tumoral e o tipo de topografia</b>	<b>48</b>
<b>5.6 Integridade do DNA das amostras de <i>buffy coat</i> e PBMC armazenadas em -30° C</b>	<b>52</b>
<b>5.7 Avaliação do rendimento das amostras de DNA e RNA total de tecido tumoral</b>	<b>53</b>
<b>5.8 Avaliação do rendimento das amostras de <i>buffy coat</i> e PBMC</b>	<b>54</b>
<b>5.9 Comparação entre os métodos de quantificação</b>	<b>54</b>
<b>6 Avaliação da autenticidade das amostras por análise de STR</b>	<b>56</b>
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>67</b>

**Anexos**

**755**

<b>Anexo A- TCLE do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos, versão abril de 2014, aplicado em pacientes com diagnóstico ou suspeita de câncer</b>	<b>75</b>
<b>Anexo B- TCLE do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos, versão abril de 2014, aplicado em indivíduos sem diagnóstico de câncer</b>	<b>80</b>
<b>Anexo C – Fichas de coleta <i>RedCap</i></b>	<b>85</b>
<b>Anexo D – Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa</b>	<b>92</b>
<b>Anexo E – Artigo "The Biobank of Barretos Cancer Hospital: 14 years of experience in cancer research"</b>	<b>106</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Principais fatores pré-analíticos in vitro que influenciam a qualidade de amostras detectados (laranja) e sangue (azul). 10
- Figura 2** - Equipamento TapeStation 4200 e os screentape de DNA (azul) e RNA (verde) 16
- Figura 3** - Número de amostras biológicas armazenadas no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos(BB-HCB) até dezembro de 2019, divididas em amostras de Biobanco e Biorrepositório. 18
- Figura 4** - Distribuição espacial dos participantes que possuem amostras biológicas armazenadas no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB). 19
- Figura 5** - Os diferentes tipos tumorais armazenados no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB). 20
- Figura 6** - Ciclo interativo interdisciplinar do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB) em diferentes etapas no processo de coleta e distribuição das amostras. 22
- Figura 7** - Distintos setores do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB): laboratório, sala de freezers e sala de congelação. 26
- Figura 8** - Gráfico e estatísticas emitido pelo sistema de monitoramento de freezer 27
- Figura 9** - Ajustes e melhorias dos Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB) ao longo de 13 anos. 28
- Figura 10** - Software de gerenciamento de amostras NorayBanks mostra as posições ocupadas (vermelho) e livres (verde) das caixas 30
- Figura 11** - Número de amostras (biológicas e ácidos nucleicos) enviadas para pesquisa ao longo dos anos. 32
- Figura 12** - Fluxograma de trabalho dividido em três etapas: pré-extração, extração de DNA/RNA e pós-extração. 37
- Figura 13** - (A) Macrodissecção dos tecidos tumorais utilizando o aparelho criostato (Leica CM 1850 UV). (B) Seleção do fragmento, após análise do patologista. 38
- Figura 14** - Equipamento de homogeneização Precellys 24 (Bertin Technologies), utilizado no processo de lise e maceração dos tecidos (capacidade de até 24 tubos de 2ml). 39



<b>Figura 15</b> - Equipamento Qiasymphony (Qiagen), plataforma automatizada utilizada para a extração de ácidos nucleicos.	40
<b>Figura 16</b> - (1) Espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e (2) Fluorímetro Qubit 2.0 (ThermoFisher), utilizado para quantificar o rendimento do DNA e RNA total.	42
<b>Figura 17</b> - Imagens geradas pelo equipamento TapeStation 4200, representando a integridade da amostra através do gel virtual, eletroferograma e número de integridade do RNA (RIN).	43
<b>Figura 18</b> - Porcentagem de amostras excluídas na macrodissecção de acordo com o tipo de topografia.	46
<b>Figura 19</b> - Frequência de amostras com DIN/RIN $\geq 7$ e $< 7$ em relação ao tempo de armazenamento, $\geq 8.1$ anos e $< 8.1$ anos para amostras de DNA e $< 4.5$ anos e $\geq 4.5$ anos para amostras de RNA.	48
<b>Figura 20</b> - Frequência de amostras com DIN $\geq 7$ e $< 7$ em relação ao tempo de armazenamento, $< 8$ anos e $\geq 8$ anos para amostras de buffy coat e $< 7.2$ e $\geq 7.2$ anos para amostras de PBMC.	51
<b>Figura 21</b> - Frequência de amostras com valor de DIN $< 7$ e $\geq 7$ , armazenadas em temperatura $-80^{\circ}\text{C}$ e $-30^{\circ}\text{C}$ .	52
<b>Figura 22</b> - Comparação entre os métodos de quantificação (nanodrop e qubit) de DNA e RNA de tecido tumoral	55
<b>Figura 23</b> - Comparação entre os métodos de quantificação (qubit e nanodrop) de DNA de PBMC e <i>buffy coat</i>	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais diferenças entre Biobancos e Biorrepositórios de acordo com as diretrizes brasileiras.	2
<b>Tabela 2</b> - Tipos de amostras biológicas coletadas para Biobanco e Biorrepositórios.	21
<b>Tabela 3</b> - Organização dos alelos e tamanho (pb*) dos locus de STR humanos amplificados.	44
<b>Tabela 4</b> - Análise da curva ROC para determinar o <i>cutoff</i> no tempo de armazenamento das amostras de DNA e RNA de tecido tumoral, em relação a integridade.	47
<b>Tabela 5</b> - Frequência de amostras com DIN <7 e $\geq 7$ em relação ao tipo de topografia.	49
<b>Tabela 6</b> - Frequência de amostras com RIN <7 e $\geq 7$ em relação ao tipo de topografia.	50
<b>Tabela 7</b> - Análise da curva ROC para determinar o cutoff no tempo de armazenamento das amostras de DNA de buffy coat e PBMC, em relação a integridade.	51
<b>Tabela 8</b> - Modelo de regressão logística ajustado para o tempo de armazenamento	52
<b>Tabela 9</b> - Rendimento em ng/ul das amostras de DNA e RNA de tecido tumoral em relação ao tipo de topografia.	53
<b>Tabela 10</b> - Rendimento das amostras de DNA de PBMC e buffy coat em ng/ul.	54
<b>Tabela 11</b> - Frequência de amostras compatíveis e incompatíveis na análise de STR, de acordo com o ano de coleta.	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
BB-HCB	Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos
BNT	Banco Nacional de Tumores
Br	<i>Broad range</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPOM	Centro de pesquisa em oncologia molecular
CQ	Controle de qualidade
DIN	<i>DNA Integrity Number</i>
DNA	<i>Desoxirribonucleico Acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPIC	<i>European Prospective Investigation into Cancer</i>
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
GC	Garantia da Qualidade

HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HeE	Hematoxilina-Eosina
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de Confiança
ICGC	<i>International Cancer Genome Consortium</i>
IEP	Instituto de Ensino e Pesquisa
IMC	Índice de massa corpórea
ISBER	<i>International Society for Biological and Environmental Respositories</i>
LC	<i>Low concentration</i>
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mg	Miligrama
mg/ml	Miligrama por mililitro
n=	Tamanho da amostras
NAP	Núcleo de apoio ao pesquisador
NCI	Nacional Cancer Institute
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NL <sup>2</sup>	Nitrogênio Líquido
nm	Nanômetro
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
OD	<i>Optical density</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>

OLACPD	<i>Latin American Cancer Program Development</i>
PB	Pares de Base
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
POP	Procedimento Operacional Padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REDCAP	<i>Research Electronic Data Capture</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROC	<i>Operating Characteristic Curve</i>
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i>
SGQ	Sistema de gestão de qualidade
SPREC	<i>Sample Preanalytical Code</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SST	<i>Serum Separator Tube</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Glass Transition

TTMB	Termo de Transferência de Material Biológico
UK	<i>United Kingdom</i>
ul	Microlitro
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta

## LISTA DE SÍMBOLOS

-	Negativo
°	Grau
°C	Grau centígrado
%	Porcentagem
≥	Menor ou igual
≤	Maior ou igual
>	Menor
<	Igual
®	Marca registrada
™	<i>Trade Mark</i>
≈	Aproximadamente

## RESUMO

Neuber AC. *Avaliação da qualidade de amostras biológicas criopreservadas: 13 anos de história do Biobanco-HCB. Tese (Doutorado)*. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2020

**JUSTIFICATIVA:** Um dos pilares que sustentam o progresso da pesquisa translacional é a disponibilidade de muitas amostras biológicas com alta qualidade e dados associados. Biobancos são responsáveis pela coleta, processamento, armazenamento e fornecimento de material biológico para fins de pesquisa. São denominados fatores pré-analíticos, todos os procedimentos em vários estágios da amostragem do material biológico, que podem afetar a sua qualidade de diversas formas, sendo o tempo de armazenamento uma importante variável. **OBJETIVO:** Avaliar a integridade e qualidade das amostras criopreservadas no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos, no período de até 9 anos de armazenamento. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Selecionou-se de forma aleatória 447 participantes com amostras pareadas de tecido tumoral e *buffy coat*/PBMC, armazenadas no período de 2008 a 2016. Todos os tecidos foram avaliados previamente por um patologista e foram incluídos aqueles com porcentagem tumoral  $\geq 60$  e de necrose  $\leq 20$ . A integridade do material genético foi avaliada em relação ao número de integridade do RNA (RIN) e DNA (DIN). Foram consideradas amostras degradadas, aquelas que apresentavam integridade  $< 7$ , e íntegras, com valores  $\geq 7$ . O número de integridade de cada amostra foi comparado com o tempo de armazenamento das mesmas. **RESULTADOS:** Um total de 130 (29%) amostras de tecido tumoral foram excluídas na avaliação feita pelo patologista. Para as amostras de DNA de tecido tumoral, foi observado que a partir de 8.1 anos (AUC:0,68;p<0,001) de armazenamento a frequência de amostras íntegras é inferior (68%), quando comparado ao período de armazenamento menor que 8 anos (92%). Em relação as amostras de RNA de tecido tumoral, observou-se que a partir de 4,5 anos de armazenamento (AUC: 0,64;p= 0,003), a frequência de amostras íntegras é inferior (17%), quando comparado ao período de armazenamento menor que 4,5 anos (45%). Para as amostras de DNA de *buffy coat*, observou-se que a partir de 8 anos de armazenamento (AUC:0,77;p<0,001) ocorre uma redução na frequência de amostras íntegras (74%), quando comparadas ao tempo de armazenamento menor que 8 anos (95%). Em amostras de DNA de PBMC, observou-se que a partir de 7.2 anos (AUC: 0,79;p= 0,012) de armazenamento, a frequência de amostras íntegras é inferior (54%), quando



comparado ao período de armazenamento menor que 7.2 anos (96%). Constatou-se também que a integridade do DNA ( $p=0,15$ ) e RNA ( $p=0,18$ ) não está diretamente relacionada com o tipo de topografia. Além disso, o rendimento das amostras de DNA e RNA de tecido variou de acordo com o tipo de topografia e metodologia de quantificação. O presente estudo também mostrou que amostras de *buffy coat* e PBMC armazenadas em  $-30^{\circ}\text{C}$  apresentam um padrão mais elevado de degradação (26%), quando comparadas às amostras que permaneceram armazenadas apenas em  $-80^{\circ}\text{C}$  (1%;  $p<0,001$ ). Por fim, observou-se uma taxa de 3% de não compatibilidade das amostras analisadas por STR, sendo mais frequente em amostras armazenadas no ano de 2008 (9%) e 2009 (7%).

**CONCLUSÕES:** O longo período de armazenamento em  $-80^{\circ}\text{C}$  teve impacto negativo na integridade do RNA de amostras de tecido. A temperatura associada às peculiaridades do armazenamento em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , que inclui flutuação de temperatura e formação de cristais (intra e extracelular) podem ser os principais fatores que contribuíram para esses resultados.

**PALAVRAS-CHAVES:** Biobanco, pesquisa translacional, pré-analíticos, integridade, controle de qualidade.

## ABSTRACT

Neuber AC. *Quality assessment of cryopreserved biological samples: 13 years of history of the Biobank-BCH. Thesis (Doctoral)*. Barretos: Barretos Cancer Hospital;2020.

**BACKGROUND:** One of the pillars that support the progress of translational research is the availability of a large number of high-quality biological samples and associated data. Biobanks are responsible for the collection, processing, storage and supply biological material for research purposes. Pre-analytical factors are all procedures in several stages of the sampling of biological material, which can affect the quality in many ways, the storage time is an important variable. **AIMS:** Evaluate the integrity and quality of the cryopreserved samples in the Biobank Barretos Cancer Hospital up to 9 years of storage. **MATERIAL AND METHODS:** We selected 447 participants in a random way with paired samples of tumor tissue and buffy coat or PBMC stored from 2008 to 2016. All tissues were previously evaluated by a pathologist and only those with tumor percentage  $\geq 60$  and necrosis  $\leq 20$  were included. The integrity of the genetic material was evaluated in relation to the number of integrities, RNA (RIN) and DNA (DIN). Were considered degraded samples those showed integrity number  $< 7$ , and intact those with values  $\geq 7$ . The integrity number of each sample was compared with storage time. **RESULTS:** A total of 130 (29%) samples of tumor tissue were excluded in the pathologist analysis. For DNA samples of tumor tissue, it was observed that from 8.1 years (AUC: 0.68;  $p < 0.001$ ) of storage the frequency of intact samples is lower (68%), when compared to the storage period less than 8 years (92%). Regarding RNA samples of tumor tissues, it was observed that after 4.5 years of storage (AUC: 0.64;  $p = 0.003$ ) the frequency of intact samples is lower (17%) when compared to storage period less than 4.5 years (45%). For buffy coat DNA samples, it was observed that after 8 years of storage (AUC:0.77;  $p < 0.001$ ) there is a reduction in the frequency of intact samples (74%) when compared to the storage time less than 8 years (95%). In PBMC DNA samples it was observed that from 7.2 years (AUC:0.79;  $p = 0.012$ ) of storage, the frequency of intact samples is lower (54%), when compared to the storage period less than 7.2 years (96%). Moreover, it was found that the integrity of the DNA ( $p = 0.15$ ) and RNA ( $p = 0.18$ ) is not related to the type of topography. In addition, the yield of tissue DNA and RNA samples varied according to the type of topography and quantification methodology. The present study also showed that buffy coat and PBMC samples stored at  $-30^{\circ}\text{C}$  showed a higher

pattern of degradation (26%) when compared to samples that remained stored only at 80°C (1%;  $p < 0.001$ ). Finally, there was a 3% rate of mismatch of the samples analyzed by STR, with high frequency of samples stored in 2008 (9%) and 2009 (7%).

**CONCLUSIONS:** The long storage period at -80°C had a negative impact on the RNA integrity of tissue samples. The temperature associated with the peculiarities of freezer storage -80°C, which includes temperature fluctuation and crystal formation (intra and extracellular) may be the main factors that contributed to these results.

**KEYWORDS:** biobank, translational research, preanalytical, integrity, quality control.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Biobancos de amostras biológicas humanas

A ideia de Biobanco não é nova, há pelo menos 150 anos materiais biológicos de seres humanos ou animais, já eram coletados, armazenados e utilizados em pesquisa, porém sem nenhuma regulamentação ou regras <sup>1</sup>. Em 2003, após a divulgação dos últimos resultados do Projeto Genoma Humano, o surgimento crescente de novos projetos no campo da genômica, e das tecnologias de sequenciamento de nova geração, tornou-se crescente a criação de grandes bancos de material biológico humano, consagrando os Biobancos como instrumento de produção de conhecimento em genética humana<sup>2,3</sup>. A *International Society for Biological and Environmental Repositories* (ISBER) define Biobanco como o local onde é feito o recebimento, processamento, armazenamento e/ou fornecimento de diferentes tipos de amostras biológicas armazenadas adequadamente, contendo DNA, RNA e proteínas de alta qualidade, tendo como objetivo principal a pesquisa científica básica e translacional <sup>4,5</sup>.

De acordo com a resolução brasileira atual 441/2011 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) Biobanco é a coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para futuros projetos de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais <sup>6</sup>.

São inúmeras as definições do termo Biobanco, de modo geral pode-se dizer que é o local onde é feita a guarda de material biológico disponibilizado a pesquisadores, considerado uma ferramenta indispensável para a pesquisa em genética humana <sup>2</sup>. Além disso, na literatura é possível encontrar também o termo Biorrepositório. De acordo com as diretrizes brasileiras, é classificado como Biorrepositório uma coleção de material biológico coletado e armazenado ao longo de um projeto de pesquisa específico sob responsabilidade institucional e gerenciamento do pesquisador, o qual apresenta características específicas que diferem da coleção de Biobanco<sup>6</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1** - Principais diferenças entre Biobancos e Biorrepositórios de acordo com as diretrizes brasileiras.

	<b>BIOBANCOS</b>	<b>BIORREPOSITÓRIOS</b>
<b>Objetivo</b>	Várias pesquisas-indefinido	Pesquisa específica
<b>Regulamentação</b>	Protocolo de desenvolvimento	Projeto de pesquisa
<b>Responsabilidade</b>	Instituição	Instituição
<b>Gerenciamento</b>	Instituição	Pesquisador
<b>Tempo de armazenamento</b>	Indeterminado	Até 10 anos ou conforme definido no estudo
<b>Termo de consentimento</b>	Isento de novo consentimento ou novo consentimento para cada pesquisa	Novo consentimento para cada pesquisa

Fonte: Resolução CNS 441/2011

### 1.1.1 Infraestrutura e segurança

Para o planejamento de um Biobanco é imprescindível que sejam considerados os aspectos de ordem física e estrutural, os quais podem variar de acordo com o tipo de material a ser armazenado bem como os recursos financeiros disponíveis <sup>7</sup>.

Em se tratando de material biológico humano, a estrutura padrão recomendada inclui um sistema de armazenamento por criopreservação das amostras em freezers -80°C, sob monitoramento constante de temperatura, ou o armazenamento por longos períodos a -140°C através de containers de nitrogênio líquido (NL<sub>2</sub>), considerado um método de custo elevado e manutenção rigorosa a fim de evitar falhas e possíveis problemas relacionados ao descongelamento das amostras <sup>8,9</sup>.

Embora a criopreservação seja o método mais adequado, o mesmo exige um bom planejamento de espaço para atender demandas iniciais e futuras <sup>4</sup>. As salas devem ser mantidas refrigeradas, com temperatura ambiente de no mínimo 22°C, para prevenir desgaste excessivo dos freezers e falhas precoces <sup>7</sup>. Os freezers devem ser equipados com

um sistema de monitoramento programados para alertar a equipe quando o mesmo estiver operando à cima da sua configuração normal, além disso, alguns freezers (aproximadamente 10%) devem ser mantidos vazios, a fim de serem utilizados como *backups*, em caso de emergências <sup>4</sup>.

Em Biobancos que fazem o uso de galões de NL<sub>2</sub>, é necessário que seja realizado um treinamento apropriado da equipe o qual deverá ser incluído como Procedimento Operacional Padrão (POP), descrevendo potenciais riscos à saúde e as devidas precauções a serem tomadas <sup>4</sup>. Para a manipulação de NL<sub>2</sub> recomenda-se que sejam utilizados equipamentos de proteção individual (luvas criogênicas, protetores faciais e aventais frontais criogênicos) bem como, sensores para mensurar o nível de oxigênio da sala, os quais devem ser calibrados anualmente <sup>7</sup>.

Outros métodos de preservação e fixação de material biológico podem ser utilizados em Biobancos, quando um sistema de criopreservação não está disponível <sup>7</sup>. A inclusão de amostras fixadas e incluídas em parafina (FFPE, do inglês *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*), e a utilização de soluções estabilizadoras de RNA e lâminas histológicas, são métodos de preservação de tecido, considerados alternativos e relativamente menos custosos <sup>7</sup>. Entretanto, a qualidade e integridade são bem inferiores quando comparadas ao armazenamento por criopreservação, limitando o uso dessas amostras <sup>8,10-12</sup>.

É necessário que todo Biobanco tenha um sistema de segurança básico que garanta a proteção das amostras, bem como os dados associados à elas <sup>4,7</sup>. Para tanto, o Biobanco deve dispor de um sistema de segurança 24 horas capaz de realizar chamadas de emergência para uma equipe capacitada, em caso de incêndio ou acesso de pessoas não autorizadas <sup>7</sup>. Em se tratando de proteção dos dados, é fundamental que seja feito o uso de *softwares* seguros que preserve os dados individuais com a mesma restrição que as informações clínicas, além disso, as informações pessoais devem ser substituídas por códigos <sup>7,13</sup>.

### **1.1.2 Aspectos éticos e legais**

Os Biobancos levantam uma série de questões éticas e legais na sociedade atual, visto que coletam, armazenam e distribuem material biológico humano para pesquisa<sup>1,4</sup>. As normas éticas atendem as necessidades específicas de cada país, e devem ser constantemente avaliadas <sup>14</sup>. Além disso, os direitos, responsabilidades e obrigações dos

membros do Biobanco, bem como dos doadores, devem ser muito bem esclarecidos e definidos <sup>1</sup>.

Atualmente o Brasil não possui uma lei específica para o armazenamento e utilização de material biológico humano em pesquisa. Entretanto, encontra-se a base legislativa na Constituição Federal de 1988, no Código Civil e em outras legislações, assuntos relacionados a essa temática, como por exemplo, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 23/11- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos, a portaria 2201/11 do Ministério da Saúde a qual estabelece as diretrizes nacionais para Biobanco de material biológico humano utilizado em pesquisa, e a Resolução do CNS nº 441/11 sendo o documento mais atual e de grande importância para regulamentação de Biobancos para fins de pesquisa<sup>6,15,16</sup>.

Sendo assim, no Brasil o processo para registro de um Biobanco inicia-se com a confecção de um protocolo de desenvolvimento, formado pelo conjunto de documentos necessários para solicitação do funcionamento de um biobanco institucional, primeiramente analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e pela Comissão Nacional de ética em Pesquisa (Conep), em atendimento à Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 441 de 12 de Maio de 2011, a qual dispõem de diretrizes para a análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores <sup>17</sup>.

Existem quatro princípios gerais que devem ser aplicados em pesquisas que utilizam amostras humanas: 1) o consentimento do participante da pesquisa deve ser um elemento indispensável, 2) garantir a proteção, confidencialidade e privacidade dos dados pessoais dos participantes, 3) oportunidades iguais e gratuidade para acesso das amostras, 4) a pesquisa deve ter embasamento científico que a justifique, suporte financeiro e aprovação em um comitê de ética <sup>7,18,19</sup>. Além disso, todos os Biobancos devem ser atribuídos à um Comitê de Ética em Pesquisa, composto por membros que façam uma gestão geral, definindo objetivos, revisando e monitorando processos, a fim de garantir que esses princípios éticos sejam corretamente seguidos <sup>7,18</sup>.

O consentimento do participante da pesquisa é imprescindível para que as amostras sejam coletadas e utilizadas em projetos de pesquisa <sup>7</sup>. Esse processo é realizado através de uma documentação denominada de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ou TCLE,

o qual o possível participante da pesquisa é informado sobre o objetivo da pesquisa bem como a possibilidade de eventuais riscos e eventos adversos que podem ocorrer <sup>1</sup>. O termo de consentimento não é considerado um processo unificado, pois é elaborado de acordo com as normas e leis de cada país <sup>20</sup>.

Embora caiba à instituição, na qual um determinado Biobanco está localizado, a responsabilidade de guarda e o gerenciamento de todo o material biológico contido (Resolução CNS n° 441, item 1.I; item 9), o material pertence ao participante do biobanco (Resolução CNS n° 441, item 9) <sup>17</sup>. Este, ou seu representante legal, a qualquer momento e sem qualquer ônus ou prejuízo, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado, valendo a desistência a partir da data da sua manifestação. Para tanto, deve o sujeito de pesquisa (ou o seu representante legal) formalizar ao Biobanco institucional sua desistência em manifesto escrito e assinado (Resolução CNS n° 441, item 10.I) <sup>17</sup>.

Em se tratando de privacidade e proteção dos dados do participante da pesquisa, as legislações e orientações podem variar de acordo com cada país <sup>4,7</sup>. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC- *International Agency for Research on Cancer*), recomenda que os Biobancos utilizem métodos de identificação que proteja seus dados, bem como assegure a privacidade e o anonimato dos dados do participante em pesquisa <sup>7</sup>. Sendo assim, os Biobancos podem usar um ou mais códigos para identificar as amostras, ao invés de associar informações pessoais, ou utilizar o método de pseudo-anonimização, onde as identificações pessoais são substituídas por um pseudônimo <sup>7</sup>.

Atualmente o Brasil possui 57 Biobancos acreditados pela CONEP <sup>17</sup>. O Biobanco mais antigo do Brasil é o do A.C. Camargo Câncer Center, fundado em 1997 e localizado na cidade de São Paulo<sup>21</sup>. Sua estrutura é composta pelo Banco de Tumores e pelo Banco de Macromoléculas, com cerca de 66 mil e 19 mil amostras armazenadas até 2017, respectivamente <sup>22</sup>.

### **1.1.3 Tipos de Biobancos**

Existem diferentes tipos de Biobancos classificados de acordo com o propósito para qual o material biológico foi coletado <sup>23,24</sup>. Resumidamente, Biobancos de amostras biológicas humanas podem ser divididos em três maiores tipos: 1) Biobancos populacionais;



2) Biobancos para epidemiologia e 3) Biobancos de doenças específicas (banco de tumores) 2,14,23,25.

Biobancos populacionais gerenciam um grande número de amostras de DNA de indivíduos saudáveis, os quais são representativos de um país, região ou coorte étnica <sup>25</sup>. Geralmente esse tipo de Biobanco possui como principal objetivo a detecção de biomarcadores de suscetibilidade para a população em questão, o que permite acompanhar a evolução das alterações genéticas nas gerações seguintes, facilitando a compreensão dos mecanismos patogênicos sejam eles genéticos ou hereditários <sup>14,23,26</sup>.

Na Europa o surgimento de Biobancos populacionais é crescente desde o sequenciamento do genoma humano, gerando novas oportunidades de investigação bem como novas medidas de preservar a saúde da população europeia <sup>27</sup>. No Reino Unido localiza-se o maior Biobanco populacional europeu, denominado de UK *Biobank* criado em 2006 e possui cerca de meio milhão de amostras de cidadãos britânicos entre 40 e 69 anos, coletadas durante 4 anos <sup>26</sup>. O Banco Nacional de ADN e o *GenBank* são outros exemplos de grandes Biobancos populacionais europeus <sup>28-30</sup>.

Os Biobancos de estudos epidemiológicos possuem suas atividades focadas em biomarcadores de exposição utilizando um elevado número de amostras de doadores expostos saudáveis e casos específicos da doença <sup>25</sup>. Esse tipo de Biobanco geralmente possui base hospitalar onde é feito a coleta prospectiva e retrospectiva de amostras e seus derivados (DNA, RNA e proteínas), juntamente com os dados clínicos do doador <sup>14,25</sup>. De forma semelhante, os Biobancos de doenças específicas (banco de tumores) também realizam estudos de caso-controle eficientes na investigação da interação genes-ambiente, bem como estudos de prognósticos <sup>14</sup>.

#### **1.1.4 Colaboração e treinamento da equipe interdisciplinar**

As atividades desenvolvidas em um Biobanco, denominada *biobanking*, envolve uma série de etapas que incluem consentimento do participante da pesquisa, coleta do material biológico e dados associados, processamento, armazenamento e distribuição <sup>10</sup>. Para que todas essas etapas sejam realizadas adequadamente, possibilitando a utilização satisfatória das amostras biológicas em pesquisas, é necessário a colaboração e treinamento de uma rede interdisciplinar envolvendo pesquisadores, cirurgiões, enfermeiros, técnicos, patologistas,

biólogos, auxiliares de escritório, profissional de tecnologia da informação e epidemiologistas<sup>18,31-35</sup>.

Normalmente, a equipe clínica faz o primeiro contato com o participante da pesquisa, coletando informações e o consentimento informado do mesmo<sup>31</sup>. Os cirurgiões são os responsáveis por obter efetivamente o material biológico humano<sup>31,32</sup>. Para garantir a qualidade das amostras teciduais coletadas, nessa etapa também estão envolvidos técnicos, os quais são responsáveis por preparar e transferir as amostras teciduais para serem congeladas rapidamente utilizando instrumentos esterilizados<sup>31</sup>. Alguns fluídos corporais, por exemplo sangue e saliva, podem ser coletados em outros departamentos, como laboratório de análises clínicas, e encaminhados para a equipe do Biobanco, que estará envolvida no processamento, cadastro e armazenamento das amostras<sup>31</sup>.

É de extrema importância que os Biobancos priorizem o treinamento e/ou certificação de toda a equipe envolvida na gestão do setor, afim de que seja fornecido um serviço de qualidade em todas as etapas<sup>31,33,36</sup>. Os guias de boas práticas em Biobancos, recomendados pela ISBER e o *National Cancer Institute* (NCI), são excelentes ferramentas utilizadas por Biobancos, afim de padronizar processos e treinamento da equipe, incluem tópicos de coleta, processamento de amostras, armazenamento, treinamento, questões éticas e legais, controle de qualidade entre outros<sup>4,13,31,33</sup>. Além disso, no *website* da ISBER é possível encontrar, os principais cursos, qualificações e programa de certificação em Biobancos<sup>37,38</sup>.

#### **1.1.4.1 O papel central do patologista**

Com o advento das técnicas de biologia molecular na medicina, a função do patologista se ampliou, paralelamente ao avanço das ferramentas disponíveis para a caracterização patológica de uma amostra, tornando-se uma especialidade fundamental não apenas para medicina diagnóstica mas também para medicina translacional e personalizada, devido a sua experiência única em diagnóstico de doenças e acesso as amostras de tecidos provenientes de cirurgias<sup>39-42</sup>. Dessa forma, o patologista é considerado um componente fundamental para o estabelecimento principalmente nos bancos de tumores, atuando como uma ponte entre clínicos e pesquisadores<sup>43,44</sup>.

O patologista está envolvido em diferentes etapas da coleta do material biológico, sendo responsável pelo controle de qualidade dos procedimentos relacionados a patologia

molecular de um banco de tumores<sup>43</sup>. Devido a sua formação, bem como a sua experiência médica e científica, os patologistas são profissionais capacitados para fornecer as informações essenciais em relação ao diagnóstico do paciente e realizarem as coletas das amostras teciduais, determinando a amostragem que será enviada para o Biobanco, priorizando sempre o diagnóstico do paciente <sup>44,45</sup>.

A presença de um patologista como membro da equipe de pesquisa é essencial para seleção correta da área dissecada, que será utilizada em futuras análises moleculares <sup>43,45</sup>. Os patologistas avaliam microscopicamente os tecidos cortados em *slides* e corados em HeE (Hematoxilina e Eosina), para a confirmação do diagnóstico patológico, determinação do *status* da doença e proporção da área tumoral, normal, necrótica e inflamatória <sup>35,40,41,43,44</sup>. É importante que as amostras de tecido tumorais coletadas para Biobanco possuam representatividade celular heterogênea e estejam livres de necrose, para que sejam reproduzidos resultados fidedignos <sup>43</sup>.

### **1.1.5 Fatores pré-analíticos**

Em um Biobanco é fundamental que sejam asseguradas tanto a qualidade quanto a disponibilidade do material biológico criopreservado por longos períodos, para utilização em pesquisa futuras <sup>46,47</sup>. São considerados fatores pré-analíticos, todos os procedimentos em vários estágios da amostragem do material biológico, que podem afetar a qualidade de uma amostra biológica de diversas formas, incluindo estrutura de proteínas, funcionalidade de enzimas, padrão de expressão gênica, metilação do DNA e viabilidade da célula <sup>4</sup>. Esses fatores, que afetam a variabilidade em dados de pesquisas, resultados e interpretações, podem estar associados às características do paciente (*in vivo*) e/ou do tipo de material biológico ou a manipulação do mesmo (*ex vivo*), devem ser observadas e anotadas sempre que possível <sup>4,48</sup>.

#### **1.1.5.1 Fatores pré-analíticos *in vivo***

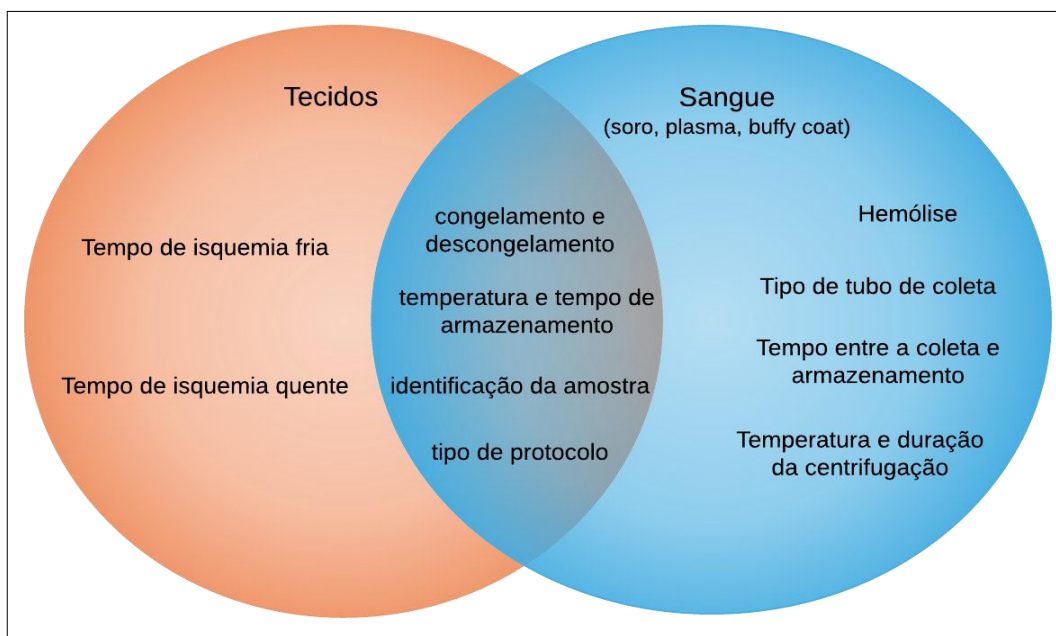
Os fatores pré-analíticos *in vivo* estão além do controle e padronização do Biobanco, visto que são determinados pela condição específica de cada paciente, podendo estar relacionado com a dieta, sexo, hábitos, medicação, estresse, estilo de vida, momento da coleta (pós-operatório/ pré-operatório), estação do ano em que foi feito a coleta do material e ritmo circadiano<sup>4</sup>.

São poucos os trabalhos disponíveis na literatura que avaliam o impacto dessa fonte de variação. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer em parceria com a Investigação Prospectiva Europeia sobre Câncer (*EPIC-European Prospective Investigation into Cancer*), estudo prospectivo e multicêntrico que investiga a relação entre o câncer e nutrição, desenvolveram um trabalho ao longo de cinco anos, cujo objetivo foi avaliar o impacto de uma série de variáveis *in vivo* no rendimento do DNA de sangue de 50 mil amostras individuais de participantes<sup>49</sup>.

Devido ao grande número amostras, foi possível identificar fatores que impactam significativamente o rendimento do DNA, sendo eles: gênero, idade, índice de massa corpórea (IMC) e tabagismo<sup>49</sup>. Em relação ao gênero, foi observado um maior rendimento de DNA das amostras de mulheres, o que pode ser justificado pela variação dos linfócitos, plaquetas e contagem de neutrófilos, que são maiores em mulheres<sup>49,50</sup>. Em se tratando da idade, foi observado menor rendimento de DNA em participantes mais velhos, ocasionado pela diminuição de células brancas na circulação periférica com ao longo dos anos de vida<sup>49,51</sup>. No que se refere ao IMC, foi observado um alto rendimento de DNA em amostras de participante obesos (IMC  $\geq 35$  KG/m<sup>2</sup>), provavelmente devido ao processo inflamatório relacionado a obesidade<sup>49,52</sup>. Da mesma forma, também foi observado um maior rendimento do DNA em participantes fumantes comparado com os não fumantes, que pode ser devido a quantidade de células brancas reportado em pessoas que fumam<sup>49,53,54</sup>.

#### **1.1.5.2 Fatores pré-analíticos *in vitro***

Os fatores pré-analíticos *in vitro* incluem tipo de tubo de coleta utilizado, hemólise, identificação adequada das amostras, tempo de processamento até o armazenamento da amostra, temperatura e duração da centrifugação, temperatura e tempo de armazenamento, tempo de isquemia fria e quente (apenas para tecidos), tipo de protocolo utilizado, identificação correta, congelamento e descongelamento<sup>4</sup>. Alguns tipos de fatores pré-analíticos *in vitro* variam de acordo com o tipo de material biológico coletado e outros são genéricos, aplicados tanto para tecidos quanto para fluídos<sup>4,55,56</sup> (Figura 1).



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Figura 1 - Principais fatores pré-analíticos in vitro que influenciam a qualidade de amostras de tecidos (laranja) e sangue (azul).

Ciclos de congelamento e descongelamento do material biológico pode interferir diretamente na qualidade dos ácidos nucleicos, os principais motivos para que isso ocorra são: utilização frequente da mesma amostra ou oscilações de temperatura do freezer, causado pela abertura constante da porta e falhas técnicas nos freezers <sup>11</sup>. Assim como em tecido, ciclos de descongelamento também podem alterar a qualidade do DNA, RNA e proteínas em amostras de sangue, podendo reduzir o rendimento do DNA para 25%, sem haver redução significativa do RNA mensageiro no soro ou plasma, em apenas um ciclo de descongelamento <sup>11</sup>. Sabidamente a molécula de RNA é mais instável e consequentemente mais vulnerável a degradação comparada a molécula de DNA. Um estudo mostrou que amostras de RNA de tecido tumoral de ovário, submetidas a 1, 2 e 3 ciclos de descongelamento podem ser congeladas e descongeladas até no máximo três vezes sem comprometer a integridade do RNA e o perfil de expressão gênica <sup>57</sup>. Um outro trabalho, utilizou amostras de autópsia de tecido cerebral, e foi observado uma correlação negativa com a integridade do RNA e os vários ciclos de congelamento e descongelamento. Além

disso, as amostras preservadas em *RNA Later* obtiveram maior qualidade do que as amostras que foram rapidamente congeladas<sup>8,58,59</sup>. Alguns estudos relatam ainda que dois ciclos de congelamento e descongelamento são suficientes para alterar a qualidade do RNA e que a correlação entre o número de ciclos e a integridade do RNA, pode estar associadas ao tipo de tecido utilizado, sendo assim, é recomendado que sejam feitas alíquotas do material, utilização de gelo seco ou nitrogênio seco, para a manipulação das amostras, evitando o descongelamento das mesmas<sup>4,11</sup>.

