

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE
XENOENXERTO ORTOTÓPICO DE METÁSTASE
HEPÁTICA DE CANCER COLORRETAL EM
CAMUNDONGO IMUNODEFICIENTE**

BRUNO ROQUE LIMA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para a
obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Oncologia**

Orientador: Dr. Rubens Chojniak

Co-orientador: Dr. Tiago Goss dos Santos

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lima, Bruno Roque

Desenvolvimento de modelo de xenoinxerto ortotópico de metástase hepática de câncer colorretal em camundongo imunodeficiente / Bruno

Roque Lima - São Paulo, 2018.

38p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Rubens Chojniak

Descritores: 1. Xenoinxerto/Heterografts. 2. Neoplasias Colorretais/ Colorectal Neoplasms. 3. Metástases Neoplásica/Neoplasm Metastasis. 4. Camundongos/Mice. 5. Modelos Animais/Models, Animal.

DEDICATÓRIA

Através da minha família tenho a oportunidade, todos os dias, de evoluir como pessoa, como profissional, moral e espiritualmente. A família é o alicerce de toda grande obra. Dedico esta obra à vocês.

Jú (*in memoriam*), você estava comigo no início dessa jornada, e não importa a distância ou o tempo que leve para nos reencontrarmos, você estará sempre no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Dr. Rubens, um sonho sonhado por mais de uma pessoa é capaz de se transformar em realidade. Minha admiração e gratidão por você é eterna. Obrigado por acreditar e sonhar comigo!

Dr Tiago, ou melhor, Tiagão, ao longo de 4 anos tive a grande oportunidade de conhecer e trabalhar ao lado de um ser humano ímpar. Sempre solicito, sempre ajudando, sempre ensinando, um exemplo a ser seguido. Muito obrigado por todos os ensinamentos, e por toda a ajuda no nosso projeto.

Dr. Eduardo Nóbrega, que apesar das poucas conversas que tivemos, o senhor também foi um grande incentivador e agente motivador para esse projeto acontecer. muito obrigado!!! Um super obrigado também a todas as enfermeiras e biomédicas do departamento de medicina nuclear que nos ajudaram com a manipulação do radio-fármaco.

A pós graduanda Caroline, que além de participar ativamente no desenvolvimento deste trabalho, dedica-se com excelência e maestria em todas as esferas que atua. Minha eterna admiração por você meu amor.

Dra. Maria Dirlei, você é muito gentil! Muito obrigado por sempre estar disponível para nos ajudar com a confecção das laminas, a realização das imunos e por nos ajudar a entender um pouco melhor nossos resultados.

Suely, desde o primeiro dia sempre com um sorriso no rosto e muito boa vontade para nos ajudar sempre que precisamos, o que seria de nós pós-graduandos sem você! Muito obrigado por toda a ajuda!

Aos amigos da pós-graduação, com certeza uma experiência incrível conhecer pessoas com vivências tão diferentes, convergindo em busca de um conhecimento em comum; oncologia.

A patologista Patricia Peresi, por nos ajudar com a confecção e leitura das lâminas.

Ao Sérgio, Francisco e sua equipe por nos proporcionar um delicioso café da manhã em todas as reuniões de quarta-feira.

Sônia, obrigado por nos ajudar com a comunicação com o Dr. Rubens. Você é muito querida!!!!

Departamento de Cirurgia Abdominal, por gentilmente ceder espaço nas reuniões de quartas-feira e me ajudarem na escolha dos pacientes para este estudo. Um agradecimento especial a enfermeira de pesquisa Carol Parucci por toda a ajuda na seleção dos pacientes.

Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) incluindo todos seus colaboradores, de pesquisadores ao pessoal da portaria, os seguranças, os bioteristas. Toda a infraestrutura necessária foi disponibilizada para que nosso projeto pudesse ser realizado.

Ao Departamento da pós graduação, principalmente a Karlinha e a Ana! Obrigado por toda a ajuda!!!

RESUMO

Lima BR. **Desenvolvimento de modelo de xenoenxerto ortotópico de metástase hepática de câncer colorretal em camundongo imunodeficiente.** São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Metástases hepáticas são a maior causa de morte em pacientes com câncer colorretal. Apesar dos tratamentos através de cirurgia e quimioterapia, o prognóstico destes pacientes permanece desfavorável. Portanto, há uma grande necessidade de se desenvolver novas estratégias terapêuticas, através da utilização de um bom modelo animal. Enxertos derivados de Paciente (PDX), são modelos pré-clínicos que representam com acurácia a individualidade do câncer humano. A doença metastática pode também ser reproduzida através da implantação ortotópica do tumor no órgão correspondente no camundongo. Testes com diferentes tratamentos baseados na assinatura genética do tumor podem ser realizados no modelo pré-clínico contribuindo no tratamento do paciente. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo de enxerto tumoral de metástase hepática de cancer colorretal, a partir de fragmento tumoral fresco implantado no parênquima hepático de camundongos atímicos nude. Nós reproduzimos com sucesso tumores metastáticos de pacientes para camundongos, e propagamos em três passagens de camundongos. As características morfológicas e imuno-histoquímicas demonstraram que os enxertos recriaram a arquitetura tumoral e expressaram as proteínas de reparo *MLH1*, *MSH2*, *MSH1*, e *PMS2*. Após a primeira passagem o tempo de crescimento tumoral variou de 153-281 dias para 27-99 dias sem perda de identidade tumoral. Doença linfoproliferativa pós-transplante foi observada em um caso. Este piloto obteve sucesso em estabelecer institucionalmente a plataforma pré-clínica PDX permitindo estudar novas estratégias terapêuticas, progressão da doença, biomarcadores e resposta a tratamento.

SUMMARY

Lima, BR. **[Development of patient-derived orthotopic xenografts from metastatic colorectal cancer in nude mice]**. São Paulo, 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Liver metastasis is the major cause of death for patients with colorectal cancer. Despite treatment with surgery and chemotherapy, patient outcomes are quite unfavorable. Thus, there is an urgent need to develop new treatment strategies, with the associated establishment of good animal models. Patient-derived xenografts (PDX) are preclinical models that accurately represent the individuality of human cancer. Metastatic disease can also be modeled using orthotopic implantation to the corresponding mouse organ to test various treatments based on individualized gene signatures of the human tumor, and results can inform clinical decision-making. The objective of this study was develop metastatic colorectal tumors in athymic nude mice, implanting fresh tumor fragments into mouse liver parenchyma. We successfully propagated metastatic tumors from patients in mice, serially implanted in second and third-generation mice. Morphologic and immunohistochemical characteristics indicate that xenografts recreate the tumor architecture and mismatch repair gene expression for *MLH1*, *MSH2*, *MSH1*, and *PMS2*. After tumor implantation during first passage, the time of tumor growth decreased from 150 to 250 days to 30 to 100 days, without loss of tumor identity. Post-transplantation lymphoproliferative disease was observed in one case. This pilot study was successful in establishing the institutional PDX preclinical platform to study new therapeutic strategies, disease progression biomarkers, and treatment responsiveness.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência e mortalidade de câncer colorretal no Brasil e no mundo.....	1
Figura 2	Incidência e mortalidade de câncer colorretal por região e por sexo no Brasil.....	3
Figura 3	Figura ilustrativa dos cinco estágios do câncer colorretal.....	4
Figura 4	Figura esquemática de propagação tumoral através de implantação em camundongos nude.....	8
Figura 5	Processo de inoculação tumoral em camundongo atímico nude.....	17
Figura 6	Caracterização morfológica e imunohistoquímica das proteínas de reparo de DNA no paciente 1 e seu respectivo PDOX.....	19
Figura 7	Caracterização morfológica e imunohistoquímica das proteínas de reparo de DNA no paciente 2 e seu respectivo PDOX.....	21
Figura 8	Doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD).....	22
Figura 9	Caracterização morfológica e imunohistoquímica das proteínas de reparo de DNA no paciente 6 e seus respectivos PDOX.....	25

Figura 10 Caracterização morfológica e imunohistoquímica das proteínas de reparo de DNA na segunda e terceira passagem tumoral em PDOX do paciente 6..... 26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais protocolos de quimioterapia empregados no tratamento do câncer colorretal.....	6
Quadro 2	Imuno-expressão das proteínas de reparo nas amostras do paciente 1 e seus respectivos xenoenxertos.....	18
Quadro 3	Imuno-expressão das proteínas de reparo nas amostras do paciente 2 e seus respectivos xenoenxertos.....	20
Quadro 4	Imuno-expressão das proteínas de reparo nas amostras do paciente 6 e seus respectivos xenoenxertos.....	24
Quadro 5	Características clínico-patológicas dos pacientes.....	27
Quadro 6	Sumário das características de crescimento do enxerto tumoral.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Adenomatosis Polyposis Coli
BALB/c	Bagg albino
CCR	Câncer colorretal
EBV	Epstein-Barr virus
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MLH1	MutL Homolog 1 - Proteína de reparo de DNA
MSH2	MutS Homolog 2 - Proteína de reparo de DNA
MSH6	MutS Homolog 6 - Proteína de reparo de DNA
PMS2	PMS1 Homolog 2 - Proteína de reparo de DNA
PDOX	Patient-derived orthotopic xenograft
PDX	Patient-derived xenograft
PTLD	Post-transplantation lymphoproliferative Disease
SPF	Specific Patogen Free
TP53	Transformation-Related Protein 53 - Gene supressor tumoral

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	10
2.1	Objetivo Geral.....	10
2.2	Objetivos Específicos.....	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Critério de Inclusão dos Pacientes	11
3.2	Seleção das Amostras Tumorais	11
3.3	Animais de Estudo	12
3.4	Confecção do Xenoenxerto.....	12
3.4.1	Transplante do enxerto tumoral	13
3.5	Avaliação do Crescimento Tumoral	14
3.6	Análise Anátomo-Patológica e Imunohistoquímica	15
3.7	Passagem Tumoral	15
4	RESULTADOS	16
4.1	Confecção do xenoenxerto.....	16
4.2	Paciente 01	18
4.3	Paciente 02	20
4.4	Paciente 03	22
4.5	Paciente 04	23
4.6	Paciente 05	23
4.7	Pacietne 06	23
4.8	Características Clínico-Patológicas dos Pacientes	27
4.9	Período de Crescimento do Enxerto Tumoral.....	28
5	DISCUSSÃO.....	29
6	CONCLUSÃO	34

