

**ANÁLISE DE MARCADORES SANGUÍNEOS EM  
PACIENTES COM SARCOMAS DE PARTES  
MOLES, OSTEOSSARCOMA E TUMOR  
DESMÓIDE**

**ALEXCIA CAMILA BRAUN**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Doutora  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Ludmilla Thomé Domingos  
Chinen**

**São Paulo**

**2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Braun, Alexcia Camila

**Análise de marcadores sanguíneos em pacientes com osteossarcoma, sarcomas de partes moles e tumor desmóide** / Alexcia Camila Braun – São Paulo, 2022.

68p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Descritores: 1. Tumor Desmóide/Desmoid Tumor. 2. Sarcomas de Partes Moles/Soft Tissue Sarcomas. 3. Células Tumorais Circulantes/Circulating tumor cells.

**APOIO FINANCEIRO:** Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio à Pesquisa - processo 2019/18100-8.

*“Admitir a incerteza é admitir a fraqueza, a impotência e acreditar em si mesmo apesar de ambos. É uma fragilidade, mas nessa fragilidade há uma força: a convicção de viver em sua própria mente, e não na mente de outra pessoa”.*

*Tara Westover – A menina da Montanha*

## DEDICATÓRIA

*Ao meu tio e padrinho de coração Sandro Braun (in memoriam), que juntamente com toda a minha família me ensinou o imprescindível: AMOR.*

*Aos meus pais, Lídia Braun e Rodrigo Petry pela confiança depositada e por todo apoio e incentivo na busca dos meus sonhos ao longo desses 10 anos de vida acadêmica.*

*A minha irmã Gabriela Petry, por ser a razão para que eu queira dar o melhor de mim a cada dia. Eu te amo!*

*Não há forma justa de retribuir tudo o que vocês sempre me deram e significam para mim.*

*Dedico a vocês a concretização desse sonho!*

## AGRADECIMENTOS

A todos os antigos, atuais e futuros pacientes oncológicos que acreditam na ciência, obrigada pela chance de aprendizado e realização desse estudo. Que todo o conhecimento contruído ao longo desses 4 anos de Doutorado e compartilhado nessas páginas seja combustível para novas descobertas.

À minha orientadora Dra. Ludmilla Chinen, meu mais sincero obrigada pela oportunidade de aprendizado. Agradeço imensamente pela formação profissional que me proporcionou e por todo o meu crescimento pessoal ao longo desses 7 anos. *“Somos muito parecidas, mas a parte em você que mais admiro é a que difere de mim”*.

Ao meu colega de pesquisa Dr. Fernando Campos, agradeço imensamente por toda a ajuda para recrutarmos os pacientes, pelas oportunidades de conversas e pela disponibilidade e estímulo nas minhas buscas.

À minha amiga/irmã do coração e futura Dra., Anna Paula Ruano, por toda a amizade e estímulo ao longo desses 4 anos, obrigada por me inspirar com a sua força, te admiro!

Às minhas amigas/colegas de laboratório Emne e Jacqueline pela amizade e inúmeras contribuições profissionais e pessoais. Aos demais colegas que estiveram presentes ao longo desses 7 anos no nosso laboratório, meu mais sincero obrigada pelos debates, pela ajuda nos momentos necessários, pelos cafés, chocolates e experiências compartilhadas.

Aos colegas da Oncologia Clínica, em especial, Dr. Virgílio Sousa, Dr. Thiago Bueno, Dra. Solange Sanches, Dra. Milena Tariki e Dr. Douglas Guedes por permitirem que eu fizesse parte dos estudos de vocês, obrigada por todo aprendizado.

À Dra. Patrícia Paterlini-Brechót pelas imensas contribuições para a concretização desta pesquisa.

Ao demais colegas do A.C. Camargo Cancer Center e do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino.

À equipe da Pós-graduação e Biblioteca pelo suporte.

Aos meus pais e irmã, por estarem sempre ao meu lado apoiando todas minhas escolhas e decisões.

Ao meu namorado Marco Antonio Guimarães por ser meu maior incentivador e acreditar em mim até nos meus momentos de maior fraqueza, mesmo sem saber, muitas vezes você foi a minha maior força para continuar a seguir em frente.

À minha família e amigos que mesmo longe vibram com minhas conquistas e realizações.

À FAPESP e à CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Muito obrigada!

Braun, AC. [ANÁLISE DE MARCADORES SANGUÍNEOS EM PACIENTES COM SARCOMAS DE PARTES MOLES E TUMOR DESMÓIDE]. São Paulo; 2022. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução:** O tumor desmoide (TD) é uma neoplasia rara com altas taxas de recorrência local, composto por células fibroblásticas que se caracterizam pela expressão de moléculas-chave, incluindo o filamento intermediário vimentina, ciclooxigenase-2 (COX-2) e  $\beta$ -catenina nuclear. Células tumorais circulantes (CTCs) isoladas do sangue periférico de pacientes com sarcomas e outras neoplasias podem ser utilizadas como biomarcadores precoces de invasão e disseminação tumoral. A família dos Receptores do Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) também podem influenciar no processo de invasão das CTCs, na formação de metástases e na recolonização de seus tumores de origem por meio de um processo de “auto-semeadura do tumor”. **Objetivo:** Nosso objetivo foi identificar CTCs no sangue periférico de pacientes com TD ou sarcomas e avaliar a expressão das proteínas  $\beta$ -catenina, TGF- $\beta$ RI (do Inglês, *Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor 1*), COX-2 (*Cyclooxygenase-2*), vimentina, GLUT-1 (*Glucose Transporter 1*), LGR5 (*G-Protein Coupled Receptor 5*) e EGFR, e sua correlação com sobrevidas global (SG) e livre de progressão (SLP). **Materiais e Métodos:** Foi realizado um estudo prospectivo de pacientes com diagnóstico inicial ou TD recidivado com doença mensurável. Para sarcomas, utilizamos amostras coletadas de forma prospectiva e retrospectiva. As amostras de sangue de cada paciente foram processadas e filtradas pelo ISET<sup>®</sup> (Rarecells, França) para isolamento e quantificação de CTCs. A expressão das proteínas foi analisada por imunocitoquímica (ICC). Para análise molecular das CTCs provenientes de pacientes com TD foi padronizado o método de PCR digital. **Resultados:** Foram incluídos 18 pacientes com TD, todos com CTCs detectáveis, com níveis que variaram entre 0,5–13 CTCs/mL. Encontramos uma concordância da expressão de  $\beta$ -catenina em CTCs e tumores primários de 42,8% (6/14)



dos casos usando ICC e imunohistoquímica, respectivamente. Nos nossos testes prévios de PCR digital, encontramos cópias mutadas de S45Pro em 4 pacientes (40%) e de S45Phe em apenas um paciente (10%). Em contraste, não foram encontradas mutações Th41Ala. Nas amostras de sarcomas, analisamos 30 amostras e encontramos CTCs em 93% dos pacientes e os níveis variaram de 0-11,25 CTCs/mL. Observamos também que a SG dos pacientes positivos para EGFR ( $p=0,027$ ) eram inferiores às sobrevidas dos pacientes negativos para as mesmas proteínas. **Conclusões:** Nosso estudo identificou alta prevalência de CTCs em pacientes com TD e sarcomas. A concordância da expressão de  $\beta$ -catenina entre tumor primário e CTCs traz novas perspectivas para avaliar a dinâmica das CTCs no compartimento sanguíneo, abrindo novos caminhos para o estudo da biologia e comportamento do TD. Este é o primeiro estudo a demonstrar a expressão da proteína LGR5 em CTCs de pacientes com diferentes tipos de sarcomas, o que pode abrir novas oportunidades para futuras investigações. O próximo passo é caracterizar CTCs em uma coorte maior de pacientes para entender melhor o papel do LGR5 e das demais proteínas no processo de metástases tumorais em sarcomas. Além disso, esses resultados abrem a possibilidade de usar CTCs para prever a dinâmica do TD no momento da progressão da doença e tratamento. Mais estudos com tamanhos de amostra maiores são necessários para validar nossos achados tanto em TD como em sarcomas.

## SUMMARY

Braun, AC. [ANALYSIS OF BLOOD MARKERS IN PATIENTS WITH SOFT TISSUE SARCOMA AND DESMOID TUMOR]. São Paulo; 2022. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Introduction:** Desmoid tumor (DT) is a rare neoplasm with high rates of local recurrence, composed of fibroblast cells that are characterized by the expression of key molecules, including the intermediate filament vimentin, cyclooxygenase-2 (COX-2) and  $\beta$ -catenin. Circulating tumor cells (CTCs) isolated from the peripheral blood of patients with sarcomas and other neoplasms can be used as early biomarkers of tumor invasion and dissemination. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) family can also influence the process of CTC invasion, metastasis formation and recolonization of their tumors of origin through a process of “*tumor self-seeding*”. **Objective:** Our objective was to identify CTCs in the peripheral blood of patients with TD or sarcomas and to evaluate the expression of  $\beta$ -catenin proteins, transforming growth factor receptor beta I (TGF- $\beta$ RI), COX-2 (cyclooxygenase-2), vimentin, GLUT-1 (Glucose transporter 1), LGR5 (G-protein coupled receptor 5) and EGFR and their relation with progression free (PFS) and overall survival (OS). **Methods:** We performed a prospective study of patients with initial diagnosis or relapsed TD with measurable disease. For sarcomas, we used samples collected prospectively and retrospectively. Blood samples from each patient were processed and filtered by ISET<sup>®</sup> (Rarecells, France) for isolation and quantification of CTCs. Protein expression was analyzed by immunocytochemistry (ICC). For the molecular analysis of CTCs from patients with TD, the digital PCR method was standardized. Results: Eighteen TD patients were included, all with detectable CTCs, with levels ranging from 0.5–13 CTCs/mL. We found a concordance of  $\beta$ -catenin expression in CTCs and primary tumors of 42.8% (6/14) of cases

using ICC and immunohistochemistry, respectively. In our previous digital PCR tests, we found mutated copies of S45Pro in 4 patients (40%) and of S45Phe in only one patient (10%). In contrast, no Th41Ala mutations were found. In the sarcoma samples, we analyzed 30 samples and found CTCs in 93% of the patients and the levels ranged from 0-11.25 CTCs/mL. We also observed that the OS of EGFR positive patients ( $p=0.027$ ) were lower than the survival of negative patients for the same proteins. Conclusions: Our study identified a high prevalence of CTCs in patients with TD and sarcomas. The agreement of  $\beta$ -catenin expression between primary tumor and CTCs brings new perspectives to evaluate the dynamics of CTCs in the blood compartment, opening new avenues for the study of the biology and behavior of TD. This is the first study to demonstrate the expression of LGR5 protein in CTCs from patients with different types of sarcomas, which may open new opportunities for future investigations. The next step is to characterize CTCs in a larger cohort of patients to better understand the role of LGR5 and other proteins in the process of tumor metastases in sarcomas. Furthermore, these results open up the possibility of using CTCs to predict the dynamics of TD at the time of disease progression and treatment. More studies with larger sample sizes are needed to validate our findings in both TD and sarcomas.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação da localização subcelular da $\beta$ -catenina....	6
<b>Figura 2</b>	Cascata de sinalização <i>Wnt</i> .....	7
<b>Figura 3</b>	Esquema realizado por Thomas Ashworth para demonstrar as diferenças morfológicas entre as células visualizadas em microscopia de campo claro em sangue saudável, no tumor do paciente e no sangue do paciente.	15
<b>Figura 4</b>	Ilustração do mecanismo de disseminação de CTCs (Células Tumorais Circulantes) e MTCs (Microêmbolos Tumorais Circulantes).....	16
<b>Figura 5</b>	Ilustração demonstrando os tipos de mecanismos de disseminação das CTCs.....	18
<b>Figura 6</b>	Técnicas de enriquecimento das CTCs.....	19
<b>Figura 7</b>	Modelo proposto da promoção mediada por LGR5 do crescimento do câncer do por meio da via de sinalização <i>Wnt</i> / $\beta$ -catenina.....	24
<b>Figura 8</b>	Funções bifásicas do TGF $\beta$ -RI durante a progressão do tumor.....	26
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática do EGFR na transmissão de sinais que regulam o crescimento tumoral e metástases...	28
<b>Figura 10</b>	Demonstração do fluxo de trabalho utilizando a metodologia ISET.....	33

<b>Figura 11</b>	Esquema da detecção de CTCs a partir do sistema <i>ScreenCell</i> .....	39
<b>Figura 12</b>	Exemplos de CTCs negativas para as proteínas testadas isoladas de paciente com sarcoma com características citomorfológicas.....	43
<b>Figura 13</b>	Gráfico de sobrevida livre de progressão (SLP) em relação ao sexo dos pacientes de sarcomas.....	44
<b>Figura 14</b>	Gráfico de sobrevida livre de progressão (SLP) de acordo com a quantificação de CTCs.....	44
<b>Figura 15</b>	Gráfico de sobrevida global (SG) em pacientes com diferentes tipos de sarcomas de acordo com a expressão da proteína EGFR.....	47
<b>Figura 16</b>	Gráfico de sobrevida livre de progressão em pacientes com diferentes tipos de sarcomas de acordo com a expressão da proteína GLUT-1.....	48
<b>Figura 17</b>	Fotomicrografia de Imunocitoquímica de CTC com anticorpo anti-EGFR, TGF- $\beta$ RI e $\beta$ -catenina.....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Opções de terapia sistêmica em adultos com tumores desmóides (adaptado de PENEL et al. 2017).....	4
<b>Tabela 2</b>	Subtipos de SPM mais comuns ( <i>WHO Classification of Tumours: Soft Tissue and Bone Tumours, 2020</i> ).....	9
<b>Tabela 3</b>	Estudos publicados envolvendo a detecção de CTCs em sarcomas.....	22
<b>Tabela 4</b>	Descrição dos anticorpos utilizados e suas respectivas diluições padronizadas.....	35
<b>Tabela 5</b>	Descrição da escolha de cada anticorpo para a análise de expressão proteica.....	36
<b>Tabela 6</b>	Descrição das mutações encontradas nos pacientes com tumor desmóide.....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>CTC</b>	Células Tumorais Circulantes
<b>TD</b>	Tumor desmóide
<b>PAF</b>	Polipose adenomatosa familiar
<b>ICQ</b>	Imunocitoquímica
<b>RM</b>	Ressonância magnética
<b>ISET</b>	<i>Isolation by Size of Tumor Cells</i>
<b>IHQ</b>	Imunoistoquímica
<b>NCI</b>	<i>National Cancer Institute</i>
<b>cfDNA</b>	<i>Cell free DNA</i>
<b>MTC</b>	Microêmbolos Tumorais Circulantes
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia de Polimerase
<b>ddPCR</b>	<i>Droplet Digital Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SG</b>	Sobrevida Global
<b>SLP</b>	Sobrevida Livre de Progressão
<b>EV</b>	Vesículas extracelulares
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>SPM</b>	Sarcomas de Partes Moles
<b>TME</b>	Transição Mesênquima-Epitélio
<b>TEM</b>	Transição Epitélio-Mesênquima
<b>TGF-<math>\beta</math>RI</b>	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math> Receptor Type 1</i>
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>COX-2</b>	<i>Ciclo-Oxigenase-2</i>
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>FAP</b>	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
<b>Wnt</b>	<i>Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site member</i>
<b>WG</b>	<i>Wingless</i>
<b>Fz</b>	<i>Frizzled</i>
<b>Dvl</b>	<i>Disheveled</i>

<b>TD WT</b>	Tumor Desmóide " <i>Wild Type</i> "
<b>OS</b>	Osteossarcoma
<b>SE</b>	Sarcoma de Ewing
<b>NCI</b>	<i>National Cancer Institute</i>
<b>LGR5</b>	Receptor 5 acoplado à proteína G
<b>GLUT-1</b>	<i>Glucose transporter 1</i>
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>VEGF</b>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Tumor desmóide.....	1
1.2	Diagnóstico do tumor desmóide .....	2
1.3	Tratamento do tumor desmóide.....	3
1.4	Via de sinalização Wnt .....	4
1.5	Sarcomas de partes moles .....	9
1.6	Tratamento dos sarcomas de partes moles.....	11
1.7	Sarcomas de partes moles e o microambiente tumoral.....	12
1.8	Novos biomarcadores para sarcomas .....	13
1.9	Osteossarcomas.....	13
1.10	Células tumorais circulantes.....	15
1.11	Receptor 5 acoplado a proteína G (LGR5) .....	23
1.12	Ciclo-oxigenase-2 (COX-2).....	24
1.13	Via do Fator de Crescimento Transformador Beta I (TGFβI) .....	25
1.14	Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) .....	27
1.15	Vimentina.....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1	Objetivo Primário .....	30
2.2	Objetivos Secundários.....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1	Critérios Gerais de Inclusão .....	31
3.2	Critérios Gerais de Exclusão .....	32
3.3	Isolamento e Purificação de CTCs .....	32
3.4	Imunocitoquímica nas Membranas ISET .....	33
3.5	Anticorpos padronizados na imunocitoquímica (ICC) .....	35
3.6	Extração de DNA das CTCs .....	36
3.7	Quantificação fluorométrica qubit .....	37

3.8	ddPCR ( <i>Droplet Digital Polymerase Chain Reaction</i> ).....	37
3.9	Coleta de CTCs de camundongos.....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
4.1	Tumor desmóide.....	40
4.2	Sarcomas .....	41
4.2.1	Características demográficas, clínicas e patológicas .....	41
4.2.2	Análise de CTCs.....	42
4.3	Isolamento e purificação de CTCs obtidas de camundongos.....	51
4.4	ddPCR em tumor desmóide .....	52
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>

## **ANEXO**

**Anexo 1** Artigo Publicado: “Braun AC, Campos FAB, Abdallah EA, et al. *Circulating Tumor Cells in Desmoid Tumors: New Perspectives. Front Oncol.* 2021;11:622626. Published 2021 Sep 14. doi:10.3389/fonc.2021.622626”

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

## **APÊNDICE**

**Apêndice 1** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TUMOR DESMÓIDE

O tumor desmóide (TD) é um tipo raro de tumor, de baixo grau de malignidade e alto potencial de recorrência, geralmente *in situ* (25–77%), (MICHAEL. et al 1985; ROCK et al. 1984). A incidência é de três em cada 3,5 milhões e tem uma predisposição feminina de 2:1 masculina (EASTLEY et al. 2016; KASPER et al. 2016; REITAMO et al. 1982).

O TD ocorre devido a uma mutação no gene que codifica a  $\beta$ -catenina em casos esporádicos ou nos genes APC em casos familiares, que geralmente estão associados à síndrome da polipose adenomatosa familiar (PAF) (*Familial Adenomatous Polyposis* - FAP) (CHEON et al. 2002; FISHER e THWAY 2014; HOWARD e POLLOCK 2016)

Casos esporádicos caracterizam-se por doença localmente agressiva e estão mais comumente localizados nos membros, cintura escapular, tronco e pescoço (BRIAND et al. 2014; FIORE et al. 2016; GRONCHI et al. 2014). Diferentemente dos casos esporádicos, os casos familiares estão normalmente localizados intra-abdominalmente envolvendo mesentério e/ou a parede abdominal (CLARK et al. 2002; KASPER et al. 2017).

Conforme descrito por Sørensen et al. 2002 e Teixeira et al. 2016, os TDs possuem um período médio de recorrência em torno de 14,1 meses, com taxas de recorrência local entre 15 e 77% (TEIXEIRA et al. 2016). Além disso, até dois terços das lesões excisadas cirurgicamente foram relatadas como recorrentes, independente das margens de ressecção devido à natureza infiltrativa dos TDs, que muitas vezes comprometem estruturas locais, como feixes neurovasculares ou parênquima vizinho (COLANGELI et al. [s.d.]; PHILLIPS et al. 2004; SØRENSEN et al. 2002).

Apesar de ser um tumor incomum, benigno e sem potencial metastático, alta tendência à recorrência local após excisão e ter uma natureza agressiva (CHURCH et al. 2008; GRONCHI et al. 2014), os TDs fazem parte de uma área de debate ativo na literatura e geram curiosidade entre os estudiosos, pois o seu curso é imprevisível, uma vez que, pode ocorrer regressão espontânea, doença estável de longa duração e progressão da doença, além disso, faltam fatores preditivos confiáveis e validados.

## 1.2 DIAGNÓSTICO DO TUMOR DESMÓIDE

Para caracterizar a extensão inicial do TD e monitorar a evolução, a ressonância magnética (RM) é considerada o método de imagem mais adequado para caracterizar a extensão inicial do TD e monitorar a evolução da doença (GOUNDER et al. 2011). Além disso, a biópsia por agulha grossa guiada por imagem é necessária para diagnosticar formalmente o TD.

Em 2016, um grupo de pesquisadores Franceses demonstrou que um terço dos TDs são diagnosticados erroneamente (PENEL et al. 2016), sendo assim, uma segunda opinião de um patologista especialista de grande importância, além da análise da superexpressão de  $\beta$ -catenina que acaba se tornando uma ferramenta útil no momento do diagnóstico.

Não há consenso em relação à retocoloscopia na investigação inicial do TD. Apesar do TD poder ser a primeira manifestação da FAP (mutação inicial da linha germinativa ou mutação hereditária não reconhecida em casos de FAP atenuada), as mutações *APC* e *CTNNB1* parecem ser mutuamente exclusivas, nesses casos, a retocoloscopia pode ser evitada em casos de tumor desmoide com variações somáticas de *CTNNB1*.

### 1.3 TRATAMENTO DO TUMOR DESMÓIDE

A cirurgia de grande porte não é mais considerada tratamento fundamental para o TD, pois a taxa de recidiva excede 60% dos casos (CRAGO et al. 2013). Além disso, a recidiva local pode ser maior que o tumor primário. Parâmetros clínicos que podem estar associados a um alto risco de recidiva após a cirurgia são: idade jovem (CRAGO et al. 2013; SALAS et al. 2011), tumores volumosos e margens positivas (HUANG et al. 2014). Além desses fatores, diversos estudos sugerem que a mutação S45F *CTNNB1* é um importante fator de risco para recorrência local (COLOMBO et al. 2013; DÔMONT et al. 2010; LAZAR et al. 2008; MULLEN et al. 2013; VAN BROEKHOVEN et al. 2015).

Portanto, houve uma mudança para uma abordagem mais conservadora, e a conduta de “*watch and wait*” (BONVALOT et al. 2008) tem sido aplicada, principalmente porque atualmente os dados disponíveis sugerem que apenas uma pequena porcentagem de TD é progressiva e que a maioria das progressões é observada dentro de 36 meses após o diagnóstico (COLOMBO et al. 2015; FIORE et al. 2009). Essa conduta evita o tratamento inadequado para casos em que o TD pode regredir espontaneamente.

A radioterapia raramente é utilizada no tratamento de TD. A radioterapia adjuvante é proposta em casos específicos de ressecção e em casos localizados em sítios críticos. Porém, diferentes tipos de terapia sistêmica podem ser usadas nos casos de progressão do TD (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Opções de terapia sistêmica em adultos com tumores desmóides (adaptado de PENEL et al. 2017).