Em relação à temperatura de armazenamento das amostras, diversos estudos utilizam o método de criopreservação (-80°C a -190°C), pois este proporciona um alto rendimento e qualidade dos ácidos nucleicos, favorecendo estudos morfológicos de alta qualidade os quais utilizam técnicas como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), *microarrays* e PCR digital, para a avaliação do genoma, transcriptoma e proteoma<sup>11</sup>. A temperatura e o tempo de armazenamento também são fatores determinantes, no que se diz respeito à qualidade de amostras criopreservadas<sup>4</sup>. A criopreservação em temperaturas abaixo de -130 °C, através de ultra freezers ou nitrogênio, é opção ideal para a preservação das biomoléculas de RNA, pois mantém sua integridade intacta em até 50 meses<sup>47</sup>. Porém, um estudo que avaliou a integridade do RNA de amostras de tecido endócrino armazenadas em freezers a -80°C com diferentes tempos de armazenamento, mostrou que este tipo de armazenamento por longos períodos prazo não afeta negativamente a qualidade do RNA e sugere que o armazenamento em -80°C é equivalente ao armazenamento feito em nitrogênio<sup>47</sup>. A literatura neste aspecto ainda é muito contraditória necessitando de mais estudos com grande número de amostras afim de melhor elucidar o impacto do tempo na qualidade das amostras criopreservadas para pesquisa genômica.

A identificação adequada das amostras biológicas é uma etapa importante em Biobanco, em se tratando da autenticidade da amostra<sup>4,13</sup>. Cada amostra deve conter identificação única que seja clara, legível, firmemente fixada no tubo e apta para suportar as condições de armazenamento<sup>13</sup>. Outras informações relevantes devem estar associadas à identificação, como informações pessoais do participante da pesquisa, o consentimento informado do mesmo, bem como a localização das amostras em uma caixa específica do freezer<sup>7,13</sup>.

A isquemia fria é um fator pré-analítico importante em amostras de tecidos, está relacionada com o tempo entre a remoção cirúrgica do tecido e o congelamento da amostra,

que deve ser realizado no menor tempo possível <sup>13,50</sup>. Alguns estudos foram realizados a fim de mensurar o tempo ideal de isquemia fria que mantêm o RNA íntegro, os resultados obtidos variam de acordo com o tipo de topografia do tecido, sendo o tempo de 30 minutos o mais eficiente para manter a integridade do RNA <sup>11,60,61</sup>.

A isquemia quente ocorre no momento da diminuição da perfusão sanguínea e de oxigênio no tecido, após o mesmo ter sido removido do corpo e ser mantido em temperatura ambiente, antes da amostra ser congelada <sup>59,62</sup>. Um estudo acerca desse tema foi realizado utilizando amostras frescas de cólon coletadas, cortadas em pedaços e mantidas em gelo por 0,5, 1 e 4 horas antes de serem congeladas, foi observado que o tempo de isquemia quente de até 4 horas não acarretou impacto significativo em relação a integridade do RNA das amostras de cólon<sup>59</sup>. O tempo de isquemia quente, associado a períodos longos de manipulação cirúrgica, também podem alterar o perfil da expressão gênica, portanto devem ser controlados <sup>8</sup>.

Outro fator pré-analítico importante que influencia a qualidade das amostras de sangue é o tempo em que a amostra permanece em temperatura ambiente em tubos EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) até ser processada <sup>8</sup>. Amostras condicionadas por longos períodos em tubos EDTA podem ter alterações, quanto ao perfil de expressão gênica por início da transcrição *in vitro*, portanto o que se recomenda é o processamento e armazenamento do sangue em até 4 horas a 4°C após a coleta do mesmo <sup>8,63</sup>. Alguns estudos destacam a boa qualidade do RNA e menor variação quanto aos padrões de expressão gênica, através da utilização de tubos coletores PAXgene® (BD *biosciences*) ou Tempus (ThermoFisher) , os quais possuem uma solução estabilizadora de RNA, evitando a transcrição *in vitro* bem como degradação do RNA mensageiro por RNases <sup>8,64,65</sup>.

A hemólise *in vitro*, está relacionada a procedimentos inadequados durante a coleta ou manipulação do tubo (*pipetagem*, centrifugação, transporte), que ocasionam a destruição das hemácias e conseqüentemente a liberação de hemoglobina <sup>66</sup>. Amostras de soro e/ou plasma hemolisadas, não devem ser utilizadas, pois a presença de ferro pode ter impacto na eficiência e acurácia de testes laboratoriais e técnicas utilizadas em pesquisas como a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)<sup>10</sup>. Sabe-se que a hemólise pode ser evitada por meio de um procedimento simples que preconiza treinamento de pessoal e utilização de boas práticas na coleta do sangue, cuidado na manipulação dos tubos de coleta e a manipulação por meio do uso de pipetas <sup>63</sup>.

### 1.1.6 Controle de qualidade em biobancos

Os Biobancos atuam como uma importante ferramenta para a medicina genômica, uma vez que detêm da fonte de amostras biológicas que são utilizadas na descoberta de novos marcadores moleculares, bem como a identificação de novos alvos terapêuticos, que trarão benefícios futuros para o diagnóstico e tratamento de pacientes<sup>9</sup>. No entanto, para refletir as verdadeiras mudanças genômicas de doenças, é necessário a utilização de amostras biológicas que possuam DNA, RNA e proteínas de boa qualidade<sup>1,5</sup>.

Os três principais pilares relacionados aos controles de qualidade (CQ) em Biobancos, são: autenticidade, pureza e estabilidade<sup>4,13,67</sup>. O primeiro está correlacionado com a identificação correta atribuída à amostra, o segundo diz respeito à amostras livres de contaminação, e o último corresponde à capacidade do material em manter seus valores iniciais por um período de tempo definido<sup>4,7</sup>.

A autenticidade da amostra é um pré-requisito importante para qualquer pesquisa<sup>68</sup>. A manipulação de um grande número de amostras pode gerar erros de identificação e trocas durante o processamento das mesmas, portanto esse tópico é considerado um desafio em Biobancos, que devem assegurar a qualidade desse processo<sup>69,70</sup>. Uma maneira de confirmar a identidade do participante da pesquisa, a partir de amostras de DNA, é através da identificação de regiões polimórficas denominadas STR (*Short Tandem Repeat*)<sup>71</sup>. A análise de STR é uma técnica de alta resolução que pode ser utilizada tanto para identificação de linhagens celulares, como em tecidos<sup>70-72</sup>. Sua principal aplicação é na diferenciação de uma linhagem celular humana da outra, pois a probabilidade de duas linhagens celulares não relacionadas terem o mesmo perfil de DNA, utilizando 17 marcadores de STR, é de  $1 \times 10^{-1869}$ . Entretanto, essa técnica não é adequada para distinguir linhagens celulares humanas provenientes de tipos diferentes de tecido do mesmo participante da pesquisa, pois elas terão o mesmo perfil de STR independente do tipo de topografia, desde que seja do mesmo participante da pesquisa<sup>69,72</sup>.

O controle de qualidade de amostras teciduais utilizadas em pesquisa deve ser desenvolvido de maneira adequada, a fim de potencializar o desempenho das análises moleculares futuras<sup>4</sup>. Dessa forma, recomenda-se que as amostras de tecido sejam avaliadas micro ou macroscopicamente por um patologista<sup>4,7,13</sup>. Para isso, os tecidos são cortados em secções de 5 micras com o auxílio de um aparelho criostato, em seguida essas secções são coradas em lâminas de vidro utilizando hematoxilina e eosina (HE)<sup>7</sup>. A partir da



lâmina, o patologista irá indicar a porcentagem de células neoplásicas, necrose e fibrose presentes no tecido <sup>4,7</sup>. De acordo com as boas práticas para estudos científicos, a obtenção do material genético a partir do tecido tumoral, pode ser feita somente após a confirmação da porcentagem tumoral considerando como padrão porcentagem  $\geq 60$  de células tumorais viáveis e porcentagem  $\leq 20$  de necrose, amostras fora desse parâmetro devem ser consideradas impróprias para análise molecular <sup>4,7</sup>.

A utilização de protocolos padronizados, denominado Procedimento Operacional Padrão (POPs), é uma importante ferramenta utilizada no controle de qualidade, os quais devem ser documentados de uma forma passível de revisão e modificações <sup>9</sup>. Os POPs têm função de descrever como as tarefas deverão ser executadas pelo operador capacitado de forma padronizada, a fim de garantir que as amostras sejam corretamente coletadas, processadas e armazenadas seguindo um mesmo protocolo oficialmente padronizado <sup>3</sup>. A utilização de POPs inadequados pode prejudicar a qualidade de dados e reduzir o poder estatístico de estudos principalmente àqueles que pesquisam interação entre gene e ambiente, dessa forma, é crucial a utilização de protocolos validados <sup>4,7,3</sup>.

Com o objetivo de compreender melhor os fatores pré-analíticos e consequentemente fornecer espécimes de alta qualidade para serem utilizadas em pesquisa, foram desenvolvidos guias de gestão de qualidade em Biobanco. Atualmente os principais guias internacionais de boas práticas utilizados por Biobancos e Biorrepositórios são produzidos pela ISBER, NCI, IARC e *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), a partir deles é possível desenvolver um Sistema de Gestão Qualidade (SGQ) de amostras, a fim de minimizar situações adversas que podem afetar resultados científicos, garantindo assim a segurança da equipe e aumentando a qualidade das amostras armazenadas <sup>4,7,13,67</sup>.

Além disso, Betsou et al.<sup>74</sup> desenvolveram um código para amostras biológicas denominado de “*Sample PREanalytical Code- SPREC-01 versão 03*”, o qual fornece detalhes sobre o processo pré-analítico das amostras, auxiliando pesquisadores e profissionais que trabalham em Biobancos a identificar as variáveis pré-analíticas mais importantes associadas com os diferentes tipos de amostras biológicas <sup>74</sup>. Através desse código é possível saber informações como, por exemplo: o tipo de material biológico, tipo de tubo de coleta utilizado, detalhes da centrifugação, tempo de processamento entre a centrifugação e o congelamento e temperatura onde a amostra ficou armazenada. Atualmente o SPREC- 03 é

a versão mais recente, sem mudanças significativas realizadas, porém com mais opções que permitem utilização de novas tecnologias desenvolvidas <sup>74</sup>.

#### **1.1.6.1 Controle de qualidade de ácidos nucleicos**

Algumas técnicas são utilizadas como ferramentas padrão para avaliar a qualidade dos ácidos nucleicos criopreservados <sup>11</sup>. Uma maneira rápida e eficiente de mensurar a pureza bem como o rendimento das amostras, é através da utilização de espectrofotômetros com comprimento de onda de 260 nm e 280 nm, o qual determina a densidade óptica (OD) do DNA e RNA obtidos a partir de células, tecidos, sangue e outros materiais biológicos <sup>11</sup>.

Através da razão de absorbância 260/280 é possível avaliar a contaminação da amostra por proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em ou perto de 280nm <sup>75,76</sup>. Valores de absorbância próximos de 1,8 e 2,0 geralmente são considerados aceitáveis para amostras de DNA e RNA, respectivamente <sup>75</sup>.

A razão de absorbância de 260/230 é uma outra forma de avaliar a pureza dos ácidos nucleicos, identificando contaminação por compostos como EDTA, carboidratos e trizol <sup>76</sup>. Possui como referência de pureza valores entre 2,0-2,2, que também podem ser alterados de acordo com o pH da solução, onde soluções ácidas podem gerar valores muito à baixo (0,2-0,3) enquanto soluções básicas são representadas em excesso quando quantificadas <sup>76</sup>. Além disso, se a amostra estiver muito degradada, os nucleotídeos únicos podem alterar a leitura da absorbância de 260 nm, superestimando a concentração <sup>7,75,77,78</sup>.

Atualmente, o aparelho espectrofotômetro de microvolumes, NanoDrop (Thermo Scientific), é a ferramenta menos custosa e amplamente utilizada em pesquisa para determinar a concentração e pureza dos ácidos nucleicos <sup>67</sup>. Entretanto, muitos Biobancos já fazem uso do método de quantificação por fluorescência com o aparelho Qubit (ThermoFisher) por ser mais preciso e confiável quando comparado com o método de espectrofotometria, porém esta ainda é uma opção que se restringe a grandes centros e laboratórios de pesquisa por ter um custo mais elevado, quando comparado ao NanoDrop, visto que é necessário a aquisição de kits para a utilização do aparelho <sup>71</sup>.

Os resultados gerados pelos aparelhos de quantificação de ácidos nucleicos indicam apenas o rendimento e pureza, em relação à contaminação da amostra e não necessariamente refletem a integridade da mesma <sup>11</sup>. A integridade representa o nível de degradação dos ácidos nucleicos <sup>7</sup>. Dessa forma, técnicas adicionadas devem ser utilizadas a

fim de avaliar a integridade do DNA e RNA, visto que esse é um parâmetro importante para diversos experimentos a nível molecular, principalmente aqueles que tentam refletir a expressão gênica de forma instantânea até o momento da extração do RNA <sup>62,79</sup>.

A técnica de eletroforese possibilita avaliar a integridade das moléculas de DNA e RNA através da separação dos seus fragmentos de acordo com seu peso e tamanho <sup>7</sup>. A partir de um gel de agarose é possível avaliar a integridade dos ácidos nucleicos, porém essa técnica é considerada inconsistente e subjetiva <sup>77</sup>.

O advento da eletroforese microfluídica digital possibilita mensurar a integridade dos ácidos nucleicos de uma maneira mais precisa e objetiva, empregando volumes mínimos de amostras. Pensando nisso, em 2015 a *Agilent Technologies* introduziu no mercado um novo sistema de eletroforese digital, denominado *TapeStation 4200*, o qual utiliza *screentapes* para realizar os ensaios, contendo 16 canais cada, onde são inseridas de maneira individual e automatiza, as amostras à serem analisadas (Figura 2) . A partir desse sistema, é possível quantificar a integridade do DNA ou RNA através de um algoritmo denominado RIN (*RNA Integrity Number*) e DIN (*DNA Integrity Number*) que segue uma escala de 1 até 10 <sup>7,13,62,80</sup>. Tradicionalmente, a integridade do RNA é mensurada a partir da razão 28S e 18S do RNA ribossômico (rRNA), sendo assim, quanto maior for o número do RIN, mais íntegra estará a amostra <sup>7,62</sup>. De forma semelhante, o DIN determina o nível de degradação do DNA, então quanto maior for o seu valor, melhor a integridade do DNA genômico (DNAg)<sup>7,81</sup>. Ácidos nucleicos considerados de boa qualidade, possuem valores  $\geq 7$ , enquanto valores  $< 7$  possuem níveis diferentes de degradação <sup>62,82</sup>.



**Fonte:** *Agilent Technologies*.

Figura 2 - Equipamento TapeStation 4200 e os screentape de DNA (azul) e RNA (verde).

A utilização de controles de qualidade do DNA/RNA das amostras armazenadas em Biobancos é um procedimento essencial que têm grande impacto nas pesquisas que às utilizam, visto que geram resultados melhores e confiáveis <sup>11</sup>.

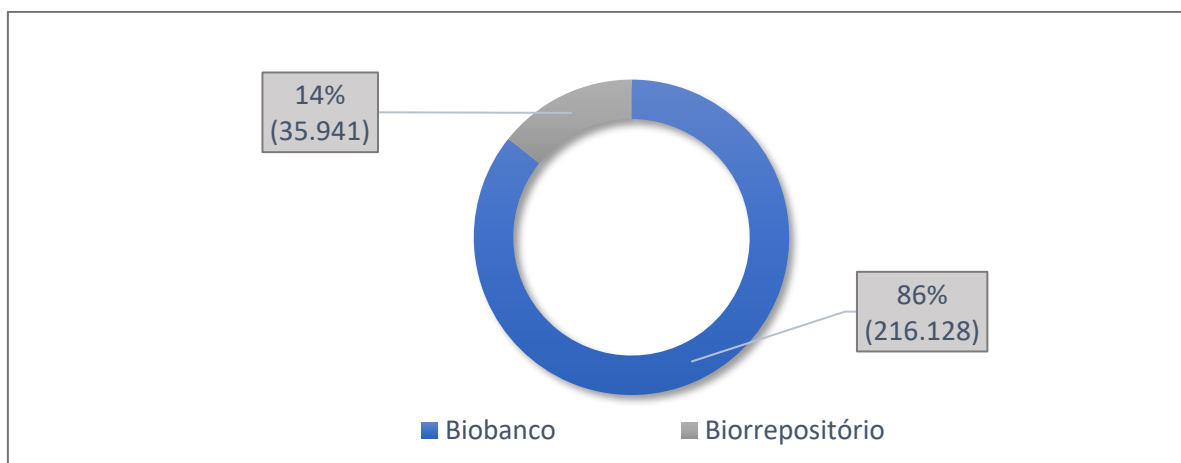
## **1.2 Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos**

Em 1967 foi instituído O Hospital de Câncer de Barretos, atualmente nomeado como Hospital de Amor, é uma instituição filantrópica, especializada na prevenção e tratamento do câncer. Atualmente possui 12 unidades e realiza mais de 4 mil atendimentos por dia, apenas na unidade I na cidade de Barretos <sup>83</sup>.

O Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB) foi inicialmente fundado em março de 2006, a partir de projeto de pesquisa fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob protocolo número 2005/51691-7, intitulado *“Implantação de um Banco de Tumores: UNESP / Hospital de Câncer de Barretos-SP”* com vigência de 01/10/2005 a 30/09/2007, sendo uma parceria entre o Hospital de Câncer de Barretos e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Em 2009, com a inauguração do Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP) na unidade, iniciou-se o processo de credenciamento do Biobanco institucional juntamente com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), processo concluído em 2012.

### **1.2.1 Número de amostras e pacientes**

Considerado um dos três maiores bancos de tumores do Brasil, atualmente possui cerca de 252.069 amostras biológicas armazenadas, as quais são divididas em Biobanco, que incluem amostras coletadas de forma prospectiva como parte das atividades do Biobanco, e amostras atreladas a projetos de pesquisa específico, denominadas Biorrepositório. Além disso, parte do acervo de amostras Biobanco (12%), são amostras controles, coletadas de indivíduos saudáveis (Figura 3).

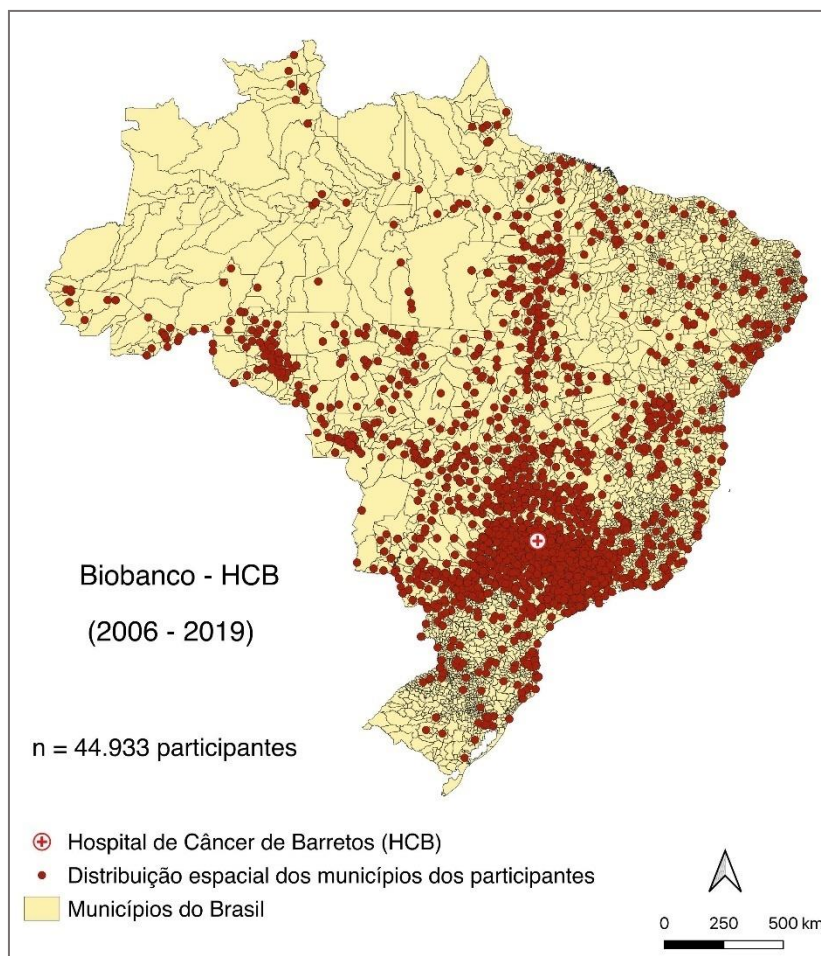


**Fonte:** Indicadores BB-HCB.

Figura 3 - Número de amostras biológicas armazenadas no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB) até dezembro de 2019, divididas em amostras de Biobanco e Biorrepositório.

As amostras biológicas armazenadas no BB-HCB foram coletadas de 43.933 participantes, tanto do acervo Biobanco como Biorrepositório, provenientes de diferentes regiões do Brasil (norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul), conferindo uma alta representatividade genética da população brasileira. Os participantes são recrutados na unidade hospitalar I (adulto e infantil), e unidades móveis (carreta ou *van*) que percorrem a região do município.

Participantes da região sudeste, onde o HCB está localizado, são os mais representativos, cerca de 75%, seguido da região centro-oeste com 16% e norte com 6%. As regiões nordeste e sul possuem o menor número de participantes com amostras armazenadas, 2 % e 1 % respectivamente (Figura 4).

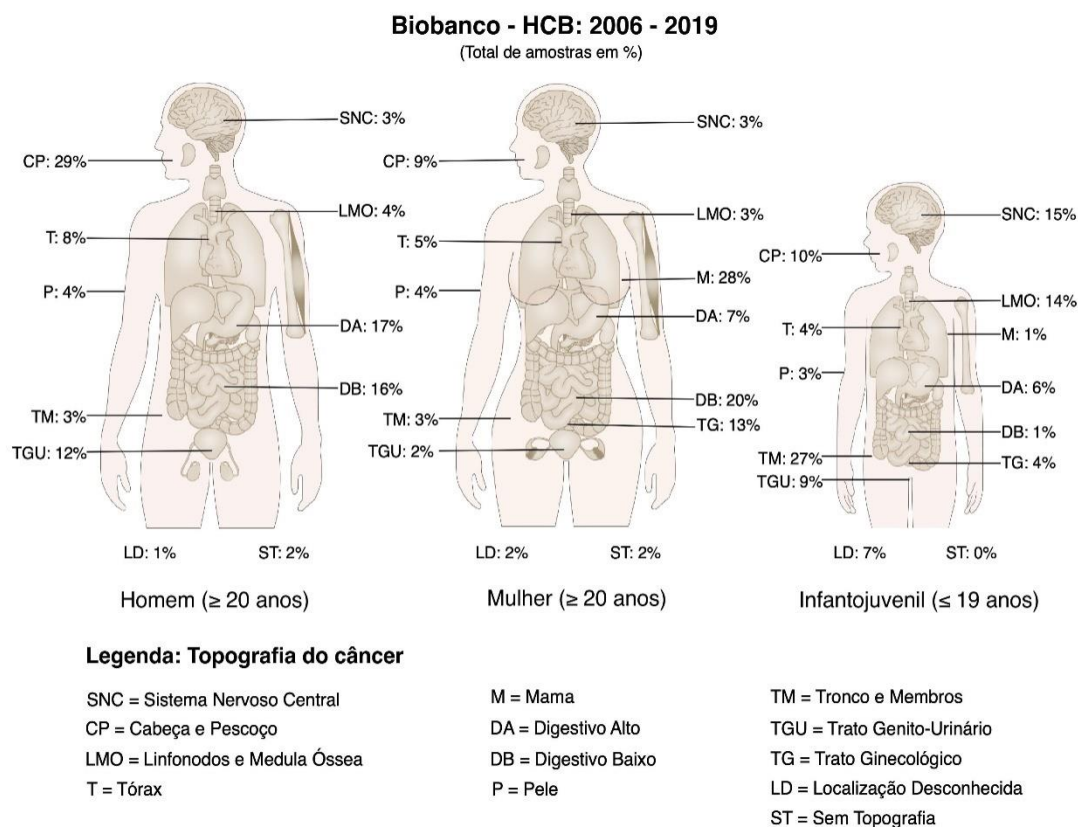


**Fonte:** Indicadores BB-HCB.

Figura 4 - Distribuição espacial dos participantes que possuem amostras biológicas armazenadas no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB).

### 1.2.2 Tipos tumorais coletados

O BB-HCB possui uma ampla representatividade de amostras tumorais sítios específicas de indivíduos adultos ( $\geq 20$  anos) de ambos os sexos que incluem sistema nervoso central, pele, mama, sistema hematológico, ginecológico, urológico e digestivo, além de cabeça e pescoço, tórax e ortopedia (Figura 5).



**Fonte:** Indicadores BB-HCB.

Figura 5 - Os diferentes tipos tumorais armazenados no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB).

Em homens as quatro topografias que possuem maior porcentagem de amostras armazenadas, são cabeça e pescoço (29%), digestivo alto (17%), digestivo baixo (16%) e trato geniturinário (12%). Enquanto em mulheres, mama (28%), digestivo baixo (20%), trato ginecológico (13%) e cabeça e pescoço (9%), são as mais representativas. Além disso, cerca de 3,72% da coleção BB-HCB são amostras de tumores infanto-juvenil, sendo os mais representativos troncos e membros (27%), sistema nervoso central (15%) e linfonodo/medula óssea (14%).

### 1.2.3 Tipos de materiais biológicos coletados

O tipo de material biológico coletado, pode variar de acordo com o tipo de pesquisa, em casos de Biorrepositórios. Atualmente o BB-HCB possui cerca de 14 diferentes tipos de materiais biológicos armazenados, essa diversidade de amostra é devido aos diferentes protocolos de projetos de Biorrepositórios, enquanto que para Biobanco, basicamente são

coletadas amostras de sangue (soro, plasma e *buffy coat*), tecido e medula óssea (coletado apenas de crianças) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Tipos de amostras biológicas coletadas para Biobanco e Biorrepositórios.

<b>Protocolo Biobanco</b>	<b>Protocolo Biorrepositório</b>
Plasma	Plasma
<i>Buffy coat</i>	<i>Buffy coat</i>
Soro	Soro
Tecido tumoral	Tecido tumoral
Tecido normal	Tecido normal
Medula óssea	Pele
	Escarro
	Urina
	Citologia líquida (LBC)
	Teste imunoquímico fetal (FIT)
	Hemácias
	Lavado bucal
	Sangue total

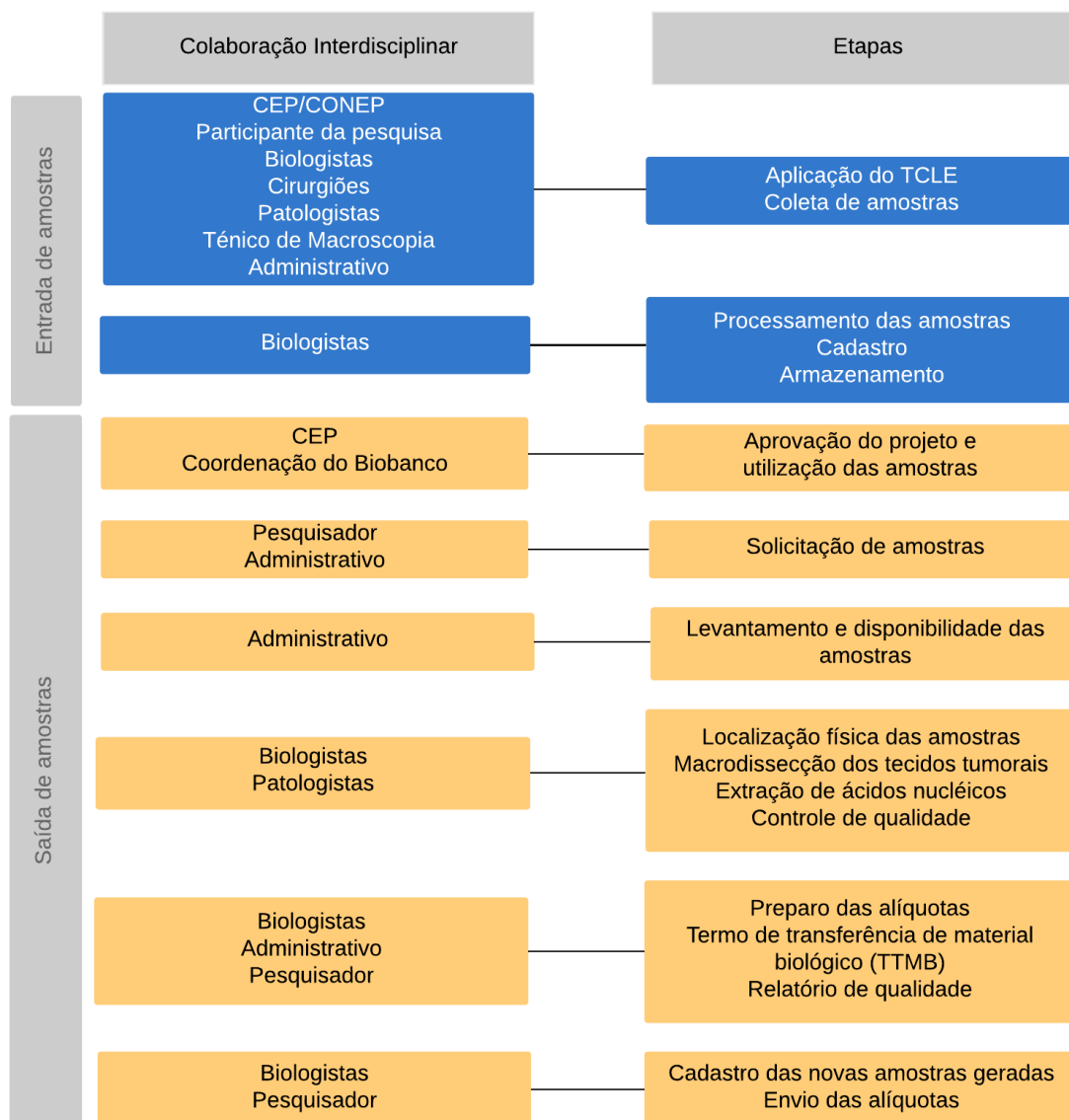
As amostras de tecidos (tumoral, normal e metastático) são provenientes de cirurgias ou biópsias realizadas na unidade I e hospital infantil das seguintes especialidades: neurocirúrgica, melanoma, mastologia, hematologia, ginecologia, digestivo baixo, digestivo alto, cabeça e pescoço, urologia, tórax e ortopedia,

#### **1.2.4 Equipe e fluxo de trabalho**

Inicialmente a equipe do BB-HCB era composta basicamente por seis pessoas, sendo dois biólogos, trabalhando diretamente na parte técnica e manipulação de amostras, dois auxiliares administrativo, um patologista e um biomédico responsáveis pela coordenação do setor. Com o objetivo de melhoria e adequação de processos, o número de funcionários dobrou. Atualmente, a equipe é composta por 12 pessoas, sendo três biólogos, dois assistentes administrativos, duas coordenadoras de projetos, duas estagiárias, um técnico para avaliação macroscópica da área tumoral, e uma biomédica e uma patologista responsáveis pela coordenação.

O fluxo de entrada de amostra pode ser dividido em cinco etapas: aplicação do TCLE coleta, processamento do material biológico, cadastro e armazenamento (Figura 6).





**Fonte:** Arquivo pessoal.

Figura 6 - Ciclo interativo interdisciplinar do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB) em diferentes etapas no processo de coleta e distribuição das amostras.

A etapa inicial envolve o processo ético de consentimento do possível participante da pesquisa, através da aplicação do TCLE, executada por duas coordenadoras de pesquisa do Biobanco, onde irá autorizar ou não a sua participação em pesquisa bem como a coleta do seu material biológico. Existem dois formatos padrão de TCLE utilizados pelo BB-HCB, um é aplicado em pacientes oncológicos ou com suspeita de câncer (Anexo A) e o outro em

indivíduos sem câncer (Anexo B) atendidos nas unidades de prevenção, ambos TCLEs foram aprovados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Conforme citado anteriormente, o BB-HCB também armazena material biológico vinculado a projetos específicos, denominados Biorrepositórios, nesse caso a aplicação do TCLE é feita por coordenadoras de projetos do NAP (Núcleo de Apoio a Pesquisa), responsáveis pela aplicação do TCLE do Biobanco juntamente com o TCLE específico do projeto. Além disso, os critérios de inclusão e tipo de material biológico coletado seguem um fluxo diferente das amostras coletadas para Biobanco.

Por fim, após o consentimento do participante da pesquisa é feito a coleta do material biológico. Para Biobanco são coletados aproximadamente 25ml de sangue, equivalente a 4 tubos de coleta BD Vacuntainer EDTA<sup>®</sup> e 1 tubo gel BD SST<sup>®</sup> advance com ativador de coágulo. Os tubos são identificados e encaminhados para o biólogo do Biobanco, responsável pelo processamento e cadastro da amostra. Primeiramente o sangue é fracionado em soro e plasma, através da plataforma automatizada Genesis Freedom<sup>®</sup> (Tecan) e o *buffy coat* é retirado manualmente. Após a obtenção das alíquotas, as amostras são cadastradas de maneira que as informações do participante da pesquisa sejam associadas à amostra, bem como a localização específica do freezer em que ficarão armazenadas até o momento de serem solicitadas pelo pesquisador. Todas as amostras são colocadas em criotubos, resistentes a baixas temperaturas, e identificadas através de código de barras.

A próxima etapa consiste em realizar a coleta de tecido tumoral dos mesmos participantes que tiveram seu sangue anteriormente coletado. As peças provenientes de cirurgias, são encaminhadas a sala de congelação do centro cirúrgico, onde um técnico juntamente com um médico patologista fará a coleta de material para diagnóstico do paciente e um fragmento ( $\cong 1$  cm) excedente que será destinado para pesquisa<sup>43,44</sup>. Os fragmentos selecionados para fins de pesquisa, são congelados rapidamente em vapor de nitrogênio e submetidos à técnica de macrodissecção, onde o fragmento é cortado em fina espessura, transferido para uma lâmina e corado em HeE. Apenas amostras que tiverem área neoplásica  $\geq 60$  % e até 20% de necrose são enviadas para o BB-HCB. As amostras qualificadas permanecem armazenadas em galão de nitrogênio em vapor, até o momento de serem enviadas ao BB-HCB, juntamente com as informações da macrodissecção, inseridas no sistema de gerenciamento de amostras. Tecidos de biópsias não são submetidas a este

controle de qualidade antes de serem armazenadas no BB-HCB, somente no momento em que são solicitadas para pesquisa, quando existe mais de um fragmento que possibilite a realização da técnica, bem como a extração de DNA/RNA do material. O processo de cadastro e armazenamento segue da mesma forma feita em amostras de sangue, citado à cima.

O fluxo de saída de amostras envolve sete etapas: aprovação do projeto via CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), solicitação do pesquisador, levantamento das posições e disponibilidade das amostras, localização das amostras fisicamente, extração de ácidos nucléicos, controle de qualidade, preparo das alíquotas e envio (Figura 5).

O processo de saída das amostras, para utilização em pesquisa, inicia-se com a elaboração de um projeto de pesquisa que contemple utilização de amostras biológicas criopreservadas no BB-HCB. Antes de submeter o projeto ao CEP, o pesquisador deve entrar em contato com a secretaria do BB-HCB para realizar o levantamento de disponibilidade de amostras, de acordo com o tipo de material biológico e topografia que o pesquisador necessita. Sendo assim, a secretaria do Biobanco fornece uma listagem com a disponibilidade de amostras, que atendam os critérios de inclusão do projeto, a qual faz parte da documentação requerida pelo CEP no momento de cadastrado do projeto pela plataforma Brasil.

Após a aprovação do projeto via CEP, o pesquisador pode solicitar a retirada das amostras para o setor administrativo do BB-HCB, que fará primeiramente a conferência de toda a documentação do projeto e levantamento das posições onde as amostras encontram-se armazenadas. O biólogo é o responsável por localizar fisicamente as amostras bem como a extração de ácidos nucléicos utilizando a plataforma automatizada QIASymphony® (QIAGEN). Em caso de solicitação de DNA/RNA de tecidos, é realizado primeiramente a técnica de macrodissecção, a fim de aferir a porcentagem e tecido tumoral/normal e necrose, somente após esse processo, é feita a extração do material biológico.

Após a extração, as amostras de DNA/RNA são submetidas a análise de controle de qualidade, que consiste em mensurar o rendimento e pureza do material, antes do envio para o pesquisador. Em alguns casos, o pesquisador também pode solicitar a análise de integridade das amostras, mediante ao fornecimento do kit necessário para realização.

Por fim, uma alíquota de cada amostra é enviada ao pesquisador juntamente com o TTMB (Termo de Transferência de Material Biológico) e relatório de qualidade, documentos

com informações das amostras, que deverá ser assinado pelo pesquisador, coordenação do Biobanco e biologista responsável pela entrega do material. As amostras originais que restarem, são cadastradas e armazenadas em freezers -80°C.

### **1.2.5 Comitê Biobanco**

O BB-HCB possui um comitê científico, composto por cinco membros e um secretário, cujo objetivo é a discussão de temas relacionados a regulamentação da utilização, armazenamento e manipulação de material biológico humano para fins de pesquisa. Sendo assim, são as principais atribuições do Comitê BB-HCB:

a) Definir diretrizes para a liberação e distribuição de amostras biológicas alocadas nas dependências da Hospital de Câncer de Barretos sob sua guarda;

b) Acompanhar e definir periodicamente os indicadores do BB-HCB;

c) Apreciar, diretamente ou através de comissão especial, os projetos de pesquisa que visem à utilização das amostras biológicas respeitando a políticas de propriedade intelectual do HCB;

d) Fazer planejamento e estabelecer critérios de que maneira as amostras biológicas serão disponibilizadas para os projetos aprovados. Seguindo política institucional de acordo com procedimentos operacionais padrão (POP).

Em caso de não adequação dos itens por parte do pesquisador, o mesmo poderá ficar impedido de utilizar novas amostras.

### **1.2.6 Infraestrutura**

O BB-HCB possui uma moderna infraestrutura, associada ao Centro de Pesquisa de Oncologia Molecular (CPOM), com cerca de 100 m<sup>2</sup>. Essa área é dividida em laboratório, duas salas de freezers e uma sala de congelação, integrada à sala de congelação do departamento de patologia no centro cirúrgico (Figura 7).