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	35
----------	--	-----------

ANEXOS

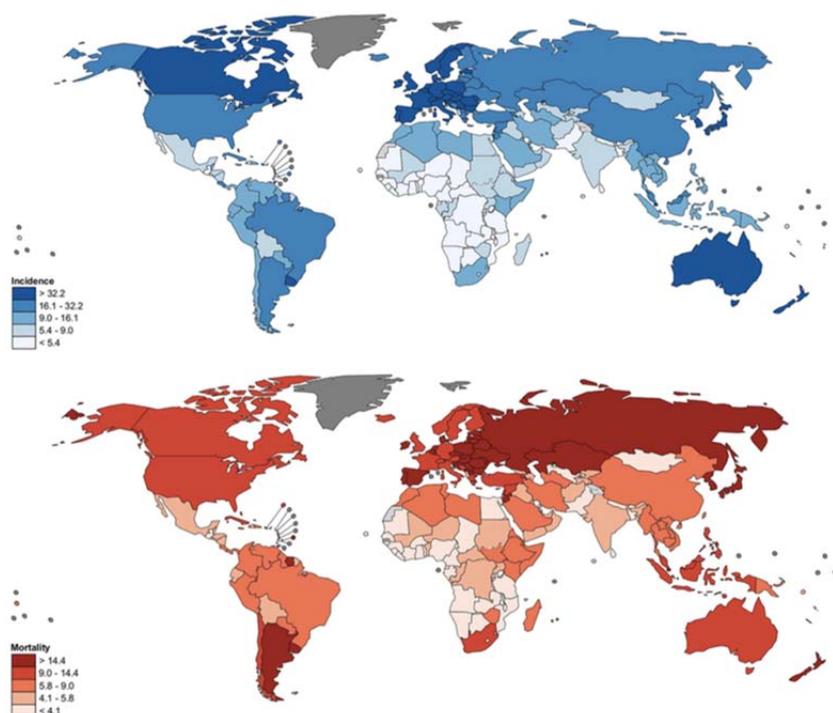
Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais-CEUA

Anexo 2 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é o terceiro câncer mais comumente diagnosticado e está em quarto lugar nas mortes relacionadas ao câncer no mundo. É esperado um aumento de 60% na sua incidência com mais de 2,2 milhões de novos casos e 1,1 milhão de mortes até 2030 ³ (Figura 1).

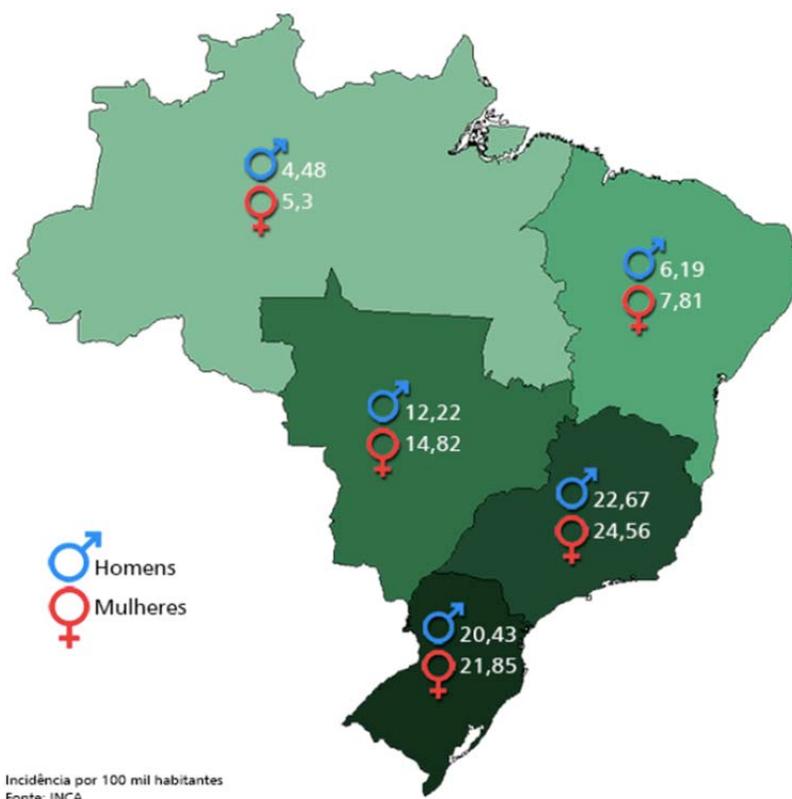
Apesar dos avanços na medicina, principalmente em termos de diagnóstico e tratamento, a mortalidade causada por essa neoplasia é alta, de tal forma que sua sobrevida média global, em cinco anos, tem sido descrita como em torno de 55% nos países desenvolvidos e de 40% para países em desenvolvimento ²⁰



Fonte: ARNOLD ³

Figura 1 - Incidência e mortalidade de câncer colorretal no Brasil e no mundo.

Um estudo que avaliou o número de óbitos por câncer colorretal (CCR) no Brasil por ano, mostrou um aumento crescente no período de 2005 a 2014. Tal fato pode ser observado pela redução de óbitos por doenças infectocontagiosas e do aumento de doenças crônico-degenerativas, dentre elas, o câncer. Em 2005, foram registrados 5,6 óbitos para cada 100 mil habitantes, enquanto em 2014 foram notificados 7,9 óbitos para cada 100 mil habitantes, dados que indicam uma diferença de 5.860 óbitos em números absolutos entre os anos de 2005 e 2014.¹⁹ De acordo com dados do do INCA (2016), a incidência da doença foi mais prevalente no sexo feminino ao longo dos anos estudados. Os maiores índices de taxas de mortalidade para CCR foram observados nas regiões Sul e Sudeste, e os menores índices, nas regiões Norte e Nordeste (Figura 2). Considerando que as regiões Sul e Sudeste são áreas mais desenvolvidas e industrializadas do Brasil, os aumentos da taxa de mortalidade e do número de óbitos nessas regiões podem estar relacionados aos fatores de risco presentes em países desenvolvidos.²¹

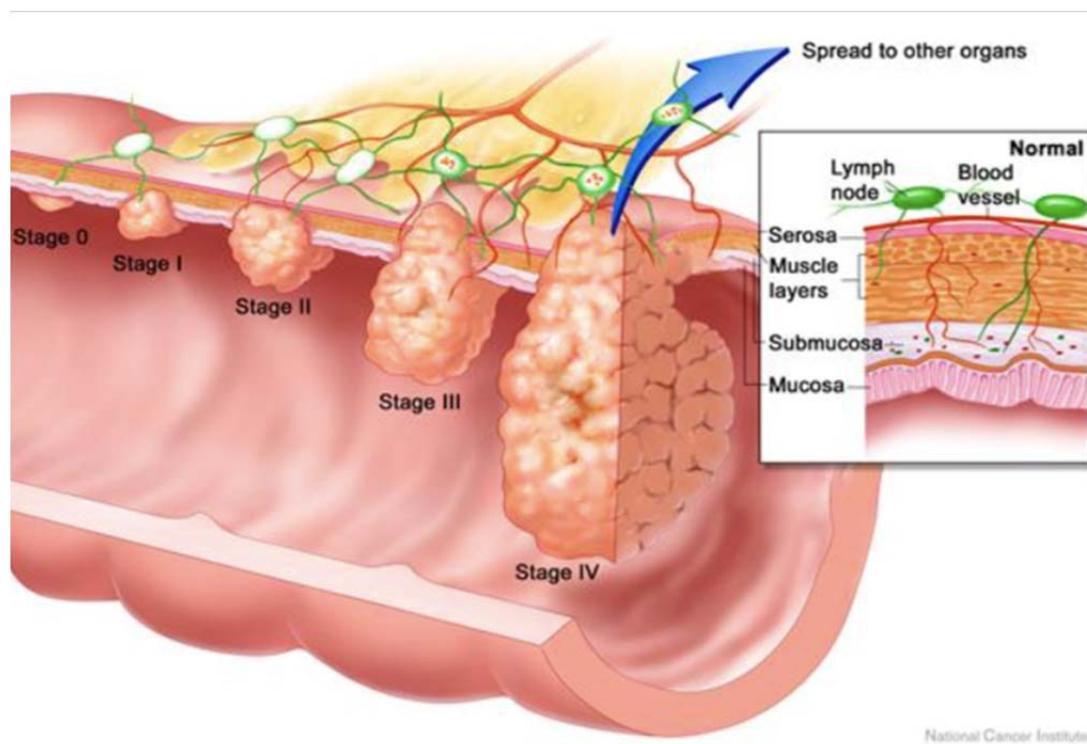


Fonte: Ministério da Saúde ²¹

Figura 2 - Incidência de câncer colorretal por região e por sexo no Brasil.

São fatores de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal: histórico familiar de CCR; idade; dieta baseada em gorduras animais; baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais integrais; etilismo e tabagismo; obesidade e sedentarismo. Com relação à idade, o CCR é mais frequente entre idosos, principalmente após os 60 anos, embora possa surgir em qualquer idade, sendo mais agressivo quanto mais precoce for o seu surgimento, quando é geralmente relacionado à síndromes, como a do câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) ²³. Os pólipos adenomatosos esporádicos, responsáveis por 90% de todos os casos de câncer de cólon e reto, são condições pré-neoplásicas, havendo transformação do epitélio do cólon normal em pólipo adenomatoso. A progressão para o adenocarcinoma é lenta e dura em média

dez anos (Figura 3), fazendo com que esse tipo de neoplasia seja o alvo ideal de programas de prevenção e rastreamento populacional.³



Fonte: <https://www.bowelcancer australia.org/bowel-cancer-staging>

Figura 3 - Figura ilustrativa dos cinco estágios do câncer colorretal.