Tratamento	Natureza do Estudo	n	Taxa de resposta	Outros endpoints	Referência
<b>Sulindac</b>	Retrospectivo	14	57%		Tsukada, et al. 1992
<b>Toremifeno</b>	Retrospectivo	27	22%	SLP de 6 meses: 76%	Fiore et al. 2011
<b>Metotrexato-Vimblastina</b>	Fase II	27	15%	SLP de 10 anos: 67%	Azzarelli et al. 2001
<b>Doxorrubicina</b>	Retrospectivo	14	33%		Constantinidou, et al. 2009
<b>Doxorrubicina + dacarbazina</b>	Retrospectivo	12	50%		Patel et al. 1993
<b>Imatinibe (800 mg/dia)</b>	Fase II	51	6%	SLP de 1 ano: 66%	Chugh et al. 2010
<b>Imatinibe (800 mg/dia)</b>	Fase II	37	3%	SLP de 6 meses: 65%	Kasper et al. 2016
<b>Imatinibe (400 mg/dia)</b>	Fase II	50	12%	SLP de 1 ano: 67%	Penel et al. 2011
<b>Sunitinibe</b>	Fase II	19	26%	SLP de 1 ano: 80%	Jo et al. 2014
<b>Sorafenibe</b>	Retrospectivo	26	26%		Gounder et al. 2011

**Legenda:** SLP: Sobrevida livre de progressão.

Infelizmente, não existe uma ferramenta confiável para a escolha do tratamento sistêmico do TD. No entanto, alguns estudos sugerem que TDs com mutações *CTNNB1* são mais sensíveis ao Imatinibe do que os tumores desmóides sem estas mutações (KASPER et al. 2016). Além disso, a mutação *CTNNB1* S45F está associada à resistência aos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) (meloxicam) em comparação com outras mutações ou a ausência de mutações (HAMADA et al. 2014).

Novos ensaios clínicos são necessários para identificar fatores preditivos e avaliar adequadamente a atividade do tratamento usando ensaios randomizados e ensaios usando dados de qualidade de vida.

## 1.4 VIA DE SINALIZAÇÃO Wnt

A via de sinalização da glicoproteína Wnt (*wingless-type mouse mammary tumor virus integration site member*) participa da regulação da proliferação e do

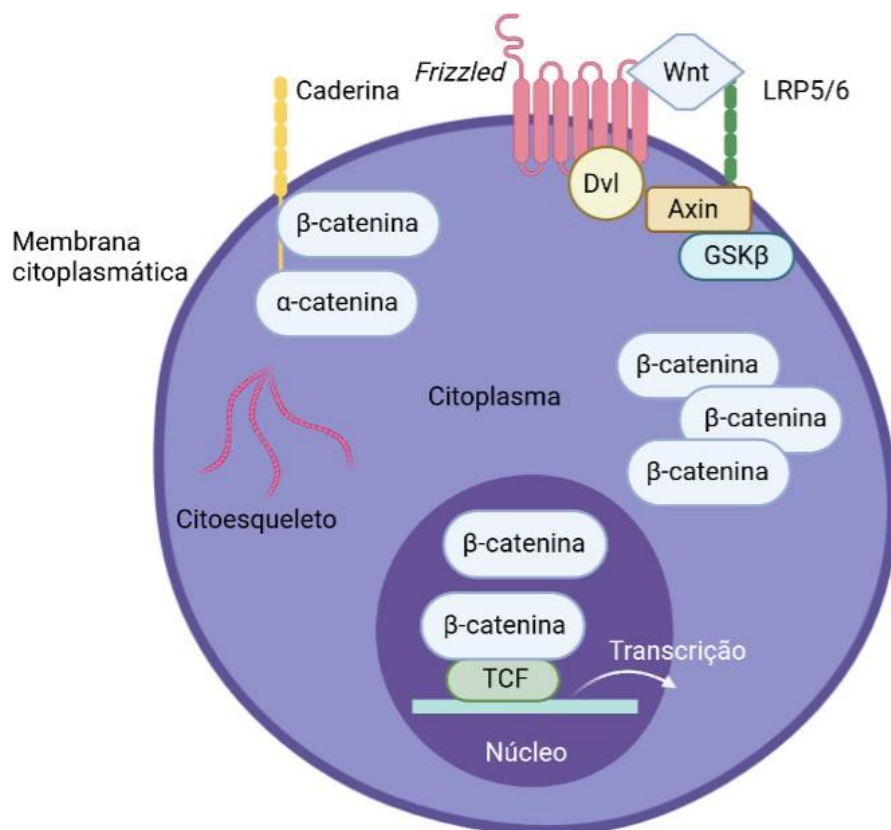
desenvolvimento celular no período embrionário (KATOH e KATOH 2007; KLAUS e BIRCHMEIER 2008).

Essa glicoproteína ativadora tem o seu nome derivado do gene *Integration 1* (Int 1) e que foi primeiramente definido como um protooncogene relacionado ao desenvolvimento de tumores de mama em ratos e do gene *Wingless* (Wg) que está relacionado ao desenvolvimento embrionário mutante de *Drosophila melanogaster* com ausência de asas.

O gene *wg* foi descrito em 1973, já o gene *int 1* foi descrito apenas em 1982, sendo posteriormente observado que estes genes eram ortólogos (entende-se como genes ortólogos os genes de diferentes espécies que são similares entre si por serem derivados de um ancestral comum). A nomenclatura Wnt deriva da junção entre *wg* e *int 1* (KLAUS e BIRCHMEIER 2008).

A via de sinalização *Wnt* depende da quantidade citoplasmática e nuclear de  $\beta$ -catenina para manter suas atividades. A cascata de sinalização *Wnt* participa do desenvolvimento embrionário e da manutenção da homeostase de tecidos maduros e regula processos celulares importantes (proliferação, adesão, diferenciação, motilidade, sobrevivência e apoptose celular (KLAUS e BIRCHMEIER 2008; TAKAHASHI-YANAGA e SASAGURI 2007) .

A via Wnt tem como seu principal efetor a  $\beta$ -catenina, que atua como um cofator de ativação transcricional e possui ação de proteína adaptadora estrutural e liga as caderinas presentes na membrana citoplasmática à actina do citoesqueleto (KIM et al. 2013; NELSON e NUSSE 2004). Sendo assim, a  $\beta$ -catenina é uma proteína que participa da adesividade celular e que pode também agir como ativador transcricional (**Figura 1**).



**Figura 1:** Representação da localização subcelular da  $\beta$ -catenina. **Membrana celular:** a  $\beta$ -catenina participa da adesão intercelular por meio da interação com a porção intracitoplasmática da caderina. **Citoplasma e/ou núcleo:** a ativação da via Wnt inibe a degradação proteossômica da  $\beta$ -catenina, que se acumula no citoplasma, podendo migrar para o núcleo celular onde atua como coativador transcricional.

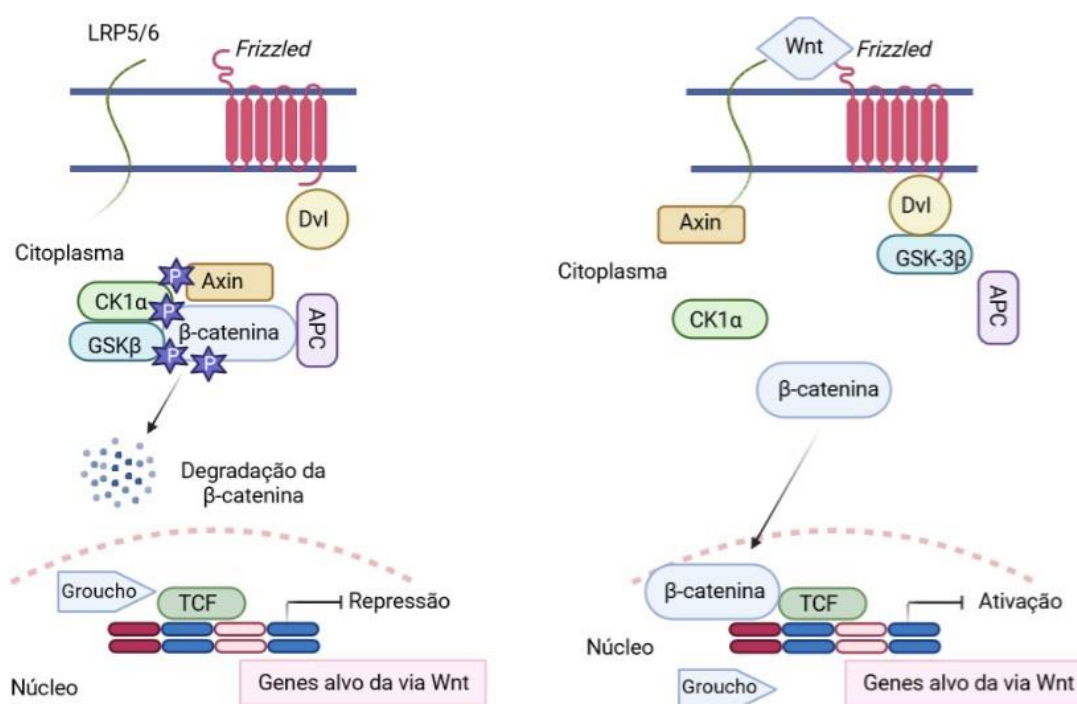
**Legenda:** LRP5/6: receptor relacionado à lipoproteína de baixa densidade; Dvl: *Disheveled*; APC: *adenomatous polyposis coli*; GSK $\beta$ : quinase glicogênio sintase  $\beta$ ; TCF: fator de células T (J Pharmacol Sci 2007;104: 293-302) (Adaptado de: J Pharmacol Sci 2007;104: 293-302) (Biorender)

A  $\beta$ -catenina desempenha o seu papel de sinalizador por meio da ativação de genes específicos no núcleo celular (ALENCAR et al. 2011). As concentrações reduzidas de  $\beta$ -catenina citoplasmática são mantidas por meio de sua contínua degradação, que é regulada por um complexo de múltiplas proteínas contendo *axis inhibition protein* (AXIN), *adenomatous polyposis coli* (APC), quinase glicogênio sintase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) e caseína quinase-1  $\alpha$  (CK-1 $\alpha$ ) (Figura 2A).

Quando ocorre a ausência da ativação da sinalização Wnt, a  $\beta$ -catenina citoplasmática forma um complexo com as proteínas de ancoragem APC-Axin, facilitando a fosforilação de resíduos de serina/treonina localizados na porção amino-terminal da  $\beta$ -catenina, o que causa sua destruição preteossômica. A ativação da via



Wnt estabiliza a  $\beta$ -catenina citoplasmática. Esta via de sinalização então é iniciada pela ligação da proteína Wnt ao complexo formado por um receptor com 7 domínios transmembrana denominado Frizzled (Fz) e um co-receptor, o receptor relacionado à proteína de baixa densidade (LRP 5 ou 6). A dimerização do receptor ativa a proteína *Disheveled* (Dvl) que promove a inativação da GSK-3  $\beta$  e, em última análise, impede a degradação da  $\beta$ -catenina que migra para o núcleo celular, onde desempenha a função de ativador transcricional (**Figura 2B**) (TAKAHASHI-YANAGA e SASAGURI 2007).



**Figura 2: Cascata de sinalização Wnt. A)** Na ausência da proteína Wnt, a  $\beta$ -catenina irá ligar-se ao complexo proteico formado pela Axin, APC, GSK-3 $\beta$  e CK-1 $\alpha$  e será fosforilada pela GSK-3  $\beta$  e CK-1 $\alpha$  na sua porção amino-terminal, resultando em destruição. **B)** A proteína Wnt liga-se ao receptor Fze ao co-receptor LRP5/6 e estes receptores medeiam a sinalização intracelular. GSK-3  $\beta$  é inibida pela Dvl ativada, impedindo a fosforilação da  $\beta$ -catenina. A  $\beta$ -catenina acumula-se no citoplasma, migrando para o núcleo. No núcleo celular a  $\beta$ -catenina irá liberar o fator repressor Groucho, liberando a transcrição de genes alvo.

**Legenda:** **Fz:** Frizzled; **LRP5/6:** receptor relacionado à lipoproteína de baixa densidade; **Dvl:** Disheveled; **APC:** adenomatous polyposis coli; **GSK-3  $\beta$ :** quinase glicogênio sintase 3  $\beta$ ; **CK-1 $\alpha$ :** quinase caseína 1  $\alpha$ ); **TCF:** fator de células T (J Pharmacol Sci 2007;104: 293-302.)

A cascata de sinalização do *Wnt* é uma via muito importante de transdução de sinal em cânceres humanos, sendo dependente da quantidade de  $\beta$ -catenina citoplasmática e nuclear (CROCE 2008; KATOH e KATOH 2007). Mutações ativadoras no gene  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*) já foram relatadas em diversos cânceres humanos como câncer de cólon, carcinoma hepatocelular, câncer gástrico, melanoma, carcinoma adrenocortical, osteossarcomas (OS) e lipossarcomas (HAYDON et al. 2002; HOANG et al. 2004; KATOH e KATOH 2007; OREN 2003; SAKAMOTO et al. 2002; TAKAHASHI-YANAGA e SASAGURI 2007).

Nos TDs, a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é muito estudada. Acredita-se que essa via seja crucial para a patogênese do TD pelo fato de a grande maioria (85%) dos TDs abrigarem uma mutação no exon 3 do gene *CTNNB1* ( $\beta$ -catenina), tornando a proteína mais resistente à ação proteolítica (DÔMONT et al. 2010; LE GUELLEC et al. 2012; TEJPAR et al. 1999).

As mutações de perda de função no gene supressor de tumor *APC*, mais comumente no contexto FAP, são menos frequentes. Em ambos os casos, a  $\beta$ -catenina se transloca para o núcleo ativando de forma aberrante os genes-alvo (LIPS et al. 2009). Esse acúmulo nuclear pode ser determinado por imunohistoquímica (IHQ) e serve como uma ferramenta diagnóstica que diferencia os TDS de outros tumores ósseos, de tecidos moles e fibrosos (NG et al. 2005).

O grupo de TDs de  $\beta$ -catenina do tipo selvagem (WT) compreende cerca de 15% de todos os TDS e é definido como “sem mutações *CTNNB1* no exon 3” (CRAGO et al. 2015).

As mutações de  $\beta$ -catenina observadas em TDs são quase exclusivamente confinadas aos resíduos T41 e S45 que ativam a via fracamente (REBOUISSOU et al. 2016). Aparentemente, essa ativação fraca é ideal para o crescimento de TDs de acordo com a hipótese de sinalização “*just-right*” que postula que cada tipo de tumor seleciona um nível ideal de sinalização de  $\beta$ -catenina para a iniciação e progressão do tumor (ALBUQUERQUE et al. 2011). Por outro lado, as proteínas mutantes de *APC* observadas em TDs retêm alguma funcionalidade na regulação dos níveis de  $\beta$ -catenina. A mutação específica da  $\beta$ -catenina pode ser de relevância clínica, uma vez que vários grupos relataram uma taxa de recorrência maior em tumores mutantes *CTNNB1* S45F em comparação com outros tumores com variantes *CTNNB1* (T41A) e TD WT (Tumor desmóide “*Wild Type*”) (LAZAR et al. 2008; TIMBERGEN et al. 2019; VAN BROEKHOVEN et al. 2015).

## 1.5 SARCOMAS DE PARTES MOLES

Os sarcomas de partes moles (SPM) compreendem ~70-80% de todos os sarcomas com > 70 subtipos histológicos heterogêneos (*WHO Classification of Tumours: Soft Tissue and Bone Tumours, 2020*) (KALLEN e HORNICK 2021). São tumores originados em tecidos conjuntivos embriologicamente derivados do mesênquima. Suas dezenas de subtipos (**Tabela 2**) podem diferenciar-se de diversos tipos celulares tais como tecido adiposo, muscular, cartilaginoso e fibroso (DUCIMETIÈRE et al. 2011).

**Tabela 2:** Subtipos de SPM mais comuns (*WHO Classification of Tumours: Soft Tissue and Bone Tumours, 2020*).

<b>Tipo de tumor</b>	<b>Subtipo de tumor</b>	<b>Principais características</b>
<b>Adiposo</b>	Lipoma - Benigno	Localização: Variável (mais comumente
	Lipossarcoma bem diferenciado - Maligno	no espaço retroperitoneal)
	Lipossarcoma Mixóide - Maligno	Histopatologia: Células cancerosas com diferenciação adipocítica variável e morfologia heterogênea
<b>Fibroso</b>	Fascite Nodular - Benigno	Localização: tecidos moles profundos
	Fibromatose/Tumor	das extremidades, tronco e cabeça e
	Desmóide - Benigno	pescoço
	Fibrossarcoma - Maligno	Histopatologia: Composto por células cancerígenas fibroblásticas
	Fibrossarcoma Inflamatório - Maligno	monomórficas em matriz colagenosa
	Fibrossarcoma pós-radiação - Maligno	
	Fibrossarcoma Cicatricial - Maligno	
<b>Músculo esquelético</b>	Rabdomioma - Benigno	Localização: Variável
	Rabdomiossarcoma alveolar - Maligno	Histopatologia: fenótipo mesenquimal com diferenciação miogênica variável
	Rabdomiossarcoma embrionário - Maligno	(geralmente positiva para miogenina e MYOD)
<b>Músculo liso</b>	Leiomioma - Benigno	Localização: Mais comumente detectado
	Leiomiossarcoma - Maligno	no peritônio e útero (raramente no osso)
	Leiomiossarcoma epitelióide - Maligno	Histopatologia: Células mesenquimais fusiformes com diferenciação de músculo

		liso (positividade SMA, desmina e h-Caldesmon)
		• Cariótipos altamente complexos com instabilidade genômica
<b>Vascular</b>	Hemangioma - Benigno	
	Hemangioendotelioma –	
	Malignade intermediária	
	Hemangiopericitoma –	
	Malignade intermediária	
	Angiossarcoma - Maligno	
<b>Tumores sinoviais</b>	Sarcoma sinovial - Maligno	Localização: Principalmente em tecidos moles profundos das extremidades Histopatologia: células fusiformes com diferenciação mesenquimal e/ou epitelial variável (ou seja, SS monofásica/bifásica) Oncogenes de fusão SS18-SSX1/2/4 específicos do porto
<b>Tumores pleomórficos</b>	Mixofibrossarcoma - Maligno	Localização: Mais frequentemente nas extremidades
	Sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grau - Maligno	Histopatologia: Células cancerosas indiferenciadas com alto grau de atipia celular e pleomorfismo
	Sarcoma pleomórfico indiferenciado com inflamação proeminente - Maligno	

Embora os SPM representem < 1% de todos os cânceres, eles têm a maior incidência entre as malignidades raras. No geral, a sobrevida de 5 anos para SPM é estimada em ~57-62% e pode variar amplamente dependendo do estágio da doença e da interação complexa entre o local anatômico e o subtipo (LYU et al. 2018).

SPM ocorrem mais comumente nas extremidades, representando cerca de 40% de todos os casos de SPM. São predominantes nos membros inferiores (28%), seguidos de membros superiores (12%). Em torno de 44% de todos os casos de SPM de extremidades ocorre nas coxas.

Os fatores prognósticos adversos para os SPM são: tamanho, idade avançada, alto grau, metástase ao diagnóstico, recorrência local ao diagnóstico (após excisão

não planejada), margem cirúrgica positiva, profundidade muscular e altos níveis de necrose tumoral (ZAGARS et al. 2003).

Devido à heterogeneidade do SPM, não é possível definir especificamente as características clínicas de um sarcoma apresentado. Por esse motivo, nódulos de tecidos moles que apresentem qualquer uma das seguintes características clínicas devem ser considerados malignos até que se prove o contrário: aumento de tamanho tumoral > 5 cm, tumores que apresentem massa profunda e/ou dolorosa. Quanto maior o número dessas características clínicas presentes, maior o risco de uma massa de tecidos moles ser maligna. Sendo assim, o aumento de tamanho da massa tumoral acaba por ser o melhor indicador individual. O tempo de crescimento é individual e não há relatos na literatura a respeito do tempo que esse crescimento normalmente ocorre, portanto, o paciente deve ser acompanhado pelo médico especialista (DANGOOR et al. 2016).

## **1.6 TRATAMENTO DOS SARCOMAS DE PARTES MOLES**

Apesar da cirurgia ser uma opção universal de tratamento para os SPM, a quimioterapia adjuvante auxilia um número limitado de subtipos e muitas vezes é guiada pela histologia do tumor.

A quimioterapia é considerada uma parte essencial do tratamento padrão para os OS e Sarcoma de Ewing (SE) (GERRAND et al. 2016), mas o uso rotineiro em SPM permanece em grande parte não comprovado (DANGOOR et al. 2016). O tratamento padrão geralmente inclui terapia combinada neoadjuvante sistêmica pré-operatória, envolvendo quimioterapia, excisão cirúrgica e quimioterapia adjuvante pós-operatória (CARRLE e BIELACK 2006).

A radioterapia tem um papel bem estabelecido no regime de tratamento dos SPM, tanto na doença localizada quanto na doença metastática. Alguns ensaios clínicos randomizados confirmaram que o tratamento combinado de cirurgia e radioterapia é o tratamento mais eficaz para a maioria dos SPM de alto grau (PISTERS et al. 1996; ROSENBERG et al. 1982; YANG et al. 1998). Em 1982, um ensaio realizado pelo *National Cancer Institute* (NCI), estabeleceu a cirurgia de preservação de membros combinada com radioterapia como o novo padrão de

tratamento após publicar que amputação ou cirurgia de preservação de membros tinham taxas de sobrevida iguais (ROSENBERG et al. 1982).

O objetivo primário da radioterapia é inativar as extensões microscópicas do tumor que circundam a cápsula tumoral, reduzindo o potencial cirúrgico de semeadura e margens histologicamente positivas, diminuindo posteriormente a taxa de recorrência local. Além disso, uma queda significativa na taxa de recorrência local para menos de 15% foi observada quando a radioterapia e a cirurgia combinadas foram introduzidas (O'CONNOR et al. 1993).

## **1.7 SARCOMAS DE PARTES MOLES E O MICROAMBIENTE TUMORAL**

As células de sarcoma evoluem em um ambiente permissivo favorecendo sua quiescência e resistência a drogas ou a sua proliferação e agressividade. Este comportamento se assemelha à teoria da “*seed and soil*” (semente e solo) descrita para outras malignidades (PAGET 1889). As células dos sarcomas estão inseridas em um contexto tecidual altamente heterogêneo composto por células imunes, células endoteliais, células tronco mesenquimais, fibroblastos associados ao câncer e fibras nervosas, podendo influenciar seu comportamento (ABARRATEGI et al. 2016; BROWN et al. 2017; FOURNEAUX et al. 2019; HATINA et al. 2019)

Alguns estudos clínicos e pré-clínicos já relataram tratamentos capazes de atingir o microambiente tumoral ou as células tronco cancerígenas em sarcomas (ABARRATEGI et al. 2016; GENADRY et al. 2018; SCHIAVONE et al. 2019). A análise de célula única, por exemplo, como sequenciamento de DNA/RNA, poderá futuramente acelerar o estudo da heterogeneidade do tecido do sarcoma e possivelmente levará à identificação de novos biomarcadores e/ou alvos terapêuticos.

## 1.8 NOVOS BIOMARCADORES PARA SARCOMAS

A avaliação histomorfológica de amostras de sarcomas em conjunto com a avaliação das características clínicas e de imagem estabelecem o diagnóstico desses tumores. Além disso, o crescimento da busca pela identificação de produtos de genes de fusão ou oncogenes superexpressos por imunohistoquímica (IHQ) enriqueceu a prática clínica (CHOI e RO 2021) (*WHO Classification of Tumours: Soft Tissue and Bone Tumours, 2020*). Porém, os sarcomas muitas vezes não expressam marcadores de IHQ específicos (GRÜNEWALD et al. 2020). Em contraste a esse cenário, a descoberta de células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (cfDNA) e vesículas extracelulares derivadas de tumores (Evs), chamadas em conjunto de Biópsia Líquida (Panabiere & Pantel, 2010) e o crescimento de novas tecnologias para detectar, quantificar e analisar esses grupos biológicos no sangue periférico e outros fluidos biológicos, são uma grande promessa para o desenvolvimento de métodos minimamente invasivos para melhorar o atendimento ao paciente.

Embora os marcadores de IHQ continuem sendo a principal ferramenta para o diagnóstico de sarcomas (WEI et al. 2017), sabemos que as biópsias líquidas podem permitir o monitoramento longitudinal da resposta ao tratamento, a detecção precoce de recaídas e a identificação de mutações.