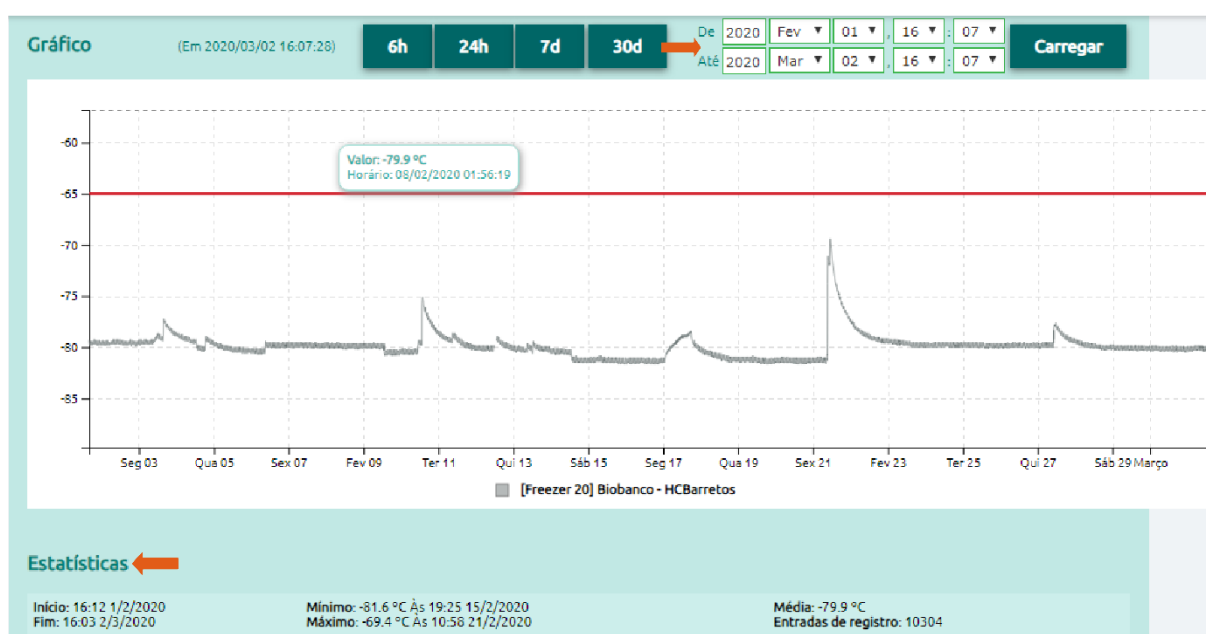
**Fonte:** Departamento de eventos HCB.

Figura 7 - Distintos setores do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB): laboratório, sala de freezers e sala de congelação.

O laboratório é o local onde é feito o recebimento e processamento de material biológico e genético, para tanto é equipado com diferentes máquinas. O equipamento Genesis Freedom® (Tecan), utilizado na rotina de processamento de sangue possui capacidade de *pipetar* e alíquotar até 62 amostras de plasma e/ou soro de acordo com o volume que o operador determinar. Para extração de material genético, a partir de qualquer material biológico, é utilizado a plataforma automatizada QIASymphony® (QIAGEN), capaz de extrair 96 amostras em até 4 horas. O equipamento criostato (Leica), instalado tanto no laboratório quanto na sala de congelação do centro cirúrgico, é utilizado na técnica de macrodissecção, que consiste em fazer o corte histológico dos tecidos em temperatura de congelamento, a fim de saber a porcentagem de tumor e necrose da amostra. Em se tratando de controle de qualidade do material genético, o laboratório é equipado com dois sistemas de eletroforese microfluídica, *Bioanalyzer* e *TapeStation* (Agilent), dois espectrofotômetros, *Nanodrop 2000* e *Nanodrop one* e um fluorômetro, *Qubit2.0* (ThermoFisher).

A sala em que os freezers ficam alocados possui um sistema de monitoramento de CO<sub>2</sub>, que pode ser acionado em caso de emergência, bem como um monitoramento de temperatura ambiente o qual emite um alerta caso a temperatura da sala ultrapasse os 22° C. Além disso, a sala de freezer possui acesso restrito, podendo ter acesso apenas membros da equipe, plantonistas e pessoas autorizadas.

Atualmente o BB-HCB possui 13 freezers -80°C, com capacidade de 24 a 56 mil amostras e 2 freezers -20°C. Todos os freezers estão conectados 24 horas ao sistema de monitoramento Sensorweb, que pode ser acessado a qualquer momento através de um computador ou smartphone com acesso à internet (Figura 8).



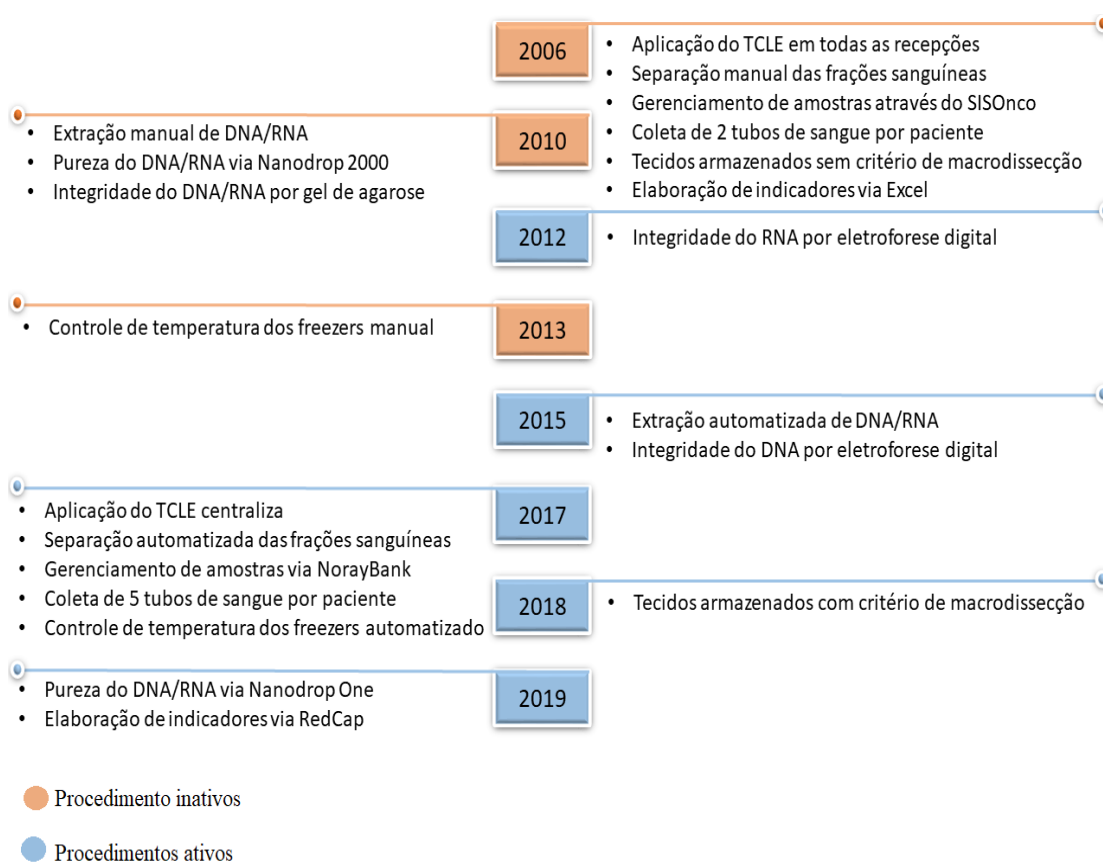
Fonte: Site sensorweb ([www.sensorweb.com.br](http://www.sensorweb.com.br))

Figura 8 - Gráfico e estatísticas emitido pelo sistema de monitoramento de freezer

Se houver algum tipo de problema de refrigeração, tanto do equipamento como da sala, o sistema realiza chamadas telefônicas e sinal de alerta ao biólogo plantonista, o qual fica responsável por realizar o plano de contingência, que consiste em transferir todas as amostras do freezer para um freezer *backup*, o qual permanece vazio para ser utilizado em situações como esta. Além disso, o sistema de monitoramento também fornece estatísticas e gráficos de cada equipamento monitorado de acordo com o período que o usuário solicitar, sendo muito útil principalmente em casos de auditorias e/ou intercorrências.

### 1.2.7 Procedimentos operacionais padrão

Os POPs utilizados pelo BB-HCB são desenvolvidos pelos biólogos juntamente com coordenação e o setor de qualidade do Hospital de Câncer de Barretos, a partir dos guias de boas práticas da ISBER, NCI e IARC <sup>4,7</sup>. A criação dos POPs é considerada uma atividade dinâmica que evolui continuamente, portanto diversos procedimentos foram modificados e/ou acrescentados no fluxo de rotina do BB-HCB ao longo dos anos. Dentre todas as modificações de procedimentos que ocorreram ao longo dos anos, algumas merecem destaque, devido ao grande impacto que tiveram na melhoria de qualidade dos processos (Figura 9).



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Figura 9 - Ajustes e melhorias dos Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BB-HCB) ao longo de 13 anos.

As maiores mudanças ocorreram no ano de 2017, incluiu a forma de aplicação do consentimento, aumento do volume de sangue coletado, automação de processos e aquisição de um *software* de gerenciamento de amostras específico para Biobanco.

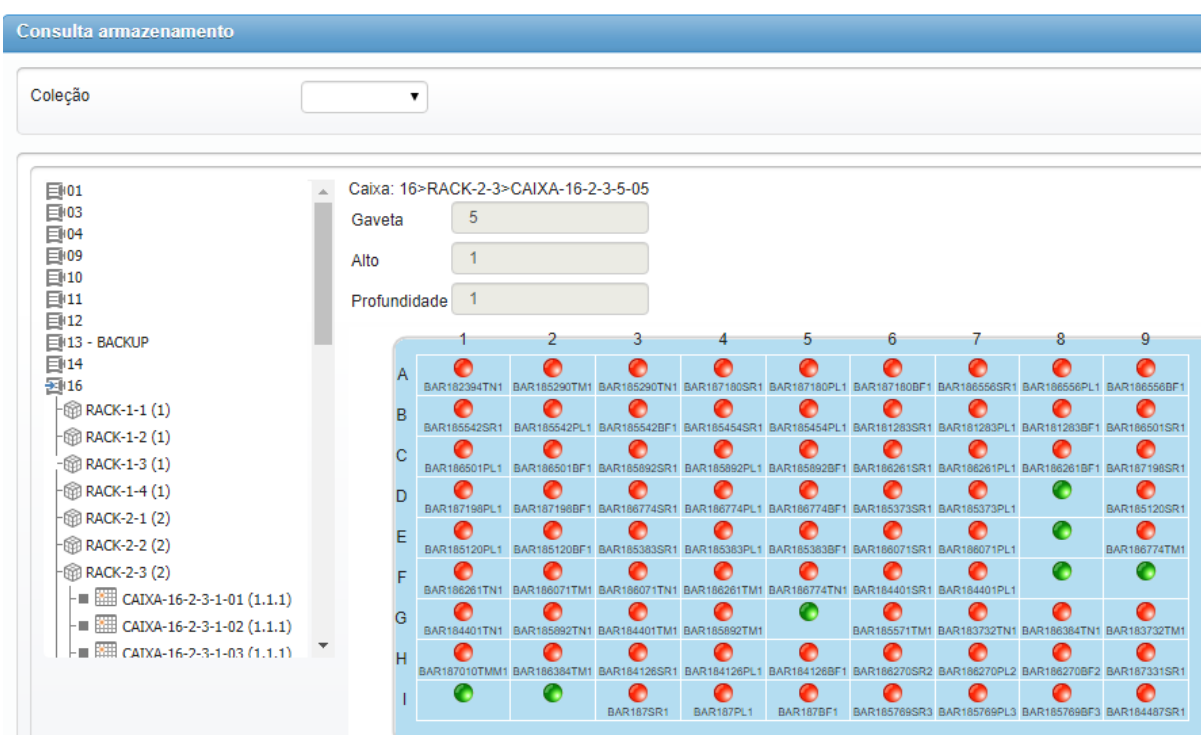
Em se tratando da aplicação TCLE, inicialmente (2006) o processo era realizado em todas as recepções do Hospital de Câncer de Barretos, no momento da abertura do prontuário do paciente, por funcionários da recepção que haviam sido treinados e orientados. Com a expansão crescente do Hospital e conseqüentemente o grande número de recepções e rotatividade de funcionários, foi observado que aplicação do TCLE bem como a coleta do material não estava sendo totalmente eficaz. Dessa forma, no ano de 2017 esse processo foi modificado pelos membros do Comitê do BB-HCB, após reunião, viram a necessidade de inclusão de uma pessoa exclusiva para aplicação do TCLE. Assim, foi integrada na equipe do BB-HCB, uma coordenadora de projetos para atender essa demanda, responsável não só pela aplicação direta do termo, mas também o gerenciamento e recrutamento de participantes, coleta do material, capacitação e monitoramento contínuo da equipe. Essa mudança melhorou significativamente tanto o processo da aplicação de termo como de qualidade do material coletado, uma vez que o mesmo passou a ter um critério maior de tempo de coleta, processamento e redução na taxa de hemólise.

A alteração no aumento da quantidade de sangue coletado por participante da pesquisa, foi devido ao crescente número de pesquisa de biópsia líquida. Dessa forma, a coleta passou de 13 ml de sangue do paciente, correspondente a 1 tubo gel BD SST<sup>®</sup> advance e 1 tubo de coleta BD Vacutainer EDTA<sup>®</sup>, para 25 ml de sangue, correspondente a 1 tubo gel BD SST<sup>®</sup> advance e 4 tubos de coleta BD Vacutainer EDTA<sup>®</sup>. Essa alteração possibilitou a utilização das amostras de plasma em projetos de biópsia líquida, o qual necessita de um maior volume de plasma para validação da técnica. Com o aumento da quantidade de sangue coletado, foi necessário ajustar a forma de processamento, feita manualmente desde o início. Para tanto, foi adquirido um *pipetador* automático Genesis Freedom<sup>®</sup> (Tecan), com capacidade de processamento de 64 amostras em 30 minutos. A aquisição do equipamento otimizou bastante o processamento das amostras, possibilitando a entrada de uma maior quantidade de amostras sem a necessidade de aumento do quadro de funcionários.

A troca de *software* de gerenciamento de amostras impactou positivamente em melhorias de qualidade da informação, agilidade do processo e sustentabilidade do setor pois o *software* é habilitado para sinalizar as posições dos freezers que estão vazias, reduzindo a necessidade de compra de novos freezers (Figura 10). Inicialmente era utilizado o *software* SISonco, desenvolvido e utilizado pelo Hospital de Câncer de Barretos, devido as suas limitações e busca por melhorias, foi adquirido o *software* NorayBanks (NorayBio),



utilizado mundialmente por outros Biobancos. Outro sistema que foi adquirido, foi o de monitoramento 24 horas dos freezers. Inicialmente o controle de temperatura era feito manualmente pelos biólogos do setor, quatro vezes ao dia, porém além de ser um processo demorado, que demandava tempo dos funcionários, não era eficaz. Com a aquisição do novo sistema, hoje é possível acessar via internet e em tempo real a temperatura de todos os freezers.



**Fonte:** Site Noraybanks([www.noraybio.com](http://www.noraybio.com))

Figura 10 - Software de gerenciamento de amostras NorayBanks mostra as posições ocupadas (vermelho) e livres (verde) das caixas

Outras mudanças que tiveram grande impacto foi a automação das extrações de ácidos nucleicos e o controle de qualidade dos tecidos armazenados através da macrodissecção. No ano de 2015, as extrações de material genético feitas manualmente, foram padronizados para plataforma automatizada QIASymphony® (QIAgen). Para a implantação desse procedimento, foram feitos vários testes utilizando diferentes protocolos, materiais biológicos e volumes de eluição. Atualmente os protocolos utilizados pelo BB-HCB são customizados, permitindo executar grandes demandas em um período

curto de tempo, além de atender os critérios de qualidade das amostras para utilização em pesquisa. A partir de 2018, os tecidos tumorais provenientes de cirurgias e biópsias, passaram a ter critério de macrodissecção, antes de serem encaminhados para o BB-HCB. Inicialmente, esse critério não era utilizado, sendo assim, amostras com menos de 60% de área neoplásica e até mesmo sem tumor, eram armazenadas. A técnica da macrodissecção era feita no BB-HCB somente após a solicitação do pesquisador para a utilização da amostra em pesquisa, porém era observado uma perda de até 40% das amostras solicitadas. Essa mudança foi possível através da colaboração com setor de patologia, que cedeu um técnico de *macroscopia*, responsável pelo corte dos fragmentos e coloração das lâminas, além de um patologista que integra a coordenação do BBHCB, responsável por analisar as lâminas. Dessa forma, 100% dos tecidos coletados e encaminhados ao Biobanco a partir do ano de 2018 atende ao critério de qualidade ( $\geq 60\%$  de células neoplásicas e 20% de necrose).

#### **1.2.8 Colaboração e uso de amostras em projetos de pesquisa**

O BB-HCB colaborou com diversos projetos de pesquisa, desenvolvidos pelos pesquisadores do HCB e em parceria com outras instituições tais como: AC. Camargo, Fiocruz, USP (Universidade de São Paulo), UNESP (Universidade Estadual Paulista), Sírio Libanês, NCI, The Cancer Genome Atlas (TCGA), IARC, International Genome Consortium (ICGC) e MDAnderson. Até o momento (2006-2019) o BB-HCB forneceu cerca de 26.399 amostras para diferentes projetos de pesquisa, sendo amostras biológicas enviadas na íntegra ou extraídas (DNA/RNA) (Figura11).

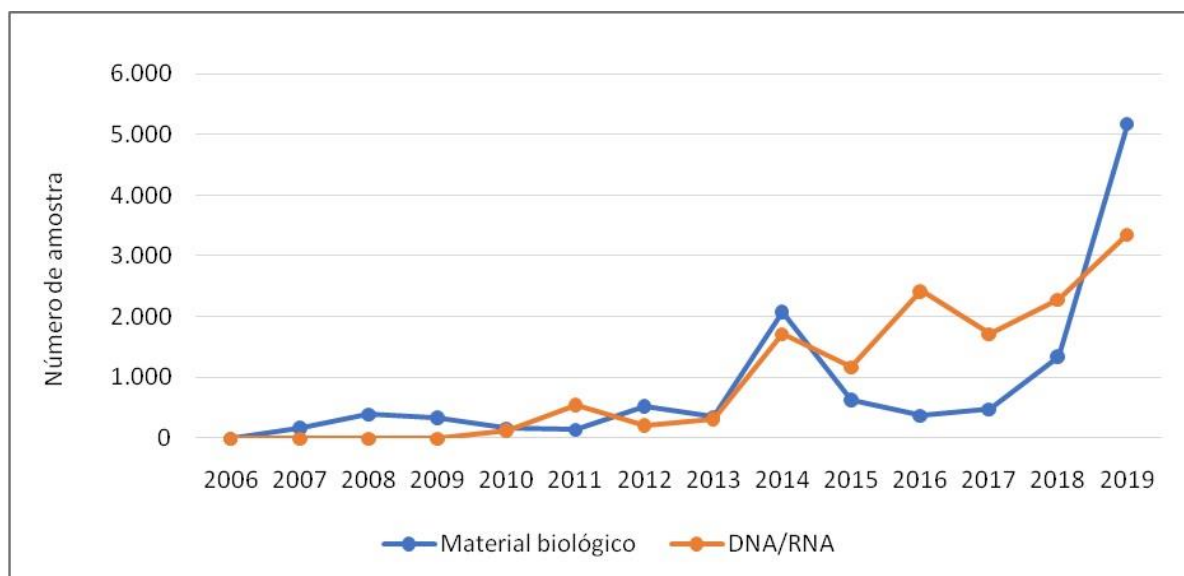


Figura 11 - Número de amostras (biológicas e ácidos nucleicos) enviadas para pesquisa ao longo dos anos.

Inicialmente (2006-2009) o BB-HCB fornecia apenas amostras biológicas na íntegra para pesquisadores e instituições parceiras. Em 2010, o BB-HCB começou a realizar as extrações de DNA/RNA das amostras biológicas armazenadas, fornecendo-as em forma de alíquotas, facilitando e otimizando bastante a pesquisa, além de possibilitar o uso da amostra em vários estudos.

Como parte do *Latin American Cancer Program Development* (OLACPD) o BB-HCB iniciou em 2010 um projeto piloto em parceria com o NCI, cujo objetivo foi caracterizar a distribuição do perfil molecular do câncer de mama invasivo nos estágios II ou III em mulheres latino-americanas. Fizeram parte do estudo uma coorte prospectiva de 200 mulheres em 2 anos de recrutamento, envolvendo coleta de sangue, tecido de cirurgia e biópsia, dados clínicos e extração de DNA e RNA. Outra parceria com o NCI, foi através do projeto TCGA, um estudo de grande escala com o objetivo de criar um “atlas” do genoma do câncer. Esse projeto envolveu a coleta de tecido tumoral e tecido normal pareados das topografias de bexiga, cabeça e pescoço, estômago, esôfago e colo do útero, além de dados clínicos de cada participante. Após extração de DNA e RNA das mesmas amostras de tecido e um extenso controle de qualidade, o material genético foi analisado por uma variedade de tecnologias de microarray e sequenciamentos. As informações geradas por esses projetos, após análise

computacional e de bioinformática, foram centralizadas e inseridas em bancos de dados públicos<sup>84-89</sup>.

O primeiro estudo que envolveu análise de exôma deu início em 2014, em parceria com o ICGC, o estudo realizou o sequenciamento completo de tecido tumoral e tecido normal pareados de 120 participantes portadores de melanoma, criando desta forma um perfil mutacional somático e germinativo de melanomas que acometem pacientes brasileiros<sup>90</sup>. Desde então, outros projetos de exôma foram realizados em diferentes tipos tumorais, tais como: pulmão, esôfago, mama e cólon retal. O BB-HCB também foi objeto de estudo em uma tese de doutorado realizada em parceria com a Universidade de São Paulo (USP), afim de avaliar a interferência do tempo de isquemia fria na qualidade do RNA extraído de amostras de tecido tumoral de mama, estômago e colorretal<sup>20,60</sup>. Atualmente o BB-HCB possui cerca de 70 projetos de pesquisa ativos e 68 já finalizados, além de contribuir com a pesquisa translacional em câncer, esses estudos auxiliaram o BB-HCB na implantação de POPs e controle de qualidade das amostras criopreservadas.

## 2 JUSTIFICATIVA

No contexto de Biobancos, diferentes fatores pré-analíticos influenciam a qualidade das amostras, sendo o tempo de armazenamento um fator que pode afetar a qualidade das amostras armazenadas por períodos indeterminados. Portanto, é essencial que os Biobancos assegurem a qualidade das amostras fornecidas para pesquisa.

O BB-HCB atualmente é considerado um dos maiores Biobancos da América Latina. Considerando o longo período de amostras armazenadas no BB-HCB, a implementação de novos POPs ao decorrer dos anos de sua história, a ausência de um estudo sistemático com tamanho amostral representativo da coleção bem como a participação em consórcios e redes internacionais de pesquisa, se faz necessário mensurara qualidade das amostras armazenadasno BB-HCB. Dessa forma, o presente estudo avaliou a integridade das amostras armazenadas no período de até nove anos no BB-HCB, a fim de estimar o impacto do tempo de armazenamento na qualidade das amostras.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade das amostras de tecido tumoral, *buffy coat* e *PBMC* criopreservadas em ultrafreezer -80°C no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos, ao longo de até 9 anos de armazenamento (período de 2008 a 2016).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade das amostras de tecido tumoral, através da macrodissecção dos fragmentos;
- Avaliar a integridade e rendimento do DNA/RNA obtido a partir de tecido tumoral, através de eletroforese digital e duas técnicas de quantificação, respectivamente;
- Avaliar a integridade e rendimento do DNA obtido a partir do *buffy coat* e *PBMC*, através de eletroforese digital e duas técnicas de quantificação, respectivamente;
- Avaliar a autenticidade das amostras de tecido tumoral e *buffy coat/PBMC*, do mesmo participante, através da análise de *STR (Short Tandem Repeats)*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Seleção de casos

Este trabalho trata-se de um estudo analítico observacional transversal, o qual selecionou aleatoriamente um total de 447 participantes com amostras retrospectivas armazenadas no BB-HCB. Como critério de inclusão, foram selecionados participantes que tivessem amostras retrospectivas pareadas, tecido tumoral e *buffy coat* ou tecido tumoral e *PBMC*, no período de 2008 a 2016. Como critério de exclusão, não foram utilizadas amostras vinculadas a projetos de pesquisa (Biorrepositório) e amostras de tecido tumoral com porcentagem neoplásica < 60% e porcentagem de necrose >20%.

O cálculo amostral realizado foi baseado na disponibilidade de amostras pareadas coletadas e armazenadas no período de 2008 a 2016, considerando-se uma precisão absoluta do intervalo de confiança de 9 pontos percentuais e inadequação de 50%. O projeto foi desenvolvido no Hospital de Câncer de Barretos- Fundação Pio XII, entre o período de 2016 a 2020 e contou com a colaboração do departamento de patologia da instituição.

A coleta de dados de cada amostra foi realizada através do *software* SISONCO, sistema informatizado desenvolvido pelo HCB, com a finalidade de gerenciar as amostras biológicas, bem como os dados associados a elas. Através do SISONCO foi possível obter as principais informações de cada amostra, tais como: data e centro de coleta, topografia, disponibilidade da amostra, localização e possíveis intercorrências durante o período de armazenamento.

O estudo foi dividido em 3 etapas: pré-extração, extração de DNA/RNA e pós-extração conforme descrito no fluxograma de trabalho à baixo (Figura 12).

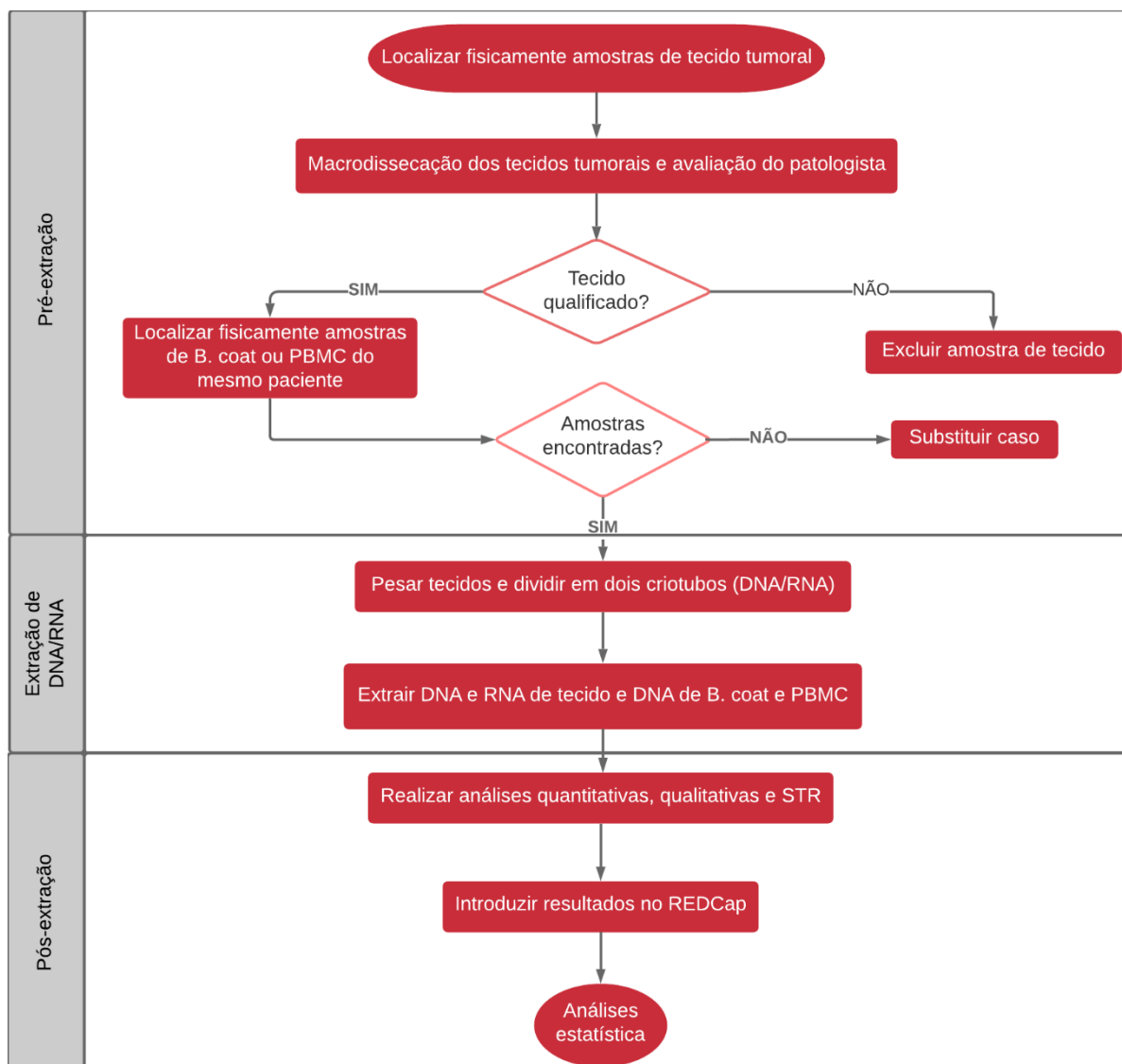


Figura 12 - Fluxograma de trabalho dividido em três etapas: pré-extração, extração de DNA/RNA e pós-extração.

#### 4.2 Macrodissecação dos tecidos tumorais

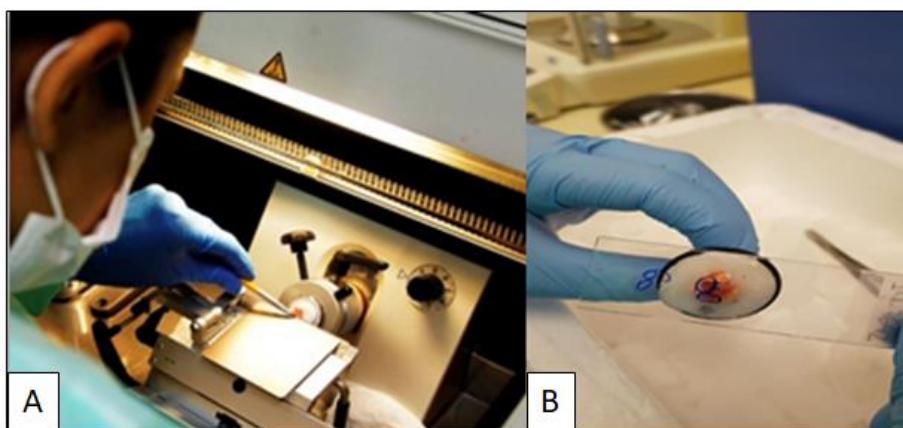
Todos os tecidos tumorais foram submetidos à macrodissecação (dissecação macroscópica do tecido) a fim de mensurar a porcentagem de área neoplásica e necrose, para tanto, os fragmentos de tecidos tumorais criopreservados foram inseridos na superfície de discos metálicos previamente identificados e preparados com gel Tissue-Tek (O.C.T-temperatura ótima de corte) e fixados com água destilada.

Posteriormente, foi feito o corte histológico de 5 mm do tecido com o auxílio do criostato (Leica CM 1850 UV) (Figura 13). Esse equipamento consiste em um micrótomo rotatório acondicionado dentro de uma câmara frigorífica com temperaturas de até  $-35^{\circ}\text{C}$ ,



que mantém o tecido congelado. Após o corte, o fragmento de tecido foi coletado em lâminas para microscopia e submetidos à coloração HE (hematoxilina-eosina).

Por fim, as lâminas foram analisadas por um médico patologista, através de um microscópio, que avaliou a porcentagem de tumor e necrose de cada amostra. Todos os tecidos tumorais com porcentagem <60% de tumor e >20% de necrose, foram excluídos para extração de DNA/RNA. A técnica de macrodissecção foi utilizada como critério para aferir a qualidade das amostras de tecido armazenadas e fornecidas pelos centros de coletas HCB.



**Fonte:** Arquivo pessoal

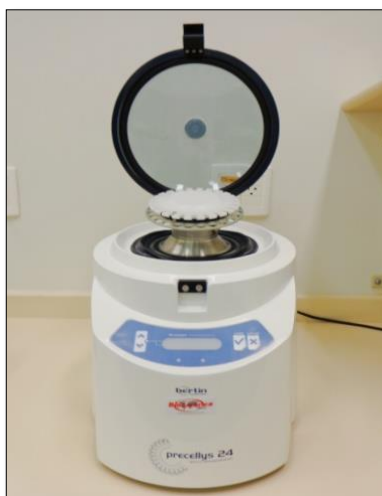
Figura 13 - (A) Macrodissecção dos tecidos tumorais utilizando o aparelho criostato (Leica CM 1850 UV). (B) Seleção do fragmento, após análise do patologista.

#### 4.3 Extração de DNA e RNA total de tecidos tumorais

Os tecidos tumorais qualificados na macrodissecção foram pesados e divididos em dois fragmentos, um para a extração de DNA e o outro para a extração de RNA. Amostras com fragmentos pequenos, com quantidade insuficiente para extração de DNA e RNA, optamos por utilizar o fragmento apenas para extração do DNA visto que para a realização do teste de STR é necessário o DNA do tecido tumoral. Para a extração de ambos os ácidos nucléicos foram utilizados de 20 a 30 mg de tecidos.

Para extração de DNA, em torno de 20 a 30mg dos tecidos foram transferidos para tubos contendo esferas de cerâmica e 230 ul de tampão de lise (ATL- Qiagen). Esses tubos foram colocados no equipamento homogeneizador de tecidos *Precellys 24* (Bertin Technologies) (Figura 14), a fim de se realizar a maceração completa dos tecidos e, portanto,

liberação do material genético. Utilizamos a programação de 2 ciclos de 10 segundos a 6.500 RPM.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Figura 14 - Equipamento de homogeneização Precellys 24 (Bertin Technologies), utilizado no processo de lise e maceração dos tecidos (capacidade de até 24 tubos de 2ml).

Após a maceração pelo equipamento Precellys 24 (Bertin Technologies), as amostras foram submetidas a centrifugação durante 1 minuto a 8.000 RPM. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, foi coletado o sobrenadante de cada amostra, sem resquícios de fragmentos sólidos de tecido, e adicionado 20  $\mu$ l de proteinase K. Posteriormente, as amostras foram transferidas para o equipamento Thermomixer (Eppendorf), para incubação a temperatura de 56°C e 700 RPM, por 2 horas. Em seguida as amostras foram retiradas do equipamento e mantidas na bancada, até atingirem temperatura ambiente (de 15 a 25°C). Por fim, foi adicionado 4  $\mu$ l de RNase (100 mg/ml) (Qiagen) em cada amostra e homogeneizado em *vórtex*, permanecendo em repouso durante 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram inseridas no aparelho QIA Symphony (Qiagen) (Figura 15), utilizando o DNA Minikit (Qiagen) e o protocolo padronizado denominado Tissue\_200\_LC, o qual utiliza 230  $\mu$ l de amostras e 50  $\mu$ l de volume de eluição.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Figura 15 - Equipamento Qiasymphony (Qiagen), plataforma automatizada utilizada para a extração de ácidos nucleicos.

A separação dos fragmentos para extração de RNA das amostras tumorais, foi realizada em área devidamente descontaminada utilizando a solução RnaseZAP™ (Ambion), a fim de remover completamente potenciais enzimas RNases comumente presentes em superfícies. Em seguida, os fragmentos de tecidos, previamente pesados e identificados, foram transferidos para tubos com esferas de cerâmica e 400 ul de uma solução contendo 2-Mercaptoetanol (Sigma) e RTL plus (Qiagen), na proporção de 1:100, respectivamente. Posteriormente, os tubos foram inseridos no equipamento Precellys 24 (Bertin Technologies), utilizando a programação de 2 ciclos por 10 segundos sob centrifugação a 6.500 RPM durante 3 minutos na velocidade máxima. Por fim, com o auxílio de uma pipeta, foi coletado o sobrenadante de cada amostra, sem resquícios de fragmentos sólidos de tecido, transferidos para tubos de 2ml (Sarstedt) e colocados no aparelho QIASymphony (Qiagen). Para extração de RNA, foi utilizado o RNA kit (Qiagen), utilizando o protocolo RNA\_400 padronizado para extração de RNA de tecido, e um volume de entrada da amostra de 430 ul e volume de eluição de 50 ul.

#### 4.4 Extração de DNA de *buffy coat* e PBMC

Primeiramente, as amostras de *buffy coat* (cerca de 500 ul), contendo hemácias, foram descongeladas no equipamento Thermomixer (Eppendorf) a uma temperatura de 37°C, submetidas a 200 RPM de centrifugação a temperatura ambiente (15-25°C). Posteriormente, foi adicionado 4 ul de RNase A (100 mg/ml) (Qiagen), em cada amostra, e em seguida homogeneizado sob *vórtex*, permanecendo em repouso durante 2 minutos. Seguidamente, todo conteúdo foi transferido para tubos de 2 ml (Sarsted) e inseridos no equipamento QIASymphony (Qiagen). Para a extração utilizamos o DNA Midi Kit (Qiagen) e o protocolo automatizado customizado DNA\_Blood\_400, com volume de entrada de amostra de 500 ul e um volume de eluição de 50 ul.

Para as mostras de sangue armazenadas como PBMC, fizemos extração do material genético utilizando kits comerciais (não a plataforma automatizada QIASymphony), uma vez que por terem sido armazenadas como *pellet* de células, não é possível utilizar a plataforma automatizada. Inicialmente estas amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, com posterior adição de 200 ul de tampão fosfato-salino, 200 ul de tampão AL (Qiagen) e 20 ul de protease e levadas ao equipamento Thermomixer (Eppendorf) para incubação à 56°C por 15 a 20 minutos. Posteriormente, foi adicionando em cada amostra, 4 ul de RNase A (100 mg/ml) (Qiagen), seguido de etapas de lavagem utilizando as soluções do *DNA Blood Mini Kit* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.5 Avaliação do rendimento das amostras de DNA e RNA total

Para a avaliação do rendimento do material genético, tanto DNA quanto RNA, foi utilizado duas metodologias diferentes de quantificação: espectrofotometria (Nanodrop 2000, ThermoFisher) e fluorimetria (Qubit 2.0, ThermoFisher) (Figura 16).



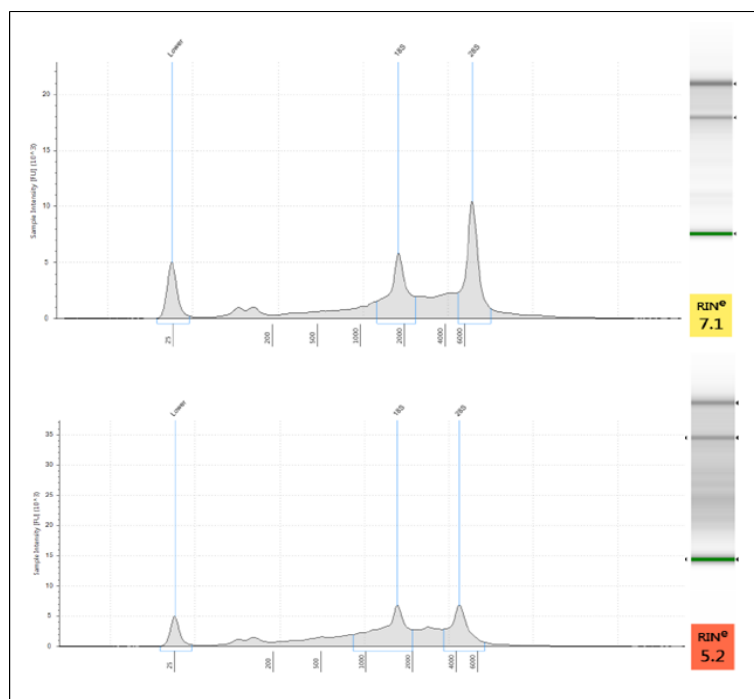
**Fonte:** Arquivo pessoal.