A HNPCC ou Síndrome de Lynch, é uma condição relacionada a mutações na linhagem germinativa dos genes que formam um complexo de proteínas envolvidas com reparo do DNA (como o *APC*) e está relacionada a manifestações de alguns tipos de carcinomas dentre eles o carcinoma colorretal. Admite-se que aproximadamente 6 a 8% dos casos de CCR podem relacionar-se à HNPCC. Esta síndrome é caracterizada pela presença eventual de reduzido número de pólipos que progridem rapidamente para carcinomas.⁴ Alterações moleculares diferentes podem influenciar a resposta do paciente ao tratamento e modificar o prognóstico²³.

Dentre os genes envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer colorretal estão os protooncogenes, genes que sofrem mutações que são associadas a ganho de crescimento e proliferação celular ²⁶. Os principais oncogenes envolvidos no CCR são os genes da família *RAS* composta de três genes – *K-RAS*, *H-RAS* e *N-RAS*, que codificam proteínas responsáveis no processo de sinalização celular. Os genes de supressão tumoral são aqueles que quando inativados por uma mutação aumentam a atividade proliferativa. Os principais genes supressores de tumor relacionados ao câncer colorretal são o gene *APC* e o gene *TP53*. Por fim, os genes de reparo de DNA atuam durante o seu processo de replicação e é responsável pela substituição de nucleotídeos que apresentem pareamento incorreto (*mismatch repair*). A inativação desse sistema, portanto, pode levar ao acúmulo errôneo de nucleotídeos pareados e predisposição à carcinogênese. ^{23,26} Conforme mencionado anteriormente, mutações nesses genes estão relacionadas à síndrome de Lynch. Os principais genes de reparo envolvidos são *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*. A formação de tumor requer a inativação do sistema de reparo seguida por outras mutações, como a do gene *APC*. ^{23,26}

As metástases são encontradas em cerca de 25% dos pacientes no momento do diagnóstico de câncer colorretal e irão surgir em aproximadamente 50% dos pacientes ao longo do curso da doença. ²⁷ O fígado e o sítio mais comum de metástases e apenas 15-20% dos pacientes com metástases hepáticas apresentam elegibilidade cirúrgica. ¹⁶

Diversos protocolos quimioterápicos são aplicados em pacientes com doença metastática irressuscável (Quadro 1), contudo as taxas de sobrevivência global permanecem desfavoráveis. ¹⁸ A investigação dos mecanismos pelo qual a metástase

hepática ocorre é pilar central na criação de estratégias que controlem ou bloqueiem a progressão da doença.¹⁸

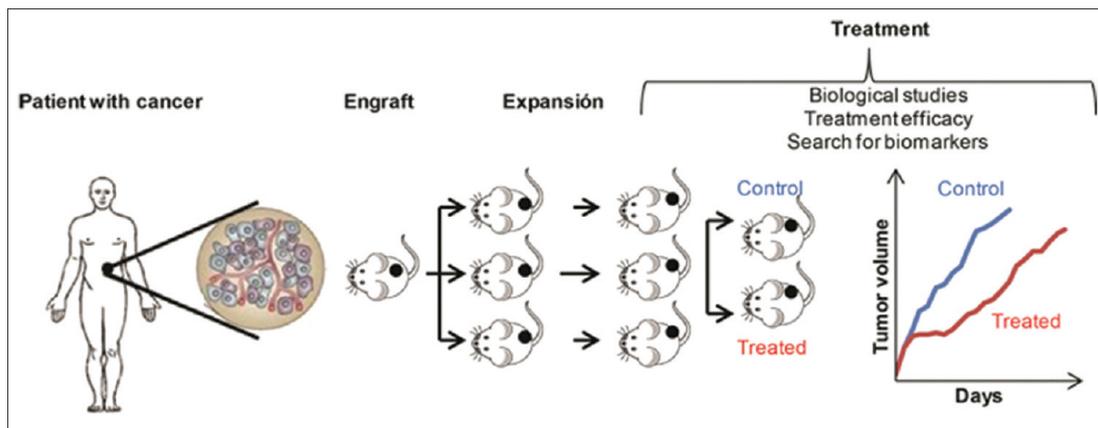
Quadro 1 - Principais protocolos de quimioterapia empregados no tratamento do câncer colorretal

Anti-neoplásico/protocolo	Princípio ativo	Nome comercial
5-FU/LV	5-FU= Fluorouracil LV=Leucovorin	—
Capecitabina	Capecitabina	Xeloda
CAPEOX	CAPE=Capecitabina OX=Oxaliplatina	Xeloda Eloxatin
FOLFIRI	FOL=Leucovorin F= Fluorouracil IRI=Irinotecano	Camptosar
FOLFOX	FOL=Leucovorin F= Fluorouracil OX=Oxaliplatina	Eloxatin
FOLFOXIRI	FOL=Leucovorin F= Fluorouracil OX=Oxaliplatina IRI=Irinotecano	Eloxatin Camptosar
Irinotecano	Irinotecano	Camptosar

Fonte: National Comprehensive Cancer Network Guidelines for Colon Cancer, Version 1.2017

O uso de modelos pré-clínicos é o pilar central em qualquer aspecto que envolve a pesquisa translacional, compreendendo desde o entendimento da biologia tumoral até o desenvolvimento de novos tratamentos. Atualmente, o *NCI-60 cancer cell line panel* representa o maior acervo de linhagens celulares tumorais sendo o mais frequentemente utilizado em estudos desenvolvimento de novos fármacos *in vitro*.¹ Estas células derivam de tumores de pacientes e estão adaptadas a crescer

indefinidamente em meios de cultura artificiais. Apesar dessas linhagens celulares convencionais serem de fácil utilização, apresentam importantes limitações no desenvolvimento de fármacos no cenário pré-clínico. A mais relevante é a falta de valor preditivo no que se refere a sua atividade em determinados tipos de câncer em ensaios clínicos. Ainda, linhagens celulares são normalmente estabelecidas a partir de componentes mais agressivos do tumor e, conseqüentemente, não conseguem representar a complexa heterogeneidade tumoral evidente na prática clínica.¹³ Em contraste, modelos metastáticos *in vivo* usando camundongos podem representar, com maior acurácia, o processo metastático e ajudar na compreensão do mecanismo de sua formação e na criação de estratégias terapêuticas²²⁻²³ (Figura 4). A introdução do camundongo atímico nude para implantação e crescimento de tumores humanos em 1969 mudou o paradigma da pesquisa básica aplicada ao estudo do câncer. Rygaard e Povlsen²⁵ implantaram um fragmento de câncer colorretal de um paciente de 71 anos de idade, no subcutâneo de um camundongo nude. O tumor cresceu como um adenocarcinoma de cólon bem diferenciado similar a amostra removida do paciente. Este foi o primeiro *patient-derived xenograft* (PDX) descrito na literatura, contudo, divergências foram repetidamente descritas entre a habilidade de invasão e metástase do tumor no paciente comparadas ao comportamento benigno dos tumores implantados no subcutâneo dos camundongo nude. A grande maioria dos tumores humanos sólidos, não se metastatizavam quando implantados no subcutâneo destes camundongos.²⁵



Fonte: PEREZ et al.²⁴

Figura 4 - Figura esquemática de propagação tumoral através de implantação em camundongos *nude*.

Wang and Sordat²⁸ in 1982 foram os primeiros a implantar tumores humanos ortotopicamente em animais imunodeficientes. Uma suspensão de células de câncer colorretal foi injetada no cólon descendente de um camundongo *nude*. Foram observados o crescimento tumoral no local da injeção e também a propagação de metástases, levantando a hipótese que o sítio ortotópico de implantação, ou seja, o local correspondente ao local de origem do tumor no paciente, permite um comportamento tumoral mais similar ao tumor do paciente, quando comparado a implantação de tumores no subcutâneo. Hidalgo et al.¹³ desenvolveram o primeiro modelo *patient-derived orthotopic xenograft* (PDOX) em camundongos *nude* utilizando a técnica de implantação cirúrgica ortotópica de tecido intacto de câncer colorretal. Uma maior ocorrência de metástases foi observada em modelos ortotópicos implantados com tecido tumoral intacto, com o seu micro-ambiente preservado, quando comparados com implantação de células tumorais. Os modelos PDOX podem ser uma boa oportunidade de se estudar os mecanismos de progressão tumoral por mimetizarem os padrões clínicos de metástases. Ainda, esta estratégia

poderia permitir o estudo de resposta a diferentes fármacos simultaneamente no paciente e no modelo animal, a investigação de novos marcadores tumorais de resistência e susceptibilidade, e o teste de novas combinações de fármacos para vencer resistências.¹³

Os regimes de quimioterapia aprovados para uso clínico são indicados com base na chance de resposta antitumoral observada em alguns pacientes em estudos clínicos. Desta forma, não é possível antecipar se um paciente específico se beneficiará desse tratamento. A evolução da oncologia personalizada tem como premissa a identificação do tratamento ideal para cada paciente e, a possibilidade de avaliação *in vivo* da eficácia de diferentes tratamentos para o tumor específico de um paciente tem grande apelo para a incorporação clínica desse conceito. Esta abordagem pode permitir identificar as características individuais de cada linha de tumor, fornecendo possíveis tratamentos alternativos para cada paciente.

Deve-se notar que, no momento, não existem modelos alternativos (cultura celular, ou abordagens *in silico*) que possam simular de forma mais fiel o ambiente apropriado para o crescimento tumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Este projeto visa desenvolver um modelo de xenoenxerto ortotópico a partir de metástase hepática de câncer colorretal em camundongos imunodeficientes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar ensaios de crescimento tumoral *in vivo* a partir de fragmentos de metástases hepáticas de pacientes portadores de tumores colorretais;
- Realizar a caracterização morfológica e molecular das proteínas de reparo de DNA MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6 por imuno-histoquímica dos tumores gerados nos animais e comparar com os tumores dos pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CRITÉRIO DE INCLUSÃO DOS PACIENTES

Os pacientes selecionados para este estudo prospectivo respeitaram os seguintes critérios de inclusão: portadores de câncer colorretal com metástases hepáticas confirmadas através de exame anátomo-patológico; com indicação de segmentectomia hepática; submetidos a procedimento cirúrgico pelo Departamento de Cirurgia Abdominal do A.C.Camargo Cancer Center; e que concordaram em participar do estudo através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A seleção ocorreu durante as reuniões de departamento da Equipe da Cirurgia Abdominal às quartas-feiras ao longo do ano de 2015. Seis pacientes cumpriram os critérios e foram incluídos no estudo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente (processo número 1950/14). (Anexo 2)

3.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS TUMORAIS

A amostra tumoral foi coletada no momento em que a peça cirúrgica foi levada à patologia. (Figura 5A). O patologista responsável confeccionou um fragmento tumoral em cunha com diâmetro máximo de 5 mm. As amostras foram imersas imediatamente em tubo plástico com meio de cultura celular DMEM e 10% de soro fetal bovino (Gibco) a 4° C. As coletas ocorreram em dias diferentes de acordo com a agenda de cirurgia do departamento.