## 1.9 OSTEOSSARCOMAS

O OS é a malignidade primária do osso mais comum, apresentando-se tipicamente na primeira ou segunda décadas de vida (HARRISON et al. 2018). Infelizmente, os resultados clínicos para pacientes com osteossarcoma não melhoraram substancialmente em mais de 30 anos (MORROW e KHANNA 2015).

O OS é um tumor de origem mesenquimal raro que se caracteriza histologicamente pela presença de células mesenquimais malignas e pela produção de estroma ósseo. Subtipos histológicos distintos foram definidos, incluindo osteossarcomas osteoblásticos, condroblásticos, fibroblásticos e telangiectásicos

(KLEIN e SIEGAL 2006), porém, o comportamento biológico e os tratamentos para esses subtipos são semelhantes.

Nos Estados Unidos, há aproximadamente 900 novos casos de osteossarcoma relatados a cada ano. A biologia desse tumor é mais comumente caracterizada por um tumor primário com alta taxa de metástase para os pulmões (GELLER e GORLICK 2010).

Considerado um tumor quimiorresistente, o OS foi tratado primariamente com cirurgia até a década de 1970. Mesmo quando o controle local completo com margens amplas da área afetada era possível, 80-90% dos pacientes sofriam metástases pulmonares fatais dentro de um ano após o diagnóstico (CHOU e GORLICK 2006). Isso demonstra a natureza maligna do osteossarcoma com a provável presença de micrometástases indetectáveis ao diagnóstico e indica a necessidade da realização de um tratamento sistêmico além da cirurgia.

Posteriormente, a implantação da quimioterapia neoadjuvante e adjuvante nas décadas de 1970 e 1980 melhorou a sobrevida global em pacientes com osteossarcoma com doença não metastática ao diagnóstico para 70% (LINK et al. 1986; ROSEN et al. 1982). No entanto, isso não melhorou drasticamente o resultado para pacientes portadores de macrometástases no diagnóstico ou aqueles com doença recidivante, com ambos os grupos exibindo taxas de sobrevida de apenas 20% (HARRISON et al. 2018; STILLER et al. 2006).

O OS é uma doença heterogênea caracterizada por um alto nível de instabilidade genômica (KUIJER et al. 2013), uma ampla gama de aberrações genéticas (CHEN et al. 2014a) e múltiplas vias de sinalização alteradas (KANSARA et al. 2014). Fatores envolvidos em sua evolução e manutenção foram identificados como decorrentes de vias envolvidas no desenvolvimento e regulação óssea, microambiente tumoral, estabilidade genômica, controle do ciclo e sinalização celulares.

A vasta instabilidade genômica, a heterogeneidade e a alta incidência metastática do osteossarcoma requerem uma combinação altamente intensiva de terapias. Embora a cirurgia (e às vezes radioterapia (BLATTMANN et al. 2010)) seja crítica para o controle local do osteossarcoma, o controle sistêmico requer um tratamento sistêmico.

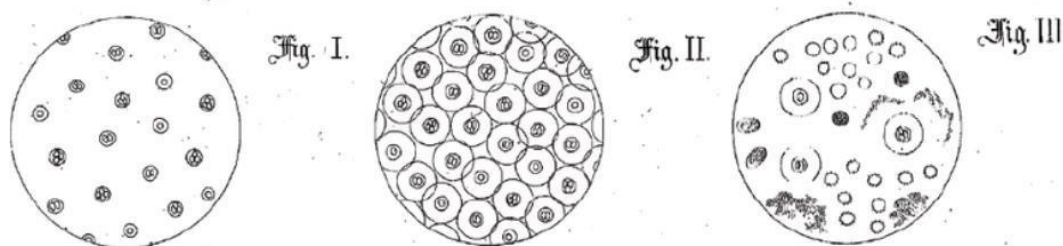
Biomarcadores adicionais na biópsia líquida são, atualmente, objeto de investigação tanto para pesquisa quanto para viabilidade clínica em



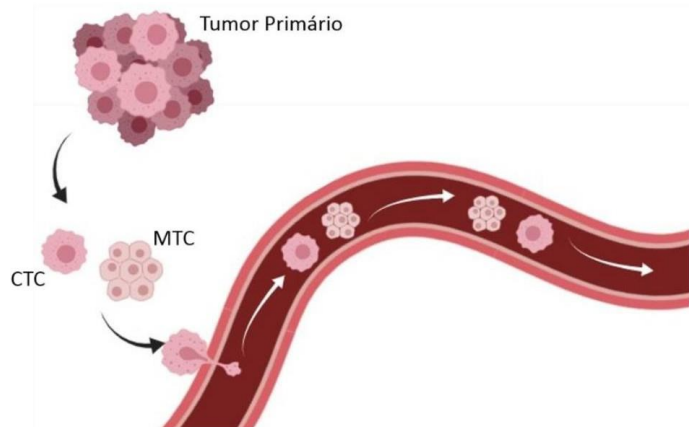
osteossarcomas. De fato, grande interesse tem sido direcionado nestes últimos anos em abordar vários biomarcadores na circulação de pacientes com câncer ao mesmo tempo, porém, poucos estudos tem focado em pacientes com osteossarcomas, devido a sua raridade e dificuldade de realizar as coletas antes do início do tratamento.

## 1.10 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

Descritas pela primeira vez há 152 anos por Thomas Ashworth, que notou células com uma morfologia incomum no sangue de um paciente que havia morrido de câncer (ASHWORTH 1869). Este médico considerou possível que essas células (devido às suas características morfológicas semelhantes às células do tumor), teriam se desprendido do sarcoma de tórax (**Figura 3**).



**Figura 3:** Esquema realizado por Thomas Ashworth para demonstrar as diferenças morfológicas entre as células visualizadas em microscopia de campo claro em sangue saudável (I), no tumor do paciente (II) e no sangue do paciente (III). Nota-se que na última figura Thomas Ashworth ilustrou células idênticas às células saudáveis e entre elas células idênticas as do tumor.



**Figura 4:** Ilustração do mecanismo de disseminação de CTCs (Células Tumorais Circulantes) e MTCs (Microêmbolos Tumorais Circulantes). As CTCs e os MTCs se desprendem do tumor primário e caem na corrente sanguínea, podendo assim, atingir sítios distantes e formar metástases.

Acredita-se que as CTCs sejam células que se desprendem do tumor primário/metastático (**Figura 4**) e passam por várias estruturas, ativa ou passivamente, e atingem o lúmen da vasculatura próxima, e, portanto, estão intimamente relacionadas ao processo metastático do câncer (SAN JUAN et al. 2019).

Segundo Fischer et al, apenas 0,0000001% de todas as células tumorais chegarão à corrente sanguínea (1-10 células/MI)

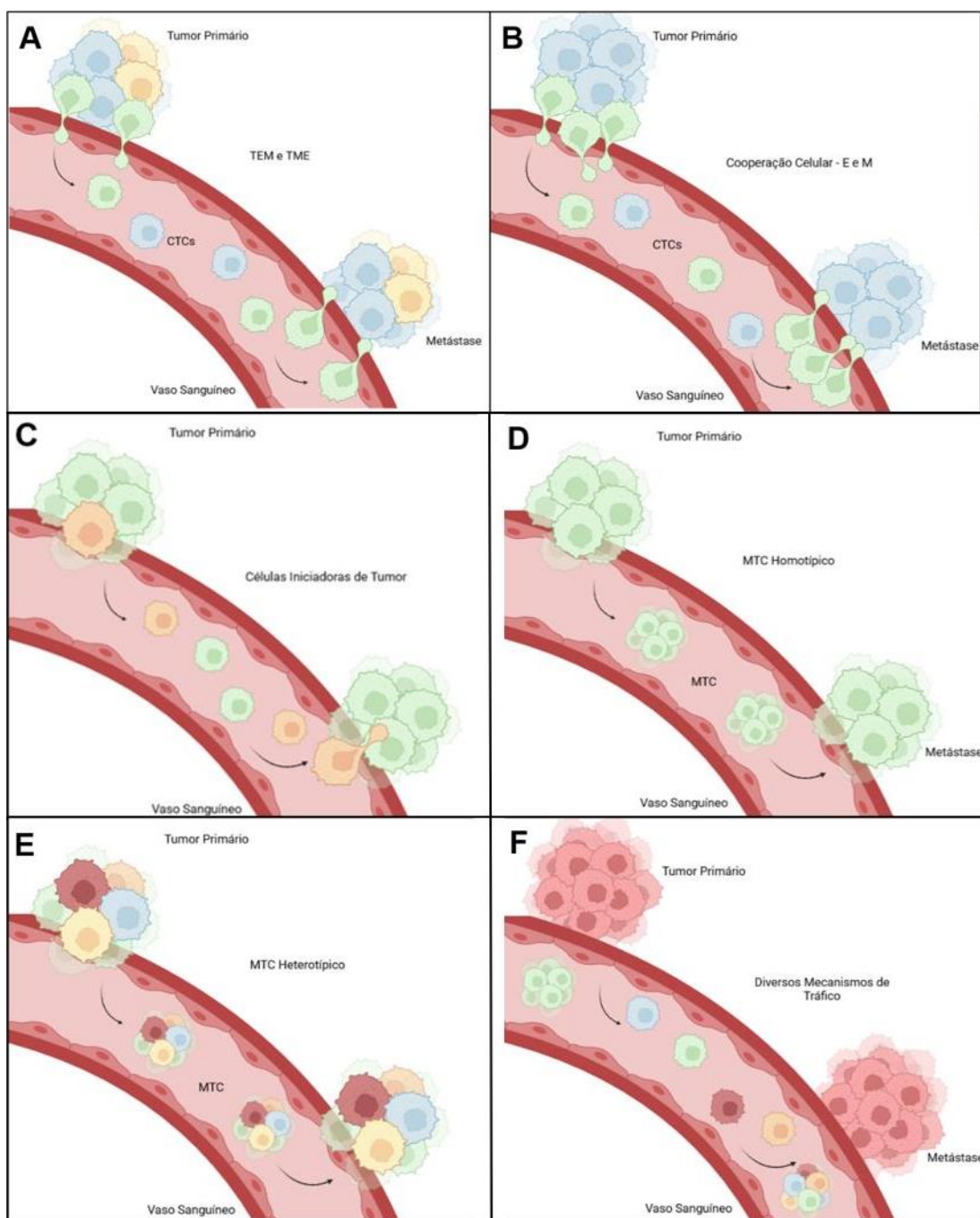
(FISCHER 2009).

Na literatura encontramos descritos diferentes mecanismos de disseminação das CTCs (KREBS et al. 2014). Alguns desses mecanismos ainda não são completamente compreendidos, mas avanços nas capacidades de detecção das CTCs e estudos de “*single cells*” estão gerando um grande avanço para a melhor compreensão do tema. Por exemplo, alguns estudos observam que quando comparamos a disseminação de CTCs únicas em comparação com MTCs (microêmbolos tumorais circulantes), a sobrevivência das CTCs na corrente sanguínea é aumentada dentro de MTCs, que podem ser formados apenas por células tumorais ou por células tumorais “clamufadas” entre células sanguíneas normais. A hipótese é de que a sobrevivência das CTCs na corrente sanguínea é aumentada dentro de MTCs (ACETO et al. 2014; HOU et al. 2012).

Se considerarmos que as CTCs e o tumor de onde provem são considerados “estranhos” para o sistema imune do hospedeiro, eles precisam escapar da resposta imune. O escape é feito justamente pela habilidade de formar MTCs, que atingem locais distantes dos de origem. Já foi demonstrado que a formação de microêmbolos de 5-10 CTCs ocultas escapa do sistema imune, promovendo recrutamento de fatores pró-angiogênicos a partir do microambiente local e expressão de novos marcadores de superfície (MUKAI 2005). Desta forma, os MTCs desempenham um papel importante na cascata metastática, uma vez que podem resistir à morte celular

na circulação sanguínea, além de serem responsáveis por atingirem mais focos de micrometástases quando comparados com as CTCs isoladas (CHEN et al. 2016).

Associando-se a estruturas de leucócitos, fibroblastos, células endoteliais ou plaquetas, os MTCs adicionam proteção contra agentes externos e outras células relacionadas ao sistema imunológico na circulação sanguínea, adquirindo-se assim, uma característica mais agressiva (KREBS et al. 2014). Além disso, os MTCs fornecem uma vantagem de adesão célula-célula na corrente sanguínea e ativam a sinalização anti-apoptose e proteção contra *anoikis* (entende-se por *anoikis* a morte celular programada que ocorre em células dependentes de ancoragem quando as mesmas se separam da matriz extracelular circundante) (HOU et al. 2012). Muitos estudiosos têm focado no papel dos MTCs, e alguns estudos já foram publicados envolvendo diversos tumores (câncer de cólon, próstata, rim e células não pequenas células) (BRANDT et al. 1996; KATS-UGURLU et al. 2009; KNISELY e MAHALEY 1958; KREBS et al. 2012; MOLNAR et al. 2001). Outros estudos clínicos também sugerem que a transição epitélio-mesênquima (TEM) (THIERY e LIM 2013) et al. 2002) e a cooperação celular ocorrem (TSUJI et al. 2008) **(Figura 5)**.



**Figura 5:** **A)** As células tumorais do tumor epitelial primário sofrem TEM parcial ou completamente. Essas células então sofrem o processo reverso da TEM em um local distante para formar a lesão metastática. **B)** As células mesenquimais invadem a vasculatura, permitindo que as células epiteliais passem despercebidas (cooperação celular). Ambos os tipos celulares são necessários para formar metástases. **C)** MTC foram detectadas em muitos pacientes com tumores sólidos. MTC são considerados como tendo uma vantagem de sobrevivência sobre células individuais, que são suscetíveis a anóikis e ataque imunológico. Os MTCs podem se apresentar com apenas um tipo celular, caracterizando um MTC homotípico. **D)** MTC heterotípico, com células acessórias, como fibroblastos ou células endoteliais demonstram ter maior potencial para formar metástases distantes do que MTC sem células acessórias. **E)** Células iniciadoras de tumor. Apenas uma minoria de células circulantes (células iniciadoras de tumor ou células cancerígenas) têm a capacidade de sobreviver na circulação e formar metástases distantes. As células filhas podem não ter esse potencial e, por fim, sofrem apoptose, liberando DNA livre de células na circulação. **F)** É improvável

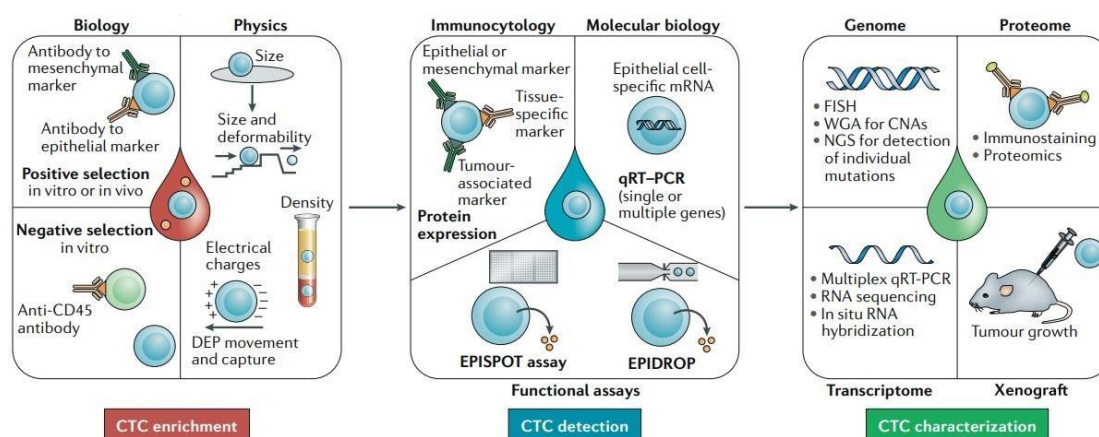
que os conceitos descritos em a–e sejam mutuamente exclusivos e sim, que todos contribuam potencialmente para a metástase.

**Legenda:** CTCs, células tumorais circulantes; MTC microêmbolo tumoral circulante; TEM, transição epitélio-mesênquima.

Adaptado de Krebs, M., Metcalf, R., Carter, L. et al. Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 11, 129–144 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.253>.

Nos últimos anos tem sido proposto que as células transitam de estados epiteliais para estados mesenquimais para migrar, mas revertem para um estado epitelial em locais distantes pelo processo reverso, transição mesênquima-epitélio (TME), como ocorre no desenvolvimento de órgãos (STARK et al. 1994). Dessa forma, a dinâmica do processo é difícil de definir através da análise apenas da biópsia do tumor e, portanto, as CTCs têm o potencial de fornecer o elo perdido em relação às propriedades das células itinerantes. Sendo assim, sistemas de captura de CTCs não epiteliais são essenciais para isolar a população de células mesenquimais (KREBS et al. 2014).

As CTCs circulam lado a lado das células sanguíneas normais, e por serem tão raras, necessitam de um método com uma alta especificidade e sensibilidade para serem detectadas de uma maneira que reflitam a quantidade real de células na circulação do paciente. Sendo assim, a sensibilidade da detecção de CTCs no sangue periférico do paciente é dependente do método de detecção usado, pois diferentes métodos provavelmente detectam diferentes subpopulações dessas células (THIELE et al. 2021) (**Figura 6**).



**Figura 6:** As CTCs no sangue podem ser enriquecidas usando técnicas dependentes de marcadores: as CTCs podem ser selecionadas *positivamente in vitro* ou *in vivo* usando anticorpos para proteínas epiteliais e/ou mesenquimais (como molécula de adesão de células epiteliais (EPCAM) e/ou citoqueratinas e vimentina mesenquimal ou N-caderina) ou selecionados negativamente por meio de depleção de leucócitos usando anticorpos anti-CD45. O enriquecimento positivo de CTCs também

pode ser realizado *in vitro* usando ensaios baseados nas características das CTCs, incluindo tamanho, deformabilidade, densidade e carga elétrica. Após o enriquecimento, as CTCs isoladas podem ser identificadas usando ensaios imunocitológicos, moleculares ou funcionais. Com plataformas imunocitológicas, as CTCs são identificadas por coloração de membrana e/ou intracitoplasmática com anticorpos para marcadores epiteliais, mesenquimais, específicos de tecido ou associados a tumores. As tecnologias moleculares permitem a identificação de CTCs usando ensaios baseados em RNA, como PCR de transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR), sequenciamento de RNA ou hibridização de RNA *in situ*. Ensaios funcionais podem ser usados para detectar CTCs viáveis com base em suas atividades biológicas, por exemplo, o ensaio fluoro-Epithelial ImmunoSPOT (EPISPOT) para certas proteínas secretadas ou liberadas por CTCs e a tecnologia EPISPOT *in drop* (EPIDROP) relacionada que permite a detecção de CTCs simples em microgotículas. As características moleculares das CTCs podem ser mais exploradas no nível de DNA, RNA e proteína, e as propriedades funcionais das CTCs podem ser investigadas *in vivo* injetando as células em camundongos imunodeficientes para formar modelos de xenoinxerto derivados do paciente.

Adaptado de Pantel, K., Alix-Panabières, C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 409–424 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0187-3>

A sensibilidade para cada método é geralmente determinada por experimentos de *spiking* utilizando um número pré-determinado de células de linhagem tumoral inseridas no sangue de um doador saudável, como descrito por Chinen et al. 2013, em um estudo que realizou o teste *spiking* e demonstrou a sensibilidade da metodologia ISET (*Isolation by SizE of Tumor Cells – Rarecells/France*) utilizando células de origem mesenquimal (CHINEN et al. 2013).

Ao longo dos anos, as CTCs estão sendo detectadas em diferentes tipos de câncer e numerosos estudos mostram uma associação da presença elevada de CTCs com mau prognóstico (sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevivida global (SG) ruins) (COHEN et al. 2009; CRISTOFANILLI et al. 2004; DE BONO et al. 2008; TOL et al. 2010). Além disso, as CTCs também têm sido estudadas para fornecerem dados preditivos, como os fornecidos por meio da análise de expressão proteica de marcadores de resistência a tratamento, o que pode ser um fator determinante para acompanhamento da recorrência local e progressão tumoral (GRADILONE et al. 2011).

Entre as diversas aplicações clínicas potenciais para as CTCs, podemos também citar a detecção precoce; prognóstico e definição de tratamento com base na contagem de CTCs; caracterização molecular; monitoramento da eficácia dos tratamentos; identificação dinâmica de alvos terapêuticos e mecanismos de resistência para a realização de mudanças em tempo real no manejo clínico; além de ser possível acompanhar o surgimento de novas metástases (ACETO et al. 2014).

Apesar de evidências clínicas mostrando que CTCs podem estar presentes no sangue de pacientes com tumores de origem mesenquimal, poucos estudos têm trabalhado com este tema. Realizando um levantamento breve utilizando as palavras “*circulating tumor cells*” na base de dados MEDLINE (PubMed) encontramos em torno de 13.000 artigos, mas ao acrescentarmos a palavra “*mesenchymal*” o número de estudos localizados pela plataforma é reduzido para 1.900 artigos, o que representa cerca de apenas 15% dos estudos relacionados ao tema. Essa diferença discrepante pode estar relacionada ao tipo de método utilizado na detecção dessas células (a maioria dos estudos é realizado com metodologias voltadas para a identificação de células epiteliais, com o uso de marcadores específicos) e devido à raridade desses tumores e a escassez de tratamentos voltados para esse tipo de tumor.

Além disso, a maior parte dos trabalhos publicados utilizou a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou métodos baseados em anticorpos de proteínas da superfície celular, incluindo a citometria de fluxo **(Tabela 3)**.

**Tabela 3:** Estudos publicados envolvendo a detecção de CTCs em sarcomas.

Adaptado de *Atlas of Liquid Biopsy Circulating Tumor Cells and Other Rare Cells in Cancer Patients' Blood*. Ludmilla T. D. Chinen. ISBN-13: 978-3030698782 ISBN-10: 3030698

<b>Autor</b>	<b>Ano de publicação</b>	<b>Pacientes (n)</b>	<b>Histologia</b>	<b>Método de Detecção</b>
Peter et al.	1995	36	Ewing's Sarcoma	RT-PCR
Pfleiderer et al.	1995	16	Ewing's Sarcoma	RT-PCR
Kelly et al.	1996	11	Rhabdomyosarcoma	RT-PCR
West et al.	1997	16	Ewing's Sarcoma/PNET	RT-PCR
Fagnou et al.	1998	62	Ewing's Sarcoma	RT-PCR
Zoubek et al.	1998	35	Ewing's Sarcoma	RT-PCR
Thomson et al.	1999	12	Alveolar rhabdomyosarcoma, Ewing's sarcoma	RT-PCR
Wong et al.	2000	11	Osteosarcoma	RT-PCR
Burchill et al.	2001	49	Neuroblastoma	RT-PCR
Schleiermacher et al.	2003	172	Ewing's Sarcoma	RT-PCR
Avigad et al.	2004	26	Ewing's Sarcoma	RT-PCR
Gallego et al.	2006	16	Rhabdomyosarcoma	RT-PCR
Hoshino et al.	2009	1	Alveolar Sarcoma	RT-PCR
Dubois et al.	2010	1	Ewing's Sarcoma	Flow Cytometry
Chinen et al.	2013	11	Soft-Tissue Sarcomas	ISET
Przybyl et al.	2014	38	Ewing's Sarcoma	RT-PCR
Satelli et al.	2014	28	Ewing's sarcoma/Osteossarcoma/Leyomiosarcoma/Angiosarcoma	Flow Cytometry
Braun et al.	2018	18	Soft-Tissue Sarcomas	ISET
Mihály et al.	2018	15	Synovial Sarcoma	ddPCR

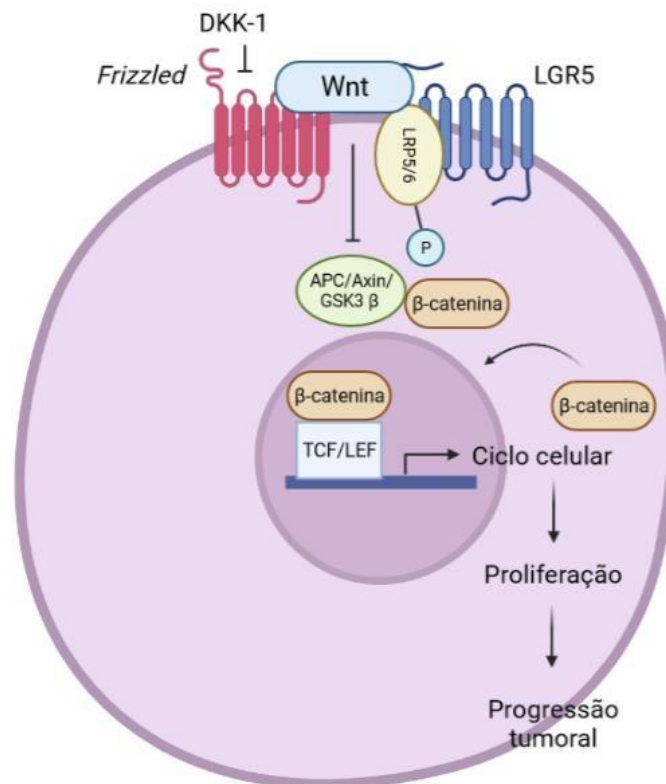


Apesar de todos eles apresentarem resultados relevantes envolvendo CTCs e tumores de origem mesenquimal, as abordagens possuem algumas limitações envolvendo a sensibilidade e especificidade dos métodos, pois não permitem a caracterização morfológica das CTCs, o estudo de expressão proteica e potencial de invasão e não detectam as células que podem estar passando pelo processo de transição mesênquima-epitélio (TME).