Figura 16 - (1) Espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) e (2) Fluorímetro Qubit 2.0 (ThermoFisher), utilizado para quantificar o rendimento do DNA e RNA total.

Foi utilizado os kits dsDNA BR (*Broad-Range*, ThermoFisher) e RNA- BR(*Broad-Range*, ThermoFisher), para avaliação do rendimento por fluorimetria, seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.6 Avaliação da integridade das amostras de DNA e do RNA total**

A integridade do material genético, tanto DNA quanto RNA, foi avaliada utilizando o sistema de eletroforese microfluídica TapeStation 4200 (Agilent) (Figura 17), utilizando o kit *DNA genomic* e *RNA Screen Tape Assay* (Agilent), seguindo as recomendações do fabricante. Esta análise nos permitiu obter o número de integridade do DNA (DIN) e do RNA (RIN), em que o valor 1 indica que a amostra está totalmente degradada e o valor 10 indica que a mesma está totalmente íntegra, sendo o valor  $\geq 7$  considerado aceitável para a maioria das aplicações para análises moleculares<sup>62</sup>.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Figura 17 - Imagens geradas pelo equipamento TapeStation 4200, representando a integridade da amostra através do gel virtual, eletroferograma e número de integridade do RNA (RIN).

#### 4.7 Análise de STR

A fim de se avaliar a autenticidade do material genético (DNA), realizamos a análise de STR (*Short Tandem Repeat*) das amostras de tecido tumoral e *buffy coat*, provenientes do mesmo participante da pesquisa.

O protocolo utilizado foi de acordo com Dirks et al.<sup>68,91</sup>. Primeiramente as amostras foram submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando 1 ul de amostra de DNA a 50 ng/ul, kit comercial PCR multiplex (Qiagen) e um conjunto de nove pares de *primers* (Tabela 03). Todos os *primers forwards* foram marcados por fluorescência FAM™ ou JOE™ (ThermoFisher). O protocolo de ciclagem térmica foi: 95°C por 15 minutos, 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 30 minutos.

Após a reação de PCR, as amostras foram preparadas para reação de sequenciamento, utilizando 1ul do produto da PCR diluído em água ultrapura (1:60), formamida deionizada (ThermoFisher) e reagente padrão *Genescan 500ROX* (ThermoFisher). Por fim, as amostras foram submetidas a uma eletroforese capilar utilizando o sequenciador

3500 (Genetic Analyser). Os dados gerados foram analisados através do *software GeneMapper* (Applied Biosystems).

Tabela 3 - Organização dos alelos e tamanho (pb\*) dos locus de STR humanos amplificados.

Alelo	D5s818	D13S317	D7S820	S16S539	vWa	TH01	TPOX	CSF1P0	Amelogenin
<b>3</b>						169			209=X
<b>4</b>						173			215=Y
<b>5</b>		164	212	266		177	220	287	
<b>6</b>	114	168	216	270		181	224	291	
<b>7</b>	118	172	220	274		185	228	295	
<b>8</b>	122	176	224	278		189	232	299	
<b>9</b>	126	180	228	282		193	236	303	
<b>9.3</b>						196			
<b>10</b>	130	184	232	286	118	197	240	307	
<b>11</b>	134	188	236	290	122	201	244	311	
<b>12</b>	138	192	240	294	126	205	248	315	
<b>13</b>	142	196	244	298	130		252	319	
<b>14</b>	146	200	248	302	134		256	323	
<b>15</b>	150	204	252	306	138			327	
<b>16</b>	154				142			331	
<b>17</b>	158				146				
<b>18</b>					150				
<b>19</b>					154				
<b>20</b>					158				
<b>21</b>					162				
<b>22</b>					166				
<b>23</b>					170				

\*pares de base

**Fonte:** Wilhelm e Drexler <sup>68</sup>

#### 4.8 Coleta de dados e análises estatísticas

Os dados obtidos foram inseridos na plataforma web *REDCap* por meio de uma ficha de coleta de dados (Anexo C) elaborada juntamente com a equipe de estatísticos do Hospital de Câncer de Barretos, e para realizar as análises estatísticas foi utilizado o *SPSS software*, versão 15.0.

A significância estatística adotada foi de 0,05, portanto valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos. Além disso, foi utilizado a área abaixo da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinar o *cutoff* no tempo de armazenamento

que fosse capaz de discriminar amostras degradadas (DIN/RIN <7) e íntegras (DIN/RIN ≥ 7), utilizando como critério a maior soma entre a sensibilidade e especificidade.

O parâmetro qualitativo do DNA e RNA foi comparado com o tempo de armazenamento das amostras, tipo de topografia (tecido), tipo de amostra sanguínea (*buffy coat* ou PBMC) e temperatura de armazenamento. O parâmetro quantitativo foi comparado ao tipo de topografia (tecido), tipo de amostra sanguínea (*buffy coat* ou PBMC) e metodologia de quantificação. Para as referidas comparações foi utilizado o teste de qui-quadrado. O modelo de regressão logística foi ajustado para verificar o efeito da temperatura de armazenamento sob a integridade das amostras de DNA *buffy coat*, através do qual foi estimado a *Odds Ratio* (OR) e seu respectivo Intervalo de Confiança 95% (IC 95%).

#### **4.9 Aspectos éticos**

O projeto possui aprovação do comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos, cujo número é 1207/2016 e CAAE 58927716.0.0000.5437 (Anexo C), atendendo aos critérios éticos em conformidade com a resolução CNS 466/12. Como se trata de um estudo de risco mínimo aos participantes e que não haverá benefício aos mesmos, foi solicitada a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Seleção de casos

De acordo com os critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados aleatoriamente 447 amostras de tecido tumoral, 362 amostras de *buffy coat* e 38 amostras de PBMC, armazenadas entre os anos de 2008 a 2016.

### 5.2 Macrodissecção dos tecidos tumorais

Das 447 amostras de tecido tumoral selecionadas, 130 (29%) foram excluídas na macrodissecção e um total de 317 (71%) foram consideradas qualificadas para utilização. Observamos que a diferença na frequência de exclusão foi estatisticamente significativa entre as topografias ( $p < 0,001$ ). As topografias com maior frequência de exclusão foram: trato genital masculino (55%), tronco e membros (ossos partes moles) (43%) e digestivo baixo (36%) (Figura 18).

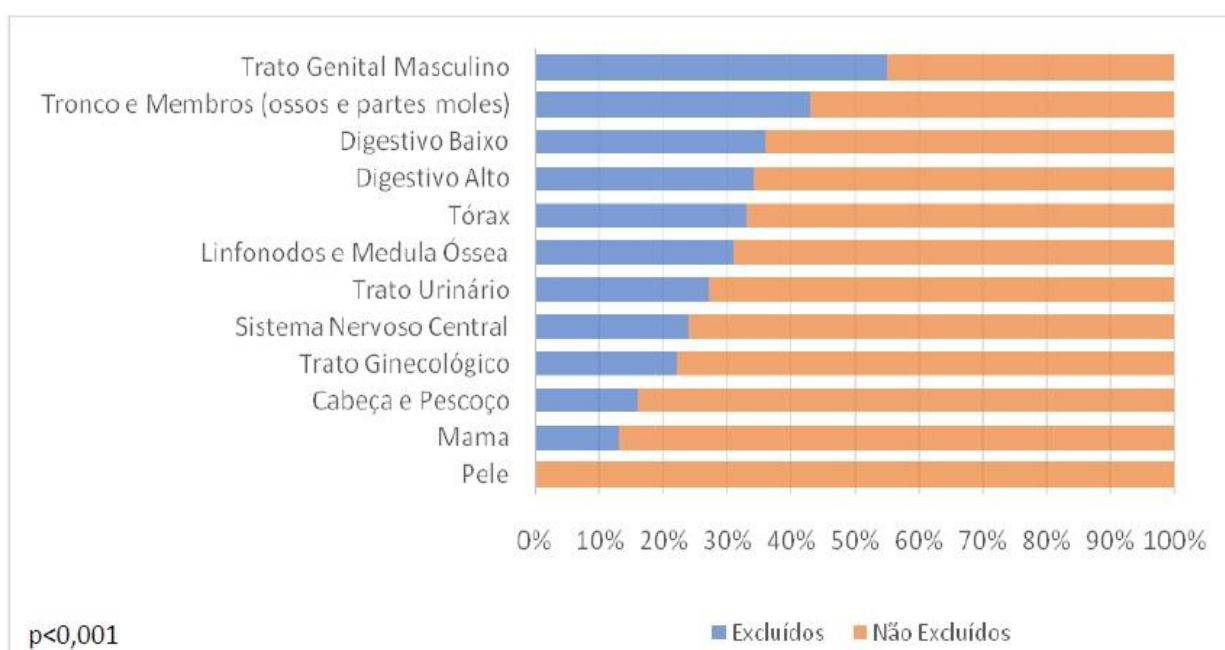


Figura 18 - Porcentagem de amostras excluídas na macrodissecção de acordo com o tipo de topografia.

### 5.3 Avaliação da integridade do DNA/RNA das amostras de tecido tumoral e o tempo de armazenamento

A partir das 317 amostras de tecido tumoral qualificados, realizamos a extração de DNA no entanto para extração de RNA total só foi possível em 190 tecidos desta casuística. Utilizando a área abaixo da curva ROC, o *cutoff* no tempo de armazenamento para as amostras de DNA de tecido tumoral foi de 8.1 anos ( $p < 0,001$ ) e de RNA 4.5 anos ( $p = 0,003$ ). (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise da curva ROC para determinar o cutoff no tempo de armazenamento das amostras de DNA e RNA de tecido tumoral, em relação a integridade.

Tipo de amostra	Cutoff	AUC*	IC: 95%**	Sensibilidade	Especificidade	p
DNA tecido	8.1 anos	0,68	0,60-0,76	0,70	0,69	<0,001
RNA tecido	4.5 anos	0,64	0,55-0,74	0,83	0,46	0,003

\*Área á baixo da curva (*Area Under the Curve-AUC*)

\*\*Intervalo de Confiança (IC)

Ao agrupar as amostras de DNA em dois tempos diferentes de armazenamento, < 8.1 anos e  $\geq 8.1$  anos, observou-se que no primeiro grupo 92 % das amostras possuem DIN  $\geq 7$  e apenas 8% DIN < 7, em contra partida, no segundo grupo 68% das amostras possuem DIN  $\geq 7$  e 32% DIN < 7 ( $p < 0,001$ ) (Figura 19).

Ao agrupar as amostras de RNA total em dois tempos diferentes de armazenamento, < 4.5 anos e  $\geq 4.5$  anos, observou-se que no primeiro grupo 54% das amostras possuem RIN < 7 e 45% RIN  $\geq 7$ , em contra partida, no segundo grupo 83% das amostras possuem RIN < 7 e 17% RIN  $\geq 7$  ( $p < 0,001$ ) (Figura 19).

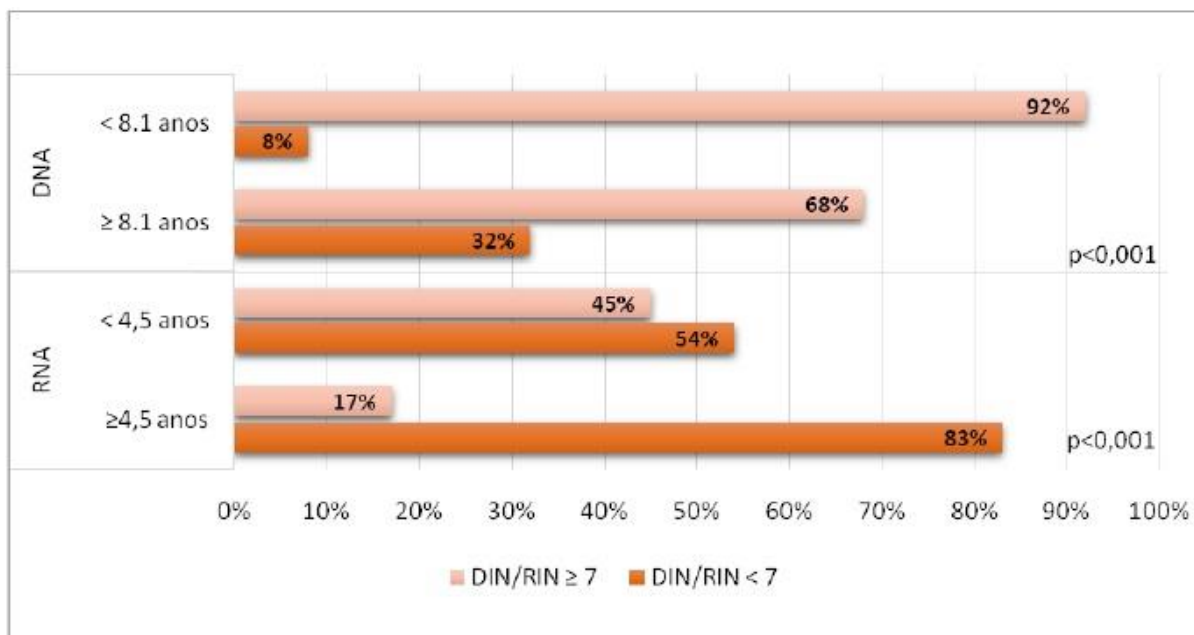


Figura 19 - Frequência de amostras com DIN/RIN  $\geq 7$  e  $< 7$  em relação ao tempo de armazenamento,  $\geq 8.1$  anos e  $< 8.1$  anos para amostras de DNA e  $< 4.5$  anos e  $\geq 4.5$  anos para amostras de RNA.

#### 5.4 Avaliação da integridade do DNA/RNA das amostras de tecido tumoral e o tipo de topografia

Em relação a integridade, observou-se que não houve diferenças com significância estatística em relação a frequência de amostras com  $DIN < 7$  e  $\geq 7$  entre os tipos de topografias ( $p=0,15$ ). Amostras das topografias de pele, tórax e sistema nervoso central tiveram maior frequência de valores  $DIN < 7$ , 36%, 29% e 25%, respectivamente. Em contra partida, as amostras das topografias trato urinário, trato genital masculino e trato ginecológico, foram as que tiveram maior frequência de valores  $DIN \geq 7$ , 95%, 93% e 94% respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5** - Frequência de amostras com DIN <7 e ≥ 7 em relação ao tipo de topografia.

Topografia	DIN		Valor de p
	< 7	≥ 7	
Pele	4 (36%)	7 (64%)	
Tórax (pulmão, coração e mediastino)	4 (29%)	10 (71%)	
Sistema nervoso central	4 (25%)	12 (75%)	
Mama	10 (24%)	31 (76%)	
Cabeça e pescoço	6 (23%)	20 (77%)	
Digestivo alto	12 (21%)	45 (79%)	0,15
Tronco e membros (ossos e partes moles)	3 (18%)	14 (82%)	
Linfonodos e medula óssea	3 (17%)	15 (83%)	
Digestivo baixo	4 (13%)	27 (87%)	
Trato ginecológico	3 (6%)	50 (94%)	
Trato genital masculino	1 (7%)	13 (93%)	
Trato urinário	1 (5%)	18 (95%)	

Em relação a integridade das amostras de RNA total, observou-se que não houve diferenças com significância estatística em relação a frequência de amostras RIN < 7 e ≥7, entre os tipos de topografias, ( $p=0,18$ ). Amostras de topografia de troncos e membros, tórax e pele tiveram maior frequência de valores RIN < 7, 100%, 100% e 90%, respectivamente. De outra forma, as amostras com topografia de trato genital masculino, mama e sistema nervoso central foram as que tiveram maior frequência de valores RIN ≥7, 40%, 38% e 36% respectivamente (Tabela 6).

**Tabela 6** - Frequência de amostras com RIN <7 e ≥ 7 em relação ao tipo de topografia.

Topografia	RIN		Valor de p
	< 7	≥ 7	
Tronco e membros (ossos e partes moles)	16 (100%)	0 (0%)	
Tórax (pulmão, coração e mediastino)	6 (100%)	0(0%)	
Pele	9 (90%)	1 (10%)	
Digestivo alto	12 (80%)	3 (20%)	
Linfonodos e medula óssea	12 (80%)	3 (20%)	
Trato ginecológico	21 (78%)	6 (22%)	0,18
Cabeça e pescoço	13 (76%)	4 (24%)	
Digestivo baixo	9 (75%)	3 (25%)	
Trato urinário	12 (75%)	4 (25%)	
Sistema nervoso central	9 (64%)	5 (36%)	
Mama	20 (62%)	12 (38%)	
Trato genital masculino	6(60%)	4 (40%)	

### 5.5 Avaliação da integridade do DNA das amostras de *buffy coat* e *PBMC* e o tempo de armazenamento

Foi extraído um total de 362 amostras de DNA de *buffy coat* e 38 amostras de DNA de *PBMC*. Utilizando a área abaixo da curva ROC, o *cutoff* no tempo de armazenamento para as amostras de DNA de *buffy coat* foi 8 anos de armazenamento ( $p < 0,001$ ), enquanto de DNA de *PBMC* foi 7.2 anos ( $p < 0,018$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7** - Análise da curva ROC para determinar o cutoff no tempo de armazenamento das amostras de DNA de buffy coat e PBMC, em relação a integridade.

Tipo de amostra	Cutoff	AUC*	IC: 95%**	Sensibilidade	Especificidade	p
DNA <i>buffy coat</i>	8 anos	0,77	0,71-0,82	0,71	0,69	<0,001
DNA PBMC	7.2 anos	0,79	0,59-0,99	0,87	0,73	0,012

\*Área á baixo da curva (*Area Under the Curve-AUC*)

\*\*Intervalo de Confiança (IC)

Ao agrupar as amostras de DNA de *buffy coat* em dois tempos diferentes de armazenamento, < 8 anos e  $\geq$  8 anos, observou-se que no primeiro grupo 95% das amostras apresentam  $DIN \geq 7$  e apenas 5%  $DIN < 7$ , em contra partida, no segundo grupo 74% das amostras apresentam  $DIN \geq 7$  e 26%  $DIN < 7$  ( $p < 0,001$ ) (Figura 20).

Ao agrupar as amostras de DNA de PBMC em dois tempos diferentes de armazenamento, < 7.2 anos e  $\geq$  7.2 anos, observou-se que no primeiro grupo 96% das amostras apresentam  $DIN \geq 7$  e 4%  $DIN < 7$ , por outro lado, no segundo grupo 54% das amostras apresentam  $DIN \geq 7$  e 46%  $DIN < 7$  ( $p = 0,003$ ) (Figura 20).

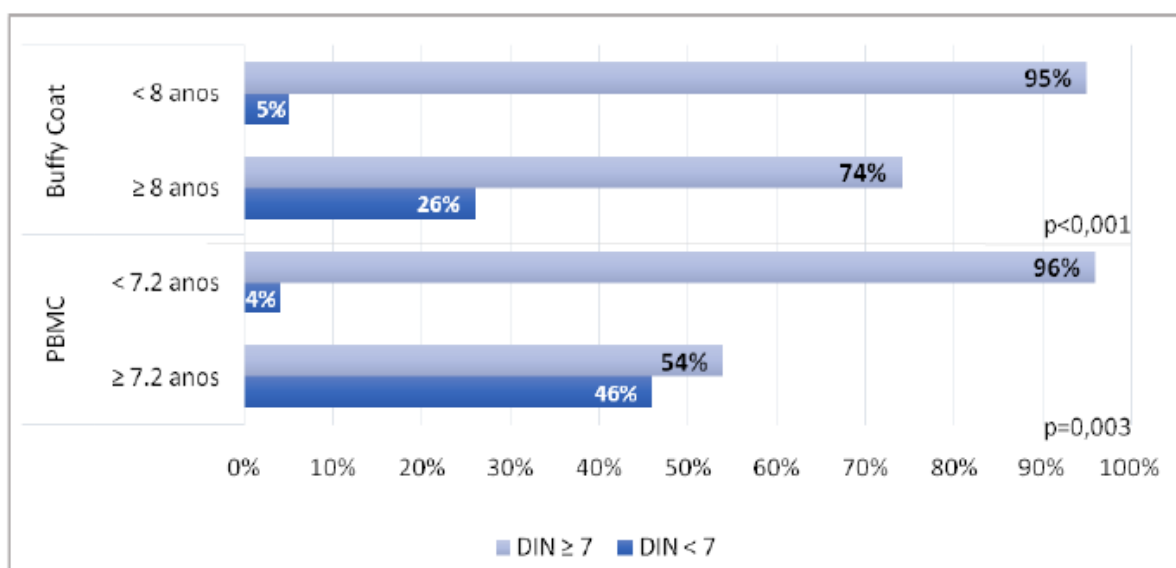


Figura 20 - Frequência de amostras com  $DIN \geq 7$  e  $< 7$  em relação ao tempo de armazenamento, < 8 anos e  $\geq$  8 anos para amostras de buffy coat e < 7.2 e  $\geq$  7.2 anos para amostras de PBMC.

### 5.6 Integridade do DNA das amostras de *buffy coat* PBMC armazenadas em -30° C

Um total de 171 amostras de *buffy coat* e 37 amostras de PBMC permaneceram armazenadas de 2 à 7 anos em freezer -30°C , antes de serem transferidas para um ultra-freezer -80°C, enquanto que 191 amostras de *buffy coat* e apenas 1 amostra de PBMC permaneceram armazenadas todo período apenas em -80°C. Ao comparar o valor do DIN das amostras armazenadas em -30°C e -80°C, observou-se uma frequência maior de amostras com valores de DIN < 7 (26%) no primeiro grupo, em relação ao segundo grupo (1%) ( $p < 0,001$ ) (Figura 21).

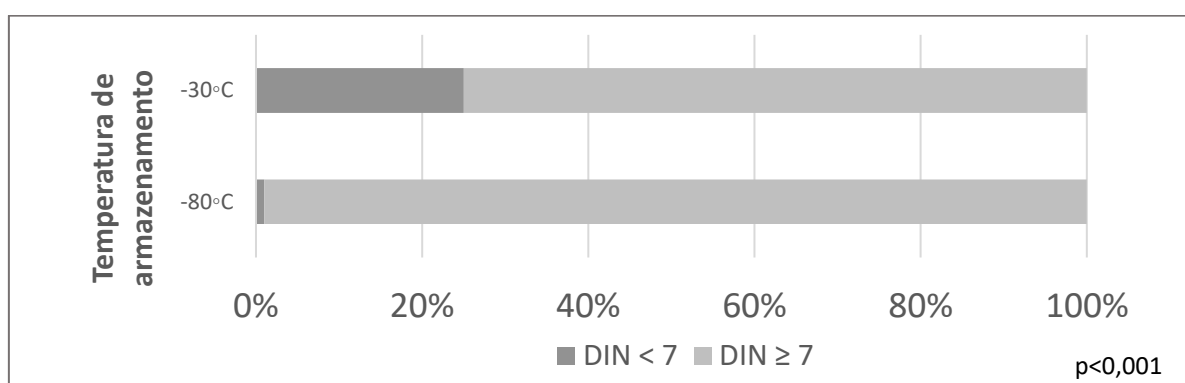


Figura 21 - Frequência de amostras com valor de DIN < 7 e ≥ 7, armazenadas em temperatura -80°C e -30°C.

Além disso, a partir do modelo de regressão logística ajustado para o tempo de armazenamento, foi possível observar uma maior chance (OR= 72,1) das amostras de *buffy coat* armazenadas em -30°C estarem degradadas (DIN <7) quando comparadas com as amostras de *buffy coat* armazenadas em -80° C (OR=1) (Tabela 8).

**Tabela 8** - Modelo de regressão logística ajustado para o tempo de armazenamento

Temperatura de armazenamento	OR	IC 95%	p
-80°C	1	-	-
-30°C	72,1	8,9-578,5	<0,001

### 5.7 Avaliação do rendimento das amostras de DNA e RNA total de tecido tumoral

Um total de 317 amostras de DNA e 190 amostras de RNA de tecido tumoral, foram avaliadas quanto ao seu rendimento. O rendimento médio das amostras de DNA de tecido tumoral variou significativamente em relação ao tipo de topografia ( $p < 0,001$ ) (Tabela 7). Dessa forma, observou-se um maior rendimento das amostras de DNA das topografias de linfonodos e medula óssea (362 ng/ul), pele (324 ng/ul), trato ginecológico (307 ng/ul) e trato urinário (240 ng/ul) (Tabela 9).

Do mesmo modo, o rendimento das amostras de RNA de tecido tumoral também variou significativamente em relação ao tipo de topografia ( $p < 0,005$ ) (Tabela 7). Observou-se um maior rendimento das amostras de RNA das topografias de linfonodos e medula óssea (552 ng/ul), pele (473 ng/ul), digestivo baixo (455 ng/ul) e trato ginecológico (418 ng/ul) (Tabela 9).

**Tabela 9** - Rendimento em ng/ul das amostras de DNA e RNA de tecido tumoral em relação ao tipo de topografia.

Topografia	Mediana DNA	Valor de p	Mediana RNA	Valor de p
Linfonodos e medula óssea	362		552	
Pele	324		473	
Trato ginecológico	307		418	
Trato urinário	240		189	
Cabeça e pescoço	235		222	
Digestivo baixo	232	< 0,001	455	< 0,005
Sistema nervoso central	203		154	
Tronco e membros (ossos e partes moles)	188		202	
Mama	184		156	
Trato sexual masculino	169		228	
Digestivo alto	135		274	
Tórax (pulmão, coração e mediastino)	73		161	



### 5.8 Avaliação do rendimento das amostras de *buffy coat* e PBMC

Foi avaliado o rendimento do DNA de 362 amostras de *buffy coat* e 38 amostras de PBMC (Tabela 10). O volume inicial das amostras de *buffy coat* foi de 500 ul, enquanto para PBMC, por se tratar de uma amostra de *pellet*, não foi possível mensurar o volume. O rendimento médio das amostras de DNA variou significativamente entre amostras de PBMC e *buffy coat*, sendo menor em amostras PBMC (50 ng/ul) e maior em amostras de *buffy coat* (145 ng/ul) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10** - Rendimento das amostras de DNA de PBMC e *buffy coat* em ng/ul.

Tipo de amostra	Mediana	DP*	Mínimo	Máximo	Valor de p
DNA PBMC	50	50	14	264	<0,001
DNA <i>Buffy coat</i>	145	96	5	424	

\*Desvio Padrão

### 5.9 Comparação entre os métodos de quantificação

Foi avaliado ainda o rendimento de 317 amostras de DNA e 190 amostras de RNA de tecido tumoral, utilizando duas metodologias de quantificação. Observou-se uma superestimação dos valores de rendimento (ng/ul) na quantificação por nanodrop quando comparado com a quantificação por Qubit. A diferença na quantificação entre os dois métodos foi considerada significativa tanto para amostras de DNA ( $p < 0,001$ ), quanto para amostras de RNA ( $p < 0,001$ ) (Figura 22).

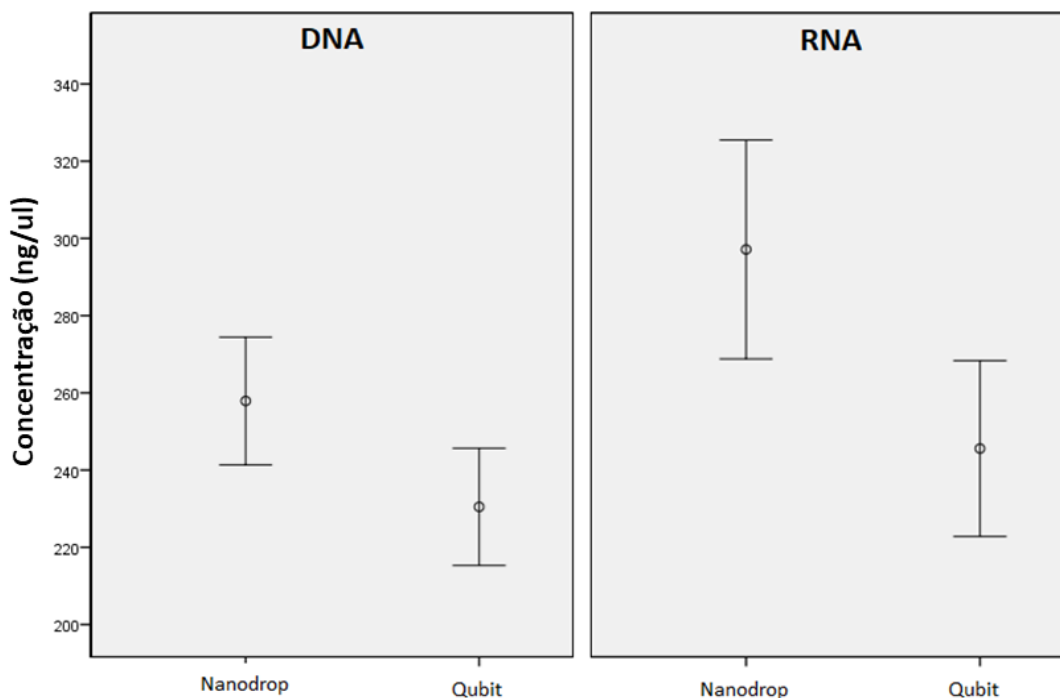


Figura 22 - Comparação entre os métodos de quantificação (nanodrop e qubit) de DNA e RNA de tecido tumoral

Da mesma forma, foi avaliado o rendimento do DNA de 362 amostras de *buffy coat* e 38 amostras de PBMC. Também se observou uma superestimação dos valores de rendimento na quantificação por nanodrop quando comparado com a quantificação por qubit. A diferença na quantificação entre os dois métodos foi considerada significativa tanto para amostras de *buffy coat* ( $p < 0,001$ ), quanto para amostras de PBMC ( $p < 0,001$ ) (Figura 23).

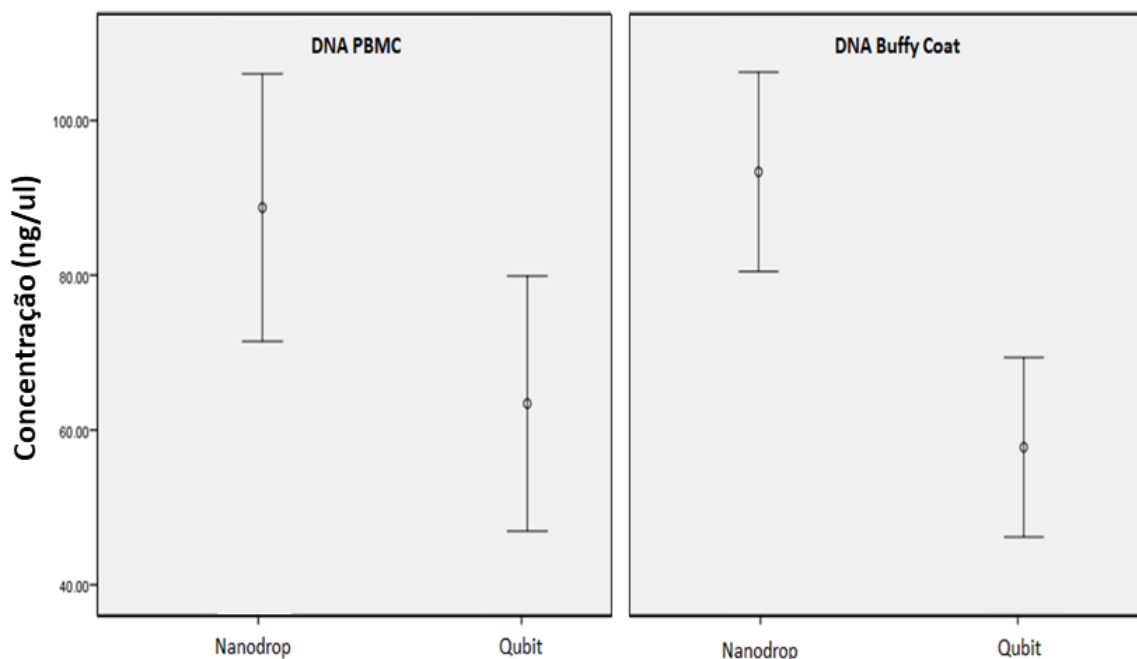


Figura 23 - Comparação entre os métodos de quantificação (qubit e nanodrop) de DNA de PBMC e *buffy coat*

## 6 Avaliação da autenticidade das amostras por análise de STR

Um total de 317 pares de amostras de DNA de tecido tumoral e *buffy coat* ou tecido tumoral e PBMC, armazenados entre os anos de 2008 e 2016, foram avaliadas quanto ao seu pareamento genético, através da análise de STR. Um total de 309 (97%) pares de amostras de diferentes participantes foram classificadas como compatíveis, pois apresentaram concordância nos 9 *locus* STR, enquanto 8 (3%) pares de amostras foram classificados como incompatíveis pois apresentaram discordância de 7 a 8 *locus* STR (Tabela 11).

**Tabela 11** - Frequência de amostras compatíveis e incompatíveis na análise de STR, de acordo com o ano de coleta.

Ano de coleta	Compatível	Incompatível
2008	11 (91%)	1 (9%)
2009	71 (93%)	5 (7%)
2010	63 (98%)	1 (2%)
2011	11 (100%)	0 (0%)
2012	4 (100%)	0 (0%)
2013	44 (98%)	1 (2%)
2014	44 (100%)	0 (0%)
2015	29 (100%)	0 (0%)
2016	32 (100%)	0 (0%)

Foram classificadas como incompatíveis na análise de STR, amostras armazenadas nos anos de 2008 (9%), 2009 (7%), 2010 (2%) e 2013 (2%). Além disso, o perfil genético das amostras incompatíveis foi comparado com as demais amostras extraídas na mesma data, com o objetivo de identificar possível erro ou trocadurante essa etapa, porém não foi encontrado compatibilidade entre elas.

## 7 DISCUSSÃO

Neste trabalho podemos sugerir que, a alta frequência de exclusão na análise histopatológica pode estar relacionada com a ausência de uma prática laboratorial previa a criopreservação no que tange a porcentagem de células tumorais nos tecidos coletados para Biobanco antes do seu armazenamento. Dessa forma, este trabalho mostrou que os tecidos criopreservados no BB-HCB de 2008 a 2017, não apresentam um padrão em relação a porcentagem de células tumorais e necrose. A análise histopatológica no início era realizada mediante a solicitação dos tecidos para obtenção de material genético e futura utilização em pesquisa apenas quando já se encontravam armazenadas no BB-HCB. No ano de 2018, durante o desenvolvimento desse trabalho, foi implementado um POP para a coleta e armazenamento das amostras de tecido antes de serem enviadas para criopreservação no BB-HCB, ou seja, ainda no centro cirúrgico do nosso hospital. Desde então, apenas às amostras teciduais com porcentagem de tumor  $\geq 60\%$  e até 20% de necrose são consideradas aptas para armazenamento no BB-HCB. Esse controle de qualidade é feito por um patologista capacitado, no momento da coleta do material na sala de congelação do centro cirúrgico.

De acordo com os nossos resultados, a topografia de trato genital masculino (próstata) foi o tipo tumoral que apresentou maior frequência (55%) de exclusão na análise histopatológica. Segundo Ji et al. em comparação com outros tumores sólidos, as amostras tumorais de próstata apresentam propriedades físicas distintas, o que torna desafiador a identificação do câncer apenas pela inspeção visual<sup>92</sup>. É possível encontrar na literatura, alguns trabalhos que descrevem as técnicas utilizadas na coleta e identificação das amostras de próstata armazenadas em Biobanco. Brimo et al. avaliaram 157 lâminas de amostras de próstata, 79 foram classificadas como tecido benigno sem evidência de carcinoma invasivo e 78 apresentaram carcinoma invasivo<sup>93</sup>. As amostras tumorais foram classificadas de acordo com a escala de Gleason, com valores de 6 a 10 que indicam o grau de diferenciação do tumor<sup>93,94</sup>. Das 78 lâminas tumorais, um total de 44% apresentaram pontuação 6 (baixo grau), 32% pontuação 7 (grau intermediário) e 24% pontuação de 8-10 (alto grau)<sup>93,94</sup>. Em outro estudo, Brimo et al. utilizaram o protocolo de imagem espelhada, onde a próstata foi dividida em 4 quadrantes cortados em intervalos de 3-5 mm<sup>93</sup>. Os fragmentos foram alternativamente separados em blocos de parafina e congeladas em gel OCT para armazenamento em Biobanco<sup>93</sup>. Foi observado uma taxa de 94% de concordância entre

blocos de parafina e seus respectivos blocos congelados em amostras com câncer e 98% para diagnósticos benignos<sup>93</sup>. Outro estudo semelhante, observou uma concordância de 93,3% entre as amostras congeladas e às parafinadas, para diagnóstico benigno e maligno, não havendo diferença significativa na porcentagem de câncer e pontuação de Gleason<sup>92</sup>. A utilização dessa metodologia elimina a necessidade da secção da amostra congelada durante a coleta do material, procedimento que muitas vezes demanda tempo do patologista e dificulta a interpretação do diagnóstico, devido aos artefatos de congelamento<sup>93</sup>. Sendo assim, através dos achados obtidos no presente trabalho bem como as informações disponíveis na literatura, torna-se necessário a inclusão de um procedimento específico e validado para a coleta e identificação das amostras de próstata encaminhadas para o BB-HCB.

São escassas as informações sobre quais ferramentas fornecem o melhor diagnóstico molecular em relação a qualidade das amostras<sup>95</sup>. Caixeiro et al. realizaram uma revisão sistemática, a fim de investigar quais as metodologias mais utilizadas na literatura para mensurar a qualidade e integridade de coleções de tecidos<sup>95</sup>. Segundo os autores, todos os estudos encontrados avaliaram a qualidade dos tecidos acessando a integridade do RNA, visto que a molécula de RNA além de ser considerada altamente instável, devido a presença ubíqua de RNases, também pode ter sua qualidade comprometida pelos fatores pré-analíticos<sup>95-97</sup>. Assim como em nosso trabalho, a maioria dos estudos encontrados, avaliaram a integridade do RNA através do valor do RIN, outros, porém em menor quantidade, também utilizaram o valor de integridade do DNA (DIN) para acessar a qualidade das amostras<sup>95</sup>. Tal fato, pode estar associado a informação de que a molécula de DNA é mais estável, comparado ao RNA, além disso a tecnologia de avaliação de integridade do DNA (DIN) é recente, criada no ano de 2015 pela empresa Agilent.