3.3 ANIMAIS DE ESTUDO

Os camundongos nude utilizados neste estudo apresentam background genético BALB/ c e foram adquiridos da empresa Charles River. Machos e fêmeas com idade aproximada de 2 a 4 meses e peso aproximado de 20 gramas. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em biotério *SPF* (*Specific Pathogen Free*), mantidos em microisoladores à temperatura controlada de 22° C e sob ciclo de luz de 12 horas, tratados com água autoclavada e ração irradiada *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Fundação Antônio Prudente (processo número 065/14). (Anexo 1)

3.4 CONFECÇÃO DO XENOENXERTO

Imediatamente após a obtenção da amostra tumoral, o material seguiu em embalagem térmica, refrigerada com gelo, para o biotério do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) onde o fragmento tumoral foi implantado nos animais.

O procedimento seguiu de acordo com o protocolo descrito abaixo:

- (i) A área de trabalho foi preparada através da desinfecção de todas as superfícies da capela de fluxo laminar com A-33;
- (ii) Preparado uma placa de Petri com solução de penicilina / estreptomicina, em uma diluição de 1:100 em meio HBSS.
- (iii) Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com uma solução de Ketamina/Xilazina/PBS respeitando as proporções 50%, 25%, 25% respectivamente, e volume final de 0,25ml. Aguardar a completa sedação do animal.

(iv) O fragmento tumoral foi transferido para a placa de Petri estéril com HBSS e penicilina / estreptomicina.

(v) Com auxílio de um bisturi, o tumor foi cortado em fragmentos com tamanho aproximado de 1 mm, descartando regiões de desvitalizadas. Considerou-se descarte áreas macroscópicas características de lise tecidual.

3.4.1 Transplante do enxerto tumoral

(i) O camundongo anestesiado foi posicionado em decúbito dorsal; Para confirmar a profundidade do plano anestésico, a região distal do membro posterior foi levemente pressionada.

(ii) A antisepsia cirúrgica foi realizada com Iodo 2%.

(iii) Foi realizada uma incisão horizontal de 15 mm de comprimento, pré-retro umbilical, utilizando pinças e tesouras oftálmicas.

(iv) Um blefarostato foi utilizado para exposição hepática e um swab estéril foi utilizado para exposição do lobo hepático esquerdo. Um fragmento de 1mm^3 de tumor é inserido manualmente no interior de uma agulha coaxial utilizada em biópsia percutânea. Perfurou-se o parênquima hepático com a agulha coaxial e introduziu o fragmento pressionando o mandril dentro da agulha. O mesmo procedimento foi feito no lobo hepático direito.

(v) O local da incisão foi fechado com sutura padrão simples separado com fio não absorvível sintético nylon ethicon 4-0. Após o procedimento, os animais receberam analgesia com tramadol na dose de 2mg/kg previamente diluído em 5mg/ml, pela via subcutânea.

(vi) Após a implantação, os animais foram monitorados até a completa recuperação anestésica sob luz infra-vermelha.

3.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL

Os animais foram avaliados semanalmente, quanto a perda de peso, sinais de apatia, emagrecimento, desidratação, e aumento de volume abdominal em decorrência de crescimento tumoral.

Os animais foram submetidos a anestesia geral na presença dos sinais supra citados ou no final do período de observação de 12 meses. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical após confirmação de estagio III/4^o plano anestésico de Guedel. Os animais foram necropsiados e as regiões implantadas foram coletadas, reimplantadas em uma segunda e terceira passagem nos camundongos, e, uma amostra, armazenada em formaldeído PFA 4% para análise anátomo-patológica.

3.6 ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

As amostras tumorais foram processadas para análise histológica e submetidas a coloração de Hematoxilina-Eosina. O perfil imuno-histoquímico das proteínas de reparo de DNA MLH1 (clone M1, Ventana), PMS2 (clone EPR3947, Ventana), MSH2 (clone G219-1129, Ventana) e MSH6 (clone 44, Ventana) foi realizado buscando identificar os mesmos marcadores expressos no tumor de cada paciente. Todo o processo de análise foi feito pelo mesmo patologista com experiência maior de 10 anos e oncologia colorretal (Maria Dirlei Begnami).

3.7 PASSAGEM TUMORAL

Foram realizadas três passagens tumorais em camundongos para cada amostra de paciente. A Metodologia empregada neste estudo sofreu pequenos ajustes causados pela incompatibilidade de horário e/ou recursos disponíveis entre os setores da Patologia, Cirurgia Abdominal, Biotério e Medicina Nuclear. Face ao exposto, na primeira passagem (P-0) foram selecionados quatro animais para cada amostra de paciente, exceto na primeira passagem do paciente 01 onde utilizou-se apenas dois animais disponíveis. Os camundongos P-0 implantados foram acompanhados por 12 meses ou até a evidência de crescimento tumoral. A eutanásia foi realizada ao final do período observacional e os camundongos com implantes viáveis tinham os tumores reimplantados em uma nova série de 4 animais denominada P-1, e de forma análoga posteriormente para uma terceira série de animais denominada P-2.

4 RESULTADOS

4.1 CONFECÇÃO DO XENOENXERTO

Durante todo o experimento a coleta de material e preparo no camundongo se manteve semelhante entre os seis pacientes. O Termo de consentimento livre e esclarecido fora apresentado na noite anterior a cirurgia, e todas as duvidas relacionadas ao estudo foram sanadas. No momento da cirurgia, um recipiente com gelo e tubo Falcon contendo meio de cultura celular permanecia na patologia para o armazenamento da amostra. As coletas aconteceram predominantemente no final do dia. As amostras foram levadas imediatamente ao biotério da instituição e o procedimento de implantação tumoral excedeu mais do que três horas. Figura 5

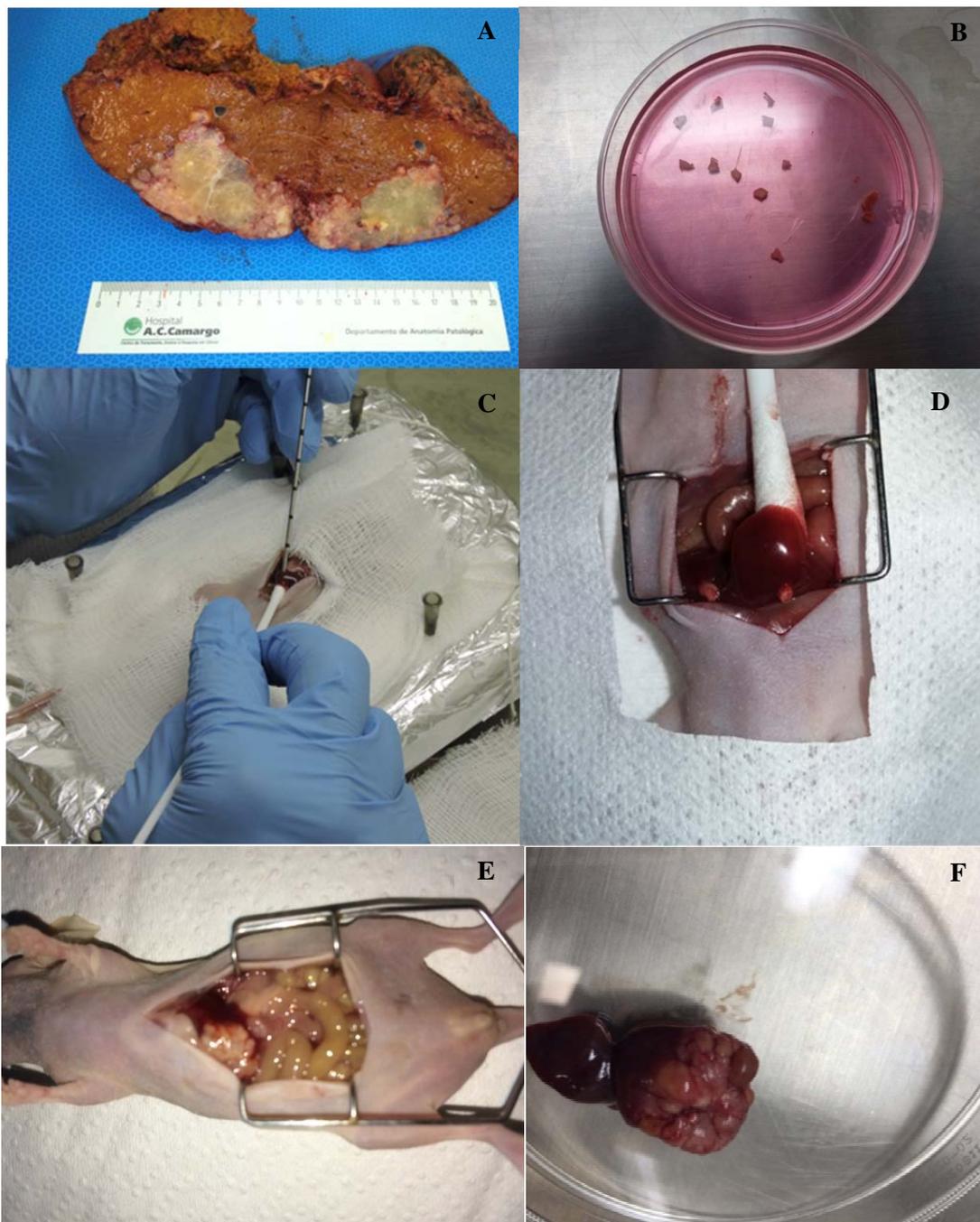


Figura 5 - Processo de inoculação tumoral em camundongo atímico nude. Amostra de metástase hepática de paciente. (A) após a remoção cirúrgica a amostra foi cortada em fragmentos de 1 mm^3 (B). Dois fragmentos foram inoculados no parênquima hepático com auxílio de agulha coaxial de biópsia percutânea (C,D). Figura representativa de um PDOX em camundongo com crescimento tumoral (E). Figura representativa de um fígado com lesão tumoral por xenoenxerto ortotópico (F)