### **1.11 RECEPTOR 5 ACOPLADO A PROTEÍNA G (LGR5)**

O receptor 5 acoplado à proteína G contém repetição rica em leucina (LGR5), um receptor de 7 transmembranas da família de receptores acoplados à proteína G relacionado à via Wnt. É considerado um marcador de células-tronco e desempenha um papel importante no desenvolvimento normal e no câncer. Está envolvido na auto-renovação e no desenvolvimento de células-tronco de tecidos, incluindo folículos pilosos, estômago, intestino delgado e cólon (BARKER et al. 2010). Foi posteriormente relatado como um marcador de células-tronco em vários tumores (CHOI et al. 2016; KOBAYASHI et al. 2012).

Estudos mostraram que o LGR5 pode promover a iniciação, proliferação e invasão do tumor (BEIER et al. 2007; CHEN et al. 2014b; XI et al. 2014). Além disso, o LGR5 demonstrou promover o crescimento e a progressão do tumor no carcinoma colorretal (AL-KHARUSI et al. 2013), glioblastoma (MCCLANAHAN et al. 2006) e neuroblastoma (YAMAMOTO 2003). Além disso, o LGR5 é regulado positivamente no sarcoma de Ewing, um tumor ósseo maligno, e promove a progressão do tumor através da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (**Figura 7**) (ROT et al. 2011).



**Figura 7:** Modelo proposto da promoção mediada por LGR5 do crescimento do câncer do por meio da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. Uma vez ativada, a proteína LGR5 recruta o complexo receptor LRP-Frizzled, que se liga aos ligantes Wnt e reforça a sinalização Wnt após a fosforilação do LRP. Segue-se uma série de etapas, incluindo o acúmulo de  $\beta$ -catenina, que é translocada para o núcleo e, juntamente com a família de fatores de transcrição TCF/LEF, aumenta a expressão gênica relacionada, levando à progressão do câncer.

## 1.12 CICLO-OXIGENASE-2 (COX-2)

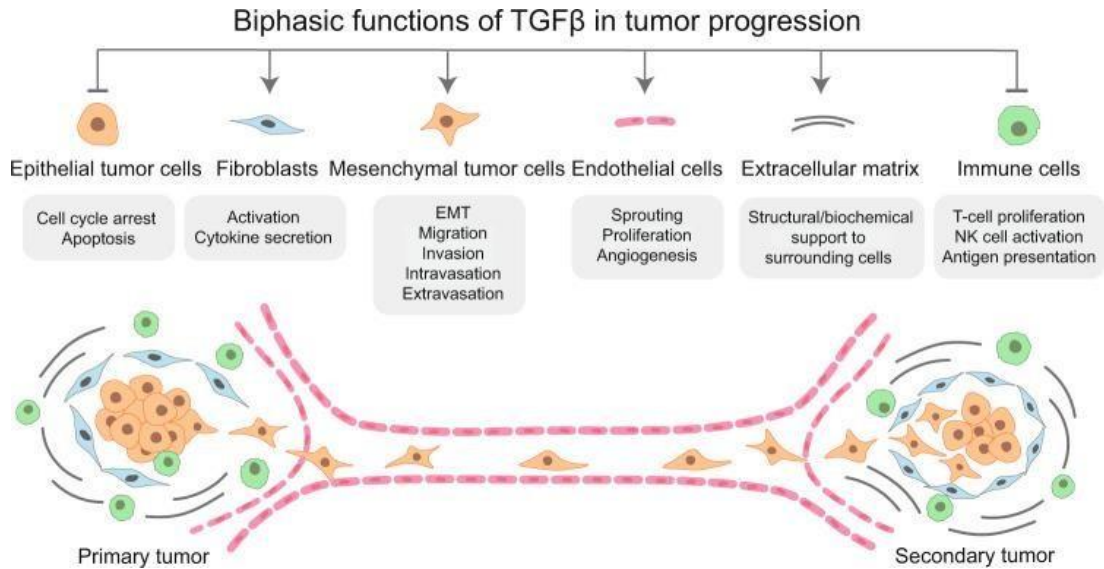
A COX-2 é uma enzima que é liberada no local da lesão tecidual para produzir uma substância semelhante a um hormônio chamada prostaglandina E2 (PGE2) que estimula a dor e a inflamação. A prostaglandina derivada da COX-2 pode promover o crescimento do tumor ligando-se a seus receptores e ativando vias de sinalização que controlam a proliferação celular (SHENG et al. 2001), angiogênese (BEN-AV et al. 1995; TSUJI et al. 1998), inibem a apoptose e aumentam o potencial metastático. Em células de câncer de mama, a expressão de COX-2 altera a estrutura e função da matriz extracelular e o número de fibroblastos associados ao câncer (KRISHNAMACHARY et al. 2017). A expressão

elevada de COX-2 é exibida em vários cânceres, incluindo câncer gástrico, hepático, esofágico, pancreático, cabeça e pescoço, pulmão, mama, bexiga, colo do útero, endométrio, pele e colorretal quando comparada com tecidos não malignos (KOKI et al. 2002).

### **1.13 VIA DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA (TGF $\beta$ )**

O fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF $\beta$ ) pertence a uma família de citocinas multifuncionais que exibem papéis importantes no desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual e regeneração, e seu mau funcionamento tem sido implicado em câncer, fibrose, doenças imunológicas e muitas outras patologias (DAVID e MASSAGUÉ 2018; DERYNCK et al. 2021). Existem três isoformas de TGF $\beta$  de mamíferos altamente relacionadas estruturalmente, ou seja, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 e TGF $\beta$ 3 (FLANDERS et al. 2016). TGF $\beta$ 1 é a isoforma mais abundante e estudada, sendo particularmente altamente enriquecida em plaquetas e ossos (SEYEDIN et al. 1986).

A sinalização de TGF $\beta$  possui numerosos papéis na regulação das funções das células cancerígenas, incluindo progressão do ciclo celular, apoptose, adesão e diferenciação (BATLLE e MASSAGUÉ 2019) (**Figura 8**).



**Figura 8:** Funções bifásicas do TGF $\beta$  durante a progressão do tumor. O TGF $\beta$  atua como supressor tumoral no estágio inicial da progressão tumoral, induzindo a parada do ciclo celular e a apoptose de células epiteliais normais e pré-malignas. Após ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor, as células tumorais tornam-se insensíveis aos efeitos citostáticos induzidos por TGF $\beta$  e sofrem proliferação descontrolada. O TGF $\beta$  produzido por células tumorais, fibroblastos, células imunes e endoteliais no microambiente tumoral podem fazer com que as células cancerosas sofram uma transição epitélio-mesênquima (TEM). Assim, as células em estágio avançado adquirem a capacidade de escapar do nicho primário, irem para a circulação, extravasar e se localizar em locais distantes e progredir para formar metástases. A sinalização recíproca de TGF $\beta$  entre as células cancerígenas e a TEM contribuem para a progressão do câncer, ativando fibroblastos associados ao câncer, estimulando a angiogênese, promovendo a secreção de citocinas pró-tumorais, aumentando a deposição de matriz extracelular e evitando um ataque imunológico. Nos sítios metastáticos, as células tumorais mesenquimais podem sofrer uma transição mesênquima-epitélio e assim, mudar de volta para um fenótipo epitelial, que permite o rápido crescimento.

Liu S, Ren J, Ten Dijke P. Targeting TGF $\beta$  signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):8. Published 2021 Jan 8. doi:10.1038/s41392-020-00436-9.

Em diferentes tipos de células e/ou condições, o TGF $\beta$  pode ter efeitos diferentes, até mesmo opostos (MASSAGUÉ 2012). Em células normais e pré-malignas, o TGF $\beta$  atua principalmente como supressor tumoral, inibindo a proliferação celular, promovendo apoptose e mantendo a estabilidade do genoma (YANG e MOSES 2008). Porém, as células tumorais podem se adaptar ou ignorar seletivamente as funções supressoras do TGF $\beta$ ; eles utilizam os papéis promocionais do TGF $\beta$  para obter uma vantagem de crescimento e passam por processos, como a transição epitélio-mesênquima (TEM), que permite sua migração, invasão, intravasamento e extravasamento (HAO et al. 2019). O TGF $\beta$  pode criar um microambiente

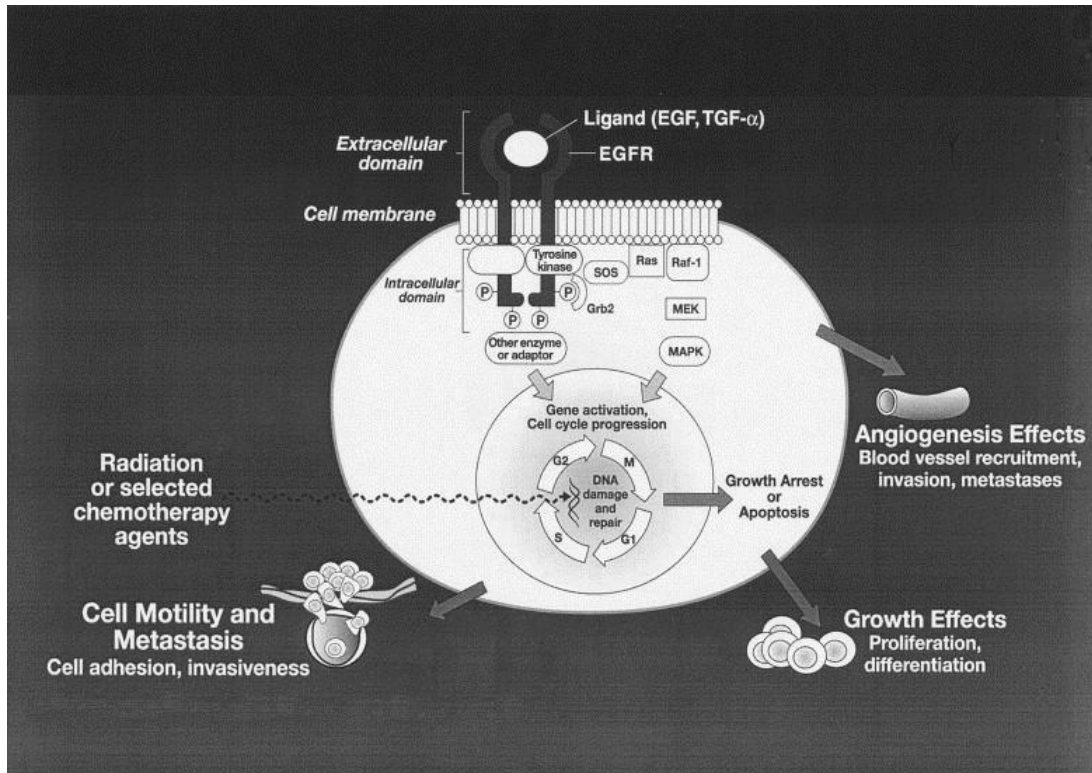
tumoral benéfico ao atuar de maneira parácrina para ativar fibroblastos associados ao câncer (FACs), promover a angiogênese, produzir matriz extracelular (MEC) e suprimir a reação imune antitumoral para desencadear a progressão do câncer e promover metástase (COLAK e TEN DIJKE 2017).

## **1.14 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)**

O receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) é um membro da família de receptores ErbB, uma subfamília de 4 receptores tirosina quinase muito próximos: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) e Her 4 (ErbB-4). A sinalização EGFR/ErbB está envolvida na proliferação celular, migração, motilidade e invasão de células malignas (EGLOFF e GRANDIS 2008). O EGFR é superexpresso em muitos cânceres, incluindo CCECP (Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço) e câncer de pulmão, bem como em tumores gastrointestinais. Vários estudos avaliando a associação entre a superexpressão de EGFR e a taxa de sobrevida foram relatados, demonstrando que o aumento da expressão tumoral da proteína EGFR está associado à redução da sobrevida em tumores sólidos (ADJEL e ROWINSKY 2003; GRANDIS et al. 1998; HYNES e LANE 2005)

A ativação do EGFR também desempenha um papel na resistência à quimioterapia e ao tratamento de radioterapia em células tumorais. Nas últimas duas décadas, muito esforço tem sido direcionado ao desenvolvimento de agentes anticancerígenos que podem interferir na atividade do EGFR. As abordagens farmacológicas mais comuns para inibir o EGFR têm sido desenvolver anticorpos monoclonais e inibidores de pequenas moléculas. Os anticorpos monoclonais bloqueiam a ligação do ligante ao domínio extracelular, enquanto os inibidores de pequenas moléculas exercem seus efeitos na porção intracelular do receptor para

evitar a fosforilação da tirosina quinase e a ativação subsequente das vias de transdução de sinal (HERBST 2004) (**Figura 9**).



**FIGURA 9:** Representação esquemática do EGFR na transmissão de sinais que regulam o crescimento tumoral e metástases. Ligantes como o EGF e o fator de crescimento transformador- $\alpha$  ligam-se ao domínio extracelular. Isso ativa o receptor tirosina quinase, que fosforila proteínas na via de transdução de sinal, levando à ativação de genes que regulam a proliferação celular, angiogênese, motilidade e metástase. Harari PM, Huang SM. Modulação de alvos moleculares para aumentar a radiação. Clin Cancer Res 2000;6:323-325.

## 1.15 VIMENTINA

A vimentina é uma proteína de filamento intermediário cujo nome é derivado da palavra latina *vimentum*, que significa vime (FRANKE et al. 1978). Franke et al. observaram por microscopia de imunofluorescência uma complexa rede de fibras, diferente do já conhecido sistema de queratina no citoesqueleto de células epiteliais. No desenvolvimento de camundongos, a vimentina surge inicialmente em um tipo de células altamente migratória (ou seja, quando o embrião ainda é um epitélio de duas camadas e as células

ectodérmicas começam a migrar para a recém-formada “fenda mesodérmica”). Nessas primeiras células mesenquimais os genes da queratina são desativados e o gene da vimentina é ativado (FRANKE et al. 1978). Além disso, foi observado precocemente que a vimentina é significativamente expressa na maioria dos tipos de células, principalmente células tumorais de origem mesenquimal.

A regulação positiva da vimentina em células epiteliais cultivadas *in vitro* (MAIER et al. 2016) e *in vivo* (WANG et al. 2018) correlaciona-se com a TEM, um processo que ocorre durante o desenvolvimento, cicatrização de feridas e também na metástase de câncer (HAY 1989).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

Detectar células tumorais circulantes e microêmbolos tumorais circulantes no sangue periférico de pacientes com tumor desmóide e sarcomas de partes moles.

### **2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- ✓ Avaliar a expressão das proteínas  $\beta$ -catenina, receptor de fator do crescimento transformador I (TGF- $\beta$ RI), COX-2 e vimentina nas amostras de tumor desmóide;
- ✓ Avaliar a expressão das proteínas  $\beta$ -catenina, receptor de fator do crescimento transformador I (TGF- $\beta$ RI), EGFR, COX-2, GLUT-1 e LGR5 nas amostras de sarcomas;
- ✓ Estabelecer um protocolo e realizar análise molecular das amostras de tumor desmóide utilizando PCR digital;
- ✓ Estabelecer um protocolo e coletar amostras de CTCs provenientes de camundongos com SPM.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto “*Análise de marcadores sanguíneos em pacientes com sarcomas de partes moles e tumor desmóide*” foi submetido ao CEP desta instituição e aprovado (nº 2427/17). Foi um estudo prospectivo realizado por meio da coleta de sangue total de pacientes com sarcoma de partes moles e tumor desmóide. Participaram da pesquisa apenas os indivíduos que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**). Todo o procedimento de identificação foi realizado por códigos, preservando a confidencialidade do paciente.

Foram coletados aproximadamente 10mL de sangue de cada paciente (para contagem e filtração no equipamento ISET), além disso, utilizamos como controle negativo do sistema, o sangue de indivíduos saudáveis.

#### 3.1 CRITÉRIOS GERAIS DE INCLUSÃO

Foram incluídos nesse estudo os pacientes que preencheram os seguintes critérios:

- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Pacientes que apresentaram sarcomas dos tipos: leiomiossarcoma, sarcoma pleomórfico, sarcoma sinovial, lipossarcoma e rabiomiossarcoma ou tumor desmóide.
- Extensão da doença determinada por exame físico e por imagem;

- Doença mensurável pelos critérios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*).

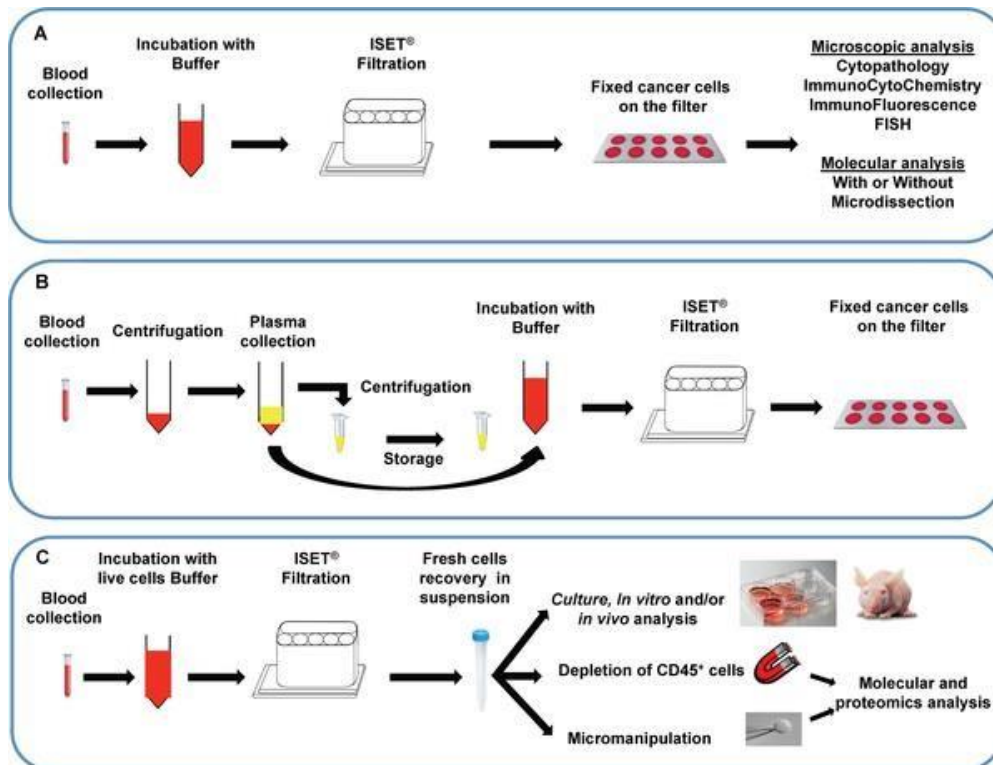
### 3.2 CRITÉRIOS GERAIS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos desse estudo pacientes que apresentaram as seguintes características:

- Terapia prévia nas últimas três semanas;
- História prévia de outros tumores nos últimos dois anos.

### 3.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE CTCS

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de EDTA (10 mL) e foram processadas dentro de 4 horas. O sangue foi diluído 1:10 em tampão de lise de eritrócitos e filtrado no sistema ISET (*Isolation by Size of Tumor Cells – Rarecells/France*) (**Figura 10**). Essa metodologia baseia-se no fato de que a maioria dos leucócitos do sangue periférico (linfócitos e neutrófilos) são as menores células do corpo, com um tamanho que varia de 8 a 11  $\mu\text{m}$ . Desta forma, estas células podem ser eliminadas por filtração do sangue através de uma membrana de policarbonato com poros calibrados de 8  $\mu\text{m}$ . Sendo assim, as células tumorais que possuem tamanho nuclear igual ou maior que 16 $\mu\text{m}$  (KREBS et al. 2012), ficam retidas na membrana para posterior análise.



**Figura 10:** Demonstração do fluxo de trabalho utilizando a metodologia ISET. Laget S, Broncy L, Hormigos K, Dhingra DM, BenMohamed F, Capiod T, et al. (2017) Technical Insights into Highly Sensitive Isolation and Molecular Characterization of Fixed and Live Circulating Tumor Cells for Early Detection of Tumor Invasion. PLoS ONE 12(1): e0169427.

Após a filtragem e fixação das CTCs nas membranas, as mesmas foram lavadas com PBS, secas à temperatura ambiente, protegidas da luz e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

### 3.4 IMUNOCITOQUÍMICA NAS MEMBRANAS ISET

Para a realização da imunocitoquímica e para análise de expressão proteica, os *spots* das membranas foram cortados e colocados em placas de 24 poços. Cada *spot* foi hidratado com *Tris Buffered Saline* (TBS) por 20 minutos. As células foram permeabilizadas com TBS 0.2% Triton X-100 por

5 min à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com TBS, as membranas foram incubadas por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, com uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio, e lavadas novamente com TBS. Em seguida o primeiro anticorpo primário a ser pesquisado foi aplicado aos *spots* e incubado por uma hora. Para o controle negativo utilizamos linhagens que sabidamente não expressam os anticorpos a serem analisados, e para os controles positivos, escolhemos linhagens de células tumorais que expressam o anticorpo a ser analisado. A escolha das linhagens foi baseada no *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) (**Tabela 4**).

A revelação foi feita com *Dual long system* HRP (Dako™) e pelo cromógeno Diaminobenzidina 3,3' (DAB) (Dako™). Após a utilização do DAB, realizamos uma incubação de uma hora com o segundo anticorpo primário, seguida por outra incubação de 20 minutos com o *Rabbit/Mouse* (LINK) (Kit Envision™ G/2 System/AP). Após lavagem com TBS, o *spot* foi incubado por 30 minutos com *AP Enzyme (Enhancer)*. O segundo anticorpo foi revelado por *Permanent Red*.

Para finalizar, o *spot* foi corado com hematoxilina. Com o anticorpo anti-CD45 foi realizada uma marcação nos leucócitos, excluindo a possibilidade de reação inespecífica e confirmando que as células marcadas pelos anticorpos pesquisados não eram leucócitos. Para leitura, os *spots* foram corados com hematoxilina por 1 minuto, aderidos a lâmina com meio de montagem aquoso e posteriormente estocados em temperatura entre -2°C e -8°C.