Um componente essencial para o valor de um Biobanco é a capacidade de armazenar amostras de alta qualidade por tempo indeterminado<sup>95,98</sup>. Considera-se que o armazenamento por longos períodos pode interferir no rendimento e qualidade dos ácidos nucleicos, porém não existe um consenso geral a respeito. Segundo Yu & Zhu a maneira ideal de preservação a longo prazo de amostras teciduais, é através da criopreservação em vapor de nitrogênio líquido (-196°C), enquanto que a criopreservação a curto prazo, deve ser feita em freezers -80°C<sup>99</sup>. De acordo com a experiência dos autores, a atividade e duração da vida biológica das macromoléculas diminuem após 3 anos ou mais de armazenamento a -

80°C<sup>99</sup>. Embora a criopreservação a -80°C seja considerada adequada pela maioria dos Biobancos de tecidos, ainda não foi estabelecido a partir de quanto tempo de armazenamento em -80°C a integridade dos ácidos nucléicos é afetada. Bao et al. avaliaram a integridade do RNA (RIN) de 51 amostras de tecido tumoral de cólon, pareadas com seus respectivos tecidos normais, armazenadas em -80°C<sup>100</sup>. As amostras foram agrupadas em diferentes períodos de armazenamento: menor que 15 meses, de 16 à 20 meses, de 21 à 25 meses e de 26 à 40 meses<sup>100</sup>. Os resultados mostraram que os períodos de armazenamento não afetaram negativamente a integridade do RNA, porém foi observado uma variação significativa na frequência de amostras de tecido tumoral (94%) e normal (67%) com valores de RIN  $\geq 7$ <sup>100</sup>. Shah et al. avaliaram a integridade do RNA (RIN) de 30 amostras, sendo 10 de mama, 5 de estômago, 10 de cérebro e 5 de testículo, armazenadas em -80°C no período de até 4,1 anos<sup>101</sup>. Um total de 50% das amostras avaliadas apresentaram valores de RIN  $\geq 6,9$ , 27% RIN  $\geq 5$  e 23% RIN  $< 5$ <sup>101</sup>. Portanto, os pesquisadores concluíram que não houve associação significativa entre a qualidade do RNA e o período de armazenamento das amostras de tecido. Esses dois estudos se basearam em tempos de armazenamento muito inferiores aos utilizados em nosso estudo (até 8 anos), o qual encontrou impacto significativo na integridade do RNA de tecidos tumorais a partir de 4,5 anos de armazenamento. Nosso estudo também se destaca pelo tamanho amostral e variedades de tipos tumorais analisados. Além disso, utilizamos um valor de RIN  $\geq 7$  para classificar amostras de alta qualidade, sendo esse um parâmetro adequado utilizado em estudos de expressão gênica ou sequenciamento, enquanto Shah et al. apesar de utilizarem um *cut off* próximo ao utilizado em nosso trabalho, 50% das amostras armazenadas apresentaram valores de RIN  $\geq 6,9$  no período de até 4,1 anos de armazenamento<sup>101,102</sup>.

Chu et al. avaliaram as características dos ácidos nucléicos extraídos de amostras de tecido uterino, endométrio e ovário, armazenados em -80°C<sup>103</sup>. Foi observado sinais de degradação do RNA a partir de 5 anos de armazenamento, porém a amplificação de fragmentos curtos, através da transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), foi bem sucedida<sup>103</sup>. Jewell et al. analisaram a estabilidade do DNA e RNA de amostras tumorais de mama, cólon, fígado, pulmão, ovário, endométrio e colo de útero, armazenadas em -80°C no período de 0 à  $\geq 12$  meses, utilizando técnicas de eletroforese simples, PCR, transcrição reversa (RT-PCR) e *Northern blot*<sup>104</sup>. Um total de 80% das amostras de DNA apresentaram boa qualidade, em contra partida, apenas 60% das

amostras de RNA apresentaram esse mesmo padrão de qualidade, sugerindo que o DNA em tecido é mais estável que o RNA <sup>104</sup>. Embora esses estudos tenham utilizado outras metodologias para mensurar a integridade e qualidade dos ácidos nucleicos, os resultados obtidos reforçam a ideia de que o tempo de armazenamento é uma variável que afeta a qualidade do DNA e RNA, sendo este mais impactado.

Um estudo recente e inédito, avaliou o impacto da temperatura de armazenamento, na integridade do DNA (DIN) e RNA (RIN) de amostras de tecido tumoral <sup>105</sup>. Foram avaliadas amostras paralelas de câncer de mama, metade armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  e metade armazenada em vapor de nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), com os mesmas condições pré-analíticas <sup>105</sup>. Os pesquisadores observaram que os valores de RIN foram significativamente maiores em amostras armazenadas em vapor de nitrogênio líquido em comparação com amostras armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  <sup>105</sup>. Em contrapartida, não foi encontrado diferença significativa nos valores de DIN em relação ao tipo de armazenamento <sup>105</sup>. Em nosso trabalho, todas as amostras de tecido permaneceram armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , não havendo a possibilidade de fazer a comparação em relação a diferentes temperaturas de armazenamento. Porém, em amostras de *buffy coat*, em que foi possível comparar amostras armazenadas por um período em  $-30^{\circ}\text{C}$  com amostras armazenadas diretamente em  $-80^{\circ}\text{C}$ , foi observado que a temperatura de armazenamento teve maior impacto na integridade do DNA das amostras, do que apenas o tempo de armazenamento. Dessa forma, podemos deduzir que a integridade do RNA e DNA das amostras teciduais avaliadas em nosso trabalho, pode também ter sido afetada não só pelo tempo de armazenamento em si, mas pelo método de armazenamento e suas peculiaridades, visto que muitos dos eventos biofísicos e biológicos que ocorrem durante o congelamento, interferem na estabilidade de qualquer tipo de amostras biológica, independente da sua origem <sup>106</sup>.

De acordo com Jang et al. amostras biológicas de organismos vivos, não devem ser armazenadas em sistema de resfriamento ou congelamento simples, pois levará a formação de cristais (intra e extracelular) durante o congelamento e descongelamento da amostra, ocasionando danos à mesma <sup>107</sup>. Portanto, é recomendado que amostras biológicas sejam armazenadas à baixo da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), onde é reduzido a mobilidade da água, bem como a atividade bioquímica de proteínas que podem levar a degradação das moléculas biológicas <sup>11,98,105</sup>. Segundo estudos disponíveis na literatura, é sugerido que a temperatura de transição vítrea seja à baixo de  $-137^{\circ}\text{C}$ , podendo variar de acordo com a



composição do material, sendo esta uma temperatura ideal para criopreservação adequada de amostras <sup>11,98,105</sup>. Além disso, a qualidade de uma amostra biológica não depende apenas do seu processamento mas também das condições de armazenamento <sup>106</sup>. Germann et al. observaram uma redução da viabilidade de células de amostras de PBMC, ao serem expostas a vários ciclos de flutuação de temperatura <sup>108</sup>. Os pesquisadores destacam a necessidade de pesquisas que determinem o número mínimo de ciclos de flutuação de temperatura que afetam negativamente as amostras biológicas <sup>108</sup>. Sendo assim, a utilização de freezer -80°C, para armazenamento a longo prazo, têm sido cada vez mais questionada, pois além de estar à cima da temperatura de transição vítrea, a flutuação da temperatura é mais presente nesse tipo de sistema, favorecendo ainda mais a formação de cristais. Esses achados corroboram com os resultados apresentados no presente trabalho, em que o armazenamento a longo prazo em -80°C impactou a qualidade do material armazenado. Portanto, o tempo de armazenamento associado às peculiaridades da metodologia de armazenamento a -80°C, podem ter sido os principais fatores que contribuíram com os resultados obtidos em nosso estudo. A formação de cristais bem como a flutuação da temperatura, devido aos diversos ciclos de abertura dos freezer -80°C ao longo dos 9 anos de armazenamento, tanto para guarda como para a retirada de amostras, e problemas mecânicos que ocorreram nos freezers, onde se fez necessária a transferência das amostras para um freezer backup, são variáveis que afetaram a integridade das amostras com maior tempo de armazenamento, visto que essas tiveram um maior período de exposição às variáveis. Outro fator importante que pode justificar a frequência de amostra degradadas, é o descongelamento da amostra que ocorre no momento da execução da técnica de macrodissecção dos tecidos tumorais, onde a amostra sofre um ciclo de descongelamento e congelamento, no momento em que é efetuado o criocorte a -30°C. Conseqüentemente, todos esses fatores apresentados tiveram maior impacto na integridade das moléculas de RNA, visto que esta é mais instável comparado ao DNA.

Em se tratando de amostras de tecido, alguns trabalhos observaram uma correlação significativa entre o tipo de tecido e a integridade do RNA <sup>95,96,109,110</sup>. Acredita-se que fatores como a manipulação cirúrgica e tempo de isquemia, podem ser os principais fatores que interferem na qualidade e integridade da amostra <sup>96</sup>. Um estudo desenvolvido no BB-HCB, teve como objetivo avaliar a integridade do RNA (RIN) de amostras tumorais de tireóide, colorretal, mama, pulmão e estômago, sob a interferência de diferentes tempos de isquemia

<sup>20,60</sup>. Os pesquisadores observaram que o tempo de isquemia de até 30 minutos, foi considerado adequado para manter a integridade do RNA das amostras <sup>20,60</sup>. Além disso, alguns tipos tumorais apresentaram maior degradação do RNA total comparado à outros, indicando que a integridade do RNA é tecido dependente <sup>20,60</sup>. De acordo com esses achados, em 2008 os pesquisadores implementaram um programa de garantia e controle de qualidade no BB-HCB, através do treinamento e capacitação da equipe, com o objetivo de melhorar o controle sobre o tempo de isquemia das amostras coletadas no BB-HCB <sup>20</sup>. Dessa forma, as amostras avaliadas no presente trabalho foram coletadas e armazenadas no período em que o controle de qualidade de coleta foi implantado no BB-HCB. Ao contrário dos trabalhos apresentados, nossos achados não encontraram uma associação significativa entre a integridade do DNA/RNA eo tipo de topografia. Esses resultados podem ser justificados pelo fato de que o tempo de armazenamento em -80°C e suas peculiaridades, teve maior impacto na integridade das amostras, ocultando uma possível associação entre o tipo de tecido e a integridade, frequentemente reportada em literatura. Além disso, a diferença significativa no rendimento do DNA e RNA das amostras tumorais em relação ao tipo de topografia, pode ser atribuída às características intrínsecas de cada tipo tumoral e a variação na porcentagem de células.

Amostras sanguíneas são frequentemente utilizadas em pesquisas, pois além de serem relativamente mais fáceis de serem coletadas, fornecem DNA e RNA de alta qualidade e pureza<sup>111</sup>. O congelamento da camada de leucócitos (*buffy coat*) é o tipo de protocolo mais comumente utilizado para o isolamento do DNA, porém é incerto se o DNA se mantém estável após anos de armazenamento <sup>111</sup>. Com o objetivo de responder a essa questão, Mychaleckyj et al. avaliaram a qualidade e integridade do DNA de 120 amostras de *buffy coat* armazenadas em -80°C por até 9 anos <sup>111</sup>. As amostras foram extraídas utilizando uma plataforma automatizada e submetidas à análise de TaqMan SNP (*single-nucleotide polymorphism*) e genotipagem, com a finalidade de testar a integridade e qualidade das amostras de DNA em análises moleculares de alta qualidade <sup>111</sup>. Os pesquisadores concluíram que as amostras de *buffy coat* podem ser armazenadas por até 9 anos em -80°C e ainda fornecer DNA de alta qualidade e rendimento para serem utilizados em análises moleculares <sup>111</sup>. Esses achados se aproximam dos resultados obtidos no presente trabalho, onde o tempo de armazenamento de até 8 anos, não afetou significativamente a integridade das amostras de DNA de *buffy coat*. É importante destacar que em nosso estudo 171 (43%)

das amostras de *buffy coat* avaliadas, permaneceram armazenadas durante um período de 2 à 7 anos em freezer  $-30^{\circ}\text{C}$  e 229 (57%) amostras de *buffy coat* foram armazenadas diretamente em  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em relação as amostras de PBMC, a maioria (97%) foi submetida a esse mesmo processo de mudança de temperatura de armazenamento e apenas uma amostra foi armazenada diretamente em  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sendo assim, a maior frequência de amostras degradadas e a redução no *cut off* (7,2 anos) no tempo de armazenamento das amostras de PBMC, não está diretamente relacionada a metodologia e sim a maior frequência de amostras submetidas a alterações de temperatura, quando comparada às amostras de *buffy coat*. Em contra partida, a diferença significativa no rendimento do DNA de amostras de *buffy coat* e PBMC, pode estar diretamente associada a metodologia e composição desses materiais, visto que o *buffy coat* é composto por toda a camada de leucócitos, contendo maior quantidade de células, enquanto PBMCs se refere apenas a fração mononuclear isolada dos glóbulos brancos.

A padronização da metodologia de qualificação dos ácidos nucléicos é uma etapa pré-analítica essencial para a obtenção de resultados consistentes e reprodutíveis<sup>112,113</sup>. A utilização de métodos inadequados pode impactar negativamente o desempenho das análises de sequenciamento, produzindo resultados de baixa confiança, desperdício de amostras e aumento de gastos<sup>113</sup>. Simbolo et al. avaliaram a qualidade do DNA de amostras de cultura celular e FFPE (*Formalin-fixed paraffin-embedded*), utilizando duas metodologias diferentes, NanoDrop e Qubit 2.0<sup>112</sup>. Foi observado uma superestimação na concentração do DNA utilizando NanoDrop, quando comparado ao Qubit, mostrando inconsistência entre os dois métodos<sup>112</sup>. Pansare et al. reportaram achados similares, ao quantificar amostras de DNA de mama armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  utilizando esses dois métodos de quantificação<sup>114</sup>. Os pesquisadores sugerem a utilização simultânea dos dois métodos para acessar a qualidade dos ácidos nucléicos, pois embora o Qubit seja mais preciso para acessar o rendimento do material, o mesmo não dispõe de tecnologia para acessar a qualidade do material em termos de pureza, a qual é feita pelo NanoDrop. Apenas a combinação dessas duas tecnologias permite qualificar corretamente os ácidos nucleicos possibilitando a detecção de impurezas e então a possível remoção de amostras preciosas disponíveis em quantidades limitadas antes de entrarem na etapa de construção de biblioteca genômica. Nossos resultados corroboram com esses achados, onde o NanoDrop superestimou os valores de todos os materiais avaliados, comparado ao Qubit. Além disso, o BB-HCB padronizou o uso dessas

duas metodologias para a qualificação adequada do DNA utilizado no sequenciamento completo do exoma.

Estima-se que um terço de todas as linhagens celulares, possuem uma origem diferente da reportada pelo investigador, impactando negativamente a reprodutibilidade do estudo e a capacidade de gerar novas descobertas<sup>115,116</sup>. A identificação incorreta de amostras ou a contaminação cruzada pode surgir durante o processo inicial de coleta ou durante o processamento da amostra através da *pipetagem*, re-identificação ou outros possíveis erros de manipulação<sup>69</sup>. Diferentes métodos de verificação de autenticidade de amostras de DNA são frequentemente utilizados como parte de um sistema de controle de qualidade de amostras<sup>116</sup>. A utilização dos marcadores STR é um tipo de ferramenta eficiente e aplicada frequentemente na medicina forense<sup>69</sup>. Além disso, essa ferramenta também têm sido muito útil na identificação de linhagens celulares e amostras armazenadas em biobancos<sup>69</sup>. Reid & Mintzer recomendam a utilização dos marcadores STR em amostras armazenadas em biobancos devido às peculiaridades da metodologia que inclui acessibilidade, fácil execução e eficiência<sup>71</sup>. Parrish et al ao avaliar a autenticidade das amostras de mais de 6.000 participantes do *eyeGENEBiorepository*, identificou erros laboratoriais em 0,4% das amostras testadas<sup>69</sup>. Nossos achados mostraram uma frequência maior (3%) de inadequação das amostras na análise de STR, comparada com os achados de Parrish et al. Porém, apesar da relevância do assunto, ainda não foi descrito em literatura qual a frequência máxima permitida ou esperada de inadequações de amostras armazenada em Biobanco. Através dos nossos resultados, foi possível observar que amostras armazenadas há mais tempos possuem uma maior frequência de incompatibilidade. Esses resultados podem ser justificados pelo fato de que no período de 2008 à 2010, a identificação dos criotubos era realizada manualmente, aumentando a chance de erros no momento da escrita e prejudicando a correta identificação da amostra, visto que alguns tubos tiveram sua identificação parcialmente apagada devido ao prolongado período de armazenamento em -80°C. Além disso, a utilização dos marcadores de STR como parte de um sistema de controle de qualidade é uma excelente prática adotada pelo BB-HCB, a qual garante o fornecimento de amostras autênticas e de alta qualidade para a utilização em pesquisas genéticas.

## 8 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível evidenciar que a temperatura e as peculiaridades dessa metodologia de criopreservação, foram os principais fatores que afetaram a integridade dos ácidos nucleicos, principalmente o RNA. Além disso, o período de até 8 anos de armazenamento em  $-80^{\circ}\text{C}$  não afetou significativamente a integridade das amostras de DNA de sangue e tecido. Devido a grande coleção de amostras sem prazo definido de armazenamento, torna-se necessário um planejamento para que seja feita uma futura readequação no sistema de congelamento das amostras armazenadas no BB-HCB.

Tendo em conta os resultados obtidos, foi possível traçar um panorama da qualidade dos ácidos nucleicos de tecidos e amostras sanguíneas armazenadas no BB-HCB ao longo de até 9 anos, em relação a diferentes variáveis. Concebemos que estes resultados impactaram diretamente em novas condutas para o BB-HCB.

Durante a evolução do projeto, foi possível realizar prontamente algumas melhorias e adequações que incluem padronização na metodologia de extração automatizada, utilização do *REDCAP* para inclusão de informações relacionadas a qualidade do material e implementação de um controle de qualidade dos tecidos antes de serem armazenados.

A descrição da longa experiência do BB-HCB, bem como os diferentes controles de qualidade utilizados, são importantes ferramentas que podem ser implementadas em outros Biobancos semelhantes, contribuindo para a melhoria da qualidade e gerenciamento das amostras, principalmente a âmbito nacional, visto que essa temática é pouco debatida no Brasil. Por fim, entendemos que este trabalho abre a perspectiva de se avaliar futuramente a qualidade de outros tipos de materiais biológicos armazenados no BB-HCB, visto que o impacto no tempo de armazenamento em  $-80^{\circ}\text{C}$  pode variar de acordo com o tipo de amostra. Os resultados desse trabalho geraram dois artigos, um já publicado (anexo E) e outro que está em processo de submissão.

## REFERÊNCIAS

- 1 Kinkorová J. Biobanks in the era of personalized medicine: objectives, challenges, and innovation: Overview. **EPMA J.** 2015; 7: 4.
- 2 Bozzetti RP. A dimensão informacional e documental dos biobancos: uma análise do UK Biobank. 2016.<http://ridi.ibict.br/handle/123456789/888> (accessed 23 Jan2018).
- 3 Henderson GE, Cadigan RJ, Edwards TP, Conlon I, Nelson AG, Evans JP *et al.* Characterizing biobank organizations in the U.S.: results from a national survey. **Genome Med.** 2013; 5: 3.
- 4 International Society for Biological and Environmental Repositories. Best Practices: Recommendations for repositories Fourth Edition. 2016.<https://www.isber.org/page/BPDownload4ed> (accessed 1 Sep2020).
- 5 De Paoli P. Bio-banking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiol Rev.** 2005; 29: 897–910.
- 6 Diário Oficial União. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde – Resolução CNS Nº 441/2011. 2011.<https://conselho.saude.gov.br/> (accessed 27 Feb2020).
- 7 Mendy M, Caboux E, Lawlor RT, Wright J, Wild and CP. *Common Minimum Technical Standards and Protocols for Biobanks Dedicated to Cancer Research*. <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Technical-Publications/Common-Minimum-Technical-Standards-And-Protocols-For-Biobanks-Dedicated-To-Cancer-Research-2017> (accessed 7 Feb2018).
- 8 Lou JJ, Mirsadraei L, Sanchez DE, Wilson RW, Shabihkhani M, Lucey GM *et al.* A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories. **Clin Biochem.** 2014; 47: 267–273.
- 9 Zhou JH, Sahin AA, Myers JN. Biobanking in genomic medicine. **Arch Pathol Lab Med.** 2015; 139: 812–818.
- 10 Mendy M, Caboux E, Lawlor RT, Wright J, Wild and CP. *Common Minimum Technical Standards and Protocols for Biobanks Dedicated to Cancer Research*. 2018<http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Technical-Publications/Common-Minimum-Technical-Standards-And-Protocols-For-Biobanks-Dedicated-To-Cancer-Research-2017> (accessed 6 Feb2018).
- 11 Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Mareninov S, Lou JJ, Vinters HV *et al.* The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. **Clin Biochem.** 2014; 47: 258–266.
- 12 Wan E, Akana M, Pons J, Chen J, Musone S, Kwok P-Y *et al.* Green technologies for room temperature nucleic acid storage. **Curr Issues Mol Biol.** 2010; 12: 135–142.
- 13 Office of Biorepositories and Biospecimen Research Best Practices. <http://biospecimens.cancer.gov/bestpractices/> (accessed 11 Aug2016).
- 14 Parreira B da CC. Biobanco “AZORBIO”: organização de recursos biológicos para a investigação. 2013.<https://repositorio.uac.pt/handle/10400.3/1653> (accessed 22 Feb2018).

- 15 Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde- Resolução CNS Nº 466/2012. [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466\\_12\\_12\\_2012.html](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html) (accessed 30 Mar2020).
- 16 Marodin G, Salgueiro JB, Motta M da L, Santos LMP. Brazilian guidelines for biorepositories and biobanks of human biological material. **Rev Assoc Medica Bras** 1992. 2013; 59: 72–77.
- 17 Conselho Nacional de Saúde. <http://conselho.saude.gov.br/> (accessed 18 Aug2016).
- 18 Ruíz-Godoy L, Meneses-García A, Suárez-Roa L, Enriquez V, Lechuga-Rojas R, Reyes-Lira E. Organization of a Tumor Bank: The Experience of the National Cancer Institute of Mexico. **Pathobiology**. 2010; 77: 147–154.
- 19 Knoppers BM, Saginur M. The Babel of genetic data terminology. **Nat Biotechnol**. 2005; 23: 925–927.
- 20 Viana CR. *Avaliação do impacto da implantação do controle de qualidade em um banco de amostras teciduais criopreservadas*. 2013. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5144/tde-28052013-105525/> (accessed 2 Sep2016).
- 21 Campos AHJFM, Silva AA, Mota LDDC, Olivieri ER, Prescinoti VC, Patrão D *et al*. The Value of a Tumor Bank in the Development of Cancer Research in Brazil: 13 Years of Experience at the A C Camargo Hospital. **Biopreservation Biobanking**. 2012; 10: 168–173.
- 22 A evolução do modelo Cancer Center no A.C.Camargo. ACCamargo Cancer Cent. 2018. <http://accamargo.org.br/releases/evolucao-do-modelo-cancer-center-no-accamargo> (accessed 24 Jul2020).
- 23 Riegman PHJ, Morente MM, Betsou F, de Blasio P, Geary P, Marble Arch International Working Group on Biobanking for Biomedical Research. Biobanking for better healthcare. **Mol Oncol**. 2008; 2: 213–222.
- 24 Hewitt RE. Biobanking: the foundation of personalized medicine. **Curr Opin Oncol**. 2011; 23: 112–119.
- 25 Martins MFM. Perspetivas públicas em relação aos biobancos médicos e para investigação científica em Portugal. **Public perspectives in relation to medical and research biobanks in Portugal**. 2015. <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/40849> (accessed 22 Feb2018).
- 26 Harris JR, Burton P, Knoppers BM, Lindpaintner K, Bledsoe M, Brookes AJ *et al*. Toward a roadmap in global biobanking for health. **Eur J Hum Genet EJHG**. 2012; 20: 1105–1111.
- 27 Kinkorová J. Biobanks in the era of personalized medicine: objectives, challenges, and innovation: Overview. **EPMA J**. 2015; 7: 4.
- 28 UK Biobank. <http://www.ukbiobank.ac.uk/> (accessed 22 Feb2018).
- 29 Banco Nacional de ADN. <http://www.bancoadn.org/> (accessed 22 Feb2018).
- 30 GenBank Overview. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed 22 Feb2018).

- 31 Goebell PJ, Morente MM. New concepts of biobanks--strategic chance for uro-oncology. **Urol Oncol**. 2010; 28: 449–457.
- 32 Mager SR, Oomen MHA, Morente MM, Ratcliffe C, Knox K, Kerr DJ *et al*. Standard operating procedure for the collection of fresh frozen tissue samples. **Eur J Cancer Oxf Engl** 1990. 2007; 43: 828–834.
- 33 Harati MD, Williams RR, Movassaghi M, Hojat A, Lucey GM, Yong WH. An Introduction to Starting a Biobank. **Methods Mol Biol Clifton NJ**. 2019; 1897: 7–16.
- 34 Thasler WE, Thasler RMK, Schelcher C, Jauch K-W. Biobanking for research in surgery: are surgeons in charge for advancing translational research or mere assistants in biomaterial and data preservation? **Langenbecks Arch Surg**. 2013; 398: 487–499.
- 35 Andry C, Duffy E, Moskaluk CA, McCall S, Roehrl MHA, Remick D. Biobanking-Budgets and the Role of Pathology Biobanks in Precision Medicine. **Acad Pathol**. 2017; 4: 2374289517702924.
- 36 Williams RR, Gupta D, Yong WH. Orientation and Training of New Biobank Personnel. **Methods Mol Biol Clifton NJ**. 2019; 1897: 51–63.
- 37 WEBSITE ISBER. <https://isber.org/page/Learning> (accessed 1 Sep2020).
- 38 Hartman V, Gali B, Dee S, O'Donoghue S, Tarling T, Barnes R *et al*. Canadian Tissue Repository Network Biobank Certification Program: Update and Review of the Program from 2011 to 2018. **Biopreservation Biobanking**. 2019; 17: 530–538.
- 39 Steu S, Baucamp M, von Dach G, Bawohl M, Dettwiler S, Storz M *et al*. A procedure for tissue freezing and processing applicable to both intra-operative frozen section diagnosis and tissue banking in surgical pathology. **Virchows Arch Int J Pathol**. 2008; 452: 305–312.
- 40 Dash RC, Robb JA, Booker DL, Foo W-C, Witte DL, Bry L. Biospecimens and biorepositories for the community pathologist. **Arch Pathol Lab Med**. 2012; 136: 668–678.
- 41 Paskal W, Paskal AM, Dębski T, Gryziak M, Jaworowski J. Aspects of Modern Biobank Activity - Comprehensive Review. **Pathol Oncol Res POR**. 2018; 24: 771–785.
- 42 Khella HWZ, Yousef GM. Translational research: Empowering the role of pathologists and cytopathologists. **Cancer Cytopathol**. 2018; 126: 831–838.
- 43 Talu CK, Toper MH, Şahin Y, Erdoğan İH. Pathology and Biobanking. **Turk Patoloji Derg**. 2020. doi:10.5146/tjpath.2020.01482.
- 44 Bevilacqua G, Bosman F, Dassesse T, Höfler H, Janin A, Langer R *et al*. The role of the pathologist in tissue banking: European Consensus Expert Group Report. **Virchows Arch Int J Pathol**. 2010; 456: 449–454.
- 45 McDonald SA. Principles of Research Tissue Banking and Specimen Evaluation from the Pathologist's Perspective. **Biopreservation Biobanking**. 2010; 8: 197–201.
- 46 Bao W-G, Zhang X, Zhang J-G, Zhou W-J, Bi T-N, Wang J-C *et al*. Biobanking of fresh-frozen human colon tissues: impact of tissue ex-vivo ischemia times and storage periods on RNA quality. **Ann Surg Oncol**. 2013; 20: 1737–1744.



- 47 Mohamadkhani A, Poustchi H. Repository of Human Blood Derivative Biospecimens in Biobank: Technical Implications. **Middle East J Dig Dis**. 2015; 7: 61–68.
- 48 Lee J-E, Kim Y-Y. Impact of Preanalytical Variations in Blood-Derived Biospecimens on Omics Studies: Toward Precision Biobanking? **Omics J Integr Biol**. 2017; 21: 499–508.
- 49 Caboux E, Lallemand C, Ferro G, Hémon B, Mendy M, Biessy C *et al*. Sources of pre-analytical variations in yield of DNA extracted from blood samples: analysis of 50,000 DNA samples in EPIC. **PLoS One**. 2012; 7: e39821.
- 50 Bain BJ. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. **J Clin Pathol**. 1996; 49: 664–666.
- 51 Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, Hannet I, Hulstaert F, Hamilton C *et al*. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. **J Pediatr**. 1992; 120: 216–222.
- 52 Laurson KR, McCann DA, Senchina DS. Age, sex, and ethnicity may modify the influence of obesity on inflammation. **J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res**. 2011; 59: 27–31.
- 53 Abel GA, Hays JT, Decker PA, Croghan GA, Kuter DJ, Rigotti NA. Effects of biochemically confirmed smoking cessation on white blood cell count. **Mayo Clin Proc**. 2005; 80: 1022–1028.
- 54 Van Tiel E, Peeters PHM, Smit HA, Nagelkerke NJD, Van Loon AJ, Grobbee DE *et al*. Quitting smoking may restore hematological characteristics within five years. **Ann Epidemiol**. 2002; 12: 378–388.
- 55 Kirwan JA, Brennan L, Broadhurst D, Fiehn O, Cascante M, Dunn WB *et al*. Preanalytical Processing and Biobanking Procedures of Biological Samples for Metabolomics Research: A White Paper, Community Perspective (for ‘Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group’-The Metabolomics Society Initiative). **Clin Chem**. 2018; 64: 1158–1182.
- 56 Chaigneau C, Cabioch T, Beaumont K, Betsou F. Serum biobank certification and the establishment of quality controls for biological fluids: examples of serum biomarker stability after temperature variation. **Clin Chem Lab Med**. 2007; 45: 1390–1395.
- 57 Jochumsen KM, Tan Q, Dahlgaard J, Kruse TA, Mogensen O. RNA quality and gene expression analysis of ovarian tumor tissue undergoing repeated thaw-freezing. **Exp Mol Pathol**. 2007; 82: 95–102.
- 58 Mohamadkhani A, Poustchi H. Repository of Human Blood Derivative Biospecimens in Biobank: Technical Implications. **Middle East J Dig Dis**. 2015; 7: 61–68.
- 59 Sherwood KR, Head MW, Walker R, Smith C, Ironside JW, Fazakerley JK. RNA integrity in post mortem human variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) and control brain tissue. **Neuropathol Appl Neurobiol**. 2011; 37: 633–642.
- 60 Viana CR, Neto CS, Kerr LM, Palmero EI, Marques MMC, Colaiacovo T *et al*. The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples. **Cell Tissue Bank**. 2013; 14: 167–173.
- 61 Hong SH, Baek HA, Jang KY, Chung MJ, Moon WS, Kang MJ *et al*. Effects of delay in the snap freezing of colorectal cancer tissues on the quality of DNA and RNA. **J Korean Soc Coloproctology**. 2010; 26: 316–323.

- 62 Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol.** 2006; 7: 3.
- 63 Tuck MK, Chan DW, Chia D, Godwin AK, Grizzle WE, Krueger KE *et al.* Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. **J Proteome Res.** 2009; 8: 113–117.
- 64 PAXgene Blood RNA Tube (IVD) | PreAnalytiX. 2016.<http://www.preanalytix.com/products/blood/RNA/paxgene-blood-rna-tube?suggest=1> (accessed 10 Aug2016).
- 65 Duale N, Brunborg G, Rønningen KS, Briese T, Aarem J, Aas KK *et al.* Human blood RNA stabilization in samples collected and transported for a large biobank. **BMC Res Notes.** 2012; 5: 510.
- 66 pubmeddev, al TP *et al.* Blood sampling and hemolysis affect concentration of plasma metabolites. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23365396> (accessed 6 May2020).
- 67 Guidelines for Human Biobanks and Genetic Research Databases (HBGRDs) - OECD. <http://www.oecd.org/sti/biotech/guidelinesforhumanbiobanksandgeneticresearchdatabaseshbgrds.htm> (accessed 7 Feb2018).
- 68 Dirks WG, Drexler HG. Online verification of human cell line identity by STR DNA typing. **Methods Mol Biol Clifton NJ.** 2011; 731: 45–55.
- 69 Parrish RS, Garafalo AV, Ndifor V, Goetz KE, Reeves MJ, Yim A *et al.* Sample Confirmation Testing: A Short Tandem Repeat-Based Quality Assurance and Quality Control Procedure for the eyeGENE Biorepository. **Biopreservation Biobanking.** 2016; 14: 149–155.
- 70 Dirks WG, Drexler HG. Online verification of human cell line identity by STR DNA typing. **Methods Mol Biol Clifton NJ.** 2011; 731: 45–55.
- 71 Reid Y, Mintzer J. The Current State of Cell Contamination and Authentication—And What It Means for Biobanks. **Biopreservation Biobanking.** 2012; 10: 236–238.
- 72 Cardoso S, Valverde L, Odriozola A, Elcoroaristizabal X, de Pancorbo MM. Quality standards in Biobanking: authentication by genetic profiling of blood spots from donor’s original sample. **Eur J Hum Genet EJHG.** 2010; 18: 848–851.
- 73 Gaye A, Peakman T, Tobin MD, Burton PR. Understanding the impact of pre-analytic variation in haematological and clinical chemistry analytes on the power of association studies. **Int J Epidemiol.** 2014; 43: 1633–1644.
- 74 Betsou F, Bilbao R, Case J, Chuaqui R, Clements JA, De Souza Y *et al.* Standard PReanalytical Code version 3.0. **Biopreservation Biobanking.** 2018. doi:10.1089/bio.2017.0109.
- 75 NanoDrop Products - Spectrophotometers and Fluorospectrometers - [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com/). <http://www.nanodrop.com/> (accessed 15 Aug2016).
- 76 Desjardins P, Conklin D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **J Vis Exp JoVE.** 2010. doi:10.3791/2565.

- 77 Kim J-H, Jin H-O, Park J-A, Chang YH, Hong YJ, Lee JK. Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood. **SpringerPlus**. 2014; 3: 76.
- 78 Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **BioTechniques**. 1997; 22: 474–476, 478–481.
- 79 Nguyen T, Kwak S, Karpowicz SJ. Re-use of commercial microfluidics chips for DNA, RNA, and protein electrophoresis. **BioTechniques**. 2014; 57: 267–271.
- 80 Pitt K, Betsou F. The ISBER Best Practices Self Assessment Tool (SAT): Lessons learned after three years of collecting responses. **Biopreservation Biobanking**. 2012; 10: 548–549.
- 81 Calleros-Basilio L, Cortés MA, García-Jerez A, Luengo-Rodríguez A, Orozco-Agudo A, Valdivielso JM *et al*. Quality Assurance of Samples and Processes in the Spanish Renal Research Network (REDinREN) Biobank. **Biopreservation Biobanking**. 2016; 14: 499–510.
- 82 Impact of RNA degradation on gene expression profiling. - PubMed - NCBI. 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=impact+of+RNA+degradation+on+gene+expression+profiling++Opitz> (accessed 22 Jan2018).
- 83 História - Hospital de Câncer de Barretos. <https://www.hcancerbarretos.com.br/institucional/historia> (accessed 3 Mar2020).
- 84 Tissue Source Site Codes | NCI Genomic Data Commons. <https://gdc.cancer.gov/resources-tcga-users/tcga-code-tables/tissue-source-site-codes> (accessed 8 Apr2020).
- 85 Cancer Genome Atlas Research Network, Albert Einstein College of Medicine, Analytical Biological Services, Barretos Cancer Hospital, Baylor College of Medicine, Beckman Research Institute of City of Hope *et al*. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nature**. 2017; 543: 378–384.
- 86 Gao Q, Liang W-W, Foltz SM, Mutharasu G, Jayasinghe RG, Cao S *et al*. Driver Fusions and Their Implications in the Development and Treatment of Human Cancers. **Cell Rep**. 2018; 23: 227–238.e3.
- 87 Wang Z, Yang B, Zhang M, Guo W, Wu Z, Wang Y *et al*. lncRNA Epigenetic Landscape Analysis Identifies EPIC1 as an Oncogenic lncRNA that Interacts with MYC and Promotes Cell-Cycle Progression in Cancer. **Cancer Cell**. 2018; 33: 706–720.e9.
- 88 Radovich M, Pickering CR, Felau I, Ha G, Zhang H, Jo H *et al*. The Integrated Genomic Landscape of Thymic Epithelial Tumors. **Cancer Cell**. 2018; 33: 244–258.e10.
- 89 Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, Poisson LM, Lazar AJ, Cherniack AD *et al*. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. **Cell**. 2018; 173: 400–416.e11.
- 90 Brazil - Melanoma | . <https://icgc.org/icgc/cgp/71/299/1001986> (accessed 8 Apr2020).
- 91 Dirks WG, Faehnrich S, Estella IAJ, Drexler HG. Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. **ALTEX**. 2005; 22: 103–109.

- 92 Ji C, Wang W, Lu Q, Fu Y, Jiang H, Chen W *et al.* A New Technique in Fresh Prostate Cancer Tissue Biobanking Based on MRI-Transrectal Ultrasound Fusion Biopsy. **Urology**. 2019; 134: 186–191.
- 93 Brimo F, Sircar K, Chevalier S, Saad F, Lacombe L, Têtu B *et al.* Banking of fresh-frozen prostate tissue using the alternate mirror image protocol: methods, validation, and impact on the pathological prognostic parameters in radical prostatectomy. **Cell Tissue Bank**. 2012; 13: 631–638.
- 94 Epstein JI, Allsbrook WCJ, Amin MB, Egevad LL, Committee and the IG. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **Am J Surg Pathol**. 2005; 29: 1228–1242.
- 95 Caixeiro NJ, Lai K, Lee CS. Quality assessment and preservation of RNA from biobank tissue specimens: a systematic review. **J Clin Pathol**. 2016; 69: 260–265.
- 96 Ma Y, Dai H, Kong X. Impact of warm ischemia on gene expression analysis in surgically removed biosamples. **Anal Biochem**. 2012; 423: 229–235.
- 97 Micke P, Ohshima M, Tahmasebpour S, Ren Z-P, Ostman A, Pontén F *et al.* Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. **Lab Investig J Tech Methods Pathol**. 2006; 86: 202–211.
- 98 Kelly R, Albert M, de Ladurantaye M, Moore M, Dokun O, Bartlett JMS. RNA and DNA Integrity Remain Stable in Frozen Tissue After Long-Term Storage at Cryogenic Temperatures: A Report from the Ontario Tumour Bank. **Biopreservation Biobanking**. 2019; 17: 282–287.
- 99 Yu Y-Y, Zhu Z-G. Significance of biological resource collection and tumor tissue bank creation. **World J Gastrointest Oncol**. 2010; 2: 5–8.
- 100 Bao W-G, Zhang X, Zhang J-G, Zhou W-J, Bi T-N, Wang J-C *et al.* Biobanking of fresh-frozen human colon tissues: impact of tissue ex-vivo ischemia times and storage periods on RNA quality. **Ann Surg Oncol**. 2013; 20: 1737–1744.
- 101 Shah SG, Rashid M, Verma T, Ludbe M, Khade B, Gera PB *et al.* Establishing a correlation between RIN and A260/280 along with the multivariate evaluation of factors affecting the quality of RNA in cryopreserved cancer bio-specimen. **Cell Tissue Bank**. 2019; 20: 489–499.
- 102 Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E *et al.* Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nucleic Acids Res**. 2005; 33: e56–e56.
- 103 Chu T-Y, Hwang K-S, Yu M-H, Lee H-S, Lai H-C, Liu J-Y. A research-based tumor tissue bank of gynecologic oncology: characteristics of nucleic acids extracted from normal and tumor tissues from different sites. **Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc**. 2002; 12: 171–176.
- 104 Jewell SD, Srinivasan M, McCart LM, Williams N, Grizzle WH, LiVolsi V *et al.* Analysis of the molecular quality of human tissues: An experience from the Cooperative Human Tissue Network. **Am J Clin Pathol**. 2002; 118: 733–741.
- 105 Babel M, Mamilos A, Seitz S, Niedermair T, Weber F, Anzeneder T *et al.* Compared DNA and RNA quality of breast cancer biobanking samples after long-term storage protocols in - 80 °C and liquid nitrogen. **Sci Rep**. 2020; 10: 14404.