4.2 PACIENTE 01

A paciente 01, 50 anos, passou por exposição prévia a três protocolos quimioterápicos, e teve o diagnóstico de metástase hepática de CCR confirmada pelo anátomo-patológico, com mutação em *K-Ras*. Na data de sua cirurgia o Biotério pode disponibilizar somente dois animais. Somente um camundongo desenvolveu tumor e foi eutanasiado após 252 dias. A paciente evoluiu a óbito devido a complicações pós-cirúrgicas. Conforme indicado na Figura 6, os PDOX mantiveram a mesma morfologia celular observada na amostra do paciente nas três passagens. A expressão de MLH1, PMS2 e MSH6 foi observada, enquanto MSH2 não foi detectado (Quadro 2). Essas características foram mantidas nos xenoenxertos. Os fragmentos de P-0 foram reimplantados em um segundo e terceiro lote de animais (P1 e P2). O número de animais que apresentaram crescimento tumoral foi dois de quatro animais com tempo de crescimento (P1) de 27 dias. Em P2 o número de animais positivos para pega do enxerto foi três de um total de quatro animais e o tempo de crescimento foi de 57 dias. Os resultados da implantação do tumor estão resumidos no Quadro 2. As amostras de P1 e P2 não tiveram a imunohistoquímica avaliada.

Quadro 2 - Imuno-expressão das proteínas de reparo nas amostras do paciente 1 e seus respectivos xenoenxertos

	Paciente 1	P-0	P-1	P-2
MLH1	+	+	sem amostra	sem amostra
PMS2	+	+	sem amostra	sem amostra
MSH2	-	-	sem amostra	sem amostra
MSH6	+	+	sem amostra	sem amostra

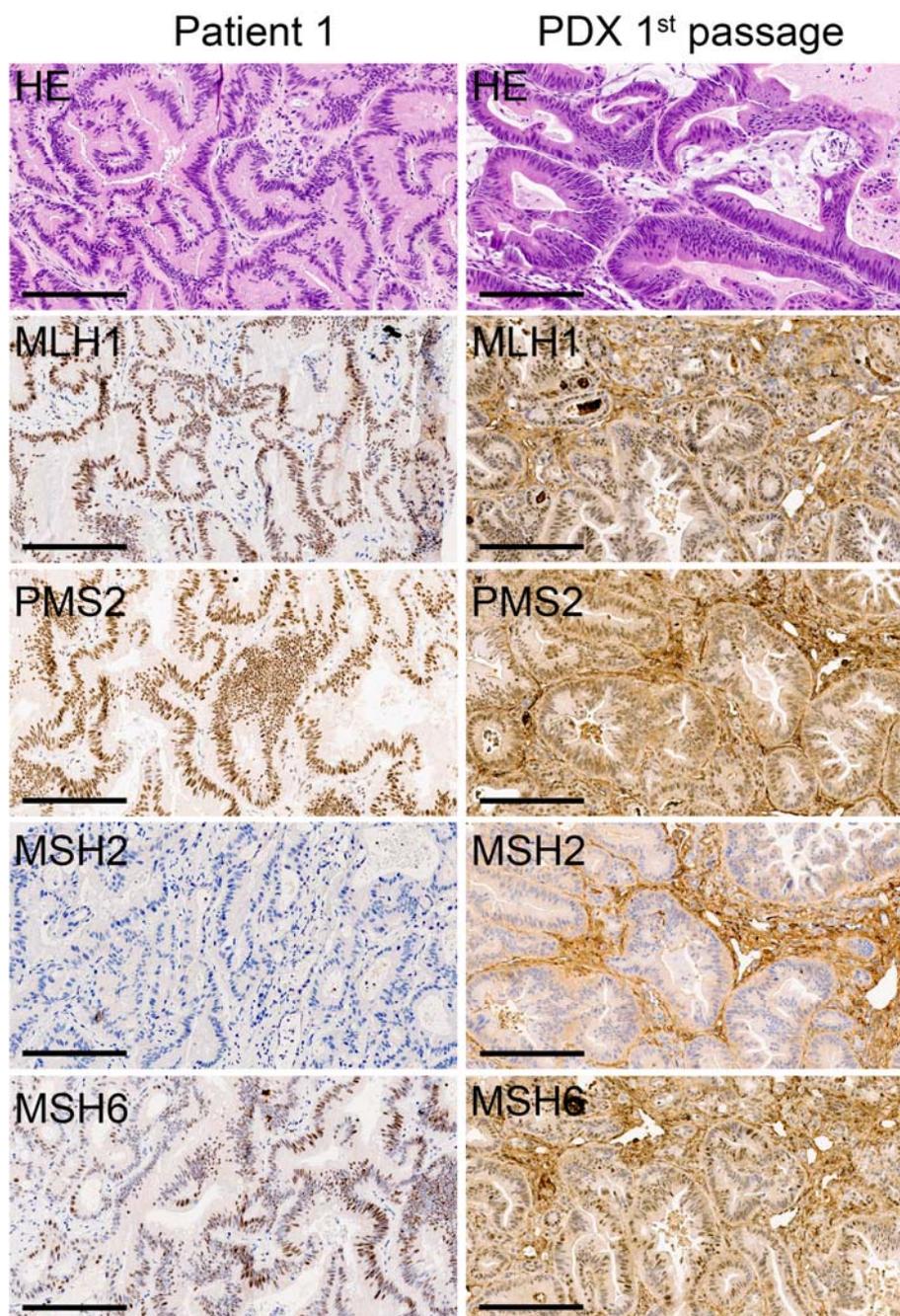


Figura 6 - Caracterização morfológica e imunohistoquímica das proteínas de reparo de DNA no paciente 1 e seu respectivo PDOX. Imagens a esquerda representam cortes histológicos do tumor do paciente, e à direita cortes histológicos da primeira passagem tumoral em PDOX. Barra de calibração = 100 μ m.

4.3 PACIENTE 02

O paciente 2 teve diagnóstico confirmado de metástase hepática de adenocarcinoma colorretal. A avaliação microscópica na amostra do paciente indicou resposta ao tratamento quimioterápico prévio, com presença de 20% de células viáveis, necrose presente em 40% da amostra e fibrose em 40%, o que quer dizer isso?). Dos quatro animais implantados somente um camundongo desenvolveu tumor após 281 dias. Os fragmentos de P-0 foram reimplantados em um segundo lote de animais (P-1) e o número de animais positivos para a pega do enxerto foram um de quatro animais; o tempo de crescimento de P1 foi de 73 dias. O animal positivo em P-1 evoluiu à óbito antes que a terceira passagem (P-2) fosse concluída. Os resultados da implantação do tumor estão resumidos no Quadro 6. Na Figura 7, a análise de HE mostrou que o PDOX recapitulou a morfologia do tumor do paciente. O paciente 2 mostrou a expressão de todas as proteínas de reparo de DNA, entretanto, em seu respectivo xenoenxerto P-0, a expressão de MSH2 não foi detectada (Quadro 3).

Quadro 3 - Imuno-expressão das proteínas de reparo nas amostras do paciente 2 e seus respectivos xenoenxertos.

	Paciente 2	P-0	P-1	P-2
MLH1	+	+	sem amostra	sem amostra
PMS2	+	+	sem amostra	sem amostra
MSH2	+	-	sem amostra	sem amostra
MSH6	+	+	sem amostra	sem amostra