As CTCs e os CTMs (os CTMs foram considerados quando observadas 3 ou mais CTCs agrupadas) foram caracterizados de acordo com os seguintes critérios: tamanho nuclear igual ou maior que 16µm, irregularidade do contorno nuclear, presença de citoplasma visível, alta proporção núcleo-citoplasma (> 0,8), de acordo com o descrito por KREBS et al. (2012). Na ausência de qualquer um dos critérios descritos, as células foram classificadas como atípicas. Os resultados foram dados em número de CTCs por mL de sangue. As lâminas foram lidas em microscópio óptico *Research System Microscope BX61 – Olympus*, acoplado a uma câmera digital (SC100 – Olympus, Tóquio, Japão).

### 3.5 ANTICORPOS PADRONIZADOS NA IMUNOCITOQUÍMICA (ICC)

**Tabela 4:** Descrição dos anticorpos utilizados e suas respectivas diluições padronizadas.

<b>Anticorpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluição</b>	<b>Controle positivo (linhagem)</b>	<b>Controle negativo (linhagem)</b>
β-Catenina	Abcam (ab16051)	1:500	SiHa	SK-BR3
Anti-EGFR	Abcam (ab52894)	1:500	A-549	MCF7
Anti -TGF β Receptor 1	Abcam (ab92486)	1:500	SK-BR3	HT-1080
COX-2	Invitrogen (MA5-14930)	1:200	U-87	MCF7
VEGFR	Abcam (ab1316)	1:500	U-87	HEK-293
LGR5	Invitrogen	1:500	HEK-293	SK-BR3

**Tabela 5:** Descrição da escolha de cada anticorpo para a análise de expressão proteica.

<b>Anticorpo</b>	<b>Justificativa</b>
$\beta$ -Catenina	A $\beta$ -catenina é uma proteína codificada pelo gene CTNNB1. Mutações e a super expressão estão associados a diversos tipos de câncer. É amplamente utilizada no diagnóstico de tumor desmóide.
Anti-EGFR	É o receptor celular de membrana para os membros da família dos fatores de crescimento epidérmico. Sua expressão é amplamente encontrada em diversos tipos tumores epiteliais, porém observamos sua expressão em tumores mesenquimais (Braun et al., 2018).
Anti-TGF $\beta$ Receptor 1	O Fator de transformação do crescimento beta é uma proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células, além de estar envolvido na transição na transição epitélio-mesênquima.
COX-2	Está associada a fenômenos de inflamação.
LGR5	O LGR5 é expresso em diversos tecidos e é basicamente utilizado como um biomarcador de células-tronco adultas em certos tecidos.

### 3.6 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA DAS CTCs

Para a realização das extrações utilizamos 4 *spots* da membrana de policarbonato obtidos pela técnica ISET (após a quantificação de CTCs) e armazenamos em RNA later. As extrações foram realizadas com o Kit QIAmp DNA Micro Kit (Qiagen, Valência, CA, EUA). Os 4 *spots* foram então cortados em pequenos pedaços, os quais posteriormente foram transferidos para o tampão de lise e proteinase K fornecido pelo Kit. As extrações foram realizadas de acordo com as orientações do fabricante. Após a extração, as amostras de DNA ficaram armazenadas em freezer -20°C até o momento da realização do ddPCR e as amostras de RNA ficaram armazenadas em freezer -80°C para futuras pesquisas.

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO FLUOROMÉTRICA QUBIT

Para a realização da quantificação de DNA utilizamos a quantificação fluorométrica Qubit. A metodologia utiliza corantes fluorescentes para determinar a concentração de ácidos nucleicos ou proteínas na amostra. A quantificação de DNA das amostras foi realizada conforme orientações do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

Sendo assim, diluímos 1µl do fluoróforo (iQuant Reagent) em 199µl do diluente (iQuant Buffer) e posteriormente acrescentamos 1µl do DNA já eluído. Esse processo foi realizado para cada amostra a ser quantificada, gerando um volume final de 200µl por amostra. A leitura das amostras foi realizada no aparelho Qubit 4 Fluorometer.

### 3.8 ddPCR (*Droplet Digital Polymerase Chain Reaction*)

Os experimentos de ddPCR foram realizados conforme recomendações do fornecedor (Bio-Rad). Realizamos a padronização das mutações EGFR para amostras de sarcomas e para tumor desmóide as mutações CTNNB1.

Primeiramente, montamos a placa de ddPCR no fluxo, onde inserimos a amostra, o *master mix* e as probes que foram padronizadas. Após a homogeneização, a mistura de reação da PCR e o óleo de geração de gotas para sondas foram carregados em um cartucho gerador de gotículas de 8 canais (Bio-Rad Laboratories). As misturas da reação de PCR foram divididas em uma emulsão de aproximadamente 20.000 gotas (~ 1 nL por gota) que foram transferidos manualmente para uma placa de PCR de 96 poços. A placa foi selada (180°C) e colocada no termociclador destinado para ddPCR (Bio-Rad) seguindo as temperaturas descritas pelo fabricante.

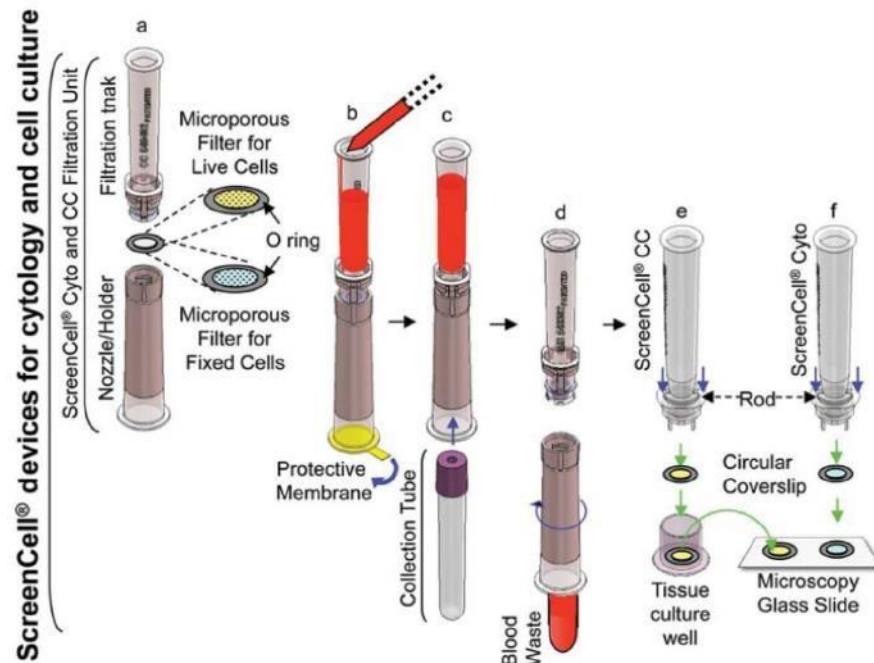
Depois, a placa foi carregada num leitor de gotas QX100 (Bio-Rad Laboratories) e a análise de dados ddPCR foi realizada com QuantaSoft software (Versão 1.7.4.0917) que analisa cada gotícula individualmente

usando um sistema de detecção de duas cores (definido para detectar Corantes FAM ou HEX). A quantificação absoluta de DNA dependeu diretamente do número de gotículas aceitas (positivas e negativas) e da quantidade de DNA analisada.

### **3.9 COLETA DE CTCs de CAMUNDONGOS**

Estabelecemos uma parceria dentro da nossa instituição com o Dr. Tiago Góss dos Santos e coletamos amostras de camundongos xenotransplantados com sarcomas de partes moles para verificarmos a presença de CTCs nesses animais. Os camundongos utilizados para a realização desse experimento fazem parte de um projeto previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (082/18) dessa instituição. Para o isolamento e purificação de CTCs nós coletamos o sangue de camundongos que seriam descartados após a retirada do xenotransplante para análise. Para isso, coletamos o sangue por punção intracardíaca e utilizamos a metodologia *ScreenCell* (**Figura 11**). A metodologia consiste basicamente em diluir a quantidade de sangue em um tampão de lise e posteriormente filtrar utilizando um dispositivo fornecido pelo fabricante.





**Figura 11:** Esquema da detecção de CTCs a partir do sistema *ScreenCell*. Imagem retirada de ANTICANCER RESEARCH 31: 427-442 (2011). Disponível em: <https://www.screencell.com/wp-content/uploads/2014/01/Desitter-et-al-2011.pdf>

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo foram divididos em quatro partes:

**4.1** Tumor desmóide: apresentados em formato de artigo;

**4.2** Sarcomas: descritos nos itens resultados e discussão.

**4.3** Isolamento e purificação de ctcs obtidas de camundongos

**4.4** ddPCR em tumor desmóide

### 4.1 TUMOR DESMÓIDE

Realizamos um estudo prospectivo de pacientes com diagnóstico inicial ou recidivado de tumor desmóide com doença mensurável. As amostras de sangue de cada paciente foram processadas e filtradas pelo ISET<sup>®</sup> para isolamento e quantificação de CTCs. A expressão de  $\beta$ -catenina, COX-2, TGF- $\beta$ RI e vimentina foi analisada por imunocitoquímica (ICC) nessas células. Um total de 18 pacientes foram incluídos e todos tinham CTCs detectáveis. Encontramos uma concordância da expressão de  $\beta$ -catenina tanto em CTCs quanto em tumores primários de 42,8% (6/14 dos casos) usando ICC e imunoistoquímica (IHQ)\*, respectivamente.

Os dados obtidos por meio desse estudo foram publicados sob o título “*Circulating Tumor Cells in Desmoid Tumors: New Perspectives*”, na revista “*Frontiers in Oncology*”, IF: 6.244.

- Braun AC, Campos FAB, Abdallah EA, et al. Circulating Tumor Cells in Desmoid Tumors: New Perspectives. *Front Oncol.* 2021;11:622626. Published 2021 Sep 14. doi:10.3389/fonc.2021.622626. **(Anexo 1)**.

\*A metodologia utilizada para a IHQ não está descrita no item “3 – Metodologia”, pois essa reação foi realizada na rotina do A.C. Camargo Cancer Center e coletamos as informações do banco de dados *Tasy*, onde ficam armazenados os prontuários eletrônicos dos pacientes atendidos na instituição.

## 4.2 SARCOMAS

### 4.2.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E PATOLÓGICAS

Amostras de sangue foram coletadas de 14 pacientes com diagnóstico de sarcoma de partes moles e osteossarcoma de forma prospectiva (Aprovação CEP: 2427/17) (**Anexo 2**). As coletas foram realizadas no período de 04/02/2018 a 14/04/2021. Realizamos também a análise retrospectiva de amostras de 16 pacientes, de 02/02/2016 a 18/01/2017 (Aprovação CEP: 2081/15). Um banco de dados com as características clínico-patológicas dos indivíduos participantes da pesquisa para análise foi construído na plataforma RedCap (PID 587). Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice 1**).

Dos 30 pacientes incluídos, 18 (60%) eram homens e 12 (40%) mulheres, com a idade mediana de 46 anos (18-72) ao diagnóstico. As contagens de CTCs de todos os pacientes foram realizadas.

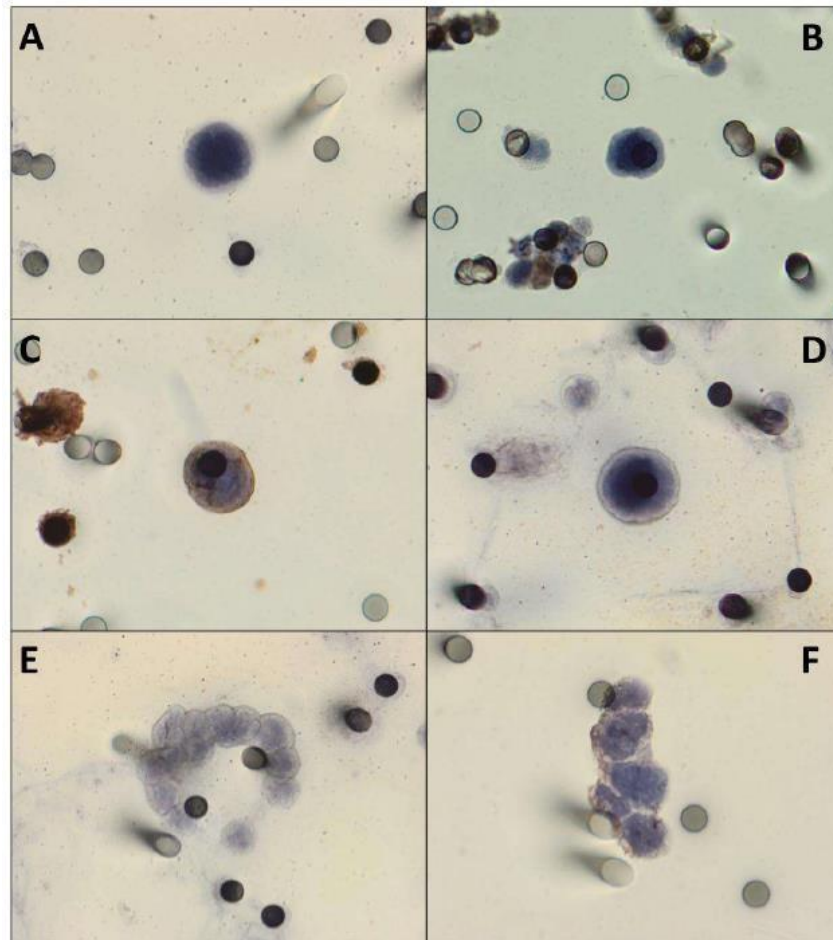
Os pacientes incluídos em sua maioria apresentaram tumor primário ao diagnóstico 19 (63%) enquanto 11 (37 %) já eram metastáticos ao diagnóstico. Dos 30 pacientes incluídos no estudo, 13 (43%) vieram a óbito, sendo que desses, 5 (38%) já eram metastáticos ao diagnóstico.

Vinte e quatro pacientes metastizaram após a coleta de CTCs e o tempo mediano de surgimento de metástase após a coleta das CTCs foi de três meses (1 mês – 11 meses).

Em relação ao tipo histológico, 29 pacientes foram diagnosticados com sarcomas de partes moles e apenas um paciente com osteossarcoma. O subtipo histológico mais predominante foi o sarcoma sinovial (n=11; 37%), seguido pelo diagnóstico de leiomiossarcoma (n=7; 24%), sarcoma pleomórfico (n= 4; 13%) e lipossarcoma (n=4; 13%), rabdomiossarcoma (n=3; 10%) e osteossarcoma (n=1; 3%).

#### 4.2.2 ANÁLISE DE CTCS

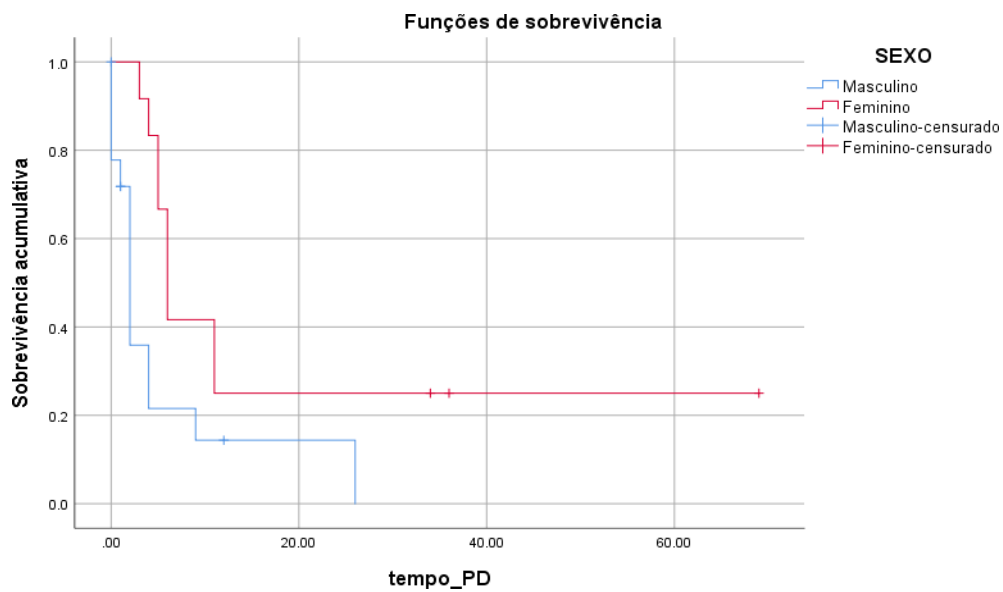
Os *spots* dos 30 pacientes foram submetidos à imunocitoquímica com os marcadores LGR5, EGFR, TGF $\beta$ , GLUT-1 e VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) conforme mencionado no item metodologia. Cada *spot* foi analisado quanto à presença de CTCs marcadas e não marcadas para o marcador utilizado na reação (**Figura 12**).



**Figura 12:** **A e B)** Exemplos de CTCs negativas para as proteínas testadas isoladas de paciente com sarcoma de partes moles com características citomorfológicas (tamanho do núcleo  $\geq 12 \mu\text{m}$ , núcleo hiper cromático e irregular, presença visível de citoplasma e uma alta proporção núcleo-citoplasma. **C e D)** Exemplos de CTCs positivas para a proteína LGR5 isoladas de paciente com sarcomas de partes moles. **E e F)** Microêmbolos tumorais circulantes isolados de pacientes com sarcomas positivos para LGR5.

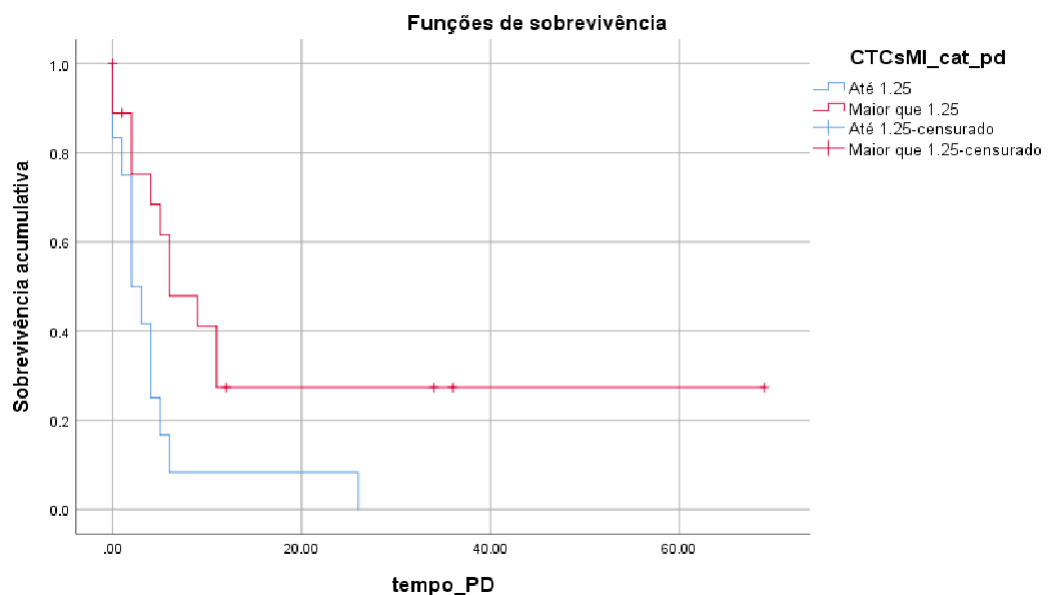
Todos os pacientes foram analisados quanto à presença de CTCs e MTCs (Microêmbolos Tumorais Circulantes). Os níveis variaram de 0 a 11,25 CTCs/ml de sangue e a mediana foi de 2 CTCs/mL de sangue.

Realizamos análises de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de progressão (SLP) e observamos que a sobrevida SLP em relação ao sexo dos pacientes analisados foi inferior no sexo masculino ( $p=0,016$ ) (**Figura 13**).



**Figura 13:** Gráfico de sobrevida livre de progressão (SLP) em relação ao sexo dos pacientes de sarcomas.

Estabelecemos também um *cut-off* (1.25 CTCs/MI) para a análise de sobrevida dos pacientes em relação à quantidade de CTCs e observamos que os pacientes que possuíam mais que 1,5 CTCs/mL de sangue possuíam uma sobrevida menor à daqueles que tinham menos CTCs na circulação ( $p=0,013$ ) (**Figura 14**).



**Figura 14:** Gráfico de sobrevida livre de progressão (SLP) de acordo com a quantificação de CTCs.

Analizamos a proteína LGR5 nos 30 pacientes incluídos no estudo, sendo que 7 deles não tinham CTCs presentes no *spot* analisado. Dos 23 pacientes com CTCs nos *spots* analisados para LGR5, 12 (52%) foram positivos. Além disso, detectamos MTCs positivos para proteína em três pacientes (13%). A análise de SG e SLP não apresentou significância estatística.

O LGR5 é essencial para o desenvolvimento embrionário normal e tem sido utilizado como um novo marcador de células-tronco adultas em vários órgãos e tecidos (KUMAR et al. 2014; LIU et al. 2014b). Diversos estudos têm demonstrado que o LGR5 promove o crescimento e sobrevivência de carcinoma colorretal e basocelular, glioblastoma e neuroblastoma (MCCLANAHAN et al. 2006; NAKATA et al. 2013; TANESE et al. 2008). Foi demonstrado que o LGR5 contribui funcionalmente para a biologia normal e maligna em tecidos de origem epitelial e neural. Para determinar se níveis elevados de LGR5 estão associados a um curso clínico mais agressivo, alguns estudos retrospectivos foram realizados e mostraram sobrevida diminuída em pacientes com carcinoma gastrointestinal e glioblastoma cujos tumores expressavam níveis elevados de LGR5 (BECKER et al. 2010; NAKATA et al. 2013; WU et al. 2012).

Os MTCs desempenham um papel importante na cascata metastática, uma vez que podem resistir à morte celular na circulação sanguínea, além de serem responsáveis por atingirem mais focos de micrometástases quando comparados com CTCs isoladas (CHEN et al. 2016).

Associando-se a estruturas de leucócitos, fibroblastos, células endoteliais ou plaquetas, os microêmbolos adicionam proteção contra agentes externos e outras células relacionadas ao sistema imunológico na circulação sanguínea, adquirindo-se assim, uma característica mais agressiva (KREBS et al. 2014). Muitos pesquisadores têm focado no papel dos microêmbolos e alguns estudos já foram publicados envolvendo diversos tumores (câncer de cólon, próstata, rim e células não pequenas células) (BRANDT et al. 1996; HOU et al. 2012; KATS-UGURLU et al. 2009;

KNISELY e MAHALEY 1958; KREBS et al. 2012; LIU et al. 2014a; MOLNAR et al. 2001). A literatura atual tem relacionado a presença de microêmbolos com pior prognóstico e com maior resistência à resposta imune (HOU et al. 2012).

Apesar de evidências clínicas mostrando que as CTCs podem estar presentes no sangue de pacientes com sarcoma, poucos estudos têm trabalhado com este tema em pacientes com este tipo de tumor, justamente pelo fato das metodologias para a detecção dessas células estarem geralmente ligadas a marcações epiteliais. Nossa equipe demonstrou o uso de uma tecnologia independente de marcação para identificação de CTCs provenientes de pacientes com sarcoma metastático ou localmente avançado (CHINEN et al. 2014).

Por meio deste estudo demonstramos que todos os pacientes incluídos apresentaram CTCs, e os níveis variaram de 2 a 48 CTCs em 8mL de sangue. Nosso grupo foi o primeiro a demonstrar que o ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumors; Rarecells, France*), uma tecnologia desenvolvida inicialmente para detectar CTCs de carcinomas, e baseada em filtração, é capaz de detectar CTCs no sangue de pacientes com sarcoma sem o uso de reação em cadeia de polimerase (PCR).