- 106 Hubel A, Spindler R, Skubitz APN. Storage of human biospecimens: selection of the optimal storage temperature. **Biopreservation Biobanking**. 2014; 12: 165–175.
- 107 Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US *et al*. Cryopreservation and its clinical applications. **Integr Med Res**. 2017; 6: 12–18.
- 108 Germann A, Oh Y-J, Schmidt T, Schön U, Zimmermann H, von Briesen H. Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. **Cryobiology**. 2013; 67: 193–200.
- 109 Kap M, Oomen M, Arshad S, de Jong B, Riegman P. Fit for purpose frozen tissue collections by RNA integrity number-based quality control assurance at the Erasmus MC tissue bank. **Biopreservation Biobanking**. 2014; 12: 81–90.
- 110 Andreasson A, Kiss NB, Juhlin CC, Höög A. Long-term storage of endocrine tissues at - 80°C does not adversely affect RNA quality or overall histomorphology. **Biopreservation Biobanking**. 2013; 11: 366–370.
- 111 Mychaleckyj JC, Farber EA, Chmielewski J, Artale J, Light LS, Bowden DW *et al*. Buffy coat specimens remain viable as a DNA source for highly multiplexed genome-wide genetic tests after long term storage. **J Transl Med**. 2011; 9: 91.
- 112 Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A, Malpeli G *et al*. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. **PLoS One**. 2013; 8: e62692.
- 113 Haque KA, Pfeiffer RM, Beerman MB, Struewing JP, Chanock SJ, Bergen AW. Performance of high-throughput DNA quantification methods. **BMC Biotechnol**. 2003; 3: 20.
- 114 Pansare K, Pillai D, Parab S, Singh SR, Kannan S, Ludbe M *et al*. Quality assessment of cryopreserved biospecimens reveals presence of intact biomolecules. **J Biophotonics**. 2019; 12: e201960048.
- 115 Boonstra JJ, van Marion R, Beer DG, Lin L, Chaves P, Ribeiro C *et al*. Verification and unmasking of widely used human esophageal adenocarcinoma cell lines. **J Natl Cancer Inst**. 2010; 102: 271–274.
- 116 Kofanova OA, Mathieson W, Thomas GA, Betsou F. DNA fingerprinting: a quality control case study for human biospecimen authentication. **Biopreservation Biobanking**. 2014; 12: 151–153.

## Anexos

**Anexo A** – TCLE do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos, versão abril de 2014, aplicado em pacientes com diagnóstico ou suspeita de câncer.

Versão 1.4 (abril/2014)



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GUARDA E UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO OU SUSPEITA DE CÂNCER

Os pesquisadores deste Hospital, em conjunto com o Instituto de Ensino e Pesquisa da Fundação Pio XII, desenvolvem pesquisas para conhecer melhor os mecanismos do câncer e, portanto, buscar novas possibilidades de prevenção, diagnóstico e tratamento. Para obter maior conhecimento sobre o câncer estamos criando um “Banco de Amostras de Material Biológico” (também chamado de BIOBANCO) de indivíduos com e sem câncer. Biobanco é um local onde se pode armazenar amostras de material biológico. “Amostra de material biológico” é qualquer material que possa ser extraído do corpo humano para análise, como, por exemplo, tumor, sangue, saliva, urina, secreção, entre outros. Assim, o “Banco de Amostras de Material Biológico” do Hospital de Câncer de Barretos armazena os materiais biológicos removidos do corpo humano e que servem para pesquisas científicas no futuro, principalmente envolvendo genes. Genes são pequenas estruturas localizadas dentro de todas as células do corpo e que herdamos dos nossos pais. Eles definem todas as características físicas que temos (como por exemplo, a cor dos olhos e do cabelo, a altura, etc) e, quando alterados, podem provocar diversas doenças, como por exemplo, o câncer. As alterações que os genes podem sofrer antes do nascimento ou durante a vida e que se relacionam a doenças são chamadas de “alterações genéticas”.

No seu caso, você tem diagnóstico ou suspeita de câncer e está sendo convidado(a) a participar do BIOBANCO cedendo material biológico para o Hospital de Câncer de Barretos. Se concordar e autorizar, pedimos que ceda ao BIOBANCO uma pequena parte do seu tumor e uma pequena quantidade de sangue (cerca de 20 ml ou o correspondente mais ou menos a duas colheres de sopa). Poderá ser solicitado a você que ceda outros tipos de materiais biológicos que não sejam nem tumor e nem sangue, como por exemplo, saliva, urina, secreção, entre outros, a depender do tipo do seu tumor, com finalidade de pesquisa científica. Você não é obrigado ceder qualquer material biológico e também pode optar por ceder, dentre os materiais que forem pedidos, apenas os que você quiser e achar mais conveniente.

A sua participação neste BIOBANCO é voluntária e não é obrigatória. Você pode aceitar participar do BIOBANCO e depois desistir a qualquer momento. Isto não tirará nenhum direito do seu tratamento e assistência neste hospital. Você também poderá pedir a qualquer momento que as suas informações sejam excluídas completamente do BIOBANCO e que elas não sejam usadas para mais nada.

O seu material será comparado futuramente com o de outros indivíduos em estudos sobre as causas, tratamentos e prevenção do câncer. Ao comparar suas amostras com o de outros indivíduos, alterações genéticas que afetam o surgimento e desenvolvimento do câncer poderão ser encontradas. Os resultados dessas pesquisas poderão ser armazenados em bancos de dados públicos

---

Rubricas Participante de pesquisa / Responsável:  
Testemunha imparcial:  
Aplicador do TCLE:

Versão 1.4 (abril/2014)



que são supervisionados por autoridade competente. Nestes bancos de dados públicos serão colocadas informações do seu material biológico, mas nenhuma informação que possa lhe identificar será fornecida (como por exemplo, nome, endereço, etc.). Os pesquisadores do mundo todo poderão ter acesso aos dados do seu material biológico, mas não saberão quem você é.

A obtenção do material biológico não implicará em riscos adicionais ao seu diagnóstico, tratamento e chance de cura. Também não acarretará atraso para o seu diagnóstico e tratamento. O material cedido será armazenado de forma adequada no Hospital de Câncer de Barretos por período indeterminado.

Outras informações a seu respeito poderão ser obtidas a partir do seu prontuário médico. Mas nenhuma informação pessoal que permita sua identificação (como nome, endereço, etc.) será disponibilizada para acesso público. O Hospital de Câncer de Barretos tomará todas as medidas para manter suas informações pessoais em sigilo. Durante todo o estudo e mesmo depois que terminar, quando os resultados forem publicados em revistas científicas ou apresentados em congressos ou reuniões, a sua identidade será guardada em segredo, não sendo revelada qualquer informação a seu respeito que possa identificar você publicamente. Algumas pessoas do BIOBANCO e do Comitê de Ética em Pesquisa poderão ter acesso direto as suas informações pessoais. Mesmo assim, a sua privacidade e a confidencialidade dos dados serão preservadas.

Você também terá direito ao resultado dos exames realizados com o seu material biológico. Mas também existe a possibilidade que a sua amostra não seja utilizada em estudo algum. Resultados dessas pesquisas não serão colocados em nenhum prontuário médico ou relatório para planos de saúde. Da mesma forma não terão nenhuma relação com o tratamento que está sendo oferecido a você.

Apesar do seu material biológico ficar guardado no Hospital de Câncer de Barretos, ele pertence a você. A qualquer momento, durante ou após este estudo, você poderá retirar este material do hospital ou pedir que seja descartado. O material também poderá ser descartado se o mesmo perder qualidade (e, por isso, não puder mais ser usado em qualquer outro estudo) ou por iniciativa do Hospital de Câncer de Barretos. Se for por iniciativa do hospital, o seu material será oferecido a, no mínimo, duas instituições de pesquisa que também possuam BIOBANCO. Se elas não aceitarem o material e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos aprovar, o seu material será descartado conforme o Plano de Gerenciamento de Resíduos do Hospital. Os materiais que foram utilizados inicialmente no diagnóstico da sua doença não serão oferecidos para outras instituições e ficarão arquivados no Hospital de Câncer de Barretos caso haja necessidade de uma nova rodada de exames. Em caso de perda ou destruição do seu material biológico, encerramento do BIOBANCO do Hospital de Câncer de Barretos e transferência do material para outro BIOBANCO, você será comunicado pessoalmente ou por escrito (carta registrada com aviso de recebimento). Se você não concordar que o seu material possa ser destruído ou transferido para outro BIOBANCO, você terá um

---

Rubricas      Participante de pesquisa / Responsável:  
Testemunha imparcial:  
Aplicador do TCLE:

Versão 1.4 (abril/2014)



prazo de 30 dias para se manifestar por escrito após o recebimento da comunicação. Se não for possível lhe encontrar, após retorno do aviso de recebimento, confirmando a sua não localização, informaremos isto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos.

As pesquisas que utilizarem o seu material serão previamente analisadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, ou quando for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. O seu material será utilizado somente se este comitê aprovar o estudo.

O material biológico cedido não terá custos para você. Todos os custos relacionados com o BIOBANCO serão pagos pelo Hospital de Câncer de Barretos. Também não haverá qualquer tipo de pagamento devido à sua participação (mesmo que haja patentes ou descobertas). Ao assinar este Termo de Consentimento, você não perderá nenhum direito, inclusive o de indenização por dano a sua saúde se isto acontecer em virtude de ceder o material.

Em caso de dúvidas você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos pelo telefone (17) 3321-0347 ou (17) 3321-6600, ramal 6647, de 2ª a 6ª feira, das 8:00h às 17:00h; por meio eletrônico (email: [cep@hancerbarretos.com.br](mailto:cep@hancerbarretos.com.br)); ou ainda por carta (Rua Antenor Duarte Vilela, 1331 – Cep: 14784-400 – Barretos, SP). O Comitê de Ética em Pesquisa é responsável pela análise da parte ética dos estudos científicos e que aprova ou não a sua realização no hospital. Todos os estudos do Hospital de Câncer de Barretos precisam desta aprovação para serem realizados. Se você quiser entrar em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa ou com o responsável pelo BIOBANCO, utilize as formas de contato que foram descritas acima.

#### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

Eu, \_\_\_\_\_,  
li e entendi este termo de consentimento. Eu concordo em ceder material biológico para este BIOBANCO que será coletado por pessoal especialmente treinado para este fim e tenho pleno conhecimento do tipo de material biológico que cederei. Entendi que o material será adequadamente armazenado e utilizado futuramente e de forma anônima em pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos. Eu entendi a informação fornecida por este documento e eu tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma delas ficará comigo.

- Embora tenha autorizado a utilização do material biológico para pesquisa, manifesto os seguintes desejos:

---

Rubricas      Participante de pesquisa / Responsável:  
                          Testemunha imparcial:  
                          Aplicador do TCLE:



Versão 1.4 (abril/2014)



**Concordo que utilizem meu material biológico em futuras pesquisas devidamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (assinale apenas uma das duas alternativas abaixo):**

- Sem necessidade de um novo consentimento para cada pesquisa.
- Com necessidade de um novo consentimento para cada pesquisa. Neste caso gostaria de ser comunicado pessoalmente ou através de carta registrada com aviso de recebimento.

**2. Autorizo que os resultados dessa pesquisa, incluindo informações genéticas, possam ser armazenados em bancos de dados públicos, desde que a minha privacidade seja preservada:**

- SIM  NÃO

**3. Apesar de minha amostra ser utilizada de forma anônima, os coordenadores do BIOBANCO têm acesso à minha identidade. Dessa forma, eu gostaria de ser comunicado pessoalmente ou por escrito (carta registrada com aviso de recebimento) caso, durante a pesquisa, venha a ser descoberta alguma informação de relevância no meu risco ou de meus familiares de desenvolver câncer ou outras doenças genéticas.**

- SIM  NÃO

Caso você tenha respondido SIM na última questão, responda abaixo:

No caso da minha falta (falecimento), ..... (escrever Sim ou Não), autorizo meu familiar, abaixo indicado, a ter acesso a esta informação. O mesmo será informado pessoalmente ou por escrito (carta registrada com aviso de recebimento), convidando-o para comparecer ao Hospital.

Familiar indicado para receber informações	
_____ / _____	
(Nome do familiar)	(grau de parentesco)
Endereço: _____	
Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____	

Rubricas Participante de pesquisa / Responsável:  
 Testemunha imparcial:  
 Aplicador do TCLE:

Versão 1.4 (abril/2014)



_____ Nome do(a) paciente / Representante legal	_____ Assinatura	_____ Data
_____ Nome do(a) responsável pela aplicação do termo de consentimento	_____ Assinatura	_____ Data
_____ Nome da(a) testemunha, se for o caso	_____ Assinatura	_____ Data

---

Rubricas      Participante de pesquisa / Responsável:  
Testemunha imparcial:  
Aplicador do TCLE:

**Anexo B – TCLE do Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos, versão abril de 2014, aplicado em indivíduos sem diagnóstico de câncer.**

Versão 1.4 (Abril/ 2014)



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA  
GUARDA E UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO DE INDIVÍDUOS SEM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER**

Os pesquisadores deste Hospital, em conjunto com o Instituto de Ensino e Pesquisa da Fundação Pio XII, desenvolvem pesquisas para conhecer melhor os mecanismos do câncer e, portanto, buscar novas possibilidades de prevenção, diagnóstico e tratamento. Para obter maior conhecimento sobre o câncer estamos criando um “Banco de Amostras de Material Biológico” (também chamado de BIOBANCO) de indivíduos com e sem câncer. Biobanco é um local onde se pode armazenar amostras de material biológico. “Amostra de material biológico” é qualquer material que possa ser extraído do corpo humano para análise, como, por exemplo, tumor, sangue, saliva, urina, secreção, entre outros. Assim, o “Banco de Amostras de Material Biológico” do Hospital de Câncer de Barretos armazena os materiais biológicos removidos do corpo humano e que servem para pesquisas científicas no futuro, principalmente envolvendo genes. Genes são pequenas estruturas localizadas dentro de todas as células do corpo e que herdamos dos nossos pais. Eles definem todas as características físicas que temos (como por exemplo, a cor dos olhos e do cabelo, a altura, etc) e, quando alterados, podem provocar diversas doenças, como por exemplo, o câncer. As alterações que os genes podem sofrer antes do nascimento ou durante a vida e que se relacionam a doenças são chamadas de “alterações genéticas”.

No seu caso, você não tem diagnóstico de câncer, mas está sendo convidado(a) a participar do BIOBANCO cedendo material biológico para o Hospital de Câncer de Barretos. Se concordar e autorizar, pedimos que ceda ao BIOBANCO uma pequena quantidade de sangue (cerca de 20 ml ou o correspondente mais ou menos a duas colheres de sopa). Poderá ser solicitado a você que ceda outros tipos de materiais biológicos que não sejam nem tumor e nem sangue, como por exemplo, saliva, urina, secreção, entre outros, com finalidade de pesquisa científica. Você não é obrigado ceder qualquer material biológico e também pode optar por ceder, dentre os materiais que forem pedidos, apenas os que você quiser e achar mais conveniente.

A sua participação neste BIOBANCO é voluntária e não é obrigatória. Você pode aceitar participar do BIOBANCO e depois desistir a qualquer momento. Isto não tirará nenhum direito do seu tratamento e assistência neste hospital. Você também poderá pedir a qualquer momento que as suas informações sejam excluídas completamente do BIOBANCO e que elas não sejam usadas para mais nada.

O seu material será comparado futuramente com o de indivíduos que tenham câncer em estudos sobre as causas, tratamentos e prevenção desta doença. Ao comparar suas amostras com as de indivíduos afetados por câncer, alterações genéticas que afetam o surgimento e desenvolvimento da doença poderão ser encontradas. Os resultados dessas pesquisas poderão ser armazenados em bancos de dados públicos que são supervisionados por autoridade competente. Nestes bancos de dados públicos serão colocadas informações do seu material biológico, mas nenhuma informação

---

Rubricas Participante de pesquisa / Responsável:  
Testemunha imparcial:  
Aplicador do TCLE:

Versão 1.4 (Abril/ 2014)



que possa lhe identificar será fornecida (como por exemplo, nome, endereço, etc.). Os pesquisadores do mundo todo poderão ter acesso aos dados do seu material biológico, mas não saberão quem você é.

A obtenção do material biológico não implicará em riscos adicionais a sua saúde. O material cedido será armazenado de forma adequada no Hospital de Câncer de Barretos por período indeterminado.

Outras informações a seu respeito poderão ser obtidas a partir de você. Mas nenhuma informação pessoal que permita sua identificação (como nome, endereço, etc.) será disponibilizada para acesso público. O Hospital de Câncer de Barretos tomará todas as medidas para manter suas informações pessoais em sigilo. Durante todo o estudo e mesmo depois que terminar, quando os resultados forem publicados em revistas científicas ou apresentados em congressos ou reuniões, a sua identidade será guardada em segredo, não sendo revelada qualquer informação a seu respeito que possa identificar você publicamente. Algumas pessoas do BIOBANCO e do Comitê de Ética em Pesquisa poderão ter acesso direto as suas informações pessoais. Mesmo assim, a sua privacidade e a confidencialidade dos dados serão preservadas.

Você também terá direito ao resultado dos exames realizados com o seu material biológico. Mas também existe a possibilidade que a sua amostra não seja utilizada em estudo algum.

Caso você concorde em ceder algum material biológico para o BIOBANCO do Hospital de Câncer de Barretos, é importante que saiba que seu material será catalogado como proveniente de indivíduo não portador de câncer. Portanto, de tempos em tempos poderemos entrar em contato com você (por telefone, carta, etc.) ou você poderá entrar em contato conosco caso, algum dia, receba o diagnóstico de câncer.

Apesar do seu material biológico ficar guardado no Hospital de Câncer de Barretos, ele pertence a você. A qualquer momento, durante ou após este estudo, você poderá retirar este material do hospital ou pedir que seja descartado. O material também poderá ser descartado se o mesmo perder qualidade (e, por isso, não puder mais ser usado em qualquer outro estudo) ou por iniciativa do Hospital de Câncer de Barretos. Se for por iniciativa do hospital, o seu material será oferecido a, no mínimo, duas instituições de pesquisa que também possuam BIOBANCO. Se elas não aceitarem o material e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos aprovar, o seu material será descartado conforme o Plano de Gerenciamento de Resíduos do Hospital. Em caso de perda ou destruição do seu material biológico, encerramento do BIOBANCO do Hospital de Câncer de Barretos e transferência do material para outro BIOBANCO, você será comunicado pessoalmente ou por escrito (carta registrada com aviso de recebimento). Se você não concordar que o seu material possa ser destruído ou transferido para outro BIOBANCO, você terá um prazo de 30 dias para se manifestar por escrito após o recebimento da comunicação. Se não for possível lhe encontrar, após retorno do Aviso de Recebimento, confirmando a sua não localização, informaremos isto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos.

---

Rubricas                      Participante de pesquisa / Responsável:  
    Testemunha imparcial:  
    Aplicador do TCLE:

Versão 1.4 (Abril/ 2014)



As pesquisas que vierem a utilizar o seu material serão previamente analisadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, ou quando for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. O seu material será utilizado somente se este comitê aprovar o estudo.

O material biológico cedido não terá custos para você. Todos os custos relacionados com o BIOBANCO serão pagos pelo Hospital de Câncer de Barretos. Também não haverá qualquer tipo de pagamento devido à sua participação (mesmo que haja patentes ou descobertas). Ao assinar este Termo de Consentimento, você não perderá nenhum direito, inclusive o de indenização por dano a sua saúde se isto acontecer em virtude de ceder o material.

Em caso de dúvidas você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos pelo telefone (17) 3321-0347 ou (17) 3321-6600, ramal 6647, de 2ª a 6ª feira, das 8:00h às 17:00h; por meio eletrônico (email: [cep@hancerbarretos.com.br](mailto:cep@hancerbarretos.com.br)); ou ainda por carta (Rua Antenor Duarte Vilela, 1331 – Cep: 14784-400 – Barretos, SP). O Comitê de Ética em Pesquisa é responsável pela análise da parte ética dos estudos científicos e que aprova ou não a sua realização no hospital. Todos os estudos do Hospital de Câncer de Barretos precisam desta aprovação para serem realizados. Se você quiser entrar em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa ou com o responsável pelo BIOBANCO, utilize as formas de contato que foram descritas acima.

#### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

Eu, \_\_\_\_\_,  
li e entendi este termo de consentimento. Eu concordo em ceder material biológico para este BIOBANCO que será coletado por pessoal especialmente treinado para este fim e tenho pleno conhecimento do tipo de material que cederei. Entendi que o material será adequadamente armazenado e utilizado futuramente e de forma anônima em pesquisa aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos. Eu entendi a informação fornecida por este documento e eu tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma delas ficará comigo.

Embora tenha autorizado a utilização do material biológico para pesquisa, manifesto os seguintes desejos:

---

Rubricas Participante de pesquisa / Responsável:  
Testemunha imparcial:  
Aplicador do TCLE:

Versão 1.4 (Abril/ 2014)



**1. Concordo que utilizem meu material biológico em futuras pesquisas devidamente aprovadas pela Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (assinale apenas uma das duas alternativas abaixo):**

- Sem necessidade de um novo consentimento para cada pesquisa.
- Com necessidade de um novo consentimento para cada pesquisa. Neste caso gostaria de ser comunicado pessoalmente ou através de carta registrada com aviso de recebimento.

**2. Autorizo que os resultados dessa pesquisa, incluindo informações genéticas, possam ser armazenados em bancos de dados públicos, desde que a minha privacidade seja preservada:**

- SIM  NÃO

**3. Apesar de minha amostra ser utilizada de forma anônima, os Coordenadores do BIOBANCO têm acesso à minha identidade. Dessa forma, eu gostaria de ser comunicado pessoalmente ou por escrito (carta registrada com aviso de recebimento) caso, durante a pesquisa, venha a ser descoberta alguma informação de relevância no meu risco ou de meus familiares de desenvolver câncer ou outras doenças genéticas.**

- SIM  NÃO

Caso você tenha respondido SIM na última questão, responda abaixo:

No caso da minha falta (falecimento), ..... (escrever Sim ou Não), autorizo meu familiar, abaixo indicado, a ter acesso a esta informação. O mesmo será informado pessoalmente ou por escrito (carta registrada com aviso de recebimento), com aviso de recebimento, convidando-o para comparecer ao Hospital.

Familiar indicado para receber informações	
_____ / _____	
(Nome do familiar)	( grau de parentesco)
Endereço: _____	
Cidade: _____	Estado: _____ CEP: _____

Rubricas Participante de pesquisa / Responsável:  
 Testemunha imparcial:  
 Aplicador do TCLE:

Versão 1.4 (Abril/ 2014)



_____ Nome do(a) paciente / Representante legal	_____ Assinatura	_____ Data
--	---------------------	---------------

_____ Nome do(a) responsável pela aplicação do termo de consentimento	_____ Assinatura	_____ Data
--	---------------------	---------------

_____ Nome da(a) testemunha, se for o caso	_____ Assinatura	_____ Data
---	---------------------	---------------

---

Rubricas      Participante de pesquisa / Responsável:  
Testemunha imparcial:  
Aplicador do TCLE:

**Anexo C- Fichas de coleta RedCap.**

Confidential

90 - Marcia Chiquetelli - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS CRIOPRESERVADAS: HISTÓRIA DO BIOBANCO-HCB  
Page 1**Identificacao**

ID NAP

**Identificacao**

Codigo de identificacao do Projeto

Nº ID no Estudo

Iniciais do paciente

RH

( \_ - \_ \_ \_ \_ \_ Manter o padrao utilizando os 7  
digitos)

Ano da coleta

Topografia

(Digitar utilizando LETRA MAIUSCULA SEM  
ABREVIÇÕES OU CARACTERES ESPECIAIS OU ACENTOS)



Confidential

90 - Marcia Chiquetelli - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS CRIOPRESERVADAS: HISTÓRIA DO BIOBANCO-HCB  
Page 1

## Buffy Coat

---

ID NAP

---

---

Data da coleta do Buffy Coat

---

---

Tempo entre a coleta e a extração de DNA do Buffy coat calculado em DIAS

---

### INFORMACOES DA COLETA

#### BUFFY COAT - DNA

##### Nanodrop

---

Data da extração

---

---

Absorbancia 260/280

---

(Numero)

---

---

Absorbancia 260/230

---

(Numero)

---

---

Concentração

---

(Numero)

---

---

ug totais nanodrop

---

##### Qubit

---

Concentração

---

(Numero)

---

---

ug totais qubit

---

Confidential

Page 2

Tapestation	
Concentracao	<input type="text"/> (Numero)
DIN	<input type="text"/> (Numero)
Str	
Pareamento (sangue e tecido)	<input type="radio"/> Negativo <input type="radio"/> Positivo
Condicoes Da Amostra	
Existe registro de armazenamento em temperatura inadequada	<input type="radio"/> Nao <input type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Ignorado
Tipo de extracao	<input type="radio"/> Automatizada <input type="radio"/> Manual <input type="radio"/> Ignorado
Tipo de armazenamento	<input type="radio"/> Pellet <input type="radio"/> Buffy coat total
Volume de entrada da amostra	<input type="text"/> (Em microlitros)
Volume de eluicao	<input type="text"/> (Em microlitros)

Confidential

90 - Marcia Chiquetelli - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS CRIOPRESERVADAS: HISTÓRIA DO BIOBANCO-HCB  
Page 1**Tecido**ID NAP  
\_\_\_\_\_

Excluído na MACRODISSECCAO

 Nao  
 Sim

% de tumor

\_\_\_\_\_  
(Em %/ Minimo 60% de tumor)

% de necrose

\_\_\_\_\_  
(Em %/ Minimo 60% de tumor)

Origem do fragmento

 Biopsia  
 Cirurgia

Fragmento ja utilizado

 Nao  
 SimData da coleta do tecido  
\_\_\_\_\_**INFORMACOES DA COLETA****TECIDO - DNA****Macrodisseccao**

Peso

\_\_\_\_\_  
(Em mg)

Volume de entrada da amostra

\_\_\_\_\_  
(Em microlitros)

Volume de eluicao

\_\_\_\_\_  
(Em microlitros)**NANODROP**

Absorbancia 260/280

\_\_\_\_\_  
(Numero)

Absorbancia 260/230

\_\_\_\_\_  
(Numero)

Confidential

Page 2

---

Concentracao

---

(Numero)

---

ug totais nanodrop

---

---

**Qubit**

---

Concentracao

---

(Numero)

---

ug totais qubit

---

---

**Tapestation**

---

Concentracao

---

(Numero)

---

DIN

---

(Numero)

---

**Str**

---

Pareamento (sangue e tecido)

- Negativo  
 Positivo

---

**Condicoes Da Amostra**

---

Existe registro de armazenamento em temperatura inadequada

- Nao  
 Sim  
 Ignorado

---

Tipo de extracao

- Automatizada  
 Manual  
 Ignorado

---

Data da extracao DNA

---

---

Tempo entre a coleta e a extracao de DNA do tecido calculado em DIAS

---

Confidential

Page 3

**INFORMACOES DA COLETA****TECIDO - RNA  
Macrodisseccao**

Peso

---

  
(Em mg)

Volume de entrada da amostra

---

  
(Em microlitros)

Volume de eluicao

---

  
(Em microlitros)**NANODROP - RNA**

Absorbancia 260/280

---

  
(Numero)

Absorbancia 260/230

---

  
(Numero)

Concentracao

---

  
(Numero)

ug totais nanodrop

---

**Qubit**

Concentracao

---

  
(Numero)

ug totais qubit

---

**Tapestation**

Concentracao

---

  
(Numero)

RIN

---

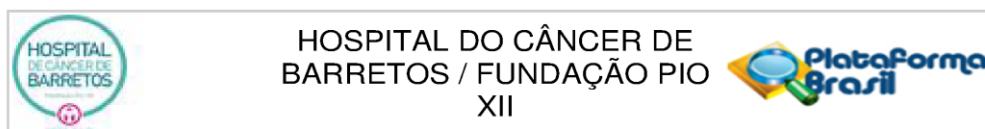
  
(Numero)

Confidential

Page 4

Condições Da Amostra	
Existe registro de armazenamento em temperatura inadequada	<input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Ignorado
Tipo de extração	<input type="radio"/> Automatizada <input type="radio"/> Manual <input type="radio"/> Ignorado
Data da extração RNA	_____
Tempo entre a coleta e a extração de RNA do tecido calculado em DIAS	_____

## Anexo D- Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE TECIDO, BUFFY COAT E PLASMA, CRIOPRESERVADAS: HISTÓRIA DO BIOBANCO-HCB

**Pesquisador:** Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 58927716.0.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Fundação Pio XII

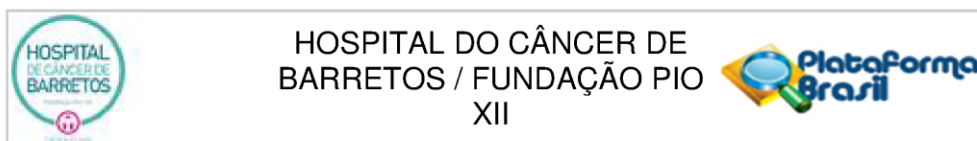
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.747.978

#### Apresentação do Projeto:

Resumo: A medicina genômica visa à identificação de biomarcadores com potencial na prática clínica a partir de amostras biológicas de alta qualidade. A fonte dessas amostras em sua grande maioria provem de biobancos cuja finalidade é o armazenamento e gerenciamento de espécimes biológicos que serão disponibilizados para pesquisa. Obter material de boa qualidade requer a implementação de procedimentos operacionais padrão que consigam controlar as variáveis pré-analíticas em biobancos que impactam diretamente na qualidade das amostras para as análises moleculares. Atualmente o método de armazenamento mais comumente utilizado nos biobancos de países de baixa e média renda, como o Brasil, é a criopreservação em freezers a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sabidamente este é o método mais barato, porém nem sempre o mais efetivo para armazenamentos por longos períodos de armazenamento. A extração de DNA e RNA é considerada um passo essencial para análises moleculares como sequenciamento genômico em larga escala e estudos de expressão genica. No entanto sabidamente o RNA é uma molécula mais facilmente degradada a qual múltiplos fatores como, por exemplo, a temperatura e as condições de processamento de amostra podem influenciar na qualidade deste material. Dentro desse contexto, o presente estudo tem como objetivo geral avaliar a qualidade das amostras criopreservadas no Biobanco-HCB no período de 7 anos. Nossa hipótese é que esse longo período de armazenamento

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



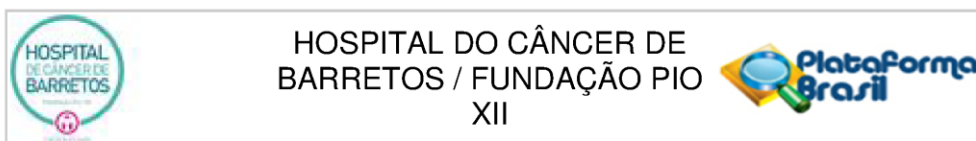
Continuação do Parecer: 1.747.978

pode influenciar a qualidade dos bioespecímenes armazenados nos freezers e que os diferentes métodos de processamento e armazenamento das amostras realizadas neste período podem ter impacto na qualidade do DNA e RNA obtidos a partir das amostras armazenadas em nosso biobanco. Para tanto, serão selecionadas amostras de tecido tumoral, buffy coat e plasma, sendo todos pareados, do mesmo paciente. Serão utilizados os tipos tumorais mais representativos em nosso biobanco para obtenção do material genético (DNA e RNA) a partir dos espécimes criopreservados. A avaliação da qualidade será realizada por meio da avaliação da concentração, pureza e integridade tanto do DNA quanto do RNA obtido a partir do tecido tumoral e buffy coat bem como do DNA presente em biopsias líquidas (plasma). Os dados obtidos a partir destas análises serão comparados a fim de se avaliar o impacto do armazenamento na qualidade do material genético para uso na medicina genômica. Os dados deste trabalho poderão ajudar os biobancos de uma forma geral na eliminação dos problemas relacionados a qualidade e custo dentro desta abordagem particular.