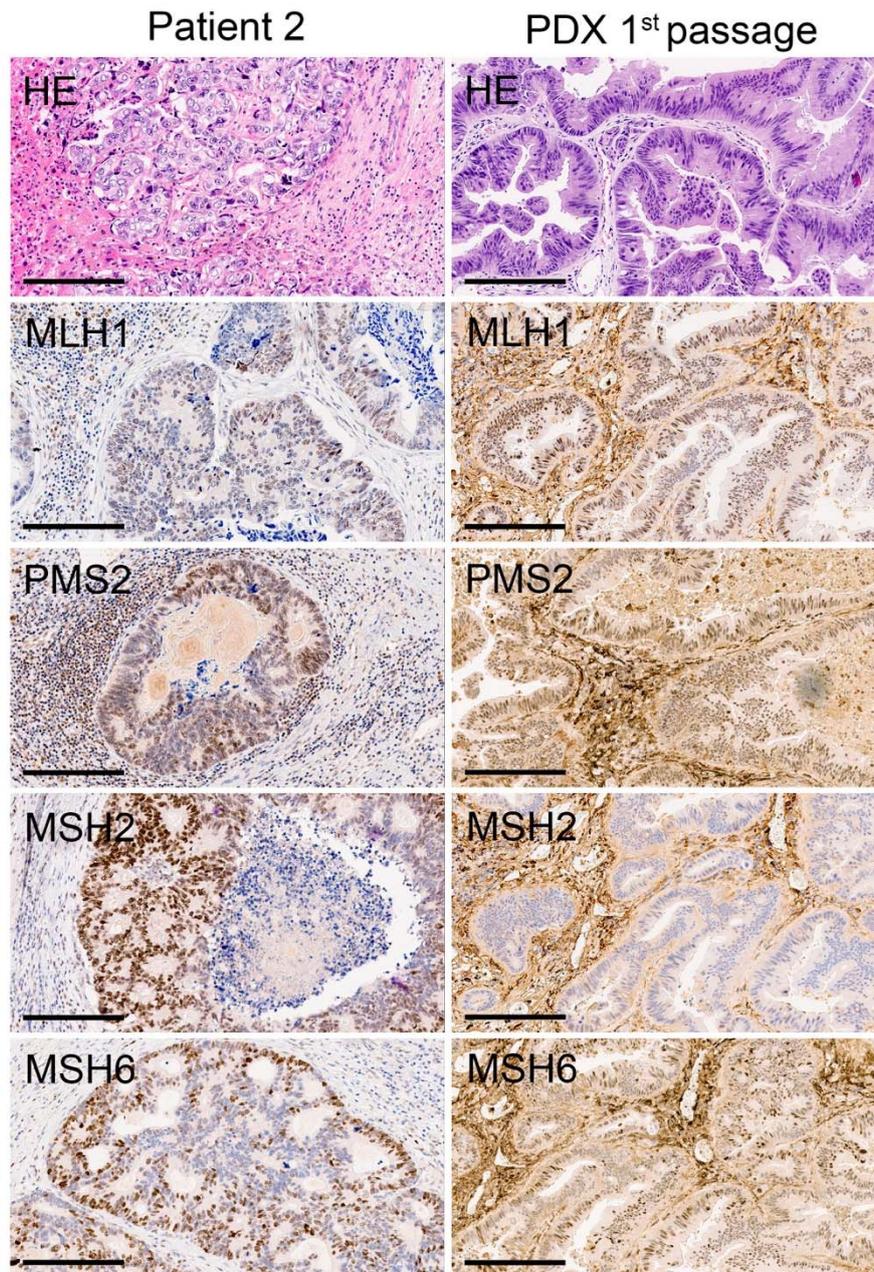


Figura 7 - Caracterização morfológica e imunohistoquímica das proteínas de reparo de DNA no paciente 2 e seu respectivo PDOX. Imagens a esquerda representam cortes histológicos do tumor do paciente, e à direita cortes histológicos da primeira passagem tumoral em PDOX. Barra de calibração = 100 μ m.

4.4 PACIENTE 03

O paciente 03, 68 anos, apresentava diagnóstico prévio de CCR e foi submetido a segmentectomia para ressecção de metástases hepáticas. A análise histopatológica do tumor do paciente 3 evidenciou parênquima hepático com fibrose extensiva, áreas frequentes de necrose e esteatose moderada. Após a análise, outra amostra do mesmo paciente foi caracterizada como segunda lesão maligna (hepatocarcinoma sólido). A implantação desta amostra deu origem a doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), a lesão foi associada a vários nódulos no fígado e baço (Figura 8) e não foram correlacionadas com o câncer colorretal. Dois de quatro animais desenvolveram PTLN, o tempo de observação em P-0 foi de 294 dias.

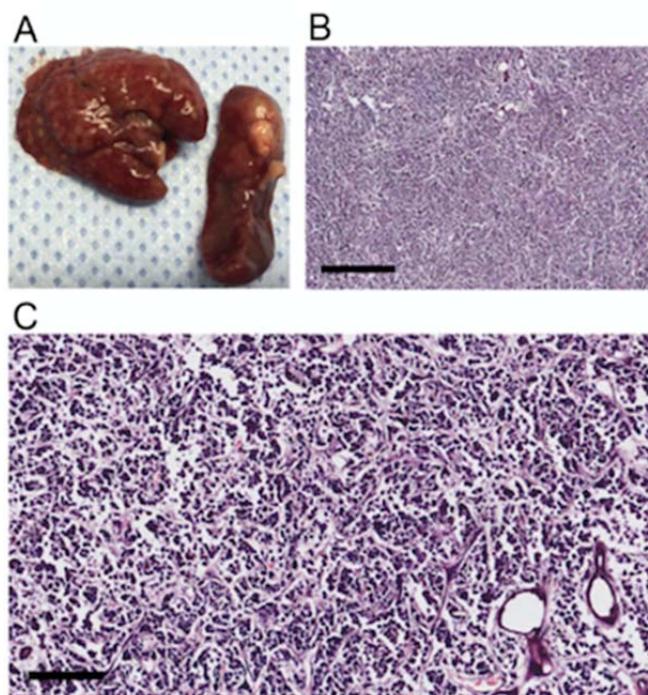


Figura 8 - Desenvolvimento de uma doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD). Em A aspecto macroscópico de baço e fígado alterados. B,C representam cortes histológicos do tumor do paciente. Barra de calibração = 100 μ m

4.5 PACIENTE 04

O paciente 04, 41 anos apresentava diagnóstico prévio de CCR com K-RAS selvagem, e submetido a protocolos de neoadjuvância. A análise histopatológica do paciente 4 evidenciou extensas áreas de necrose e fibrose. Não foi observado crescimento tumoral durante o período de observação, nos camundongos implantados.

4.6 PACIENTE 05

O paciente 05, 51 anos, apresentava diagnóstico prévio de CCR e fora submetido a protocolos de neoadjuvância. A amostra do paciente 5 também foi caracterizada por importante presença de tecido necrótico, focos de hemorragia, degeneração cística e esteatose. Não foi observado crescimento tumoral durante o período de observação, nos camundongos implantados.

4.7 PACIENTE 06

O paciente 06, 74 anos, teve seu diagnóstico confirmado de metástase hepática de adenocarcinoma colorretal e evoluiu a óbito XXX dias após a cirurgia. Dos quatro animais implantados em P-0 somente um camundongo desenvolveu tumor após 153 dias. Os fragmentos de P-0 foram reimplantados em um segundo lote de animais (P-1) e o número de animais positivos para a pega do enxerto foi de dois em quatro animais; o tempo de crescimento de P1 foi de 99 dias. As amostras de P1

foram reimplantadas em um novo lote de animais (P-2) e o número de animais positivos para pega do enxerto foi três de quatro animais; o tempo de evolução até a eutanásia foi de 87 dias. Os resultados da implantação do tumor estão resumidos no Quadro 6. Nas Figuras 09 e 10, a análise de HE mostrou que o PDOX recapitulou a morfologia do tumor do paciente em P-0, P-1 e P-2. O paciente 06 mostrou a expressão de todas as proteínas de reparo de DNA. Essas características foram mantidas nos respectivos PDOX (Quadro 4).

Quadro 4 - Imuno-expressão das proteínas de reparo nas amostras do paciente 6 e seus respectivos xenoenxertos.

	Paciente 6	P-0	P-1	P-2
MLH1	+	+	+	+
PMS2	+	+	+	+
MSH2	+	+	+	+
MSH6	+	+	+	+

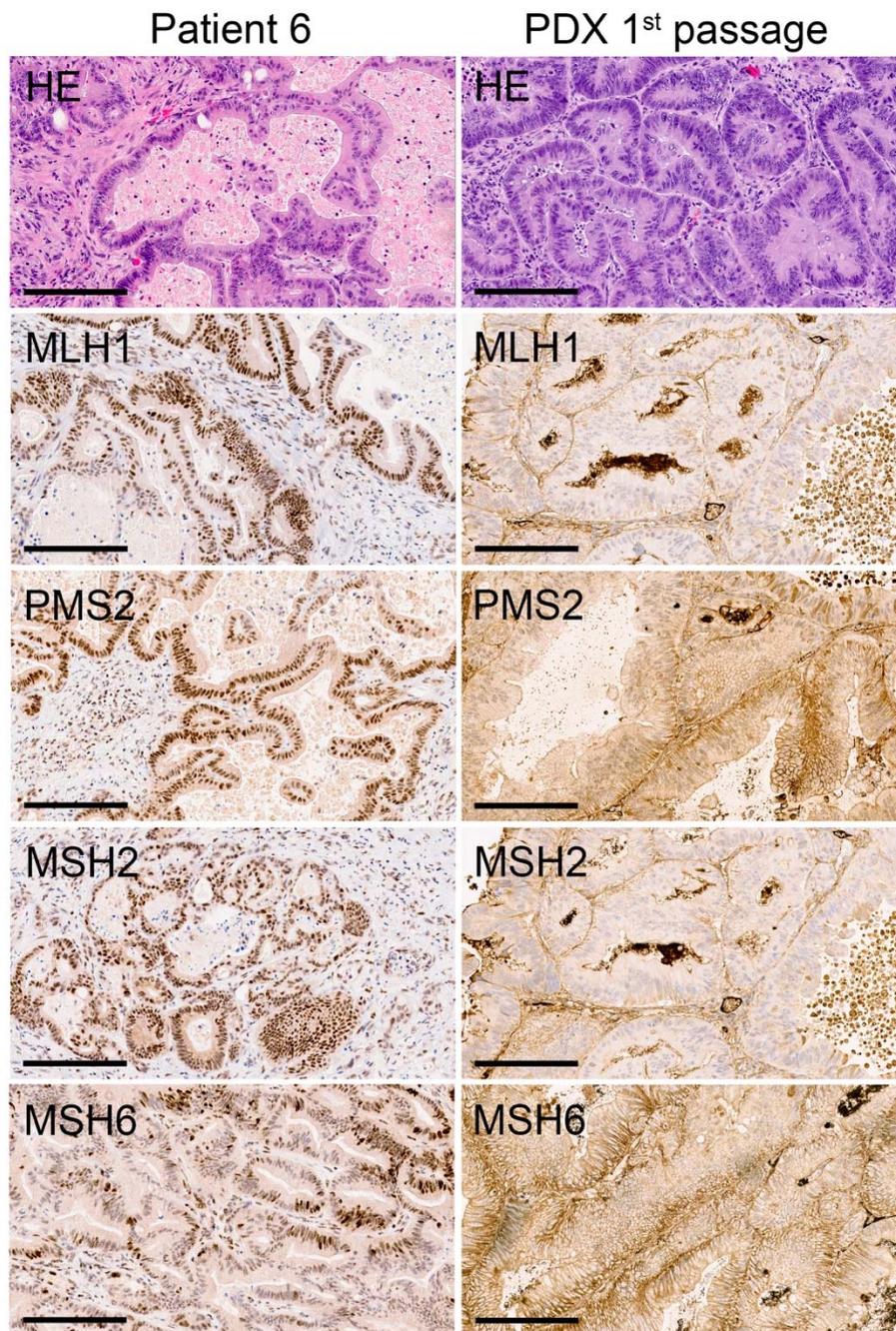


Figura 9 - Caracterização morfológica e imunohistoquímica das proteínas de reparo de DNA no paciente 6 e seus respectivos PDOX. Imagens a esquerda representam cortes histológicos do tumor do paciente, e à direita cortes histológicos da primeira passagem tumoral em PDOX. Barra de calibração = 100 μ m.