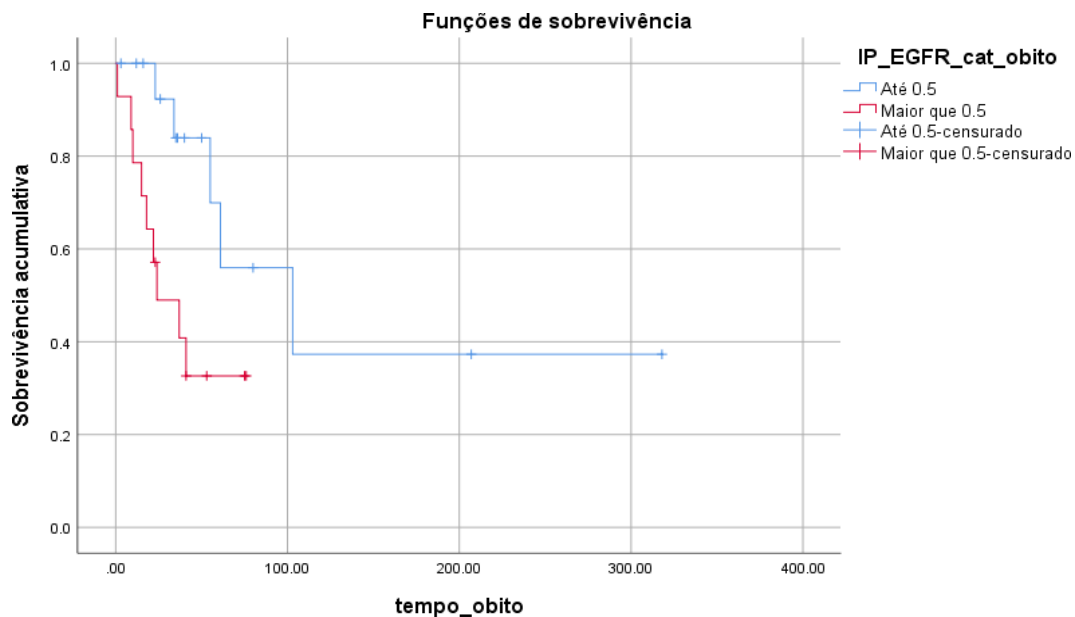
Contudo, neste nosso estudo pioneiro nenhum paciente com leiomiossarcoma de alto grau foi incluído e a proteína LGR5 não foi analisada. Acreditamos que o estudo da expressão da proteína LGR5 pode abrir novas perspectivas de tratamento para os pacientes de SPM e OS.

Pensando nisso, nossa equipe deu continuidade aos estudos com sarcomas e CTCs, o qual foi o tema da minha dissertação de mestrado intitulada “Detecção de Células Tumorais Circulantes em Pacientes com Sarcomas”, submetido ao CEP desta instituição e aprovado (nº 2081/15). Conseguimos elevar nosso número amostral e incluímos pacientes com diferentes tipos de sarcomas de partes moles.

A proteína EGFR foi analisada nos 30 pacientes e a positividade para EGFR nas CTCs foi observada em 22 (73%) dos pacientes. Curiosamente, ao realizarmos a análise de SG encontramos significância estatística



( $p=0,027$ ), demonstrando que quando o índice de positividade para EGFR nessas células era superior ou igual a 0,5 (50% das células positivas) a sobrevida dos pacientes era menor (**Figura 15**). Não encontramos significância estatística ao analisar a SLP.



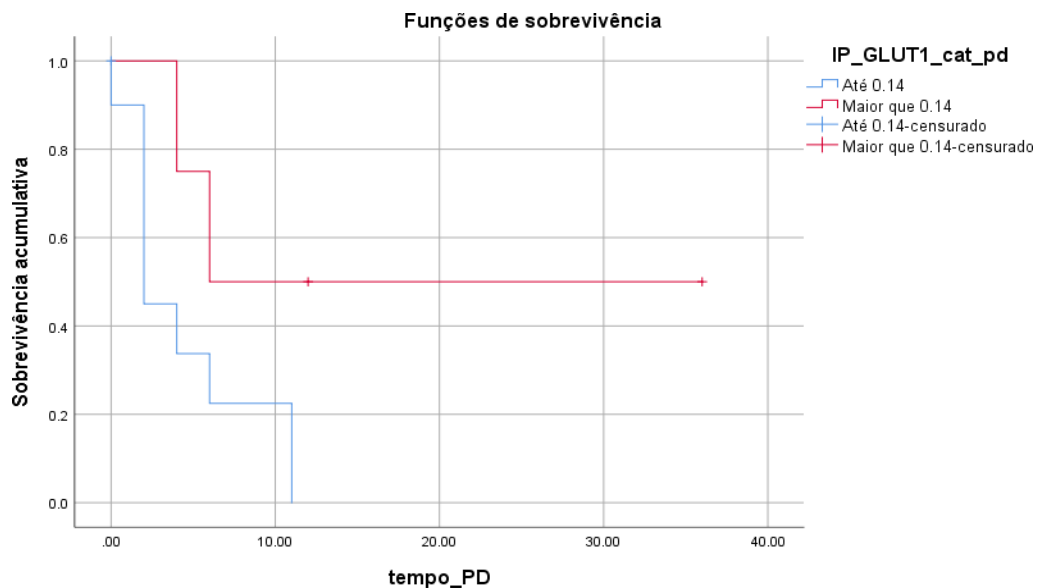
**Figura 15:** Gráfico de sobrevida global (SG) em pacientes com diferentes tipos de sarcomas de acordo com a expressão da proteína EGFR.

Esses dados fortalecem nossos achados anteriores. Em 2018, nossa equipe deu continuidade aos estudos com sarcomas e CTCs, o qual foi o tema da minha dissertação de mestrado, como mencionado anteriormente. Neste estudo do meu Mestrado, observamos positividade para EGFR nas CTCs em 93,75% dos pacientes que possuíam CTCs na circulação sanguínea. Além disso, estabelecemos um *cutoff* para a positividade do EGFR e conseguimos demonstrar que aqueles pacientes que tiveram uma expressão de EGFR superior a 83% demonstraram uma sobrevida livre de progressão inferior à daqueles pacientes com a expressão de EGFR abaixo de 83% (BRAUN et al. 2018).

Em outros tipos de câncer, a expressão de EGFR em CTCs está associada com mau prognóstico e pior sobrevida global. Vila et al., relataram

uma correlação positiva entre o número de CTCs que expressaram EGFR e pior prognóstico e sobrevida global em câncer de próstata, mama e pulmão (VILA et al. 2016).

Em relação aos demais marcadores, analisamos a expressão de GLUT-1 em 14 amostras, e a expressão da proteína foi observada em 8 casos (36%). Ao realizarmos a análise de SLP encontramos significância estatística ( $p=0,064$ ), demonstrando que quando o índice de positividade para GLUT-1 nessas células era superior ou igual a 0,14 a sobrevida dos pacientes era maior (**Figura 16**).



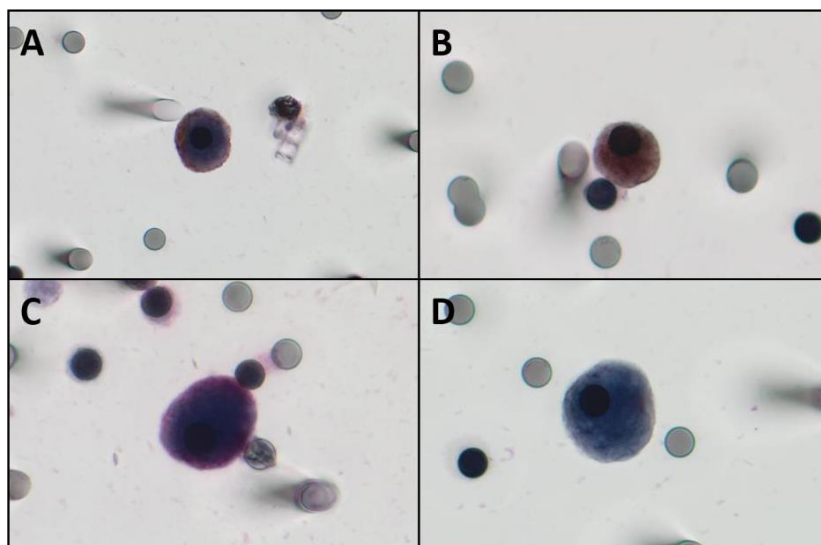
**Figura 16:** Gráfico de sobrevivência livre de progressão em pacientes com diferentes tipos de sarcomas de acordo com a expressão da proteína GLUT-1.

GLUT-1 é uma proteína transmembrana que catalisa a entrada de glicose nas células (OLSON e PESSIN 1996) e garante fisiologicamente o nível basal de glicose necessário para sua sobrevivência (MUECKLER et al. 1985). É superexpressa em muitos cânceres, incluindo câncer de pulmão, esôfago e mama e carcinoma hepatocelular. Um estudo realizado por Taha et al., demonstrou que a insulina regula positivamente a proteína GLUT-1

(TAHA et al. 1999). A insulina leva a um aumento na tradução do mRNA que codifica GLUT-1. A translocação do transportador GLUT-1 para a membrana, seu local de ação, induz aumento da glicose intracelular (CIFUENTES et al. 2011).

A principal função da GLUT-1 é catalisar a entrada de glicose nas células (OLSON e PESSIN 1996), e desempenha um papel fundamental no metabolismo energético, fornecendo transporte basal de glicose nas células. Portanto, a GLUT-1 é fisiologicamente expressa em todos os tecidos. Neste estudo, observamos que GLUT-1 foi expressa em 36% dos casos analisados. Acreditamos que essa expressão está correlacionada com alto grau histológico dos sarcomas, alto índice de proliferação e tipos moleculares mais agressivos. No entanto, não encontramos relevância estatística nas análises de SG e SLP para essa proteína.

As proteínas  $\beta$ -catenina e COX-2 foram analisadas em 10 amostras e as expressões dessas proteínas foram observadas em 5 (50%) e 2 (20%) dos casos. As expressões das proteínas VEGF e TGF-  $\beta$ RI foram analisadas em 23 e 30 casos respectivamente. As positivities das proteínas foram observadas em 8 (27%) dos casos analisados para TGF-  $\beta$ RI e dois (9%) dos casos analisados para VEGF (**Figura 17**).



**Figura 17:** A, B, C) Imunocitoquímica de CTC com anticorpo anti-EGFR, TGF- $\beta$ RI e  $\beta$ -catenina contra- coradas com DAB, respectivamente. D) Exemplo de CTC isolada de paciente com tumor desmóide com características citopatológicas (tamanho do núcleo  $\geq 12 \mu\text{m}$ , núcleo hiper Cromático e irregular, presença visível de citoplasma e alta razão núcleo-citoplasma).

Embora na literatura o papel da via WNT/ $\beta$ -catenina tenha sido amplamente descrito em cânceres colorretais, bem como em outras neoplasias de origem epitelial, pouco se sabe sobre o envolvimento desta via nos casos de SPM e OS. A via da WNT/ $\beta$ -catenina interage para regular diversos processos complexos de forma coordenada, como desenvolvimento embrionário, manutenção de células-tronco, homeostase tecidual ou cicatrização de feridas, e sua regulação alterada está associada à tumorigênese, metástase e outras doenças (DUCHARTRE et al. 2016).

Em SPM, Martinez et al., 2020, observaram que regular negativamente a expressão do gene alvo WNT *CDC25A* (que é altamente expresso em amostras de pacientes SPM), induz a morte celular ou parada do ciclo celular. Esses resultados são uma base para futuros ensaios clínicos avaliando inibidores de interações  $\beta$ -catenina-coativador em pacientes SPM com uma via de sinalização Wnt ativada, sendo este último um novo critério de seleção que pode ser incluído no recrutamento de pacientes (MARTINEZ-FONT et al. 2020).

Como descrito anteriormente, a expressão da proteína COX-2 pode promover o crescimento do tumor ligando-se a seus receptores e ativando vias de sinalização que controlam a proliferação celular (SHENG et al. 2001) promovem a angiogênese (BEN-AV et al. 1995; TSUJI et al. 1998), inibem a apoptose e aumentam o potencial metastático. Em células de câncer de mama, a expressão de COX-2 altera a estrutura e função da matriz extracelular e o número de fibroblastos associados ao câncer (KRISHNAMACHARY et al. 2017). A expressão elevada de COX-2 é exibida em vários cânceres, incluindo câncer gástrico, hepático, esofágico, pancreático, cabeça e pescoço, pulmão, mama, bexiga, colo do útero, endométrio, pele e colorretal quando comparado com tecido não maligno (KOKI e MASFERRER 2002).

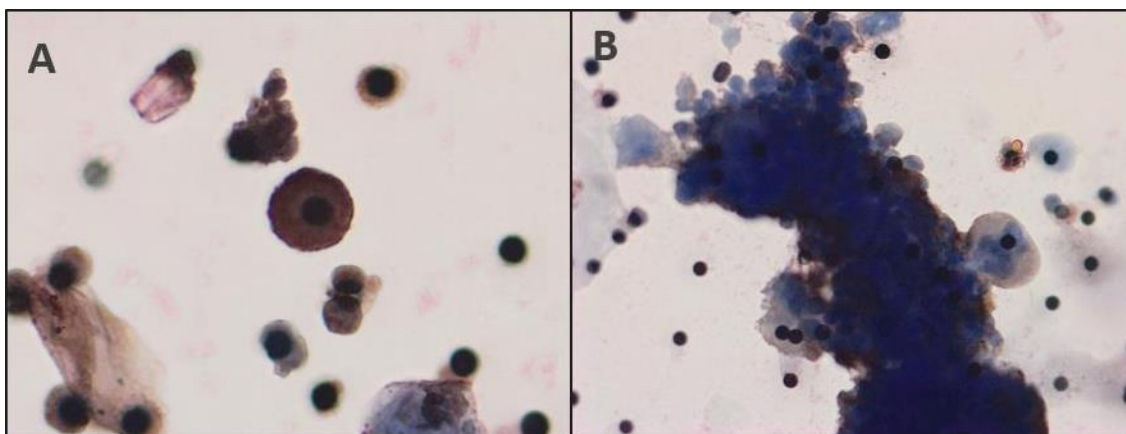
O processo das CTCs se apresentarem como MTCs tem sido associado à superexpressão do fator de crescimento epidérmico vascular

(VEGF) por células tumorais; VEGF pode induzir a liberação de CTM na vasculatura (KATS-UGURLU et al. 2009).

O VEGF é um ligante específico da família do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) (SHIBUYA 2011). É um fator de crescimento e sobrevivência para as células endoteliais e, portanto, regula a angiogênese, que também é considerada um importante processo para carcinogênese e metástase. Além disso, a superexpressão de VEGF tem sido intimamente associada ao estadiamento clínico, metástase linfonodal e recorrência (LIU 2001).

### 4.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE CTCs OBTIDAS DE CAMUNDONGOS

Inicialmente coletamos o sangue de 8 camundongos NSG com sarcoma de pênis, sarcoma pleomórfico e leiomiossarcoma. Nós filtramos as amostras utilizando a metodologia ScreenCell e constatamos que os animais também possuem CTCs na circulação. Após, realizamos imunocitoquímica dupla marcação (EGFR+CD45) nessas amostras e visualizamos a expressão da proteína em microscópio de campo claro (**Figura 18**).



**Figura 18:** **A)** CTCs positivas para EGFR, coletadas de camundongo NSG com tumor xenotransplantado de paciente com sarcoma pleomórfico. **B)** Microembolo positivo para EGFR coletado de camundongo NSG com tumor xenotransplantado de paciente com sarcoma pleomórfico.

Curiosamente, encontramos as CTCs em agrupamentos celulares (MTCs). Como descrito anteriormente, os MTCs são *clusters* de duas ou mais células tumorais que podem resistir à morte celular e atingir mais focos de micrometástases quando comparados com CTCs isoladas. Os MTCs também estão associados a leucócitos, fibroblastos, células endoteliais ou plaquetas, que podem adicionar proteção contra células NK e outras células relacionadas ao ataque do sistema imune. Poucos estudos estudaram CTCs provenientes de camundongos, nossos testes iniciais abrem novas portas para o estudo no mecanismo de disseminação das CTCs e análise proteica.

#### **4.4 ddPCR EM TUMOR DESMÓIDE**

Em relação à parte pesquisa de mutações nas CTCs provenientes de pacientes com TDs, realizamos extração de DNA e RNA de todas amostras e padronizamos os reagentes e a metodologia. Porém, tivemos algumas intercorrências com o nosso equipamento e preferimos aguardar para refazer os testes nas amostras. Estabelecemos uma parceria com a Dra. Fabiana Bettoni do Hospital Sírio Libanês e após análise dos nossos resultados resolvemos aguardar os reparos do equipamento.

Inicialmente realizamos ddPCR em 10 amostras para detecção da mutação CTNNB1 (beta-catenina). Encontramos cópias mutadas de S45Pro em 4 pacientes (40%) e de S45Phe em apenas um paciente (10%). Em contraste, não foram encontradas mutações Th41Ala conforme descrito na **Tabela 6**.

**Tabela 6** : Descrição das mutações encontradas nos pacientes com tumor desmóide.

<i>Paciente/Mutação</i>	<i>S45P</i>	<i>S45Phe</i>	<i>S45Ala</i>
1	Pos	Neg	Neg
2	Pos	Neg	Neg
3	Pos	Pos	Neg
4	Pos	Neg	Neg
5	Neg	Neg	Neg
6	Neg	Neg	Neg
7	Neg	Neg	Neg
8	Neg	Neg	Neg
9	Neg	Neg	Neg
10	Neg	Neg	Neg

Para a realização dos experimentos envolvendo ddPCR, realizamos controles positivos e negativos para cada amostra, além de dois poços NTC (branco: sem amostra mutada ou selvagem).

Curiosamente, nos tumores desmóides esporádicos, apenas três mutações pontuais em dois códons diferentes (41 e 45) são quase sempre identificados nos pacientes com mutação para o gene CTNNB1: ACC para GCC no códon 41 (T41A; substituição de treonina por alanina); TCT para TTT no códon 45 (S45F; substituição de serina por fenilalanina) e a TCT para CCT no códon 45 (S45P; substituição de serina por prolina) (LAZAR et al. 2008). Em nossos pacientes, observamos uma frequência da mutação S45P significativa (40% dos casos). Porém, a literatura sugere que mutações no gene CTNNB1 (que codifica para  $\beta$ -catenina) normalmente são identificadas com uma prevalência elevada, de aproximadamente 85%, nos tumores desmóides esporádicos (AMARY et al. 2007). O nível baixo de mutações encontradas nas nossas amostras pode ser explicado pelo baixo número amostral (apenas 10 pacientes), pela dificuldade na padronização

da metodologia para as CTCs e pelo baixo número de CTCs nos *spots* das membranas de ISET. Pretendemos futuramente repetir os testes de *ddPCR* para validar nossos achados.

A desregulação da via  $\beta$ -catenina, juntamente com a estabilidade genômica encontrada nos tumores desmóides, sugere que esta via tem um papel fundamental na tumorigênese desses tumores. Uma vez que os tumores desmóides, em alguns aspectos se assemelham a um processo de cicatrização descontrolada e que a via de Wnt desempenha um papel fisiológico importante na cicatrização de feridas, supõe-se que a desregulação desta via é de extrema importância na tumorigênese dos tumores desmóides (KIKUCHI 2003).

## 5 CONCLUSÃO

### **Tumor desmóide:**

- Com o presente trabalho, foi possível verificar a detecção de CTCs em pacientes de tumor desmóide, o que torna nosso estudo pioneiro no tema.
- A expressão de  $\beta$ -catenina, COX-2, TGF- $\beta$ RI e vimentina foi analisada por imunocitoquímica (ICC) nessas células. Encontramos uma concordância da expressão de  $\beta$ -catenina tanto em CTCs quanto em tumores primários de 42,8% (6/14) dos casos usando ICC e IHQ\*, respectivamente.
- Nossos resultados abrem a perspectiva de usar CTCs para prever a dinâmica do tumor desmóide ao longo do curso da doença. Além disso, demonstramos que DTs liberam CTCs, abrindo novos caminhos para estudar a biologia deste tumor e melhorar nossa compreensão sobre suas altas taxas de recaídas locais sem metástase. Estudos adicionais com tamanhos de amostra maiores e com análises de mutações devem ser conduzidos para validar nossos achados e explorar o mecanismo de desenvolvimento e progressão do TD.



**Sarcomas:**

- Com a coorte de Sarcomas demonstramos que as CTCs e os MTCs estão presentes na circulação de pacientes com diferentes tipos de sarcomas (leiomiossarcoma, lipossarcoma, sarcoma sinovial, sarcoma pleomórfico e rabdmiossarcoma). A expressão das proteínas EGFR, GLUT-1,  $\beta$ -Catenina, COX-2 VEGF e TGFbeta em CTCs de pacientes com tumor de origem mesenquimal foi demonstrada. Nossos achados abrem novos caminhos para pesquisas futuras na área, além de melhor entendimento da biologia desses tumores. Mais estudos e aumento do número amostral são necessários.

**Xenotransplantes e ddPCR:**

- Nossos achados envolvendo xenotransplantes e ddPCR são pioneiros na área e abrem novas perspectivas para o entendimento da disseminação tumoral e detecção de mutações com o uso de biópsias líquidas. Estudos adicionais são necessários para melhorar a metodologia que está sendo padronizada e trazer novas oportunidades de compreensão e estudo da disseminação tumoral.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarrategi A, Tornin J, Martinez-Cruzado L, et al. Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. **Stem Cells Int.** 2016; 2016:1–13.

Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. **Cell** 2014; 158:1110–1122.

Adjei AA, Rowinsky EK. Novel anticancer agents in clinical development. **Cancer Biol. Ther.** [s.d.] 2:S5-15.

Al-Kharusi MRA, Smartt HJM, Greenhough A, et al. LGR5 promotes survival in human colorectal adenoma cells and is upregulated by PGE 2: implications for targeting adenoma stem cells with NSAIDs. **Carcinogenesis** 2013; 34:1150–1157.

Albuquerque C, Bakker ERM, Van Veelen W, Smits R. Colorectal cancers choosing sides. **Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer** 2011; 1816:219–231.

Alencar GA, Fragoso MCBV, Yamaga LYI, Lerario AM, Mendonca BB. 18 F-FDG-PET/CT Imaging of ACTH-Independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia (AIMAH) Demonstrating Increased 18 F-FDG Uptake. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2011; 96:3300–3301.

Amary MFC, Pauwels P, Meulemans E, et al. Detection of  $\beta$ -Catenin Mutations in Paraffin-embedded Sporadic Desmoid-type Fibromatosis by Mutation-specific Restriction Enzyme Digestion (MSRED): an Ancillary Diagnostic Tool. **Am. J. Surg. Pathol.** 2007; 31:1299–1309.

Avigad S, Cohen IJ, Zilberstein J, et al. The predictive potential of molecular detection in the nonmetastatic Ewing family of tumors. **Cancer** 2004; 100:1053–1058.

Barker N, Huch M, Kujala P, et al. Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. **Cell Stem Cell** 2010; 6:25–36.

Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. **Immunity** 2019; 50:924–940.

Becker L, Huang Q, Mashimo H. Lgr5, an intestinal stem cell marker, is abnormally expressed in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. **Dis. Esophagus** 2010; 23:168–174.

Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. CD133 + and CD133 – Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. **Cancer Res.** 2007; 67:4010–4015.

Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. **FEBS**

**Lett.** 1995; 372:83–87.

Blattmann C, Oertel S, Schulz-Ertner D, et al. Non-randomized therapy trial to determine the safety and efficacy of heavy ion radiotherapy in patients with non-resectable osteosarcoma. **BMC Cancer** 2010; 10:96.

Bonvalot S, Eldweny H, Haddad V, et al. Extra-abdominal primary fibromatosis: Aggressive management could be avoided in a subgroup of patients. **Eur. J. Surg. Oncol.** 2008; 34:462–468.

Brandt B, Junker R, Griwatz C, et al. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. **Cancer Res.** 1996; 56:4556–61.

Braun AC, De Mello CAL, Corassa M, et al. EGFR expression in circulating tumor cells from high-grade metastatic soft tissue sarcomas. **Cancer Biol. Ther.** 2018; 19:454–460.