Introdução: 1-INTRODUÇÃO 1.1- História, finalidade e estrutura dos Biobancos A ideia de biobanco não é nova, há pelo menos 150 anos atrás materiais biológicos, não só humano, já eram coletados, armazenados e utilizados em pesquisa, porém sem nenhuma regulamentação ou regras (1). No Brasil, o processo para instituição de um biobanco inicia-se com a confecção de um protocolo de desenvolvimento que tem por finalidade promover a regularização dos biobancos brasileiros em atendimento à Resolução CNS no 441 de 12 de Maio de 2011 (2). Segundo a Sociedade Internacional de Repositórios Biológicos e Ambientais (ISBER) (3) biobanco é o local onde é feito o recebimento, processamento, armazenamento e/ou fornecimento de diferentes tipos de amostras biológicas armazenadas adequadamente, contendo DNA, RNA e proteínas de alta qualidade, tendo como objetivo principal a pesquisa científica básica e translacional (3) (4). No entanto, o termo biobanco tem sido por muitas vezes usado erroneamente como biorrepositórios, porém existem algumas diferenças entre os dois (3). De acordo com a resolução 441 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) Biobanco é a coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais (2). Por outro lado, entende-se por Biorepositório uma coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

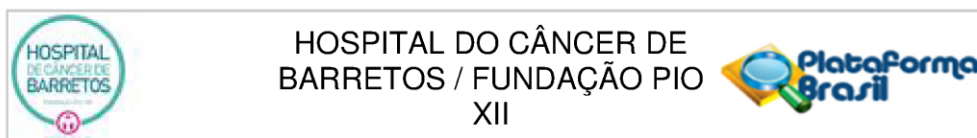




Continuação do Parecer: 1.747.978

comerciais. (1) (2). Em nossa instituição as amostras oriundas de pacientes são colhidas para o BIOBANCO -HCB desde que haja material suficiente para o diagnóstico acurado da doença. Atualmente a estrutura padrão de biobancos para armazenamento de amostras, inclui a criopreservação de amostras biológicas, como tecido e sangue em freezers -80°C e -140°C sob monitoramento de temperatura (5). Outra alternativa é o armazenamento por longos períodos em containers de nitrogênio líquido, sendo esta uma opção que demanda maior planejamento de espaço e custo de manutenção. Esta estrutura é imprescindível para o fornecimento de amostras de alta qualidade com finalidade de pesquisa (6). Algumas alternativas de armazenamento de amostra biológicas têm sido estudadas, visto que o armazenamento de material biológico em ultra-freezer ou nitrogênio é custoso, pois requer espaço e utilização de equipamentos de monitoramento em fluxo contínuo ao longo do dia para evitar falhas e possíveis problemas relacionadas ao descongelamento de amostras(5). A utilização de soluções estabilizadoras, que preservam o tecido em temperatura ambiente, e a utilização de tecidos emblocados em parafina (FFPE), são alternativas mais baratas, porém a qualidade e a integridade são bem inferiores quando comparadas ao armazenamento por criopreservação, sendo este considerado o “padrão ouro” em biobancos (5) (7) (8). Quanto aos aspectos éticos, legais e sociais devem ser cuidadosamente considerados na configuração dos biobancos, de acordo com as normas de cada país (1) (3). Os direitos, responsabilidades e obrigações dos membros do biobanco, bem como dos doadores, devem ser muito bem esclarecidos e definidos (1). Para que as amostras sejam armazenadas e posteriormente fornecidas para pesquisa, é necessário o consentimento do paciente doador, feito através de uma documentação a qual o paciente é informado o objetivo da sua participação na pesquisa e possibilidades de riscos e eventos adversos, além disso, o consentimento deve informar que o paciente pode recusar ou retirar-se da pesquisa a qualquer momento (1). Embora caiba a instituição na qual um determinado biobanco esta localizado a responsabilidade de guarda e o gerenciamento de todo o material biológico contido (Resolução CNS nº 441, item 1.I; item 9), o material pertence ao sujeito de pesquisa (Resolução CNS nº 441, item 9) (2). Este, ou seu representante legal, a qualquer momento e sem qualquer ônus ou prejuízo, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado, valendo a desistência a partir da data da sua manifestação. Para tanto, deve o sujeito de pesquisa (ou o seu representante legal) formalizar ao Biobanco institucional sua desistência em manifesto escrito e assinado (Resolução CNS nº 441, item 10.I) (2). Em nossa instituição, o consentimento para coleta, armazenamento e utilização do material biológico é formalizado através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) padrão aprovado pela CONEP que é assinado pelo sujeito

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br

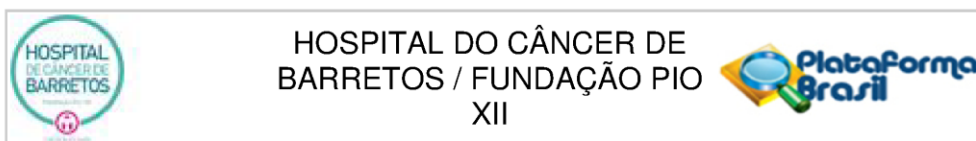


## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

Continuação do Parecer: 1.747.978

de pesquisa antes da coleta do material biológico (2). O Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos (BHCB), foi fundado em março de 2006, a partir de projeto de pesquisa fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob protocolo número 2005/51691-7, intitulado “Implantação de um Banco de Tumores: UNESP / Hospital de Câncer de Barretos-SP” e com vigência de 01/10/2005 a 30/09/2007, sendo uma parceria entre o Hospital de Câncer de Barretos e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Atualmente o BHCB possui cerca de 164.590 mil amostras biológicas de 32.501 mil pacientes utilizadas em 87 projetos de pesquisa nacionais e internacionais. O sistema de armazenamento do Biobanco-HCB é feito por criopreservação das amostras biológicas, em ultra-freezers – 80°C sob controle diário de temperatura.1.2- Fatores pré- analíticos que influenciam a qualidade das amostras criopreservadas Em um biobanco é fundamental que se sejam asseguradas tanto a qualidade quanto a disponibilidade do material biológico criopreservado por longos períodos, para utilização em pesquisa de boa qualidade (9) (10). Uma das maneiras de se controlar as variáveis pré-analíticas que impactam diretamente na qualidade das amostras biológicas é por meio da utilização de protocolos padronizados chamados Procedimento Operacional Padrão (POPs), os quais devem ser documentados de uma forma passível de revisão e modificações (6). Os POPs tem função de descrever como as tarefas deverão ser executadas pelo operador capacitado, a fim de garantir que as amostras sejam corretamente coletadas, armazenada e poderá ser efetivamente disseminada para um subsequente operador (3). Além disso, existem guias de gestão de qualidade disponíveis com a finalidade de ajudar a desenvolver um Sistema de Gestão Qualidade (SGQ) de bioespécimes eficiente, a fim de minimizar situações adversas que podem afetar resultados científicos, garantir a segurança da equipe e aumentar a qualidade e das amostras armazenadas (3) (11). Os tecidos armazenados em biobancos, geralmente são obtidos a partir de biópsias e cirurgias, portanto, uma variedade de fatores pré-analíticos são determinantes para preservar a qualidade desse material, como por exemplo, o tempo de congelamento, criopreservação, descongelamento e processamento (7) (12). Um dos fatores importantes para preservar a integridade do RNA em tecidos, é o tempo de isquemia fria, ou seja, o momento entre a remoção cirúrgica do tecido e o congelamento da amostra (7) (13). Alguns estudos foram realizados, a fim de mensurar o tempo ideal de isquemia fria que mantém o RNA íntegro, os resultados obtidos variam de acordo com o tipo de topografia inclusive um deles em nossa instituição (7) (13) (14). Nesta pesquisa foram analisadas 5 diferentes tipos de topografia: mama, tireóide, estômago, pulmão e cólon. Essas amostras foram avaliadas sob tempos de isquemia fria diferentes e posteriormente foi feita a extração e análise de integridade do RNA em que concluiu-se que o

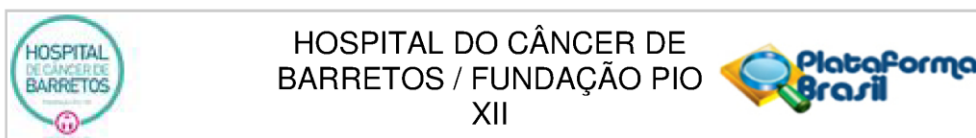
**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.978

tempo de isquemia fria de 30 minutos foi mais eficiente para manter a integridade do RNA (14). Outros estudos foram realizados para determinar o tempo de isquemia quente, quando ocorre diminuição da perfusão sanguínea e de oxigênio no tecido após ter sido removido do corpo e o mesmo é mantido em temperatura ambiente antes de a amostra ser congelada (9) (15). Amostras frescas de cólon foram coletadas, cortadas em pedaços e mantidas em gelo por 0,5, 1 e 4 horas antes de serem congeladas, conclui-se que o tempo de isquemia quente de até 4 horas não acarretou impacto significativamente a integridade do RNA das amostras de cólon (9). O tempo de isquemia quente, associado a períodos longos de manipulação cirúrgica, também podem alterar o perfil da expressão gênica, portanto devem ser controlados (5). A análise da qualidade de tecido tumoral também inclui a avaliação da porcentagem de tecido tumoral, tecido normal e necrose, realizada por um patologista (3). De acordo com as boas práticas para estudos científicos, a obtenção do material genético a partir do tecido tumoral, só pode ser feita somente após a confirmação da porcentagem tumoral considerando como padrão ter cerca de pelo menos 60% de células tumorais viáveis e no máximo 30% de necrose, amostras fora desse parâmetro devem ser consideradas impróprias para análise molecular (16). Ciclos de descongelamento do material biológico também pode alterar a qualidade dos ácidos nucleicos (7). Os principais motivos para que isso ocorra são: utilização frequente da mesma amostra, oscilações de temperatura do freezer causado pela abertura constante da porta e falhas técnicas nos freezers (7). Sabidamente a molécula de RNA é mais instável e conseqüentemente mais vulnerável do que a molécula de DNA a degradação. A qualidade e rendimento do RNA de amostras de tecido tumoral de ovário, submetidas a 1,2 e 3 ciclos de descongelamento mostrou que as amostras podem ser congeladas e descongeladas até no máximo três vezes sem comprometer a integridade do RNA e o perfil de expressão gênica (17). Com o mesmo objetivo, uma outra pesquisa utilizou amostras de autópsia de tecido cerebral, em que foi relatada uma correlação negativa com a integridade do RNA e os vários ciclos de descongelamento, além disso, as amostras preservadas em RNALater obtiveram maior qualidade do que as amostras que foram rapidamente congeladas (5) (10) (18). Alguns estudos relatam ainda que dois ciclos de descongelamento são suficientes para alterar a qualidade do RNA e que a correlação entre o número de ciclos de descongelamento e a integridade do RNA, podem estar associadas ao tipo de tecido utilizado, sendo assim, é recomendado que sejam feitas alíquotas do material, utilização de gelo seco ou nitrogênio seco para a manipulação das amostras, evitando o descongelamento das mesmas (3) (7). Assim como em tecido, ciclos de descongelamento também podem alterar a qualidade do DNA, RNA e proteínas em amostras de sangue, podendo reduzir o rendimento do DNA para 25%, sem haver redução significativa do RNA

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

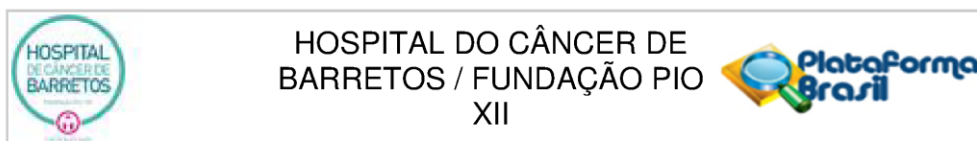
Continuação do Parecer: 1.747.978

mensageiro no soro ou plasma, em apenas um ciclo de descongelamento (7). Outro fator pré-analítico importante que influencia a qualidade das amostras de sangue é o tempo em que a amostra é mantida em temperatura ambiente em tubos EDTA até ser processada (5). Amostras condicionadas por longos períodos em tubos EDTA podem ter alteração, quanto ao perfil de expressão gênica, por início da transcrição in vitro, portanto o que se recomenda é o processamento e armazenamento do sangue em até 4 horas a 4<sup>o</sup> C após a coleta do mesmo (5) (19). Alguns estudos destacam a boa qualidade do RNA e menor variação quanto aos padrões de expressão gênica, através da utilização de tubos coletores PAXgene ou Tempus, os quais possuem uma solução estabilizadora de RNA, evitando a transcrição in vitro bem como degradação do RNA mensageiro por RNases (5) (20) (21). Além disso, amostras de sangue que possuem soro e/ou plasma hemolisados, não devem ser utilizadas, pois a presença de ferro pode ter impacto na eficiência e acurácia de testes laboratoriais e técnicas utilizadas em pesquisas como o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (10). Sabe-se que a hemólise pode ser evitada por meio de um procedimento simples que preconiza treinamento de pessoal e utilização de boas práticas na coleta do sangue, cuidado na manipulação dos tubos de coleta e técnicas de pipetagem (19). A temperatura e o tempo de armazenamento também são outros fatores determinantes, no que se diz respeito à qualidade de bioespécimes criopreservados. A criopreservação em temperaturas abaixo de -130 °C, através de ultra-freezers ou nitrogênio, é opção ideal para a preservação das biomoléculas de RNA, pois mantém sua integridade intacta em até 50 meses (10). Porém, um estudo que avaliou a integridade do RNA de amostras de tecido endócrino armazenadas em freezers a -80°C com diferentes tempos de armazenamento, mostrou que este tipo de armazenamento por longos períodos prazo não afeta negativamente a qualidade do RNA e sugere que o armazenamento em -80°C é equivalente ao armazenamento feito em nitrogênio (10). Portanto fica evidente que a literatura neste aspecto ainda é contraditória necessitando de mais estudos com grande numero de amostras afim de melhor elucidar o impacto do tempo na qualidade das amostras criopreservadas para pesquisa genômica.

1.3- Biobanco na medicina genômica Os biobancos têm atuado como uma importante ferramenta para a medicina genômica, uma vez que detém da fonte de amostras biológicas que são utilizadas na descoberta de novos marcadores moleculares, bem como a identificação de novos alvos terapêuticos, que trarão benefícios futuros para o diagnóstico e tratamento de pacientes (6). No entanto, para refletir as verdadeiras mudanças genômicas de doenças, é necessária a utilização de amostras biológicas que possuam DNA, RNA e proteínas de alta qualidade (1) (4). Em diversos estudos a utilização de amostras biológicas criopreservadas (-80°C a 190°C) é justificada pelo alto rendimento e

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



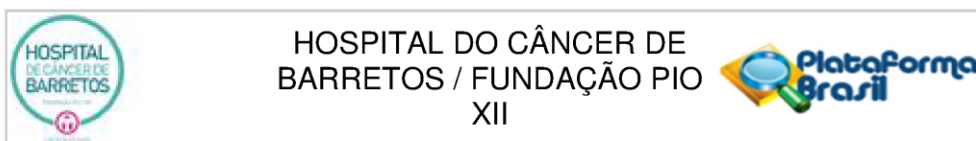


Continuação do Parecer: 1.747.978

qualidade dos ácidos nucleicos que as mesmas possuem, favorecendo estudos morfológicos de alta qualidade os quais utilizam técnicas como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), microarrays e PCR digital, para a avaliação do genoma, transcriptoma e proteoma (7). Como já discutido, os POPs asseguram que o processamento tanto das amostras quanto do material genético sejam realizados com boa reprodutibilidade e qualidade (6). Dentro deste contexto algumas técnicas são utilizadas como ferramentas padrão para avaliação da qualidade tanto do DNA quanto do RNA obtido a partir de bioespecimes criopreservados (7). Uma maneira rápida de mensurar a pureza bem como o rendimento das amostras de DNA e RNA, é através da utilização de espectrofotômetros com comprimento de onda de 260 nm e 280, o qual determinará a densidade óptica (OD) dos ácidos nucléicos obtidos a partir de células, tecidos, sangue dentre outros fluidos(7). Atualmente o aparelho NanoDrop ( Thermo Scientific) é a ferramenta mais barata e mais amplamente utilizada em pesquisa para se determinar a concentração e pureza dos ácidos nucleicos(22) . Recentemente alguns biobancos já fazem uso do método de quantificação por fluorescência com o aparelho Qubit (ThermoFisher) por ser mais mais preciso e confiável quando comparado com o método de espectrofotometria(23). No entanto esta ainda é uma opção que se restringe a grandes Centros e Laboratórios de pesquisa por ter um custo mais elevado a ser aplicado na rotina. Os resultados gerados pelos espectrofotômetros indicam apenas a qualidade dos ácidos nucléicos e não necessariamente refletem a integridade dos mesmos (7). Dessa forma, técnicas adicionadas devem ser utilizadas a fim de se avaliar a integridade como, por exemplo, a eletroforese convencional ou a microfluídica conhecida por Bioanalyzer (24).Essas análises são importantes procedimentos de controle de qualidade antes do envio de alíquotas pelos biobancos que serão utilizadas em diferentes técnicas de biologia molecular utilizadas na pratica clinica como o PCR quantitativo (7). Atualmente a técnica de PCR Digital (dPCR) é uma nova ferramenta para a detecção e quantificação de ácidos nucléicos através da contagem direta do número de moléculas alvo presentes na amostra, sem a necessidade de curvas padrão e controles endógenos (25).Diante disso fica evidente a necessidade de estudos que visam avaliar a qualidade de amostras biológicas criopreervadas em biobancos e que são rotineiramente recrutadas para pesquisa.

Hipótese: Nossa hipótese é que esse longo período de armazenamento pode influenciar a qualidade dos bioespecimes armazenados nos freezers e que os diferentes métodos de processamento e armazenamento das amostras realizadas neste período podem ter impacto na qualidade do DNA e RNA obtidos a partir das amostras armazenadas em nosso biobanco.

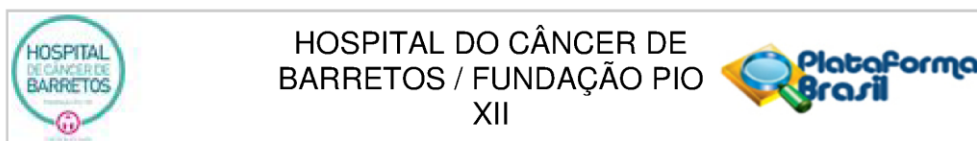
**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.978

Metodologia Proposta: 3.1- Seleção de casos Serão utilizadas um total de 1200 amostras de 3 diferentes tipos de topografias: mama, endométrio e estômago. Sendo 400 amostras de tecido tumoral, pareado com 400 amostras de buffy coat e 400 amostras de plasma. Os tipos de topografias foram escolhidos de acordo com o número e disponibilidade de amostras por topografia, ou seja, foram selecionadas as 3 topografias mais coletadas no Biobanco-HCB no período de 2009, até o ano de 2016. 3.2- Análise estatística O valor amostral foi calculado com base na quantidade total de amostras de mama, endométrio e estômago, no período de 2009 a 2016, considerando-se uma precisão absoluta do intervalo de confiança de 9 pontos percentuais e inadequação de 50%.3.3- Macrodissecção dos tecidos tumorais As macrodissecções bem como as extrações de DNA e RNA serão realizadas no Biobanco-HCB, de amostras armazenadas no período de outubro de 2009 a dezembro de 2016 Todos os tecidos tumorais serão submetidos à macrodissecção, os fragmentos de tecidos tumorais criopreservados serão emblocados em gel Tissue-Tek (O.C.T- temperatura ótima de corte) e água destilada, com o auxílio do equipamento criostato, será feito o corte histológico de 5 mm do tecido e o mesmo será coletado em lâminas para microscopia. As lâminas serão submetidas à coloração de HE (hematoxilina-eosina) e por fim serão analisadas por um patologista, para que o mesmo determine a porcentagem de tumor e necrose de cada amostra. Todo tecido tumoral que tiver menos que 60% de tumor e mais de 20% de necrose, serão desqualificados para extração de DNA/RNA. A macrodissecção também será utilizada como um critério para aferir a qualidade das amostras fornecidas pelos centros de coletas HCB.3.4- Processamento das amostras no Biobanco3.4.1. Extração de DNA e RNAi. Extração de DNA e RNA apartir de tecido tumoral, buffy coat e plasma Os tecidos qualificados na macrodissecção serão cortados em pequenos fragmentos e pesados, atendendo o critério de 20 a 30 mg de tecido. Para a extração de DNA dos tecidos tumorais, os fragmentos de tecidos serão transferidos para tubos contendo beads de cerâmica e 220 ul de buffer ATL. Esses tubos serão colocados no equipamento Precellys, utilizando a programação de 1 ciclo de 10 segundos a 6500 RPM, podendo ser repedita essa programação caso o tecido não tenha sido completamente macerado. Ao serem retirados do equipamento Precellys, os tubos serão colocados na centrífuga durante 1 minuto a 8000 RPM para que seja coletado, com auxílio de uma pipeta, somente o sobrenadante sem resquícios de fragmentos de tecido. O sobrenadante de cada amostra será transferido para tubo Sarsted contendo 20 ul de proteinase K. As amostras ficarão overnight em termociclador a 56°C e 750 RPM. Após a retirada das amostras do termociclador, será adicionado 4 ul de RNase em cada tubo e o mesmo será brevemente vortexado e ficará em

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.978

repouso durante 2 minutos. Posteriormente, as amostras serão colocadas no aparelho QIASymphony, juntamente com o QIASymphony DNA mini kit utilizando o protocolo padrão, Tissue\_200 e volume de eluição de 50 ul. Para a extração de RNA dos tecidos tumorais, os mesmos serão cortados, pesados e então transferidos para tubos com beads de cerâmica e 400 ul de Buffer RLT Plus + - mercaptoethanol (10 ul de -ME para cada 1 ml de Buffer RLT Plus). Os tubos serão colocados no equipamento Precellys, utilizando a programação de 1 ciclo de 10 segundos a 6500 RPM. Os tubos contendo os tecidos lisados, serão centrifugados por 3 minutos na velocidade máxima, posteriormente o sobrenadante será transferido para tubos Sarsted e então colocadas no aparelho QIASymphony, juntamente com o RNA kit, utilizando o protocolo padrão, RNA\_400 e volume de eluição de 50 ul. As extrações de RNA de buffy coat será feita utilizando o sistema automatizado QIASymphony. Todas as amostras serão submetidas a um pré-tratamento, adicionando 400 ul de Buffer RLT Plus + - mercaptoethanol (10 ul de -ME para cada 1 ml d

Metodologia de Análise de Dados: O valor amostral foi calculado com base na quantidade total de amostras de mama, endométrio e estômago, no período de 2009 a 2016, considerando-se uma precisão absoluta do intervalo de confiança de 9 pontos percentuais e inadequação de 50%.

Desfecho Primário: Espera-se que o tempo de armazenamento das amostras criopreservadas tenham alterado a qualidade das mesmas.

Tamanho da Amostra no Brasil: 1.200

#### **Objetivo da Pesquisa:**

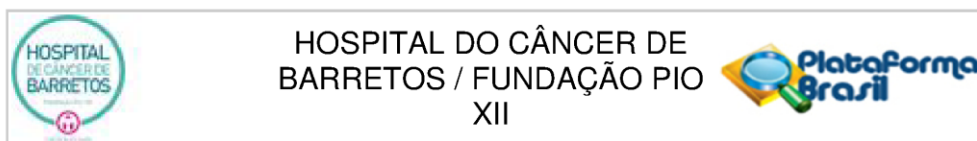
Objetivo geral:

Avaliar a qualidade de uma série histórica de amostras criopreservadas armazenadas junto ao Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos.

Objetivos específicos:

- 1-Avaliar a integridade, rendimento e pureza do RNA e DNA obtidos a partir do buffy coat e tecido tumoral criopreservado para análises genômicas.
- 2-Avaliar o pareamento genético entre as amostras de buffy coat e tecido tumoral, pelo teste de quimerismo genético.
- 3-Avaliar a qualidade e rendimento do DNA obtido de biopsias líquidas (plasma) por PCR digital

<b>Endereço:</b> Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	<b>CEP:</b> 14.784-400
<b>Bairro:</b> Dr. Paulo Prata	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BARRETOS
<b>Telefone:</b> (17)3321-0347	<b>Fax:</b> (17)3321-6600
	<b>E-mail:</b> cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.978

4-Correlacionar os dados obtidos com o tempo de armazenamento, tempo de isquemia do espécimes e protocolos de processamento e estocagem realizados no biobanco do HCB.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Trata-se de um estudo de risco mínimo às participantes (risco de quebra acidental da confidencialidade), em que não haverá benefício aos participantes.

Benefícios: O presente estudo não trará benefício direto aos participantes.

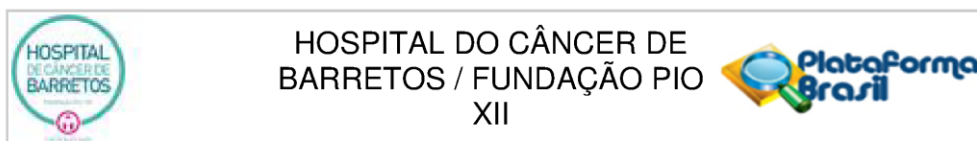
**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto retrospectivo envolvendo o Biobanco do HCB. Conforme os proponentes, a obtenção de material de boa qualidade em um Biobanco para utilização em projetos de pesquisa requer a implementação de procedimentos operacionais padrão que consigam controlar as variáveis pré-analíticas em biobancos que impactam diretamente na qualidade das amostras para as análises moleculares. A extração de DNA e RNA é considerada um passo essencial para análises moleculares como sequenciamento genômico em larga escala e estudos de expressão genica. No entanto sabidamente o RNA é uma molécula mais facilmente degradada, degradação essa que pode ser devido a múltiplos fatores, tais como como, a temperatura e as condições de processamento de amostra. Dentro desse contexto, o presente estudo tem como pretende avaliar a qualidade das amostras criopreservadas do Biobanco-HCB no período de 7 anos. A hipótese é que esse longo período de armazenamento pode influenciar a qualidade dos bioespécimes armazenados nos freezers e que os diferentes métodos de processamento e armazenamento das amostras realizadas neste período podem ter impacto na qualidade do DNA e RNA obtidos a partir das amostras armazenadas em nosso biobanco. Para tanto, serão selecionadas amostras de tecido tumoral, buffy coat e plasma, sendo todos pareados, do mesmo paciente. Serão utilizados os tipos tumorais mais representativos do nosso biobanco (mama, estômago e colo de útero) para obtenção do material genético (DNA e RNA) a partir dos espécimes criopreservados

Projeto retrospectivo que pretende analisar a qualidade das amostras de DNA/RNA obtidas a partir de material criopreservado armazenado no biobanco de 2009 a 2016. Prevê a análise de material tumoral, buffy coat e plasma de um total de 1200 amostras, sendo 400 de cada tipo de material

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br





Continuação do Parecer: 1.747.978

biólogico.. Solicita isenção de TCLE, afirmando que "Solicita-se ao Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo e ainda representar riscos mínimos para os participantes, sendo estes inerentes a quebra acidental da confidencialidade dos dados e o esgotamento do material biológico. Contudo os pesquisadores comprometem-se a preservar a privacidade dos participantes de pesquisa, garantindo que os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente para a execução do projeto em questão, e que o material biológico não será esgotado. Adicionalmente, informamos que as amostras que possuem irregularidades do TCLE (Biobanco) serão excluídas no estudo." Todas as análises serão realizadas na Instituição. Não envolve nenhuma análise do material genético propriamente dito, exceto de sua qualidade, quantidade e integridade

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

Todos os termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados.

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

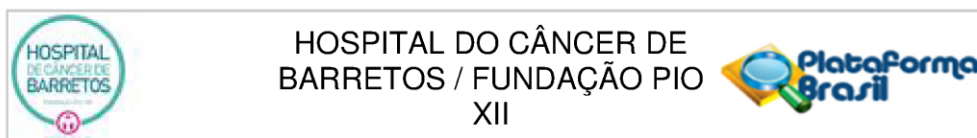
1. No projeto os pesquisadores mencionam que analisarão mama, estômago e endométrio. Já na listagem de disponibilidade de amostras do Biobanco, as listas são de mama, estômago e colo de útero. Solicita-se esclarecer se serão utilizadas apenas as amostras de endométrio ou se serão usadas as de colo de útero ou utero de forma generalizada. Se forem apenas as de endométrio, a listagem fornecida pelo Bionbanco deverá ser ajustada. Se forem utilizadas as de utero (incluindo as de endométrio mas não se restringindo a essas), essa informação deverá ser corrigida no projeto e na Plataforma Brasil.

RESPOSTA: Serão utilizadas amostras de útero na forma generalizada e esta alteração ja foi feita na nova versão do projeto seção materiais e métodos (seleção dos casos) pagina 11.

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Em relação ao objetivo 4, "Correlacionar os dados obtidos com o tempo de armazenamento, tempo de isquemia do espécimes e protocolos de processamento e estocagem realizados no biobanco do HCB.", não fica claro no estudo como será feita a análise do tempo de isquemia e do processamento das amostras, dado que são amostras retrospectivas coletadas de 2009 a 2016. Solicita-se que os pesquisadores esclareçam no projeto de que forma essas informações serão recuperadas e como essas análises serão realizadas.

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.978

RESPOSTA: Este item foi melhor esclarecido na nova versão do projeto tanto na introdução (pag. 7) referenciando um estudo institucional quanto na metodologia item Analise estatística (pag.14).

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. O autor cita que irá correlacionar os dados obtidos com o tempo de armazenamento, tempo de isquemia e estocagem realizados no biobanco do HCB. Porém, em nenhuma parte do projeto cita qual método estatístico será utilizado para fazer tais correlações.

RESPOSTA: Este item foi melhor esclarecido na nova versão do projeto tanto na introdução (pag. 7) referenciando um estudo institucional quanto na metodologia item Analise estatística (pag.14).

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA

4. Em caso de identificação de "falta de pareamento" entre as amostras de tecido tumoral, buffy coat e plasma so paciente, qual será a conduta adotada? Solicita-se esclarecimento acerca dessa possibilidade.

RESPOSTA: Para esclarecimento esta analis esera so entre tumor e sangue (buffy coat) conforme descrito no item 4.5 Teste de quimerismo da metodologia não sendo procedente a pedencia em relação a plasma. De qualquer forma ste item foi melhor esclarecido na nova versão do projeto tanto na metodologia item Teste de quimerismo (pag.11 e 12).

ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

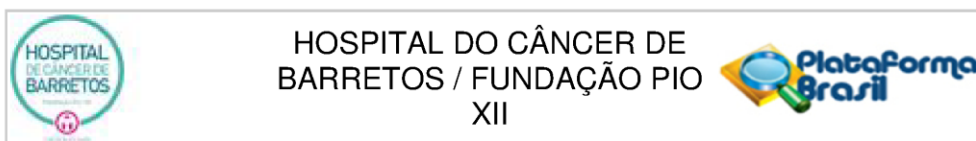
#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, e após a análise das respostas as pendências emitidas, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 27/03/2016.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

<b>Endereço:</b> Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	<b>CEP:</b> 14.784-400
<b>Bairro:</b> Dr. Paulo Prata	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BARRETOS
<b>Telefone:</b> (17)3321-0347	<b>Fax:</b> (17)3321-6600
	<b>E-mail:</b> cep@hccancerbarretos.com.br



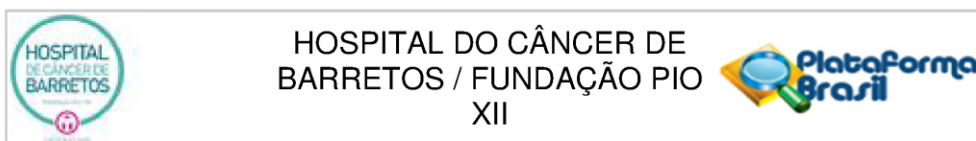
Continuação do Parecer: 1.747.978

3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1207/2016.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_778491.pdf	05/09/2016 08:42:10		Aceito
Outros	Nova-versao_projeto.doc	02/09/2016 11:55:27	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito
Outros	Carta_de_resposta.pdf	02/09/2016 11:54:47	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta.docx	02/09/2016 11:52:48	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito
Outros	mama5.pdf	29/08/2016 08:24:26	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	mama4.pdf	29/08/2016 08:23:42	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	mama3.pdf	29/08/2016 08:23:09	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	mama.pdf	29/08/2016 08:22:49	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	estomago6.pdf	29/08/2016 08:22:24	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	estomago5.pdf	29/08/2016 08:21:53	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	estomago2.pdf	29/08/2016 08:21:29	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	estomago.pdf	29/08/2016 08:21:14	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	colo_uterio6.pdf	29/08/2016 08:20:52	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	colo_uterio.pdf	29/08/2016	Thiago Buosi Silva	Aceito

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.747.978

Outros	colo_uter0.pdf	08:20:30	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	colo_de_uter07.pdf	29/08/2016 08:20:04	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	colo_de_uter01.pdf	29/08/2016 08:19:48	Thiago Buosi Silva	Aceito
Outros	colo_de_uter0.pdf	29/08/2016 08:19:31	Thiago Buosi Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	19/08/2016 16:01:25	ANA CAROLINE NEUBER	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	19/08/2016 15:59:33	ANA CAROLINE NEUBER	Aceito
Outros	MABIN_Cadastroprojeto.pdf	19/08/2016 15:58:30	ANA CAROLINE NEUBER	Aceito
Outros	Ciencia_estudo.pdf	19/08/2016 10:14:47	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito
Outros	Responsabilidade_pesquisador.pdf	19/08/2016 10:14:34	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito
Outros	Fonte_financiamento.pdf	19/08/2016 10:14:07	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BARRETOS, 27 de Setembro de 2016

Assinado por:  
Thiago Buosi Silva  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

## Anexo E- Artigo "The Biobank of Barretos Cancer Hospital: 14 years of experience in cancer research".

Cell Tissue Bank  
<https://doi.org/10.1007/s10561-021-09941-9>



### The biobank of barretos cancer hospital: 14 years of experience in cancer research

Ana Caroline Neuber · Cássio Hoft Tostes · Adeylson Guimarães Ribeiro ·  
 Gabriella Taques Marczynski · Tatiana Takahasi Komoto · Caroline Domingues Rogeri ·  
 Vinicius Duval da Silva · Edmundo Carvalho Mauad · Rui Manuel Reis ·  
 Márcia M. C. Marques

Received: 5 February 2021 / Accepted: 20 June 2021  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

**Abstract** Despite the developments in cancer research over years, cancer is still one of the leading causes of death worldwide. In Brazil, the number of cancer cases for the several next years (2020–2022) is expected to increase up to 625,000. Thus, translational research has been vital to determine the potential risk, prognostic, and predictive biomarkers in cancer. Therefore, Barretos Cancer Hospital implemented a biobank (BB-BCH) in 2006, which is responsible for processing, storage, and provision of biological materials from cancer and non-cancer participants. Hence, this article aimed to describe BB-BCH's history, experiences, and outcomes and explore its impact on Brazilian translational oncology research scenario.

BB-BCH has a multidisciplinary team who are responsible for guaranteeing the quality of all processes as recommended by international guidelines for biobanks. Furthermore, BB-BCH has ample equipment to ensure the quality of all material requested by researchers as genetic material (DNA and RNA) and/or entire biospecimens. From 2006 to 2019, BB-BCH contained 252,069 samples from 44,933 participants, the whole collection is represented by 15 different types of biospecimens collected from them. According to our data, the most collected and stored topography in men is head and neck (29%); in women is breast (28%); and in children is torso and limb (27%) samples. Finally, we supported national and

A. C. Neuber · C. H. Tostes · G. T. Marczynski ·  
 T. T. Komoto · C. D. Rogeri · V. D. da Silva ·  
 R. M. Reis · M. M. C. Marques  
 Barretos Cancer Hospital Biobank, São Paulo, Brazil

A. G. Ribeiro · E. C. Mauad · M. M. C. Marques (✉)  
 Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer  
 Hospital, Rua Antenor Duarte Vilela, 1331,  
 14784-400 Barretos, SP, Brazil  
 e-mail: marcia.marques@hcancerbarretos.com.br

V. D. da Silva  
 Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital,  
 São Paulo, Brazil

R. M. Reis  
 Department of Prevention, Barretos Cancer Hospital,  
 Barretos, Brazil

R. M. Reis  
 Life and Health Sciences Research Institute (ICVS),  
 School of Medicine, University of Minho, Braga, Portugal

R. M. Reis  
 ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga,  
 Portugal

M. M. C. Marques  
 Barretos School of Health Sciences, Barretos,  
 SP, Brazil

Published online: 03 July 2021

Springer



international consortia and projects such as The Cancer Genome Atlas. BB-BCH is a vital knowledge source for scientific community, enabling the development of high-quality studies, with a wide variety of tumor categories and high national representativeness of Brazilian population.

**Keywords** Biobank · Biobanking · Personalized Medicine · Cancer Research · Brazil

## Introduction

Cancer is one of the world's most significant health problems and is among the leading causes of premature deaths worldwide (Bray et al. 2014). According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), cancer rates will increase for the next several years, ranging from 19 million in 2020 to approximately 21.5 million in 2025 (IARC 2020). In Brazil, the number of new cases will likely increase for the next few years, up to 625,000 for each year of the 2020–2022 triennium (INCA 2020). In this context, scientific research has played an essential role in the development of safe and effective methods to prevent, detect, diagnose, and treat cancer. Furthermore, the knowledge gained after the characterization of the human genome, epigenome, proteome, and metabolome has improved the comprehension of molecular cancer characteristics, enabling personalized oncology such as genomic analysis, targeted drugs, cancer therapeutics and molecular diagnostics (Zhou et al. 2015; Coppola et al. 2019).

The progress of translational research in cancer depends on the availability of high-quality human biological samples and associated data, which are used as an essential source of material to answer scientific questions in a meaningful way (Zhou et al. 2015; Kinkorová 2016). To assist this growing demand, banks that store human biological material for research purposes, termed biobanks, have been created. A biobank requires standardized activities called “biobanking,” including patient consent and the collection, processing, storage, and management of biospecimens and their data until they are used in research (Fransson et al. 2015; Institute 2016; Mendy et al. 2017; Campbell et al. 2018; Organisation for Economic Co-operation and development 2018).

Barretos Cancer Hospital (BCH) is a reference center in the prevention and treatment of cancer in Brazil (Carneseca et al. 2013; Palmero et al. 2016; Greenwald et al. 2018). With a 56-year history, BCH is a philanthropic institution that attends patients within the Unified Health System (SUS) in Brazil, registering approximately 4000 visits per day covering all specialties, including head and neck, upper and lower digestive, genitourinary tract, breast, gynecological, head and neck, prevention and pediatrics ambulatories (Hospital de Amor 2017). Receiving patients from many regions of Brazil, BCH enables the development of research with biological samples with broad representativeness. To collect and store human biological samples from both patients and healthy individuals, in 2006, a biobank was created for research purposes in BCH. The Biobank of the Barretos Cancer Hospital (BB-BCH) is integrated into the Teaching and Research Institute, Molecular Oncology Research Center, Clinical Research Unit, and master's and Ph.D. Program in Oncology and is the basis for the development of personalized oncology in our institution. To corroborate the evolution, scientific research importance and essential nature of the link between teaching and treatment at BCH, in 2018, a ranking carried out by Scimago Institutions Rankings (SIR), which considers the results obtained based on social impact and innovation in research, ranked BCH as a leader among Latin American institutions, and it has remained in the top positions (Scimago 2020).

The BB-BCH stores an extensive collection of different cryopreserved biological materials from adult patients and children with all tumor types treated at BCH from different regions of the country, in addition to normal samples of healthy/non-cancer individuals (for case-control studies), enabling the development of oncological research in the Brazilian population. The BB-BCH has also supported several international consortia and projects, such as the Latin American-USA Cancer Research Network (USLANCRN), The Cancer Genome Atlas (TCGA), and the International Genome Consortium (ICGC).

This article aimed to describe BB-BCH's history, experiences, and outcomes and to explore its impact on the Brazilian translational oncological research scenario.

## Methods

Historical overview of the biobank of the Barretos cancer hospital

The biobank of Barretos Cancer Hospital (BB-BCH) was founded in 2006 to store and process biological material, such as tumor tissue, blood and its derivatives, cervical cytological material, and other fluids, from cancer patients and non-cancer individuals for biomedical research purposes. Initially, it was a bank of tumor tissue following the Brazilian National Research Ethics Commission (CONEP) (Amorim 2019), which approved the bank in 2012. The mission of the BB-BCH is to collect, store, and manage cryopreserved human biological samples to provide high-quality biospecimens for research and therefore contribute to scientific advances and innovation in molecular oncology. Classified as a repository of a specific disease (a “tumor bank”) for multiple users (a polyuser biobank), the BB-BCH has a collection of frozen human biological samples and associated data (Riegman et al. 2008; Watson and Barnes 2011; Arampatzis et al. 2016). Some data sets are gathered from each sample, such as its topography, tumor type, sex, and others, for which the information was previously determined by the responsible researcher for the study (Ministério da Saúde 2011). The BB-BCH collection has institutional and nonprofit responsibilities.

The BB-BCH established an organized collection of biological material for a biobank that initiates with the recruitment of patients and the administration of the informed consent form to cancer patients of the institution, as well as healthy/non-cancer individuals, and finishes with the storage of the biological sample under cryopreservation, ensuring minimal variability in collection procedures and enabling the execution of projects with different designs, including case-control studies. Researchers, surgeons, pathologists, nurses, biologists, biomedical staff, and administrative staff can guarantee the quality of this process, which follows international guidelines recommended for biobanks (Fig. 1). The biobank team is focused to guarantee the more efficiency during material collection, assuring that all biological samples (tissue and blood) are of a good quality to be used on research.

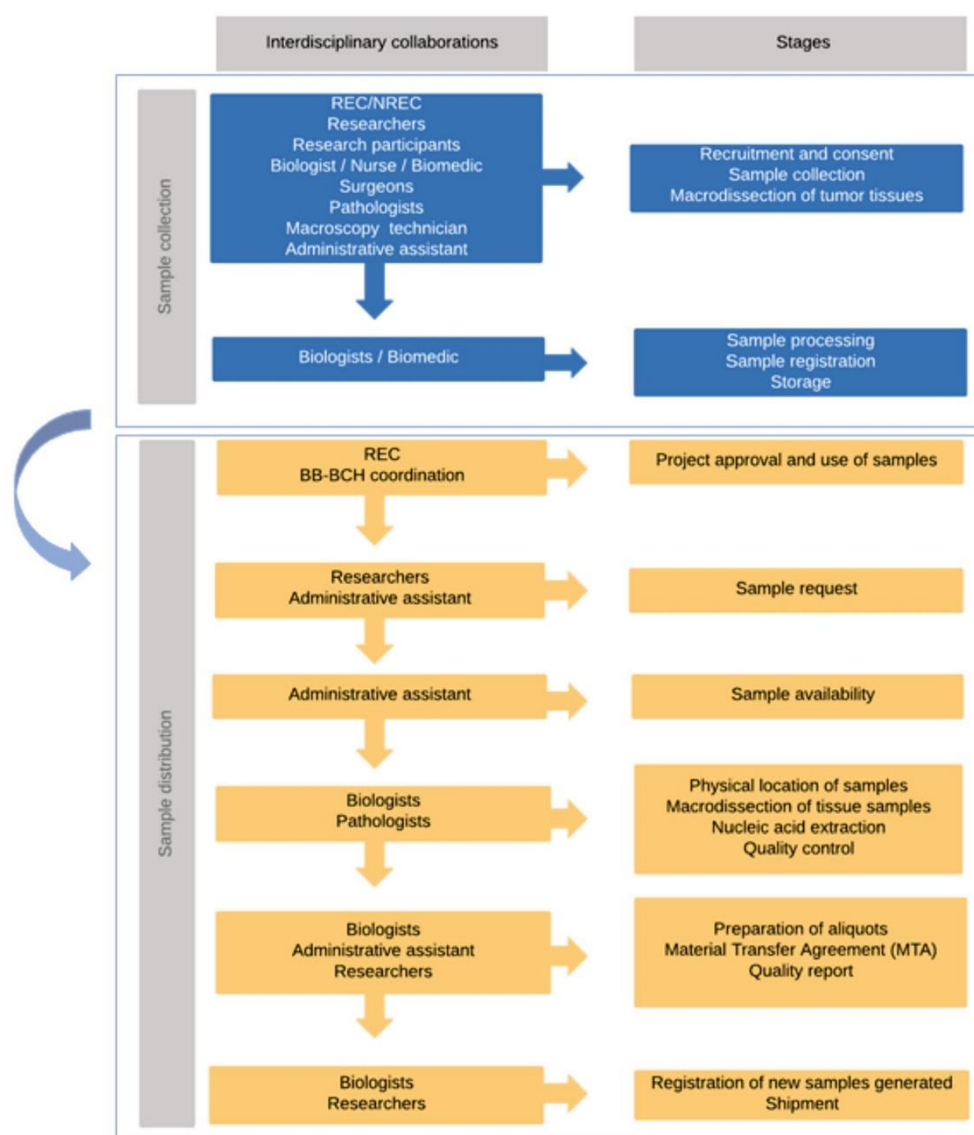
All preanalytical steps from patient recruitment to registration and the storage of samples are performed

by BB-BCH professionals following the appropriate BCH-SOPs (Barretos Cancer Hospital - Standard Operating Procedures), ensuring the quality of processes and the suitability of the biospecimens for research. This organized collection is essential for maintaining the quality of BB-BCH processes, which will directly impact the analytical phase, representing the actual application of samples in research and the resulting data (Betsou et al. 2010; Goebell and Morente 2010; Hong et al. 2010; Caboux et al. 2013; Auer et al. 2014; Hassis et al. 2015; Zhou et al. 2015; Fan et al. 2019).