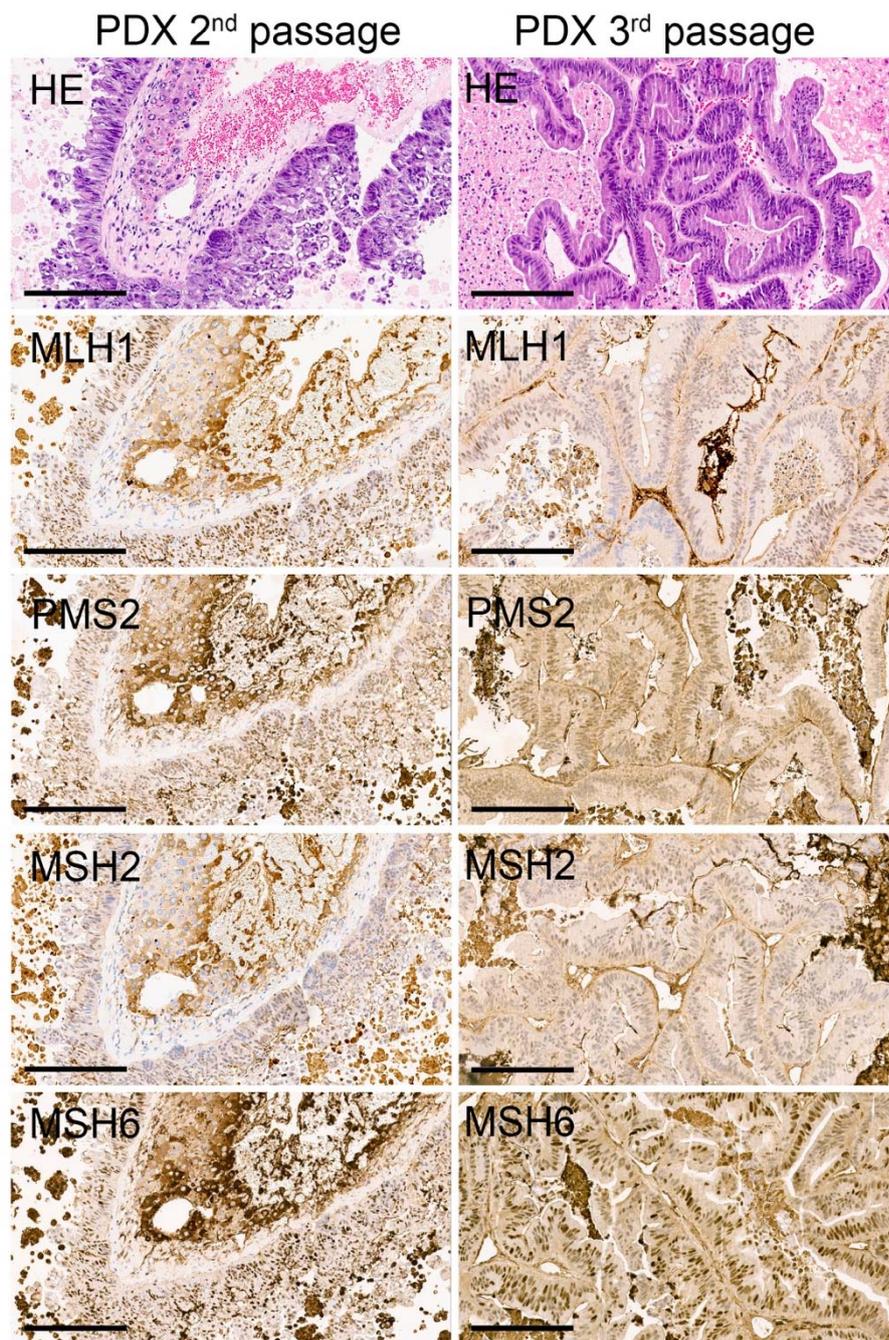


Figura 10 - Caracterização morfológica e imunohistoquímica das proteínas de reparo de DNA na segunda e terceira passagem tumoral em PDOX do paciente 6. Imagens a esquerda representam cortes histológicos da segunda passagem do PDOX, e à direita cortes histológicos da terceira passagem tumoral em PDOX. Barra de calibração = 100 μ m.

4.8 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Características clínico-patológicas dos seis pacientes incluídos no estudo estão descritas no Quadro 5.

Quadro 5 - Características clínico-patológicas dos pacientes

Número do paciente	sexo	idade na cirurgia	diagnóstico	tratamentos prévios	última atualização
1	feminino	50	CCR, K-RAS mutado	1 -FOLFOX 2-FOLVOX+ bevacizumabe 3-FOLFIRI+ bevacizumabe	Óbito – complicações pós-cirúrgicas
2	masculino	67	CCR, K-RAS selvagem	1- FOLFIRI+ cetuximabe 2-DEBIRI 3-FOLFIRI+ bevacizumabe	Segemento jan/2018
3	masculino	68	CCR, Hepatocarcinoma	sem tratamento prévio	Segemento fev/2018
4	masculino	41	CCR, K-RAS selvagem	1-FLOX+ bevacizumabe 2-FOLFIRI	recidiva hepática e linfonodal nov/17
5	feminino	51	CCR	1- FOLFOX+RFA percutâneo 2-FOLFIRI+ bevacizumabe	Segemento out/2017
6	masculino	74	CCR	sem tratamento prévio	Óbito – complicações pós-cirúrgicas

CCR = Carcinoma colorretal; FOLFOX = 5-Fluoracil + Oxaliplatina; FOLFIRI = 5-Fluoracil + Irinotecano; FLOX = Leucovorin + 5-Fluoracil + Oxaliplatina; DEBIRI = quimioembolização com Irinotecano; RFA = Ablação por Radiofrequência.

4.9 PERÍODO DE CRESCIMENTO DO ENXERTO TUMORAL

O tempo de crescimento do xenoenxerto no camundongo e o número de enxertos positivos em cada passagem estão resumidos no Quadro 6.

Quadro 6 - Sumário das características de crescimento do enxerto tumoral

Paciente	Crescimento no camundongo	Crescimento em P-0	Dias para P-0	Crescimento em P-1	Dias para P-1	Crescimento em P-2	Dias para P-2
1	Sim	1 de 2	252	2 de 4	27	3 de 4	51
2	Sim	1 de 4	281	1 de 4	73	-	
3	PTLD	2 de 4	294	-	-	-	
4	Não	-	-	-	-	-	
5	Não	-	-	-	-	-	
6	Sim	1 de 4	153	2 de 4	99	3 de 4	87

PTLD = doença linfoproliferativa pós-transplante

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, estabelecemos um modelo PDOX pré-clínico para estudar tumores colorretais metastáticos usando fragmentos de lesões hepáticas implantados no fígado de camundongos nude atímicos. Os animais desenvolveram tumores que se assemelham morfológicamente aos tumores originais do paciente, incluindo a expressão de proteínas de reparo de DNA também expressas pelo tumor dos pacientes.

Os modelos animais referidos como *Patient-derived Xenografts* (PDX) são utilizados na pesquisa translacional em câncer por mais de quatro décadas.²⁵ Ainda que este não seja um assunto novo, os xenoenxertos tumorais são alvo de muita pesquisa a medida que se visualiza uma possibilidade de definir tratamentos personalizados para um tumor específico do paciente, a partir de modelos avatar.¹⁴ O valor real desses modelos ainda é discutido e, como qualquer método de pesquisa, o PDX também possui limitações.^{5,17,24} A principal crítica é a necessidade de camundongos imunodeficientes para o crescimento de células tumorais humanas^{5,17}. Muitas linhagens de camundongos estão disponíveis para este fim. No presente trabalho utilizamos o camundongo nude atímico que não possui células T maduras,^{16,17} contudo apresenta resposta humoral e inespecífica mimetizando melhor o papel do sistema imune na carcinogênese. PDXs também podem demorar meses para crescer, tornando-os muito lentos para servir como avatares para aqueles pacientes que precisam de tomadas imediatas de decisão terapêutica.²

Ainda, ao se dissociar o tumor do paciente em meio de cultura e aplicar essas células tumorais no camundongo, ocorre a alteração no comportamento celular, comparado ao comportamento do tumor primário, descaracterizando o modelo avatar. As linhagens tumorais derivadas de tumores humanos já passaram por inúmeros processos de seleção clonal e não recapitulam a heterogeneidade tumoral observada nos tumores dos pacientes. Considerando este aspecto, o uso de tecido tumoral fresco pode sobrepor essas limitações, permitindo a criação de modelos avatares mais fiéis ao paciente. O desenvolvimento de xenoenxerto tumoral a partir de amostra de paciente permite a investigação de fatores envolvidos na progressão da doença em cenários metastáticos, como mecanismos de transformação, invasão, bem como a avaliação de resposta do avatar a fármacos anti-neoplásicos, permitindo a investigação de fatores envolvidos na transformação maligna, invasão e metástase. Além disso, esta plataforma permite ao oncologista avaliar a eficácia de fármacos anti-neoplásicos no modelo avatar, personalizando o tratamento de seu paciente.^{13,14} Nesse contexto, pesquisadores começaram a identificar maior semelhança no comportamento tumoral, ao se minimizar ao máximo as diferenças do microambiente tumoral entre paciente e camundongo.^{13,14}

A partir deste conceito que nosso estudo se insere. Uma das maiores limitações de se implantar fragmento tumoral no subcutâneo de camundongos nude é a baixa capacidade de metástases que os tumores implantados apresentam. Por outro lado, ao procurar manter as mesmas características do microambiente onde o tumor cresceu, inoculando fragmento tumoral do paciente no sítio respectivo onde a lesão foi removida (*patient-derived orthotopic xenograft* - PDOX), o comportamento metastático e agressivo da lesão é preservado.¹⁴

Nosso estudo demonstrou a capacidade de crescimento e expansão tumoral em 50% das amostras implantadas, preservando as mesmas características morfológicas e moleculares observadas no tumor do paciente. Estes resultados vão de acordo com os resultados obtidos por Fu *et al*, que notou intensa similaridade morfológica e molecular no modelo PDOX.¹¹

Ainda de acordo com Robert and Hoffman¹⁴, a preservação do microambiente tumoral durante a confecção do enxerto aumentam as chances das características morfológicas e moleculares do tumor do paciente, serem preservadas ao longo de diversas passagens tumorais no modelo animal. Estas evidências tornam esta plataforma de pesquisa muito atrativa para testes com diferentes agentes anti-neoplásicos.

Nosso trabalho reproduziu com sucesso as características morfológicas e a expressão de proteínas de reparo envolvidas na carcinogênese do câncer colorretal em três dos seis pacientes, o que concorda com dados de outros estudos e reforça a hipótese de que os modelos ortotópicos (PDOX) usando um fragmento de tumor são melhores do que os modelos que utilizam a implantação subcutânea (PDX) para preservar o comportamento do tumor no paciente. Ainda, o modelo avatar do paciente 6 teve as características supracitadas foram mantidas até a terceira passagem tumoral.¹¹

O sucesso de implantação e crescimento (50% da amostra) pode ser atribuído aos altos níveis de fibrose e necrose encontrados nos tumores implantados. Além disso, a análise microscópica das amostras dos pacientes 4 e 5 revelou parênquima hepático com alteração arquitetônica com fibrose extensiva, denotando formação de nódulos, com áreas frequentes de necrose e esteatose moderada. A seleção dos

pacientes para este estudo seguiu as recomendações do comitê de ética da pesquisa da instituição, que sugeriu a inclusão de pacientes indicados para cirurgia no fígado. Estes pacientes foram submetidos a protocolos de quimioterapia intensa antes da cirurgia, resultando em necrose e fibrose extensiva nos nódulos ressecados. As amostras dos pacientes 02 e 03 mostraram 20% e 30% de células tumorais viáveis, respectivamente. Apenas dois fragmentos de 1 mm³ foram preparados a partir dessas amostras usando uma lâmina de bisturi, evitando áreas com degeneração visível. O período excessivamente longo para o crescimento de tumores dos pacientes 01, 02 e 06 nos animais modelo e a falha dos enxertos dos pacientes 03, 04 e 05 pode ter sido resultado da resposta parcial ou total da quimioterapia previa a cirurgia. No entanto, o tempo necessário para o crescimento do tumor observado em nosso estudo é consistente com dados de estudos semelhantes, que relatam um tempo médio de 6 a 12 meses para avaliar o crescimento tumoral.¹⁵

Como mencionado anteriormente, a implantação da amostra tumoral do paciente 3 deu origem a PTLD. A lesão foi associada a vários nódulos de baço e metástases à distância e não foi correlacionada com o câncer colorretal. A patologia do PTLD ainda é debatida. Porém, há uma condição bem conhecida que envolve a proliferação de linfócitos infectados pelo *Epstein-Barr virus (EBV)* de acordo com a condição do sistema imune. Existe a possibilidade de linfócitos infectados por *EBV* se proliferarem agudamente quando transplantados em camundongo imunodeficientes como os camundongos nude utilizados neste experimento.^{6,9,10}

Uma alternativa inicialmente proposta para o estudo, mas rejeitada pelo comitê de ética, foi obter amostras de pacientes submetidos à biópsia percutânea guiada por tomografia, antes do início de terapias sistêmicas. E, ao usar imagens

metabólicas do tumor, é possível obter amostras com maior quantidade de células viáveis, diminuindo o tempo necessário para o crescimento do tumor no modelo do avatar.

As principais limitações deste estudo que podem afetar os resultados futuros em pesquisas similares incluem a seleção dos pacientes: todos expostos previamente a intensos protocolos quimioterápicos. A busca por pacientes recém diagnosticados pode alterar significativamente o tempo de crescimento do modelo avatar. A falta de análise microscópica da amostra tumoral antes da implantação no camundongo, que permitiu que fragmentos de necrose e fibrose fossem implantados. Ainda, os critérios de inclusão dos pacientes no estudo foram baseados em evidências clínicas e não anatomopatológicas, obtidas em reuniões de departamento. A este fato atribuímos a inclusão do paciente número três que posteriormente, foi diagnosticado portador de carcinoma hepatocelular. O mesmo foi mantido no estudo com o objetivo de trazer a luz dados das principais limitações do mesmo.

Embora este modelo esteja estabelecido na literatura internacional, não há estudos semelhantes no Brasil. O tratamento individualizado para pacientes oncológicos atualmente é considerado como um pilar central em diferentes linhas de pesquisa para combater o câncer e, nesse contexto, a padronização desse modelo de metástases hepáticas em camundongos nude, abre o caminho para novos tratamentos.

6 CONCLUSÃO

A implantação de fragmentos tumorais frescos diretamente no parênquima hepático foi eficiente no sentido de proporcionar o crescimento in vivo do tumor

Os tumores gerados nos animais apresentam características morfológicas e a expressão das proteínas de reparo de DNA MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6 que se assemelham aos tumores originais dos pacientes.

Existe o risco intrínseco do método para o surgimento de lesões linfoproliferativas que não são relacionadas ao tumor original do paciente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Abaan OD, Polley EC, Davis SR, et al. The exomes of the NCI-60 panel: a genomic resource for cancer biology and systems pharmacology. **Cancer Res.**2013; 73:4372-82.
- 2- Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL, Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:311-6.
- 3- Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut** 2017; 66:683-91.
- 4- Balmaña J, Stockwell DH, Steyerberg EW, et al Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in Lynch syndrome. **JAMA** 2006; 296:1469-78.
- 5- Ben-David U, Ha G, Tseng YY, Greenwald NF, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. **Nat Genet** 2017; 49:1567-75.
- 6- Bondarenko G, Ugolkov A, Rohan S, et al. Patient-derived tumor xenografts are susceptible to formation of human lymphocytic tumors. **Neoplasia** 2015; 17:735-41.
- 7- Cherry SR, Gambhir SS, Cherry SR, Gambhir SS. Use of positron emission tomography in animal research. **ILAR J** 2001; 42:219-32.
- 8- Dandekar M, Tseng JR, Gambhir SS. Reproducibility of 18F-FDG microPET studies in mouse tumor xenografts. **J Nucl Med** 2007; 48:602-7.

- 9- Evens AM, Roy R, Sterrenberg D, Moll MZ, Chadburn A, Gordon LI. Post-transplantation lymphoproliferative disorders: diagnosis, prognosis, and current approaches to therapy. **Curr Oncol Rep** 2010; 12:383-94.
- 10- Fujii E, Kato A, Chen YJ, Matsubara K, Ohnishi Y, Suzuki M. Characterization of EBV-related lymphoproliferative lesions arising in donor lymphocytes of transplanted human tumor tissues in the NOG mouse. **Exp Anim** 2014; 63:289-96.
- 11- Fu XY, Besterman JM, Monosov A, Hoffman RM. Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:9345-9.
- 12- Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nat Med** 2015; 21:1350-6.
- 13- Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. **Cancer Discov** 2014; 4:998-1013.
- 14- Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:451-2.
- 15- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. **Nat Rev Clin Oncol** 2012; 9:338-50.
- 16- Kamiyama H, Noda H, Konishi F, Rikiyama T. Molecular biomarkers for the detection of metastatic colorectal cancer cells. **World J Gastroenterol** 2014; 20:8928-38.

- 17- Ledford H. Cancer-genome study challenges mouse 'avatars' Grafting human cancer cells into mice alters tumour evolution. **Nature** 2017; 09 October.
- 18- Lintoiu-Ursut B, Tulin A, Constantinoiu S. Recurrence after hepatic resection in colorectal cancer liver metastasis - review article-. **J Med Life** 2015; 8 Spec Issue:12-4.
- 19- Menezes C, Ferreira D, Faro F, Bomfim M, Trindade L. Colorectal cancer in the Brazilian population: mortality rate in the 2005-2015 period. **Rev Bras Promoção Saude** 2016; 29:172-9.
- 20- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.
- 21- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016. Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.
- 22- Oh BY, Hong HK, Lee WY, Cho YB. Animal models of colorectal cancer with liver metastasis. **Cancer Lett** 2017; 387:114-20.
- 23- Parreiras FC, Santiago GMZ, Costa AM, Lacerda Filho A. Genetic aspects of colorectal cancer and its impact on disease management. **Rev Med Minas Gerais** 2013; 23:221-7.
- 24- Perez M, Navas L, Carnero A. Patient- derived xenogra s as models for personalized medicine research in cancer. **Cancer Transl Med** 2016; 2:197-202.

- 25- Rygaard J, Povlsen CO. Hetero transplantation of a human malignant tumor to 'nude' mice. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1969; 77:758-60.
- 26- Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. **Dtsch ArzteblInt** 2013; 110:328.
- 27- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin** 2014; 64:9-29.
- 28- Wang WR. Immune-deficient animal. In: Sordat B, editor. **4th International Workshop on Immune-Deficient Animals in Experimental Research**. New York: Karger; 1982. p.239-45.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais-CEUA



CEUA/FAP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE

São Paulo, 14 de maio de 2014.

Ao
Dr. Rubens Chojniak.

Aluno: Bruno Roque (Doutorado).

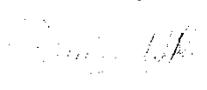
Ref. Projeto de Pesquisa nº 065/14

Título: “Desenvolvimento de modelo de enxerto tumoral de câncer colorretal com metástase hepática em camundongos imunodeficientes”

Prezado(a) Doutor(a):

O projeto de pesquisa acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua Reunião de 09 de maio de 2014. Os membros desta comissão consideraram **aprovada** a realização deste projeto de pesquisa encaminhado para análise.

Atenciosamente,


Dra. Glaucia Hajj
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo 2 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 03 de novembro de 2014.

Ao
Dr. Rubens Chojniak.

Aluno: Bruno Roque Lima (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa n.º. 1950/14

“Desenvolvimento de modelo de enxerto tumoral de câncer colorretal com metástase hepática em camundongos imunodeficientes”

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 25/11/2014, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 09/09/2014, **aprovaram** a realização do projeto (datado novembro de 2014), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Versão 1.0, de julho de 2014) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração Sobre o Plano de Recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis Pela Obtenção do TCLE;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Abdominal;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE);
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Imagem;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE);
- Aprovação do projeto em questão na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente – AC Camargo Cancer Center;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1