## Recruitment and informed consent

Due to the importance of prevention sectors at BCH that focus on screening and early detection of cancers, BCH has increased interest in research using samples from cancer patients and non-cancer individuals. Consequently, it was necessary to develop a specific informed consent form (ICF) for each group of participants. Both forms follow the guidelines of CONEP (Amorim 2019).

The informed consent process to either patients or non-cancer individuals initiates with the distribution of the ICF, which contains a brief explanation of the participation, risks and benefits, confidentiality and data privacy, and withdrawal options written in an understandable language to the participant. The ICF is specific to BB-BCH samples, was previously approved by CONEP, and considers local legal and ethical requirements applicable to the consent process. Participation is voluntary, and the individual may refuse or withdraw the form at any time without influencing his treatment or hospital care (Ministério da Saúde 2012; Marodin et al. 2013). This consent process can be private or in a group and requires trained professionals to explain and answer questions regarding the use of biological samples stored in a biobank. Those professionals may be nurses, biologists, biomedical staff, or others related to health areas, and they are trained by the Researcher Support Center, the sector responsible for managing research projects at BCH. Participant signature of the ICF implicates their acceptance of the terms for the storage of their biological specimens in the BB-BCH for research purposes. Biobank participants are allowed to choose whether they want to receive the results obtained from research on their biological material,



**Fig. 1** Interdisciplinary collaboration at each stage of sample collection and sample distribution

and they should give consent for the return of the results.

For underage or disabled patients, the professional should follow resolution CNS 466/2012, in addition to

administering the ICF, which will be signed by parents or legal guardians, as it is still necessary to have consent from one parent. The document should be in a language that is accessible to the patient for whom it is



intended, and it can be in the form of playful material, such as figures, to guarantee clarity and agreement by the patient (Ministério da Saúde 2012).

#### Data sets and biospecimen collection

The data sets collected from the research participants, as well as the data related to the sample, include hospital record number, age, address, the date of admission, project number, anatomical site, treatments, diagnosis, consent date, the type of biological material, the percentage of tumor cells and necrosis (tissues), sample barcode, the date of collection and storage, the volume of material, and the location of sample storage. We consider eligible for participation all patients with a confirmed diagnosis who have not yet been treated, preferably those who have the possibility of having both tumor tissue (surgery) and blood stored. However, the BB-BCH also has biological material from patients who received treatment already because some of them undergo neoadjuvant therapies, which means that they received treatment before surgery. Thus, sometimes it is possible to find only the blood sample that was previously collected for treatment. Even so, the tissue is collected in the same way at surgery, and all information about any procedure is available to the researcher.

We standardized the blood draw to 25 mL of peripheral blood (BD Vacutainer EDTA® BD SST® advance gel) according to the manufacturer's instructions and following the specific BCH SOP guidelines. The previously identified samples, with a tag containing the patient's Hospital Registry (RH) number, name, date of birth, mother's name, and location, are sent to the BB-BCH laboratory for processing and registration using the biobank sample management program, NorayBanks (NorayBio, Derio, Spain). After the centrifugation of peripheral blood, the plasma, serum, and buffy coat aliquots are separated using the automated platform Genesis Freedom® (Tecan, Männedorf, Switzerland). The samples are registered in the NorayBanks system so that the entire data set (clinical, storage, and processing) receives a specific 1D bar code that identifies each sample. All samples remain stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in an ultra-freezer until they are used in research.

Tumor tissue is removed during surgery at the Surgical Center (SC-BCH) for adult and pediatric

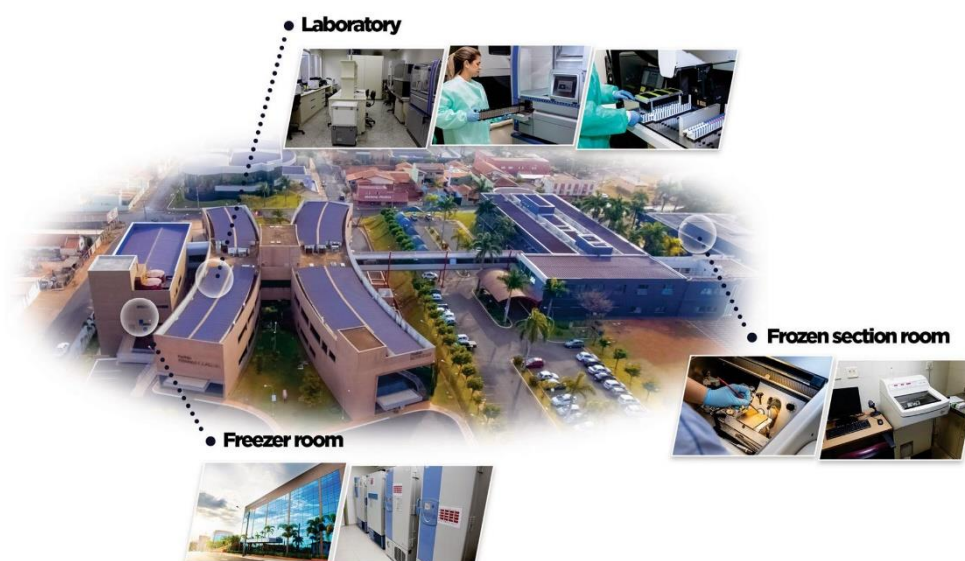
oncology patients who have signed the BB-BCH's ICF, following the specific BB-BCH SOP. At least one fragment of approximately 1 cm representing the tumor area is collected and reviewed by a biobank pathologist in the SC-BCH. The fragments are immediately frozen in liquid nitrogen at the vapor phase, respecting the cold ischemia time determined previously by our group (Viana et al. 2012). The following steps include the microdissection technique, where the fragment is cut into thin sections (approximately  $5\text{ }\mu\text{m}$ ), transferred to a slide, stained with hematoxylin-eosin (HE), and evaluated by a pathologist. Only samples that have a neoplastic area  $\geq 60\%$  and  $\leq 20\%$  necrosis are sent to the BB-BCH. Then, tissue samples are correctly registered and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. It should be noted that in the current collection, it is still possible to find tumor tissue samples outside the biobank criteria mentioned above because until 2018, all tissues collected were sent for storage without microdissection and pathologist analysis, as this procedure was performed only if the researcher requested it.

#### Infrastructure

The BB-BCH has a modern infrastructure of approximately  $100\text{ m}^2$ . This area is divided into a laboratory and two freezer rooms, and there is a freezing room integrated within the Pathology Department at the Surgical Center (SC-BCH) and Molecular Oncology Research Center, all these areas are restricted to only authorized staff (Fig. 2).

In the laboratory, biological and genetic samples are received and processed using automated platforms. The BB-BCH's equipment set includes a cryostat (Leica, Buffalo Grove, IL, USA); a Genesis Freedom® automatic pipettor (Tecan, Männedorf, Switzerland); an automated QIASymphony® platform (Qiagen, Hilden, Germany); two microfluidic electrophoresis systems, Bioanalyzer and TapeStation (Agilent, Santa Clara, CA, USA); two spectrophotometers, Nanodrop 2000 and Nanodrop one (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); and a fluorometer, Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The BB-BCH has two freezer rooms with a  $\text{CO}_2$  monitoring system, which can be activated in case of emergency. The room temperature is monitored 24 h a day, and if the room temperature exceeds  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the



**Fig. 2** Distinct sectors of the Barretos Cancer Hospital Biobank (BB-BCH)

system recruits a responsible biological team on duty at the time. The biological team on duty, when recruited, should carry out the contingency plan, which is to transfer the samples from one freezer to another (backup). Access to these rooms is restricted to people authorized by the BB-BCH. Moreover, the monitoring system also gives statistics and graphs from each monitored equipment at regular time intervals; those data are mainly crucial during audits and/or anomalies. Currently, the BB-BCH has 12 freezers at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with a capacity of 24 to 56 thousand samples, and two freezers at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Finally, the BB-BCH has a freezing room integrated within the Pathology Department at the SC-BCH, where pathologists and technicians receive surgical material, perform the microdissection and collect samples to send to the BB-BCH.

Request for and the use of biobank specimens in research projects

To either request pre-existing samples or store samples collected prospectively in the biobank, a researcher must submit a project proposal that contemplates the use of cryopreserved biological samples

for approval by our local Research Ethics Committee, whose responsibility is to evaluate research projects and protect potential participants in the study (Bon-tempo 2000). In the case of retrospective collection, prior to project submission to the CEP, the administrative staff of the BB-BCH will provide a list of available samples that meet researchers' criteria.

Once the CEP approves the project, the researcher must register the research project in the NorayBanks system, the biobank management software. After the completion of a document checklist, the BB-BCH starts processing or providing samples for the study. The main processes in the BB-BCH are (i) the isolation of genetic material (DNA or RNA) using the automated platform QIA-symphony®; (ii) quality assessment of isolated DNA/RNA by NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) instruments; and, whenever requested by the researcher, an analysis of the integrity of the genetic material using TapeStation (Agilent, Santa Clara, CA, USA). In most cases, the BB-BCH provides aliquots of genetic material and, in a few cases, the entire biospecimen. Along with the isolated DNA/RNA, the BB-HCB provides the quality reports of samples, as well as the Material Transfer



Agreement (MTA) duly signed by the researcher, the coordinator of the BB-BCH and the responsible biologist.

## Results

### Number of samples and participants

From 2006 to December 2019, 252,069 biological samples were stored at the BB-BCH. Of those samples of those samples, 89% (224,341.41 samples) were from participants with cancer and 11% (27,725.59 samples) were from non-cancer participants (healthy controls). All stored biological samples were collected from 44,933 participants from different Brazilian regions, providing significant representativeness of the Brazilian population (Fig. 3).

As expected, due to the Barretos location, we observed greater representativeness of patient samples from the Southeast (75 %), followed by the Central-West (16 %) and North (6 %) regions of Brazil. The Northeast and South regions had the lowest number of participants with stored samples, 1.3 %, and 1 %, respectively.

Currently, the BB-BCH has approximately 15 different biospecimens collected and stored (Table 1).

### Cancer sites

In the BB-BCH, there is a broad representation of adult ( $\geq 20$ -year-old) tumor types, which reaches approximately 96.28% of all samples. The BB-BCH also has an extensive sample collection obtained from various anatomical sites, such as the central nervous system; skin; breast; hematological, gynecological, urological, and digestive systems; head and neck; thorax; and skeletal system (Fig. 4). Furthermore, approximately 3.72% of the BB-BCH collections are samples from childhood and adolescent tumors, which are classified as torso and limb (27%), central nervous system (15%), and lymph nodes/bone marrow (14%) samples. Control samples do not have an associated topography because they are obtained from non-cancer patients (Fig. 4).

For men, the four topographies that show the highest percentage of stored samples are head and

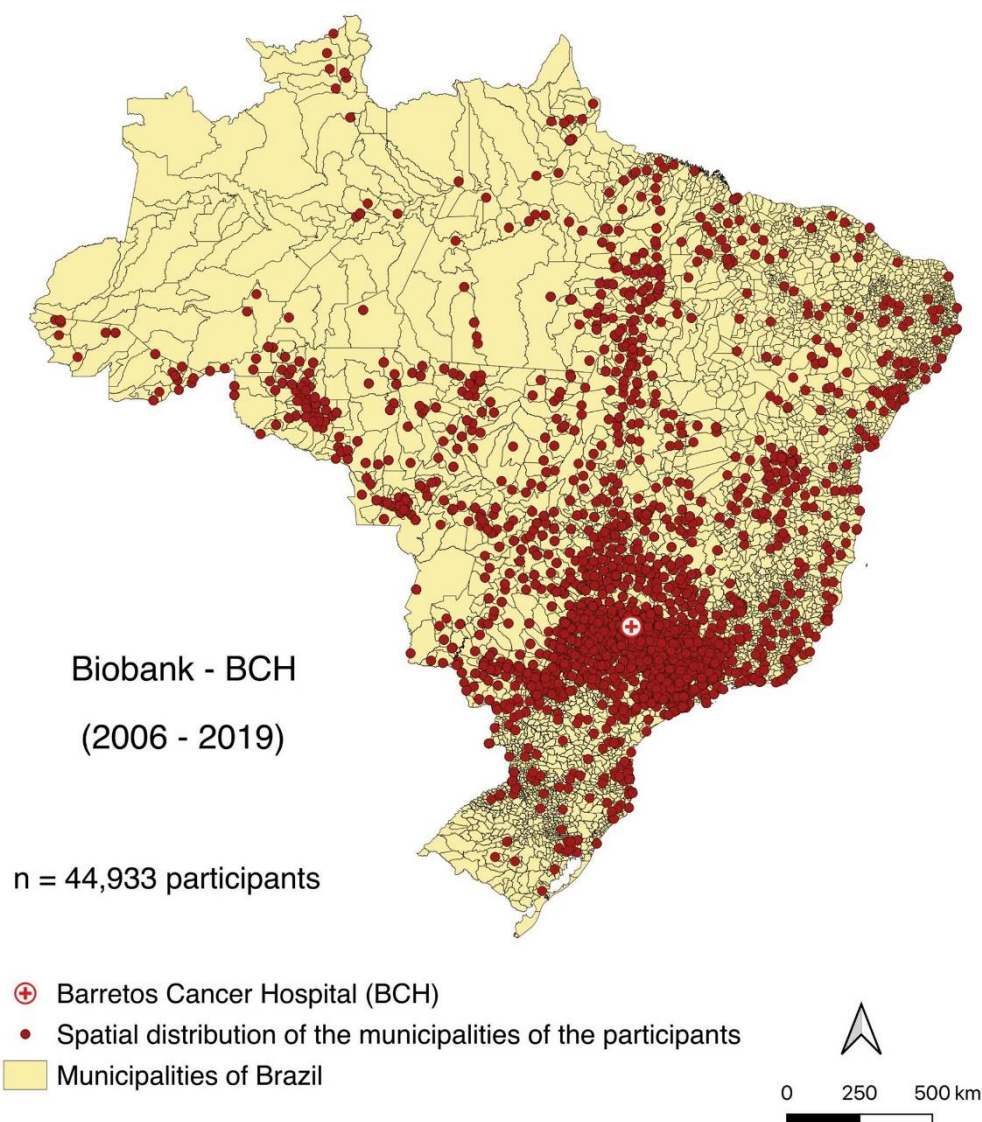
neck (29%), upper digestive (17%), lower digestive (16%), and genitourinary tract (12%) samples. In women, breast (28%), lower digestive (20%), gynecological (13%), and head and neck (9%) samples are the most represented.

### Standard operating procedures (SOPs)

As recommended by international guidelines (the International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) and the IARC (Mendy et al. 2017; Campbell et al. 2018), the BB-BCH has its own Standard Operating Procedures (SOPs) to guarantee the reproducibility and quality of processes. These SOPs have been developed throughout the history of the BB-BCH and, according to necessity, always aim to meet international guidelines (mentioned above— IARC and ISBER) for accuracy (Institute 2016).

The administration of the ICF is performed by a person exclusively responsible for and trained in ensuring proper ICF administration and the quality of the biological material obtained. The BB-BCH has a vacuum blood sample collection kit (BD Vacutainer EDTA® and BD SST® advance); therefore, once the patients sign the BB-ICF, their blood sample will be collected. This kit includes the collection of approximately 25 mL of peripheral blood, corresponding to 1 BD SST® advance collection tube and four BD Vacutainer EDTA® collection tubes. Afterward, these samples are sent and processed at the BB-BCH within 3 h by the automated platform Genesis Freedom® (Tecan, Männedorf, Switzerland), which can process 64 samples in 30 min. This kit is based on the minimum amount of peripheral blood samples necessary to be collected to be used in different molecular oncology research studies, including liquid biopsy studies.

For the registration and management of those stored samples at the BB-BCH, we use NorayBanks (<https://www.noraybio.com/productos/noraybanks-software-gestion-colecciones-muestras>), a software program from the Spanish company NorayBio (<https://www.noraybio.com/>) that was designed specifically for the management of collections of biological samples. It is customized according to the user's needs and applications, and this software is used worldwide by other biobanks from different countries, such as Spain, Italy, Norway, Argentina, Chile, and Uruguay. The BB-



**Fig. 3** Spatial distribution of Barretos Cancer Hospital Biobank (BB-BCH) participants

BCH has a 24-h temperature monitoring system at the freezer rooms with real-time access via the internet with Sensorweb software ([sensorweb.com.br](http://sensorweb.com.br)).

Sample processing and genetic material extraction (DNA and RNA) are performed by the automated

platform QIASymphony (Qiagen, Hilden, Germany). Tumor tissue is processed according to initial quality control parameters based on international guidelines and following the criteria of approximately  $\geq 60\%$

**Table 1** Types of biological samples collected and stored at Barretos Cancer Hospital Biobank (BB-BCH)

Type of biological sample	% of samples
Plasma	30.31
Buffy coat	23.55
Serum	14.07
Tumor tissue	13.24
Normal tissue	7.83
Whole Blood	4.37
Oral rinse	2.22
Hemacea	2.15
Faecal immunochemical test (FIT)	0.74
Metastatic tissue	0.54
Liquid based cytology (LBC)	0.42
Urine	0.25
Bone marrow	0.24
Sputum	0.05
Skin	0.03

neoplastic cells and  $\leq 20$  % necrosis (Organisation for Economic Co-operation and development 2018).

#### Biobank-BCH committee

The BB-BCH has a scientific committee composed of five members and an office assistant, and the purpose of this committee is to discuss topics related to the regulation of sample usage, storage, and the manipulation of biological samples in research. Therefore, the main roles of the BB-BCH committee are as follows: (i) to define guidelines for the release and distribution of biological samples placed at BCH; (ii) to monitor and regularly define the BB-BCH indicators; (iii) to evaluate, directly or through a special commission, research projects that aim to use biological samples, respecting the BCH's intellectual property policies; and (iv) to create a plan and establish some criteria related to how the biological samples will be available to approved research projects, following the institutional policy according to SOPs.

If a researcher's does not adequately meet the criteria outlined above, they may be forbidden to use new samples.

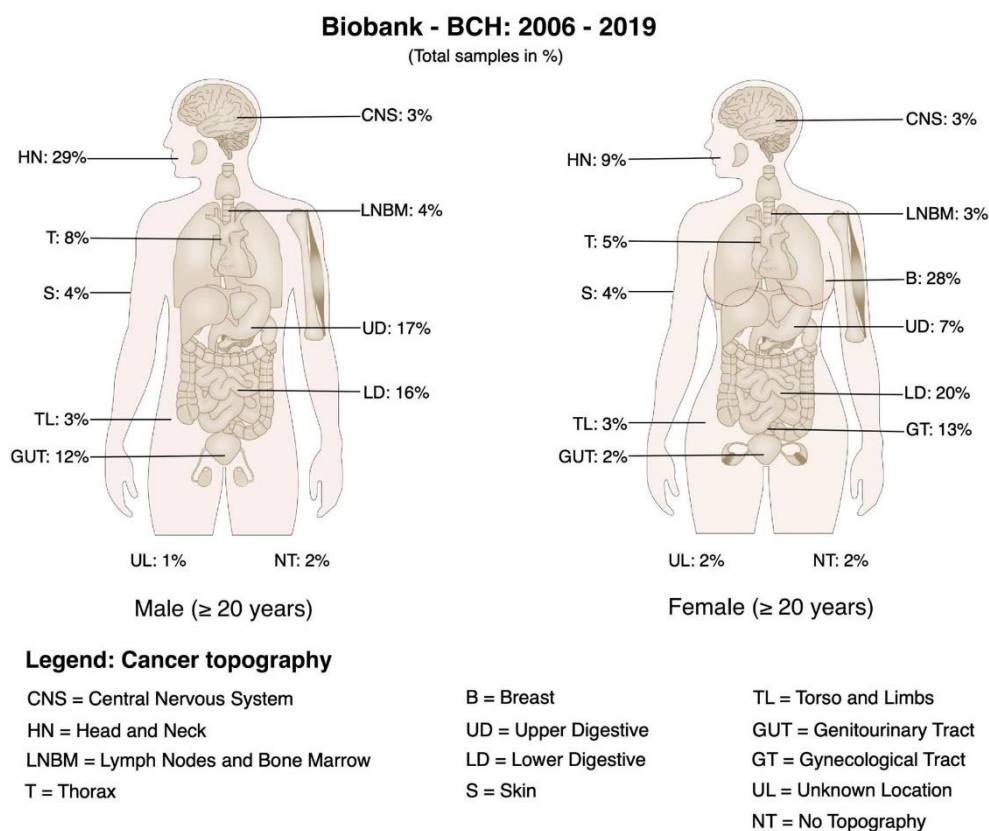
#### Collaborations and sample usage in scientific research

The BB-BCH is central to countless studies developed by BCH researches from the Molecular Oncology Research Center, BB-BCH has collaborated with 157 project (68 completed and 89 in progress), moreover, approximately 159 articles were published in partnership with the BB-BCH during these period. Additionally, it has also been used in several collaborative studies between BCH researchers and other institutions, including the A.C. Camargo Cancer Center, the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), USP (University of São Paulo), UNESP (São Paulo State University), Sírio-libanês Hospital, the MD Anderson Cancer Center (USA), Duke University (USA), Rice University (USA), McGill University (Canada), I3S (Portugal), Minho University (Portugal), and the International Agency for Research on Cancer (IARC, France), among others.

In addition to participation in bilateral studies, the BB-BCH plays an essential role in several international consortia. As part of the Latin American Cancer Program Development (OLACPD), the BB-BCH started a pilot project with the National Cancer Institute (NCI) in 2010. The aim was to characterize the molecular profile distribution of invasive breast cancer at stages II or III in Latin American women. The study included a prospective cohort of 200 women, with 2 years of recruitment, and it involved the collection of blood, tissue and biopsy samples, clinical data, and DNA and RNA extraction. Another collaboration with the NCI was through The Cancer Genome Atlas (TCGA) project. In this study, the BB-BCH sent 340 paired tumor and healthy tissue samples, with bladder, head and neck, stomach, esophageal and cervical topographies, and the clinical data from each participant (National Cancer Institute; Burk et al. 2017; Gao et al. 2018; Wang et al. 2018).

The first study related to exome analysis initiated in 2014, together with the International Cancer Genome Consortium (ICGC). This study performed a whole-genome sequencing of paired tumor and healthy tissue from 120 patients with melanoma, and it allowed the researchers to understand the somatic and germinative mutational profiles of melanomas that affect Brazilian patients (International Cancer Genome Consortium). After that, other exome projects have been carried out on different tumor types, such as those from the lung,





**Fig. 4** Distribution of cancer site of samples stored at Barretos Cancer Hospital Biobank (BB-BCH)

esophagus, breast, and rectal colon. Currently, the BB-BCH has approximately 70 active research projects and has completed 68 projects. These projects have contributed to translational cancer research and helped with SOP implementation and quality control of cryopreserved samples at the BB-BCH.

Overall, from 2006 to 2019, BB-BCH provided approximately 26,399 biological samples (with a utilization rate of 10 %) to different research projects, and those samples could be either whole-blood/tissue or DNA-RNA extraction samples.

### Discussion

The biobank's value is related to providing high-quality biological samples and associated data for research, enabling increased knowledge about a disease and, consequently, the discovery of new treatments. In the last 14 years, the BB-BCH has contributed to many types of cancer research, providing quality biological samples and/or nucleic acids. Although the number of samples used in research has increased over the years, one of the challenges of the BB-BCH, similar to other biobanks around the world, is to increase the usage of already-collected biospecimens, which would result in increased turnover of the already-stored collection. A survey with US biobank managers showed that 70% of them are concerned

about the underuse of biospecimens in their repositories. A research leader from Chapel Hill said “They have an imperative to collect, but they really want to make sure the specimens are used, and they worry about how to make that happen” (Scudellari 2013). The main factors that contribute to this problem include poor sample quality and associated data, restrictive policies that allow access to these samples only to associated researchers, and a lack of available collection at domestic and remote locations (Scudellari 2013; Sawyer et al. 2015; Betsou et al. 2016; Lawrence et al. 2020). To increase the usage of biospecimens and improve their quality, the BB-BCH has been establishing an extensive network with companies and researchers. Therefore, the BB-BCH has already been promoted at events organized by renowned institutions such as the Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI-ERIC) (BBMRI-ERIC 2020) and ISBER (Campbell et al. 2018), which resulted in the inclusion of the BB-BCH as a member of the Biobank and Cohort Building Network (BCNet) (IARC 2021).

Furthermore, in 2019, the BB-BCH organized the first national event on theme of biobanks, called “Latin-American Symposium and Training in Biobanking of Barretos Cancer Hospital”, which gathered researchers from biobanks from different regions of Brazil and international members, including the IARC Biobank, Nationwide Children’s Hospital USA, Texas Children’s Hospital, the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet), the National Cancer Institute of Mexico (INCAN) and the National Cancer Institute of Bogotá (INC). This event promoted interaction, discussion, and training between individuals from national and international biobanks and translational medicine researchers. These initiatives were essential to increase BB-BCH visibility before the scientific community, and they also contributed to training the biobank team and adapting procedures.

As mentioned above, the BB-BCH has implemented many standard operating procedures (SOPs) according to international guidelines (Fransson et al. 2015; Institute 2016). Moreover, the BB-BCH has been developing an internal quality control program to analyze the quality of the collected and stored biospecimens each year. The BB-BCH has been working over the years to increase the value and the quality of its sample collections with the goal of reaching international certification. Ensuring the

quality of samples collected and stored in biobanks is essential to guarantee the reproducibility of studies. For this reason, quality verification and standardization processes have been growing among biobanks and represent the major challenge for institutions (De Souza and Greenspan 2013; Tarling et al. 2020). Several standardization programs are used by the biobank community to provide different levels of assessment, such as the certification program of the Canadian Tissue Repository Network (CTRNet), the International Organization for Standardization (ISO) and the College of American Pathologist Biorepository Accreditation Program (CAP BAP) (McCall et al. 2018). The ISO Certification is the most current and involves external evaluation by an authorized and nationally approved organization (Allocca et al. 2017; Furuta et al. 2018; Tarling et al. 2020). The choice of which standardization to apply for can vary according to each biobank’s focus, its extension, and financial support associated with the implementation cost of the chosen standardization (Tarling et al. 2020). In 2013, the Biotechnology Technical Committee of the International Organization for Standardization (ISO/TC276) was created, which has a workgroup (WG2) focused on biobanks and bioresources (Allocca et al. 2017; Furuta et al. 2018). This group is led by Germany, and it is composed of members from 30 countries and organizations, for example, ISBER and BBMRI-ERIC (Furuta et al. 2018). This group has developed nine regulations, such as ISO: 20,387 *General requirements for biobanking*, which are used as a reference for the development of other more specific standards and established requirements to ensure the quality of biological samples and associated data (Furuta et al. 2018; ISO 2018). In Brazil, there is a commission similar to ISO/TC276, called the Commission of Specialized Study of the Brazilian Association of Technical Standards (ABNT/CEE-276-Biotechnology), coordinated by the National Institute of Metrology, Quality, and Technology (INMETRO), and its members discuss the ISO 20,387:2018 standard inclusion and predict that in 2020, a national version of this normative in Portuguese will be established (INMETRO 2019). The implementation of this standard in Brazil will represent a valuable tool to guarantee the quality, suitability, standardization, and reproducibility of biobank activities, and it will create an excellent opportunity for the BB-BCH and



other Brazilian biobanks since there is no specific ISO biobank in Brazil.

Finally, The BB-BCH is an institutional repository that, since its foundation, has stored human biological samples and associated data, supporting translational oncology research, for 14 years. This tumor bank represents an important knowledge source for the scientific community, enabling the development of high-quality studies due to a large number of stored samples, a wide variety of tumor categories and high national representativeness due to BCH's reach to all regions of Brazil. In addition, the benefits brought with the establishment of the BB-BCH reach not only researchers but also patients. The knowledge generated by studies in which these samples are used contributes to a better understanding of neoplasms and their development and improves treatments and the discovery of new therapies.

**Acknowledgements** The authors are grateful to the Barretos Cancer Hospital, including all departments involved in the creation and collection of specimens, particularly the Pathology Department and Surgical Center, national and international partners, and all participants who agreed to donate their biological samples, enabling the formation of this collection.

**Authors' contributions** ACN performed the preparation of tables, figure, gathered data information and wrote the manuscript. CHT gathered information related with biobank data. AGR performed the preparation of tables, figure and wrote the manuscript. GTM, TTK and CDR wrote the manuscript and revised it. VDS pathologist and BB-BCH vice-coordinator supervised the manuscript and its development. ECM and RMR provided advice during the study development and critically reviewed the manuscript. MMCM designed the project, supervised the research development, and wrote all the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

**Funding** This work was funded by the Financier of Studies and Projects (Finaciadora de Estudos e Projeto do Ministério da Ciência e Tecnologia - FINEP), the Public Ministry of Labor (Ministério Público do Trabalho - MPT), Barretos Cancer Hospital (BCH) and the São Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP/Protocol 2018/22100-0).

**Availability of data and materials** The datasets generated and/or analyzed during the current study are not publicly available due to it is confidentiality once it involved patients personal information but are available from the corresponding author on reasonable request.

**Code Availability** Not Applicable.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

## References

- Allocca CM, Bledsoe MJ, Furuta K, Ramirez NC (2017) ISO/TC276/WG2 biobanks and bioresources: draft international standard is now available for comment. *Biopreserv Biobank* 15:399–401. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.29025.cma>
- Amorim KPC (2019) Research ethics in the Brazilian CEP-CONEP system: necessary reflections. *Cienc e Saude Coletiva*. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018243.35292016>
- Arampatzis A, Papagiouvanni I, Anestakis D, Tsolaki M (2016) A classification and comparative study of European biobanks: an analysis of biobanking activity and its contribution to scientific progress. *Arch Med* 8:1–10
- Auer H, Mobley J, Ayers L et al (2014) The effects of frozen tissue storage conditions on the integrity of RNA and protein. *Biotech Histochem*. <https://doi.org/10.3109/10520295.2014.904927>
- BBMRI-RIC (2020) BBMRI-ERIC. <https://www.bbmri-eric.eu/>
- Betsou F, Bulla A, Cho SY et al (2016) Assays for qualification and quality stratification of clinical biospecimens used in research: a technical report from the ISBER biospecimen science working group. *Biopreserv Biobank* 14:398–409. <https://doi.org/10.1089/bio.2016.0018>
- Betsou F, Lehmann S, Ashton G et al (2010) Standard preanalytical coding for biospecimens; defining the sample PREanalytical code. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19:1004–1011. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-1268>
- Bontempo C (2000) O Sistema CEP/CONEP (\*). *Cad Ética em Pesqui* 1–10
- Bray F, Cueva P, Korir A et al (2014) Planning and developing population-based cancer registration in low-and middle-income settings. International Agency for Research on Cancer, Lyon
- Burk RD, Chen Z, Saller C et al (2017) Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature* 543:378–384. <https://doi.org/10.1038/nature21386>
- Caboux E, Paciencia M, Durand G et al (2013) Impact of delay to cryopreservation on RNA integrity and genome-wide expression profiles in resected tumor samples. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079826>
- Campbell LD, Astrin JJ, DeSouza Y et al (2018) The 2018 revision of the ISBER best practices: summary of changes and the editorial team's development process. *Biopreserv Biobank* 16:3–6. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0001>
- Cameseca EC, Mauad EC, Araujo MAA, De et al (2013) The hospital de Câncer de barretos registry: an analysis of cancer survival at a single institution in Brazil over a 10-year period. *BMC Res Notes*. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-141>



- Coppola L, Cianflone A, Grimaldi AM et al (2019) Biobanking in health care: evolution and future directions. *J Transl Med* 17:1–18. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1922-3>
- De Souza YG, Greenspan JS (2013) Biobanking past, present and future: responsibilities and benefits. *AIDS* 27(3):303. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835c1244>
- Fan XI, Huang Y, Wu PH et al (2019) Impact of cold ischemic time and freeze-thaw cycles on RNA, DNA and protein quality in colorectal cancer tissues biobanking. *J Cancer* 10:4978–4988. <https://doi.org/10.7150/jca.29372>
- Fransson MN, Rial-Sebbag E, Brochhausen M, Litton JE (2015) Toward a common language for biobanking. *Eur J Hum Genet* 23:22–28. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.45>
- Furuta K, Allocca CM, Schacter B et al (2018) Standardization and innovation in paving a path to a better future: an update of activities in ISO/TC276/WG2 biobanks and biorepositories. *Biopreserv Biobank* 16:23–27. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0117>
- Gao Q, Liang WW, Foltz SM et al (2018) Driver fusions and their implications in the development and treatment of human cancers. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.050>
- Goebell PJ, Morente MM (2010) New concepts of biobanks—strategic chance for uro-oncology. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 28:449–457. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2010.03.012>
- Greenwald ZR, Fregnani JH, Longatto-Filho A et al (2018) The performance of mobile screening units in a breast cancer screening program in Brazil. *Cancer Causes Control*. <https://doi.org/10.1007/s10552-017-0995-7>
- Hassis ME, Niles RK, Braten MN et al (2015) Evaluating the effects of preanalytical variables on the stability of the human plasma proteome. *Anal Biochem*. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.003>
- Hong SH, Baek HA, Jang KY et al (2010) Effects of delay in the snap freezing of colorectal cancer tissues on the quality of DNA and RNA. *J Korean Soc Coloproctol* 26:316–323. <https://doi.org/10.3393/jksc.2010.26.5.316>
- Hospital de Amor (2017) História - Hospital de Câncer de Barretos. <https://www.hcancerbarretos.com.br/institucional/historia>. Accessed 3 Mar 2020
- IARC (2020) Cancer tomorrow. In: *Cancer Tomorrow*. <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>
- IARC (2021) BCNet: biobank and cohort building network. <https://benet.iarc.fr/>
- INCA (2020) Estimativa | 2020 Incidência de Câncer no Brasil
- INMETRO (2019) Comissão discute internalização da norma ISO sobre biobancos. <https://www4.inmetro.gov.br/Comissao-discute-internalizacao-da-norma-ISO-sobre-biobancos>. Accessed 14 Apr 2020
- Institute NC (2016) NCI Best Practices for Biospecimen Resources. 1–81
- International Cancer Genome Consortium Brazil—Melanoma. <https://icgc.org/icgc/cgp/71/299/1001986>
- ISO (2018) ISO 20387:2018 Biotechnology—Biobanking—General requirements for biobanking. <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/06/78/67888.html>. Accessed 17 Apr 2020
- Kinkorová J (2016) Biobanks in the era of personalized medicine: objectives, challenges, and innovation. *EPMA J* 7:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13167-016-0053-7>
- Lawrence E, Sims J, Gander A et al (2020) The barriers and motivators to using human tissues for research: the views of UK-based biomedical researchers. *Biopreserv Biobank*. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0138>
- Marodin G, Salgueiro JB, Da M et al (2013) Brazilian guidelines for biorepositories and biobanks of human biological material ☆. *Rev Assoc Med Bras* 59:72–7772
- McCall SJ, Branton PA, Blanc VM et al (2018) The college of American pathologists biorepository accreditation program: results from the first 5 years. *Biopreserv Biobank* 16:16–22. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0108>
- Mendy M, Caboux E, Lawlor RT et al (2017) Common minimum technical standards and protocols for biobanks. Dedicated To Cancer Research Standards and Protocols
- Ministério da Saúde (2011) Diário Oficial União. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde – Resolução CNS No 441/2011. <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>. Accessed 27 Feb 2020
- Ministério da Saúde (2012) RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466\\_12\\_12\\_2012.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html). Accessed 30 Mar 2020
- National Cancer Institute Tissue Source Site Codes. <https://gdc.cancer.gov/resources-tcga-users/tcga-code-tables/tissue-source-site-codes>. Accessed 8 Apr 2020
- Organisation for Economic Co-operation and development (2018) Guidelines for Human Biobanks and Genetic Research Databases (HBGRDs). <http://www.oecd.org/sti/biotech/guidelinesforhumanbiobanksandgeneticresearchdatabaseshbgrds.htm>
- Palmero EI, Galvão HCR, Fernandes GC et al (2016) Oncogenetics service and the Brazilian public health system: the experience of a reference cancer hospital. *Genet Mol Biol*. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2014-0364>
- Riegman PHJ, Morente MM, Betsou F et al (2008) Biobanking for better healthcare. *Mol. Oncol* 2(3):213–22. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2008.07.004>
- Sawyer SJ, Otto JM, Suh KS (2015) Ensuring biobank value through effective utilization. *Biopreserv Biobank* 13(6):396–400. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.29043.mkh>
- Scimago (2020) Scimago Institutions Rankings. <https://www.scimagoir.com/rankings.php?sector=Health&country=LatinAmerica&year=2012>. Accessed 13 Jun 2020
- Scudellari M (2013) Biobank managers bemoan underuse of collected samples. *Nat Med* 19:253. <https://doi.org/10.1038/nm0313-253a>
- Tarling T, O'Donoghue S, Barnes R et al (2020) Comparison and analysis of two internationally recognized biobanking standards. *Biopreserv Biobank* 18:82–89. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0126>
- Viana CR, Neto CS, Kerr LM et al (2012) The interference of cold ischemia time in the quality of total RNA from frozen tumor samples. *Cell Tissue Bank* 14:167–173. <https://doi.org/10.1007/s10561-012-9313-5>
- Wang Z, Yang B, Zhang M et al (2018) lncRNA epigenetic landscape analysis Identifies EPIC1 as an oncogenic lncRNA that interacts with MYC and promotes cell-cycle progression in cancer. *Cancer Cell* 33:706–720.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.006>

- Watson PH, Barnes RO (2011) A proposed schema for classifying human research biobanks. *Biopreserv Biobank* 9:327–333. <https://doi.org/10.1089/bio.2011.0020>
- Zhou JH, Sahin AA, Myers JN (2015) Biobanking in genomic medicine. *Arch Pathol Lab Med* 139:812–818. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0261-RA>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.