Briand S, Barbier O, Biau D, et al. Wait-and-See Policy as a First-Line Management for Extra-Abdominal Desmoid Tumors. **J. Bone Jt. Surg.** 2014; 96:631–638.

Brown HK, Tellez-Gabriel M, Heymann D. Cancer stem cells in osteosarcoma. **Cancer Lett.** 2017; 386:189–195.

Burchill SA, Lewis IJ, Abrams KR, et al. Circulating Neuroblastoma Cells Detected by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Tyrosine Hydroxylase mRNA Are an Independent Poor Prognostic Indicator in Stage 4 Neuroblastoma in Children Over 1 Year. **J. Clin. Oncol.** 2001; 19:1795–1801.

Carrle D, Bielack SS. Current strategies of chemotherapy in osteosarcoma. **Int. Orthop.** 2006; 30:445–451.

Chen J-Y, Tsai W-S, Shao H-J, et al. Sensitive and Specific Biomimetic Lipid Coated Microfluidics to Isolate Viable Circulating Tumor Cells and Microemboli for Cancer Detection. **PLoS One** 2016; 11:e0149633.

Chen X, Bahrami A, Pappo A, et al. Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma. **Cell Rep.** 2014a; 7:104–112.

CHEN X, WEI B, HAN X, et al. LGR5 is required for the maintenance of spheroid-derived colon cancer stem cells. **Int. J. Mol. Med.** 2014b; 34:35–42.

Cheon SS, Cheah AYL, Turley S, et al. -Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2002; 99:6973–6978.

Chinen L, Mello C, Abdallah E, et al. Isolation, detection, and immunomorphological characterization of circulating tumor cells (CTCs) from patients with different types of sarcoma using isolation by size of tumor cells: a window on sarcoma-cell invasion. **Onco. Targets. Ther.** 2014; 1609.

Chinen LTD, De Carvalho FM, Rocha BMM, et al. Cytokeratin-based CTC

- counting unrelated to clinical follow up. **J. Thorac. Dis.** 2013; 5:593–9.
- Choi JH, Ro JY. The 2020 WHO Classification of Tumors of Soft Tissue: Selected Changes and New Entities. **Adv. Anat. Pathol.** 2021; 28:44–58.
- Choi YJ, Kim N, Lee HS, et al. Expression of Leucine-rich Repeat-containing G-protein Coupled Receptor 5 and CD44: Potential Implications for Gastric Cancer Stem Cell Marker. **J. Cancer Prev.** 2016; 21:279–287.
- Chou AJ, Gorlick R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. **Expert Rev. Anticancer Ther.** 2006; 6:1075–1085.
- Church J, Lynch C, Neary P, LaGuardia L, Elayi E. A Desmoid Tumor-Staging System Separates Patients with Intra-Abdominal, Familial Adenomatous Polyposis-Associated Desmoid Disease by Behavior and Prognosis. **Dis. Colon Rectum** 2008; 51:897–901.
- Cifuentes M, García MA, Arrabal PM, et al. Insulin regulates GLUT1-mediated glucose transport in MG-63 human osteosarcoma cells. **J. Cell. Physiol.** 2011; 226:1425–1432.
- Clark SK, Neale KF, Landgrebe JC, Phillips RKS. Desmoid tumours complicating familial adenomatous polyposis. **Br. J. Surg.** 2002; 86:1185–1189.
- Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. **Ann. Oncol.** 2009; 20:1223–1229.
- Colak S, Ten Dijke P. Targeting TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. **Trends in Cancer** 2017; 3:56–71.
- Colangeli S, Parchi P, Andreani L, et al. Cryotherapy efficacy and safety as local therapy in surgical treatment of musculoskeletal tumours. A retrospective case series of 143 patients. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents** [s.d.] 32:65–70.
- Colombo C, Miceli R, Lazar AJ, et al. CTNNB1 45F mutation is a molecular prognosticator of increased postoperative primary desmoid tumor recurrence. **Cancer** 2013; 119:3696–3702.
- Colombo C, Miceli R, Le Péchoux C, et al. Sporadic extra abdominal wall desmoid-type fibromatosis: Surgical resection can be safely limited to a minority of patients. **Eur. J. Cancer** 2015; 51:186–192.
- Crago AM, Denton B, Salas S, et al. A Prognostic Nomogram for Prediction of Recurrence in Desmoid Fibromatosis. **Ann. Surg.** 2013; 258:347–353.
- Crago AM, Chmielecki J, Rosenberg M, et al. Near universal detection of alterations in CTNNB1 and Wnt pathway regulators in desmoid-type fibromatosis by whole-exome sequencing and genomic analysis. **Genes, Chromosom. Cancer** 2015; 54:606–615.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. **N. Engl. J. Med.**

2004; 351:781–791.

Croce CM. Oncogenes and Cancer. **N. Engl. J. Med.** 2008; 358:502–511.

Dangoor A, Seddon B, Gerrand C, Grimer R, Whelan J, Judson I. UK guidelines for the management of soft tissue sarcomas. **Clin. Sarcoma Res.** 2016; 6:20.

David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGF $\beta$  action in development, immunity and cancer. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2018; 19:419–435.

De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **Clin. Cancer Res.** 2008; 14:6302–6309.

Derynck R, Turley SJ, Akhurst RJ. TGF $\beta$  biology in cancer progression and immunotherapy. **Nat. Rev. Clin. Oncol.** 2021; 18:9–34.

Dômont J, Salas S, Lacroix L, et al. High frequency of  $\beta$ -catenin heterozygous mutations in extra-abdominal fibromatosis: a potential molecular tool for disease management. **Br. J. Cancer** 2010; 102:1032–1036.

DuBois SG, Epling CL, Teague J, Matthay KK, Sinclair E. Flow cytometric detection of Ewing sarcoma cells in peripheral blood and bone marrow. **Pediatr. Blood Cancer** 2010; 54:13–18.

Duchartre Y, Kim Y-M, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 2016; 99:141–149.

Ducimetière F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, et al. Incidence of Sarcoma Histotypes and Molecular Subtypes in a Prospective Epidemiological Study with Central Pathology Review and Molecular Testing. **PLoS One** 2011; 6:e20294.

Eastley N, McCulloch T, Esler C, et al. Extra-abdominal desmoid fibromatosis: A review of management, current guidance and unanswered questions. **Eur. J. Surg. Oncol.** 2016; 42:1071–1083.

Egloff AM, Grandis JR. Targeting Epidermal Growth Factor Receptor and Src Pathways in Head and Neck Cancer. **Semin. Oncol.** 2008; 35:286–297.

Fagnou C, Michon J, Peter M, et al. Presence of tumor cells in bone marrow but not in blood is associated with adverse prognosis in patients with Ewing's tumor. Société Française d'Oncologie Pédiatrique. **J. Clin. Oncol.** 1998; 16:1707–1711.

Fiore M, Rimareix F, Mariani L, et al. Desmoid-Type Fibromatosis: A Front-Line Conservative Approach to Select Patients for Surgical Treatment. **Ann. Surg. Oncol.** 2009; 16:2587–2593.

Fiore M, MacNeill A, Gronchi A, Colombo C. Desmoid-Type Fibromatosis. **Surg. Oncol. Clin. N. Am.** 2016; 25:803–826.

Fischer AH. Circulating Tumor Cells: Seeing Is Believing. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 2009; 133:1367–1369.

- Fisher C, Thway K. Aggressive fibromatosis. **Pathology** 2014; 46:135–140.
- Flanders KC, Yang Y, Herrmann M, et al. Quantitation of TGF- $\beta$  proteins in mouse tissues shows reciprocal changes in TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 in normal vs neoplastic mammary epithelium. **Oncotarget** 2016; 7:38164–38179.
- Fourneau B, Bourdon A, Dadone B, et al. Identifying and targeting cancer stem cells in leiomyosarcoma: prognostic impact and role to overcome secondary resistance to PI3K/mTOR inhibition. **J. Hematol. Oncol.** 2019; 12:11.
- Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1978; 75:5034–5038.
- Gallego S, Llort A, Roma J, Sabado C, Gros L, De Toledo JS. Detection of bone marrow micrometastasis and microcirculating disease in rhabdomyosarcoma by a real-time RT-PCR assay. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 2006; 132:356–362.
- Geller DS, Gorlick R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. **Clin. Adv. Hematol. Oncol.** 2010; 8:705–18.
- Genadry KC, Pietrobono S, Rota R, Linardic CM. Soft Tissue Sarcoma Cancer Stem Cells: An Overview. **Front. Oncol.** 2018; 8:
- Gerrand C, Athanasou N, Brennan B, et al. UK guidelines for the management of bone sarcomas. **Clin. Sarcoma Res.** 2016; 6:7.
- Gounder MM, Lefkowitz RA, Keohan ML, et al. Activity of Sorafenib against Desmoid Tumor/Deep Fibromatosis. **Clin. Cancer Res.** 2011; 17:4082–4090.
- Gradilone A, Naso G, Raimondi C, et al. Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization. **Ann. Oncol.** 2011; 22:86–92.
- Grandis JR, Chakraborty A, Zeng Q, Melhem MF, Tweardy DJ. Downmodulation of TGF- $\alpha$  protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. **J. Cell. Biochem.** 1998; 69:55–62.
- Gronchi A, Colombo C, Le Péchoux C, et al. Sporadic desmoid-type fibromatosis: a stepwise approach to a non-metastasising neoplasm—a position paper from the Italian and the French Sarcoma Group. **Ann. Oncol.** 2014; 25:578–583.
- Grünewald TG, Alonso M, Avnet S, et al. Sarcoma treatment in the era of molecular medicine. **EMBO Mol. Med.** 2020; 12:
- Hamada S, Futamura N, Ikuta K, et al. CTNNB1 S45F Mutation Predicts Poor Efficacy of Meloxicam Treatment for Desmoid Tumors: A Pilot Study. **PLoS One** 2014; 9:e96391.
- Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. **Int. J. Mol. Sci.** 2019; 20:2767.

- Harrison DJ, Geller DS, Gill JD, Lewis VO, Gorlick R. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. **Expert Rev. Anticancer Ther.** 2018; 18:39–50.
- Hatina J, Kripnerova M, Houfkova K, et al. Sarcoma Stem Cell Heterogeneity. In: [s.l: s.n.]. p.95–118.
- Hay ED. Extracellular matrix, cell skeletons, and embryonic development. **Am. J. Med. Genet.** 1989; 34:14–29.
- Haydon RC, Deyrup A, Ishikawa A, et al. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the  $\beta$ -catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. **Int. J. Cancer** 2002; 102:338–342.
- Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. **Int. J. Radiat. Oncol.** 2004; 59:S21–S26.
- Hoang BH, Kubo T, Healey JH, et al. Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. **Int. J. Cancer** 2004; 109:106–111.
- Hoshino M, Ogose A, Kawashima H, et al. Molecular analyses of cell origin and detection of circulating tumor cells in the peripheral blood in alveolar soft part sarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.** 2009; 190:75–80.
- Hou J-M, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer. **J. Clin. Oncol.** 2012; 30:525–532.
- Howard JH, Pollock RE. Intra-Abdominal and Abdominal Wall Desmoid Fibromatosis. **Oncol. Ther.** 2016; 4:57–72.
- Huang K, Wang CM, Chen JG, et al. Prognostic factors influencing event-free survival and treatments in desmoid-type fibromatosis: analysis from a large institution. **Am. J. Surg.** 2014; 207:847–854.
- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat. Rev. Cancer** 2005; 5:341–354.
- Kallen ME, Hornick JL. The 2020 WHO Classification. **Am. J. Surg. Pathol.** 2021; 45:e1–e23.
- Kansara M, Teng MW, Smyth MJ, Thomas DM. Translational biology of osteosarcoma. **Nat. Rev. Cancer** 2014; 14:722–735.
- Kasper B, Gruenwald V, Reichardt P, Bauer S, Hohenberger P, Haller F. Correlation of CTNNB1 Mutation Status with Progression Arrest Rate in RECIST Progressive Desmoid-Type Fibromatosis Treated with Imatinib: Translational Research Results from a Phase 2 Study of the German Interdisciplinary Sarcoma Group (GISG-01). **Ann. Surg. Oncol.** 2016; 23:1924–1927.
- Kasper B, Baumgarten C, Garcia J, et al. An update on the management of sporadic desmoid-type fibromatosis: a European Consensus Initiative between Sarcoma Patients EuroNet (SPAEN) and European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)/Soft Tissue and Bone

- Sarcoma Group (STBSG). **Ann. Oncol.** 2017; 28:2399–2408.
- Katoh M, Katoh M. WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network: Fig. 1. **Clin. Cancer Res.** 2007; 13:4042–4045.
- Kats-Ugurlu G, Roodink I, De Weijert M, et al. Circulating tumour tissue fragments in patients with pulmonary metastasis of clear cell renal cell carcinoma. **J. Pathol.** 2009; 219:287–293.
- Kelly KM, Womer RB, Barr FG. Minimal disease detection in patients with alveolar rhabdomyosarcoma using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. **Cancer** 1996; 78:1320–1327.
- Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. **Cancer Sci.** 2003; 94:225–229.
- Kim W, Kim M, Jho E. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. **Biochem. J.** 2013; 450:9–21.
- Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nat. Rev. Cancer** 2008; 8:387–398.
- Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma. **Am. J. Clin. Pathol.** 2006; 125:555–581.
- KNISELY WH, MAHALEY MS. Relationship between size and distribution of spontaneous metastases and three sizes of intravenously injected particles of VX2 carcinoma. **Cancer Res.** 1958; 18:900–5.
- Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, et al. LGR5-Positive Colon Cancer Stem Cells Interconvert with Drug-Resistant LGR5-Negative cells and are Capable of Tumor Reconstitution. **Stem Cells** 2012; 30:2631–2644.
- Koki A, Khan NK, Woerner BM, et al. Cyclooxygenase-2 In Human Pathological Disease. In: [s.l: s.n.]. p.177–184.
- Koki AT, Masferrer JL. Celecoxib: A Specific COX-2 Inhibitor with Anticancer Properties. **Cancer Control** 2002; 9:28–35.
- Krebs MG, Hou J-M, Sloane R, et al. Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches. **J. Thorac. Oncol.** 2012; 7:306–315.
- Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells—biology and biomarkers. **Nat. Rev. Clin. Oncol.** 2014; 11:129–144.
- Krishnamachary B, Stasinopoulos I, Kakkad S, et al. Breast cancer cell cyclooxygenase-2 expression alters extracellular matrix structure and function and numbers of cancer associated fibroblasts. **Oncotarget** 2017; 8:17981–17994.
- Kuijjer ML, Hogendoorn PCW, Cleton-Jansen A-M. Genome-wide analyses on high-grade osteosarcoma: Making sense of a genomically most unstable tumor. **Int. J. Cancer** 2013; n/a-n/a.



- Kumar KK, Burgess AW, Gulbis JM. Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells. **Protein Sci.** 2014; 23:551–565.
- Lazar AJF, Tuvin D, Hajibashi S, et al. Specific Mutations in the  $\beta$ -Catenin Gene (CTNNB1) Correlate with Local Recurrence in Sporadic Desmoid Tumors. **Am. J. Pathol.** 2008; 173:1518–1527.
- Le Guellec S, Soubeyran I, Rochaix P, et al. CTNNB1 mutation analysis is a useful tool for the diagnosis of desmoid tumors: a study of 260 desmoid tumors and 191 potential morphologic mimics. **Mod. Pathol.** 2012; 25:1551–1558.
- Link MP, Goorin AM, Miser AW, et al. The Effect of Adjuvant Chemotherapy on Relapse-Free Survival in Patients with Osteosarcoma of the Extremity. **N. Engl. J. Med.** 1986; 314:1600–1606.
- Lips DJ, Barker N, Clevers H, Hennipman A. The role of APC and beta-catenin in the aetiology of aggressive fibromatosis (desmoid tumors). **Eur. J. Surg. Oncol.** 2009; 35:3–10.
- Liu D-H. Expression of vascular endothelial growth factor and its role in oncogenesis of human gastric carcinoma. **World J. Gastroenterol.** 2001; 7:500.
- Liu Y, Patel L, Mills GB, et al. Clinical Significance of CTNNB1 Mutation and Wnt Pathway Activation in Endometrioid Endometrial Carcinoma. **JNCI J. Natl. Cancer Inst.** 2014a; 106:
- Liu Z, Dai W, Jiang L, Cheng Y. Over-expression of LGR5 correlates with poor survival of colon cancer in mice as well as in patients. **Neoplasma** 2014b; 61:177–185.
- Lyu HG, Stein LA, Saadat L V., Phicil SN, Haider A, Raut CP. Assessment of the Accuracy of Disease Coding Among Patients Diagnosed With Sarcoma. **JAMA Oncol.** 2018; 4:1293.
- Maier J, Traenkle B, Rothbauer U. Visualizing Epithelial–Mesenchymal Transition Using the Chromobody Technology. **Cancer Res.** 2016; 76:5592–5596.
- Martinez-Font E, Pérez-Capó M, Ramos R, et al. Impact of Wnt/ $\beta$ -Catenin Inhibition on Cell Proliferation through CDC25A Downregulation in Soft Tissue Sarcomas. **Cancers (Basel).** 2020; 12:2556.
- Masaya Mukai. Occult neoplastic cells and malignant micro-aggregates in lymph node sinuses: Review and hypothesis. **Oncol. Rep.** 2005; 14:173–175.
- Massagué J. TGF $\beta$  signalling in context. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2012; 13:616–630.
- McClanahan T, Koseoglu S, Smith K, et al. Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors. **Cancer Biol. Ther.** 2006; 5:419–426.

- Michael J, Kaplan, Britt-Marie, Ljung, Enzinger FM WS. Soft Tissue Tumors. **Am. J. Otolaryngol.** 1985;
- Mihály D, Nagy N, Papp G, Pápai Z, Sápi Z. Release of circulating tumor cells and cell-free nucleic acids is an infrequent event in synovial sarcoma: liquid biopsy analysis of 15 patients diagnosed with synovial sarcoma. **Diagn. Pathol.** 2018; 13:81.
- Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sréter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. **Clin. Cancer Res.** 2001; 7:4080–5.
- Morrow JJ, Khanna C. Osteosarcoma Genetics and Epigenetics: Emerging Biology and Candidate Therapies. **Crit. Rev. Oncog.** 2015; 20:173–97.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, et al. Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter. **Science (80- ).** 1985; 229:941–945.
- Mullen JT, DeLaney TF, Rosenberg AE, et al.  $\beta$ -Catenin Mutation Status and Outcomes in Sporadic Desmoid Tumors. **Oncologist** 2013; 18:1043–1049.
- Nakata S, Campos B, Bageritz J, et al. LGR5 is a Marker of Poor Prognosis in Glioblastoma and is Required for Survival of Brain Cancer Stem-Like Cells. **Brain Pathol.** 2013; 23:60–72.
- Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt,  $\beta$ -Catenin, and Cadherin Pathways. **Science (80- ).** 2004; 303:1483–1487.
- Ng TL, Gown AM, Barry TS, et al. Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. **Mod. Pathol.** 2005; 18:68–74.
- O'CONNOR MI, PRITCHARD DJ, GUNDERSON LL. Integration of Limb-Sparing Surgery, Brachytherapy, and External-Beam Irradiation in the Treatment of Soft-Tissue Sarcomas. **Clin. Orthop. Relat. Res.** 1993; 289:73–80.
- Olson AL, Pessin JE. Structure, Function, and Regulation of the Mammalian Facilitative Glucose Transporter Gene Family. **Annu. Rev. Nutr.** 1996; 16:235–256.
- Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death Differ.** 2003; 10:431–442.
- Paget S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. **Lancet** 1889; 133:571–573.
- Penel N, Coindre J-M, Bonvalot S, et al. Management of desmoid tumours: A nationwide survey of labelled reference centre networks in France. **Eur. J. Cancer** 2016; 58:90–96.
- Peter M, Magdelenat H, Michon J, et al. Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Br. J. Cancer** 1995; 72:96–100.
- Pfleiderer C, Zoubek A, Gruber B, et al. Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from ewing tumour patients by rt-pcr. **Int. J. Cancer** 1995; 64:135–139.

Phillips SR, A'Hern R, Thomas JM. Aggressive fibromatosis of the abdominal wall, limbs and limb girdles. **Br. J. Surg.** 2004; 91:1624–1629.

Pisters PW, Harrison LB, Leung DH, Woodruff JM, Casper ES, Brennan MF. Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. **J. Clin. Oncol.** 1996; 14:859–868.

Przybyl J, Kozak K, Kosela H, et al. Gene expression profiling of peripheral blood cells: new insights into Ewing sarcoma biology and clinical applications. **Med. Oncol.** 2014; 31:109.

Rebouissou S, Franconi A, Calderaro J, et al. Genotype-phenotype correlation of CTNNB1 mutations reveals different  $\beta$ -catenin activity associated with liver tumor progression. **Hepatology** 2016; 64:2047–2061.

Reitamo JJ, Häyry P, Nykyri E, Saxen E. The Desmoid Tumor. I.: Incidence, Sex-, Age- and Anatomical Distribution in the Finnish Population. **Am. J. Clin. Pathol.** 1982; 77:665–673.

Rock MG, Pritchard DJ, Reiman HM, Soule EH, Brewster RC. Extra-abdominal desmoid tumors. **J. Bone Jt. Surg.** 1984; 66:1369–1374.

Rosen G, Caparros B, Huvos AG, et al. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: Selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. **Cancer** 1982; 49:1221–1230.

ROSENBERG SA, TEPPER J, GLATSTEIN E, et al. The Treatment of Soft-tissue Sarcomas of the Extremities. **Ann. Surg.** 1982; 196:305–315.

Rot S, Taubert H, Bache M, et al. A novel splice variant of the stem cell marker LGR5/GPR49 is correlated with the risk of tumor-related death in soft-tissue sarcoma patients. **BMC Cancer** 2011; 11:429.

Sakamoto A, Oda Y, Adachi T, et al.  $\beta$ -Catenin Accumulation and Gene Mutation in Exon 3 in Dedifferentiated Liposarcoma and Malignant Fibrous Histiocytoma. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 2002; 126:1071–1078.

Salas S, Dufresne A, Bui B, et al. Prognostic Factors Influencing Progression-Free Survival Determined From a Series of Sporadic Desmoid Tumors: A Wait-and-See Policy According to Tumor Presentation. **J. Clin. Oncol.** 2011; 29:3553–3558.

San Juan, Garcia-Leon, Rangel, Goetz, Chaffer. The Complexities of Metastasis. **Cancers (Basel)**. 2019; 11:1575.

Satelli A, Mitra A, Brownlee Z, et al. Epithelial–Mesenchymal Transitioned Circulating Tumor Cells Capture for Detecting Tumor Progression. **Clin. Cancer Res.** 2015; 21:899–906.

Schiavone K, Garnier D, Heymann M-F, Heymann D. The Heterogeneity of Osteosarcoma: The Role Played by Cancer Stem Cells. In: [s.l.: s.n.]. p.187–200.

Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, et al. Increased Risk of Systemic Relapses Associated With Bone Marrow Micrometastasis and Circulating

- Tumor Cells in Localized Ewing Tumor. **J. Clin. Oncol.** 2003; 21:85–91.
- Seyedin SM, Thompson AY, Bentz H, et al. Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. **J. Biol. Chem.** 1986; 261:5693–5695.
- Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 Increases Growth and Motility of Colorectal Carcinoma Cells. **J. Biol. Chem.** 2001; 276:18075–18081.
- Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes Cancer** 2011; 2:1097–1105.
- Sørensen A, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM. Treatment of aggressive fibromatosis: A retrospective study of 72 patients followed for 1-27 years. **Acta Orthop. Scand.** 2002; 73:213–219.
- Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. **Nature** 1994; 372:679–683.
- Stiller CA, Bielack SS, Jundt G, Steliarova-Foucher E. Bone tumours in European children and adolescents, 1978–1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. **Eur. J. Cancer** 2006; 42:2124–2135.
- Taha C, Liu Z, Jin J, Al-Hasani H, Sonenberg N, Klip A. Opposite Translational Control of GLUT1 and GLUT4 Glucose Transporter mRNAs in Response to Insulin. **J. Biol. Chem.** 1999; 274:33085–33091.
- Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. The Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway as a Target in Drug Discovery. **J. Pharmacol. Sci.** 2007; 104:293–302.
- Tanese K, Fukuma M, Yamada T, et al. G-Protein-Coupled Receptor GPR49 is Up-regulated in Basal Cell Carcinoma and Promotes Cell Proliferation and Tumor Formation. **Am. J. Pathol.** 2008; 173:835–843.
- TEIXEIRA LEM, ARANTES EC, VILLELA RF, SOARES CBG, COSTA RBDC, ANDRADE MAP DE. EXTRA-ABDOMINAL DESMOID TUMOR: LOCAL RECURRENCE AND TREATMENT OPTIONS. **Acta Ortopédica Bras.** 2016; 24:147–150.
- Tejpar S, Nollet F, Li C, et al. Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor). **Oncogene** 1999; 18:6615–6620.
- Thiery JP, Lim CT. Tumor Dissemination: An EMT Affair. **Cancer Cell** 2013; 23:272–273.
- Thomas Ashworth. A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. **Med. J. Aust.** 1869; 14:146–147.
- Thomson B, Hawkins D, Felgenhauer J, Radich J. RT-PCR evaluation of peripheral blood, bone marrow and peripheral blood stem cells in children

and adolescents undergoing VACIME chemotherapy for Ewing's sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma. **Bone Marrow Transplant.** 1999; 24:527–533.

Timbergen MJM, Smits R, Grünhagen DJ, Verhoef C, Sleijfer S, Wiemer EAC. Activated Signaling Pathways and Targeted Therapies in Desmoid-Type Fibromatosis: A Literature Review. **Front. Oncol.** 2019; 9:

Tol J, Koopman M, Miller MC, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. **Ann. Oncol.** 2010; 21:1006–1012.

Tsuji S, Kawano S, Tsujii M, et al. [Mucosal microcirculation and angiogenesis in gastrointestinal tract]. **Nihon Rinsho.** 1998; 56:2247–52.

Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Growth Suppressor p12CDK2-AP1 Promotes Tumor Cell Local Invasion but Suppresses Distant Colony Growth. **Cancer Res.** 2008; 68:10377–10386.

Van Broekhoven DLM, Verhoef C, Grünhagen DJ, et al. Prognostic Value of CTNNB1 Gene Mutation in Primary Sporadic Aggressive Fibromatosis. **Ann. Surg. Oncol.** 2015; 22:1464–1470.

Vila A, Abal M, Muínelo-Romay L, et al. EGFR-Based Immunoisolation as a Recovery Target for Low-EpCAM CTC Subpopulation. **PLoS One** 2016; 11:e0163705.

Wang Z, Divanyan A, Jourd'heuil FL, et al. Vimentin expression is required for the development of EMT-related renal fibrosis following unilateral ureteral obstruction in mice. **Am. J. Physiol. Physiol.** 2018; 315:F769–F780.

Wei S, Henderson-Jackson E, Qian X, Bui MM. Soft Tissue Tumor Immunohistochemistry Update: Illustrative Examples of Diagnostic Pearls to Avoid Pitfalls. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 2017; 141:1072–1091.

West DC, Grier HE, Swallow MM, Demetri GD, Granowetter L, Sklar J. Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. **J. Clin. Oncol.** 1997; 15:583–588.

Wong IH, Chan AT, Johnson PJ. Quantitative analysis of circulating tumor cells in peripheral blood of osteosarcoma patients using osteoblast-specific messenger RNA markers: a pilot study. **Clin. Cancer Res.** 2000; 6:2183–8.

Wu X-S, Xi H-Q, Chen L. Lgr5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival. **World J. Surg. Oncol.** 2012; 10:244.

Xi HQ, Cai AZ, Wu XS, et al. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 is associated with invasion, metastasis, and could be a potential therapeutic target in human gastric cancer. **Br. J. Cancer** 2014; 110:2011–2020.

Yamamoto Y. Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49,

in human hepatocellular carcinomas with  $\beta$ -catenin mutations. **Hepatology** 2003; 37:528–533.

Yang JC, Chang AE, Baker AR, et al. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. **J. Clin. Oncol.** 1998; 16:197–203.

Yang L, Moses HL. Transforming Growth Factor  $\beta$ : Tumor Suppressor or Promoter? Are Host Immune Cells the Answer? **Cancer Res.** 2008; 68:9107–9111.

Zagars GK, Ballo MT, Pisters PWT, et al. Prognostic factors for patients with localized soft-tissue sarcoma treated with conservation surgery and radiation therapy. **Cancer** 2003; 97:2530–2543.

Zoubek A, Ladenstein R, Windhager R, et al. Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR: A preliminary evaluation. **Int. J. Cancer** 1998; 79:56–60.



# Circulating Tumor Cells in Desmoid Tumors: New Perspectives

Alexcia C. Braun<sup>1\*</sup>, Fernando A. B. Campos<sup>2</sup>, Emne A. Abdallah<sup>1</sup>, Anna P. C. Ruano<sup>1</sup>, Tiago da S. Medina<sup>1</sup>, Milena S. Tariki<sup>2</sup>, Fabio F. E. Pinto<sup>3</sup>, Celso A. L. de Mello<sup>2</sup> and Ludmilla T. D. Chinen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> International Center for Research, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup> Department of Clinical Oncology, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup> Department of Orthopedics, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

## OPEN ACCESS

Edited by:

George Calin,  
University of Texas MD Anderson  
Cancer Center, United States

Reviewed by:

James Reuben,  
University of Texas MD Anderson  
Cancer Center, United States

Chang Zou,  
Jinan University, China

\*Correspondence:

Alexcia C. Braun  
alexciabraun@gmail.com  
Ludmilla T. D. Chinen  
ltdchinen@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular and Cellular Oncology,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

Received: 28 October 2020

Accepted: 13 August 2021

Published: 14 September 2021

Citation:

Braun AC, Campos FAB, Abdallah EA, Ruano APC, Medina TS, Tariki MS, Pinto FFE, de Mello CAL and Chinen LTD (2021) Circulating Tumor Cells in Desmoid Tumors: New Perspectives. *Front. Oncol.* 11:622626. doi: 10.3389/fonc.2021.622626

**Introduction:** Desmoid tumor (DT) is a rare neoplasm with high local recurrence rates, composed of fibroblastic cells that are characterized by the expression of key molecules, including the intermediate filament vimentin, cyclooxygenase-2 (COX-2), and nuclear  $\beta$ -catenin, and lack of epithelial markers. Circulating tumor cells (CTCs) isolated from the peripheral blood of patients with sarcomas and other neoplasms can be used as early biomarkers of tumor invasion and dissemination. Moreover, CTCs can also re-colonize their tumors of origin through a process of “tumor self-seeding.”

**Objectives:** We aimed to identify CTCs in the peripheral blood of patients with DT and evaluate their expression of  $\beta$ -catenin, transforming growth factor receptor I (TGF- $\beta$ RI), COX-2, and vimentin proteins.

**Material and Methods:** We conducted a prospective study of patients with initial diagnosis or relapsed DT with measurable disease. Blood samples from each patient were processed and filtered by ISET<sup>®</sup> (Rarecells, France) for CTC isolation and quantification. The CTC expression of  $\beta$ -catenin, COX-2, TGF- $\beta$ RI, and vimentin was analyzed by immunocytochemistry (ICC).

**Results:** A total of 18 patients were included, and all had detectable CTCs. We found a concordance of  $\beta$ -catenin expression in both CTCs and primary tumors in 42.8% (6/14) of cases by using ICC and immunohistochemistry, respectively.

**Conclusions:** Our study identified a high prevalence of CTCs in DT patients. Concordance of  $\beta$ -catenin expression between primary tumor and CTCs brings new perspectives to assess the dynamics of CTCs in the blood compartment, opening new avenues for studying the biology and behavior of DT. In addition, these results open the possibility of using CTCs to predict DT dynamics at the time of disease progression and treatment. Further studies with larger sample sizes are needed to validate our findings.

**Keywords:** circulating tumor cells, desmoid tumor, beta catenin expression, vimentin expression, TGF- $\beta$ RI expression

## INTRODUCTION

Desmoid tumor (DT) is a rare non-metastasizing mesenchymal neoplasm that can show aggressive local behavior and thereby can impact the functionality and quality of life of the patients (1, 2). DTs are typically diagnosed in adults (35–40 years) and are more common in women of reproductive age (3, 4). They can affect any anatomic site but are commonly localized in the extremities, abdominal wall, and abdominal mesentery (5). The clinical outcomes of DTs are unpredictable, with some progressing to large-sized tumors with infiltration and destruction of adjacent vital structures, and others showing spontaneous regression (6). Nevertheless, reliable and validated predictive factors regarding DT evolution are still lacking (7).

The initial management of asymptomatic patients with non-life-threatening DTs is often watch-and-wait, as up to 20% will regress spontaneously (8). If treatment is indicated, options include surgery, radiation, or systemic therapy with tyrosine-kinase inhibitors or chemotherapy (6, 8). Due to the infiltrative nature of the disease, post-surgical recurrence rates can exceed 50% of cases, especially for extra-abdominal desmoids, which reinforce observation as an adequate strategy (9).

Histologically, DTs are composed of fibroblastic cells characterized on immunohistochemistry (IHC) by the expression of intermediate filament vimentin, along with cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear b-catenin, and lack of epithelial markers expression (1, 10, 11). Approximately 90% of DTs are sporadic, while the remaining cases are usually related to familial adenomatous polyposis (FAP), specifically Gardner syndrome (12). In both cases, mutations that activate the Wnt/b-catenin signaling pathway are likely to play a significant role in tumorigenesis (13). Wnt/b-catenin signaling is involved in numerous processes, such as the control of gene expression and regulation of cell adhesion and polarity (14). In addition, approximately 85% of DTs are related to mutations in the exon 3 of the beta-catenin encoding gene *CTNNB1* (15). *CTNNB1* mutations of DTs generally occur at codons 41 or 45, with p.T41A (threonine to alanine), p.S45F (serine to phenylalanine), and p.S45P (serine to proline) being the most frequent ones (15–21).

Used as a new tool for diagnosing and monitoring cancer, liquid biopsies have received increasing attention. Using a simple blood test has enormous implications for the diagnosis of cancer, so it is possible to avoid invasive tissue biopsies in the future and obtain a similar result from the circulating tumor cell (CTC) test (22).

CTCs play a central role on tumor dissemination and metastasis, which are ultimately responsible for most cancer deaths. Cancer cells can enter circulation years before a tumor is diagnosed. The majority of cells die, and only a minor fraction contains viable metastatic precursors that infiltrate organs and survive for eventual relapse (23–25). The presence of CTCs and/or circulating tumor microemboli (CTMs) in the peripheral blood of patients can be early markers of tumor invasion and spread (26). The dissemination of cancer cells from a primary tumor is conventionally viewed as a unidirectional process that culminates with the metastatic colonization of distant organs.

CTCs and CTMs are associated with poor prognosis in several carcinomas. Furthermore, CTCs can colonize their tumors of origin through a process of “tumor self-seeding” (27). In contrast to carcinomas, few studies have examined CTCs and CTMs in mesenchymal tumor patients (28), and to the best of our knowledge, there are no reports of CTC detection in cases of DT.

Therefore, the aims of this study were to determine whether CTCs could be detected in DT patients and analyze their expression of mesenchymal proteins [vimentin, transforming growth factor receptor I (TGF- $\beta$ RI)], as well as b-catenin and COX-2.

## METHODS

### Patients and Samples

This was a prospective and descriptive study, conducted with DT patients treated at the A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, between June 2017 and October 2019. Peripheral blood samples were obtained after written informed consent. CTCs were analyzed by ISET<sup>®</sup> assay (Rarecells Diagnostics, Paris, France). This study was approved by the local Research Ethics Board (REB protocol 2427/17). Inclusion criteria were age >18 years, diagnosis of DT, presence of measurable disease, and a negative medical history of recent surgical procedures or trauma. Patients with FAP were excluded.

### ISET<sup>®</sup> Assay

Blood samples (8 ml) were drawn in EDTA tubes (BD Vacutainer<sup>®</sup>) with immediate gentle agitation after blood collection. If samples were not processed immediately after phlebotomy, the tubes were left on a blood homogenizer at room temperature for up to 4 h. The isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) assay was performed as described previously (29). The samples were processed on the platform according to the manufacturer's instructions. Eight milliliter of whole blood (1 ml per spot) was topped up to 80 ml with erythrocyte lysis buffer containing 0.02% formaldehyde, incubated for 10 min at room temperature, and filtered through an 8- $\mu$ m pore membrane. To preserve cell integrity, filtration pressure was optimized at  $-10$  kPa. The membrane was then washed once with phosphate-buffered saline 1 $\times$ . After processing, membranes were dried, wrapped in aluminum foil, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### Immunocytochemistry

The spot membranes were subjected to immunocytochemistry (ICC) in 24-well plates to evaluate protein expression. We made single [one protein analyzed, stained with DAB (Dako<sup>™</sup>)] or double (two proteins analyzed, stained with DAB and magenta chromogen) ICC assays. Before ICC reactions, antigen retrieval was performed using Antigen Retrieval Solution (Dako<sup>™</sup>). Cells in the ISET spots were then hydrated with tris-buffered saline (TBS) 1 $\times$  for 20 min and permeabilized with TBS + Triton X-100 for 5 min. Endogenous peroxides were blocked with 3% hydrogen peroxide and kept in the dark for 15 min. The spots were incubated with antibodies diluted in TBS supplemented with 10% fetal calf serum. For single staining, antibody staining



was visualized with DAB (Dako™). To amplify the antibody signal for double staining, the spots were incubated with Envision G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (Dako™), followed by a 10-min incubation with magenta chromogen to visualize the second antibody. Cells were stained with hematoxylin and analyzed by light microscopy (BX61-Olympus).

Negative and positive controls were added for each ICC staining. For positive controls, blood from healthy subjects was spiked with A549 and U-87 cell lines. According to the Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>), the A549 cell line expresses both b-catenin and TGF- $\beta$ RI, whereas the U-87 cell line expresses both COX-2 and vimentin. These cell lines were acquired from ATCC® HTB-43™. For negative controls, A549 and U-87 cell lines spiked in healthy blood were not incubated with the primary antibody, to avoid cross-reactivity (Supplementary Figure 1). For protein expression analysis, cells were classified according to their staining characteristics. The absence of staining was considered negative, while staining of the nucleus or cytoplasm was classified as positive, as expected for each antibody. We did not perform statistical analysis to evaluate protein expression, progression-free survival, or overall survival due to the rarity of events in these patients and the short follow-up interval.

## RESULTS

### Detection of CTCs and Protein Expression Analysis

Recently, it was shown that the limit of detection of ISET is 1 CTC/10 ml of whole blood and that despite its high sensitivity, the distribution of CTCs in membrane spots is not uniform (30). Thus, we tested all eight spots fixed with 0.02% formaldehyde to ensure the observation of all isolated CTCs.

Eighteen patients were enrolled in this study, including two males and 16 females, with median age at the time of recruitment of 43.5 years (18–65 years). DTs were diagnosed in the lower extremities of 27.7% of patients. Clinical and pathological characteristics were obtained from medical records and are summarized in Table 1.

CTCs were detected in all patients. Eight spots were tested for each patient. Two spots were tested for b-catenin and vimentin expression (double staining), two were single-stained for either COX-2 or TGF $\beta$ -RI, and the last spots were stained with hematoxylin for CTC visualization. In addition, the estimated CTC count was made considering the average count of the eight spots evaluated. The average number of CTCs detected by ISET® was 2.6 CTC/ml (0.5–13 CTCs/ml). One CTM, a cluster of three or more CTCs, was found in one patient. Quantification and characterization of CTCs are presented in Table 2, Figure 1, and Supplementary Figure 2.

CTCs of 11 patients (61.1%) expressed b-catenin. Immunohistochemical analysis of primary tumors revealed that 11 patients were positive for b-catenin (Figure 2) and three were negative, and the results of four patients were not reported. Five patients expressed b-catenin in both CTCs and

TABLE 1 | Clinical characteristics of the patients.

Variable	No.	%
Total number of patients	18	100
Age at recruitment, years		
Median (range)	43.5 (18–65)	
Gender		
Male	2	11
Female	16	89
Tumor location		
Lower limbs	5	28
Upper limbs	2	11
Supraclavicular	2	11
Abdominal wall	3	18
Scapular region	1	5
Retroperitoneum	1	5
Gluteal region	2	11
Paravertebral	2	11
Relapse		
Yes	12	67
No	6	33

primary tumors, and one who tested negative in the primary tumor also tested negative in CTCs. Two patients were positive for b-catenin expression in CTCs and negative in primary tumors (Table 2). Because i) IHC is the gold standard method for b-catenin detection in primary tumors and ii) primary tumor b-catenin expression was available in the medical records of only 14 patients, we found a concordance rate between primary tumors and CTCs of 42.8% (6 concordant/14 samples). As concordance, we considered simultaneous positive or negative expression of a given protein in both CTCs and primary tumors. Among the 18 patients evaluated for protein expression in CTCs, vimentin was observed in five patients (27.7%) (Figure 3), while nine were positive for TGF $\beta$ -RI (50%) and seven for COX-2 (38.8%).

## DISCUSSION

Although it was our first study with DT, we have extensive experience with ISET, as we have been working with this method for a long time, with many published papers (29, 32–40) including two with sarcomas (29, 41). In the first paper with sarcoma (29), we tested the sensitivity of the method, as we were the first group to test ISET for non-solid tumors, and we proved, with cell line, that its sensitivity was high, even for mesenchymal cells. After spiking 25, 50, 100, and 150 HT1080 cells (derived from human fibrosarcoma), in triplicate, in 1 ml of blood from healthy donors and filtering the blood using ISET, we found mean numbers of 25, 54, 100, and 155 cells, respectively. The numbers found were not identical to the numbers of cells spiked because tumor cells were counted in a counting chamber, by dilution, and not one by one. In this study, we also filtered blood samples from 30 healthy donors in ISET and found no CTCs.

Since DTs do not metastasize, it is apparently counterintuitive to find CTCs in the bloodstream of these patients. However, our study showed that CTCs can be detected and isolated from DT patients even from relatively low volumes of blood samples. This finding suggests that CTCs might be playing a different role on

TABLE 2 | CTC counting and characterization.

Patient ID	b-Catenin expression in the primary tumor	Number of b-catenin-positive CTCs in 5 ml of blood	Number of TGF $\beta$ -RI-positive CTCs in 5 ml of blood	Number of vimentin-positive CTCs in 5 ml of blood	Number of COX-2-positive CTCs in 5 ml of blood	CTC/1 ml
1	Negative	1	0	0	1	1
2	Positive	4	0	0	1	1.8
3	Positive	0	2	2	0	3.8
4	Positive	0	1	0	2	1
5	Positive	4	0	2	2	2.6
6	Positive	0	0	0	0	0.8
7	Positive	0	4	0	8	13
8	Positive	2	1	0	0	4.8
9	Positive	0	0	0	0	2.6
10	Positive	5	8	1	0	5
11	-	2	7	2	0	4.75
12	Negative	0	0	0	0	0.5
13	-	4	2	0	0	1.75
14	Negative	1	3	0	0	10.5
15	-	3	0	0	1	5
16	-	1	0	0	0	1.25
17	Positive	6*	0	9*	1	8
18	Positive	0	1	0	0	1

CTC, circulating tumor cell; COX-2, cyclooxygenase-2.

\*Patient with positive circulating tumor microemboli (CTMs) for b-catenin and vimentin.

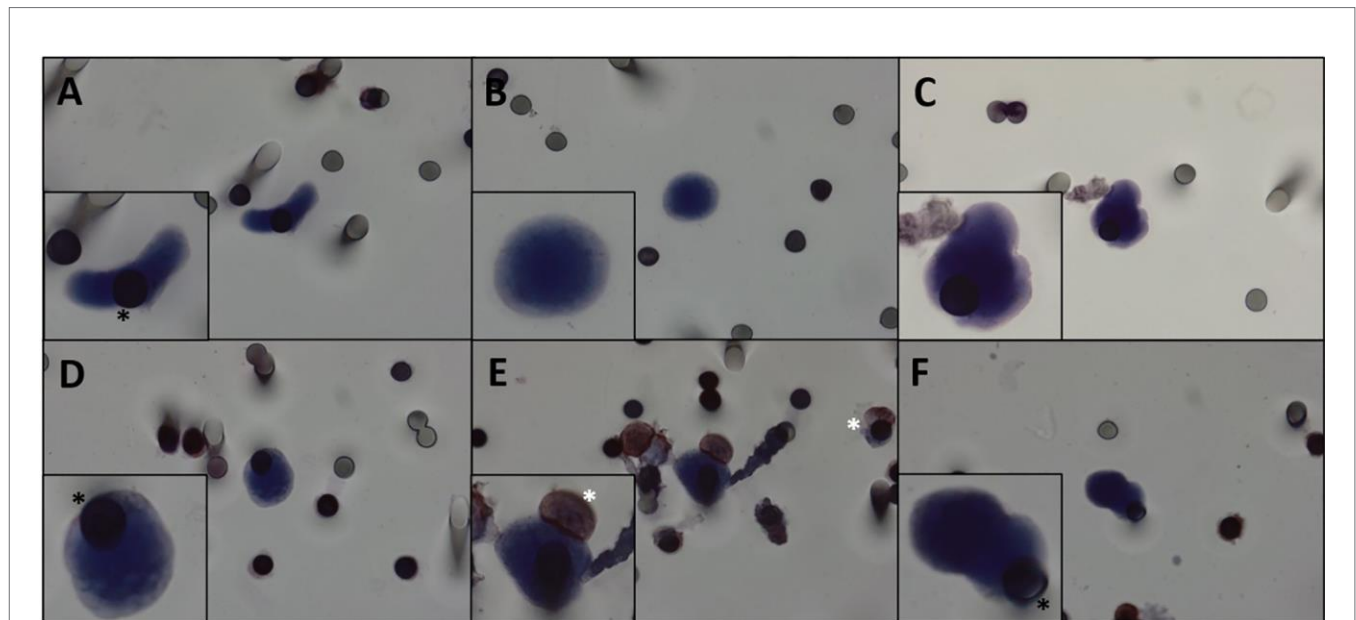


FIGURE 1 | (A-F) CTCs isolated from patients with DTs. Cells visualized with hematoxylin. We can observe pleomorphic desmoid tumor CTCs with all cytopathological features: nucleus size  $\geq 12 \mu\text{m}$ , hyperchromatic and irregular nucleus, visible presence of cytoplasm, and a high nucleus-cytoplasm ratio (31). White asterisk: leukocytes. Black asterisk: membrane spots. Images were taken at  $\times 600$  magnification using a light microscope (Research System Microscope BX61—Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a digital camera (SC100—Olympus, Tokyo, Japan). CTCs, circulating tumor cells; DTs, desmoid tumors.

the DT biology. That allowed us to hypothesize that CTCs can be working as vehicles that reseed the primary tumor, which could potentiate its aggressiveness. CTCs are characterized by cytomorphological features that include nucleus size  $\geq 12 \mu\text{m}$ ; hyperchromatic and irregular nuclei; visible presence of cytoplasm; and a high nucleus-cytoplasm ratio (31).

We defined CTCs as cells displaying all the aforementioned characteristics, and we also observed CTC pleomorphism (Figure 1 and Supplementary Figure 2). Morphologic changes resulting in more rounded or “fibroblastoid” CTCs were most likely acquired during *in vitro* cell handling or by the filtering process. In Supplementary Figure 3, examples of macrophages

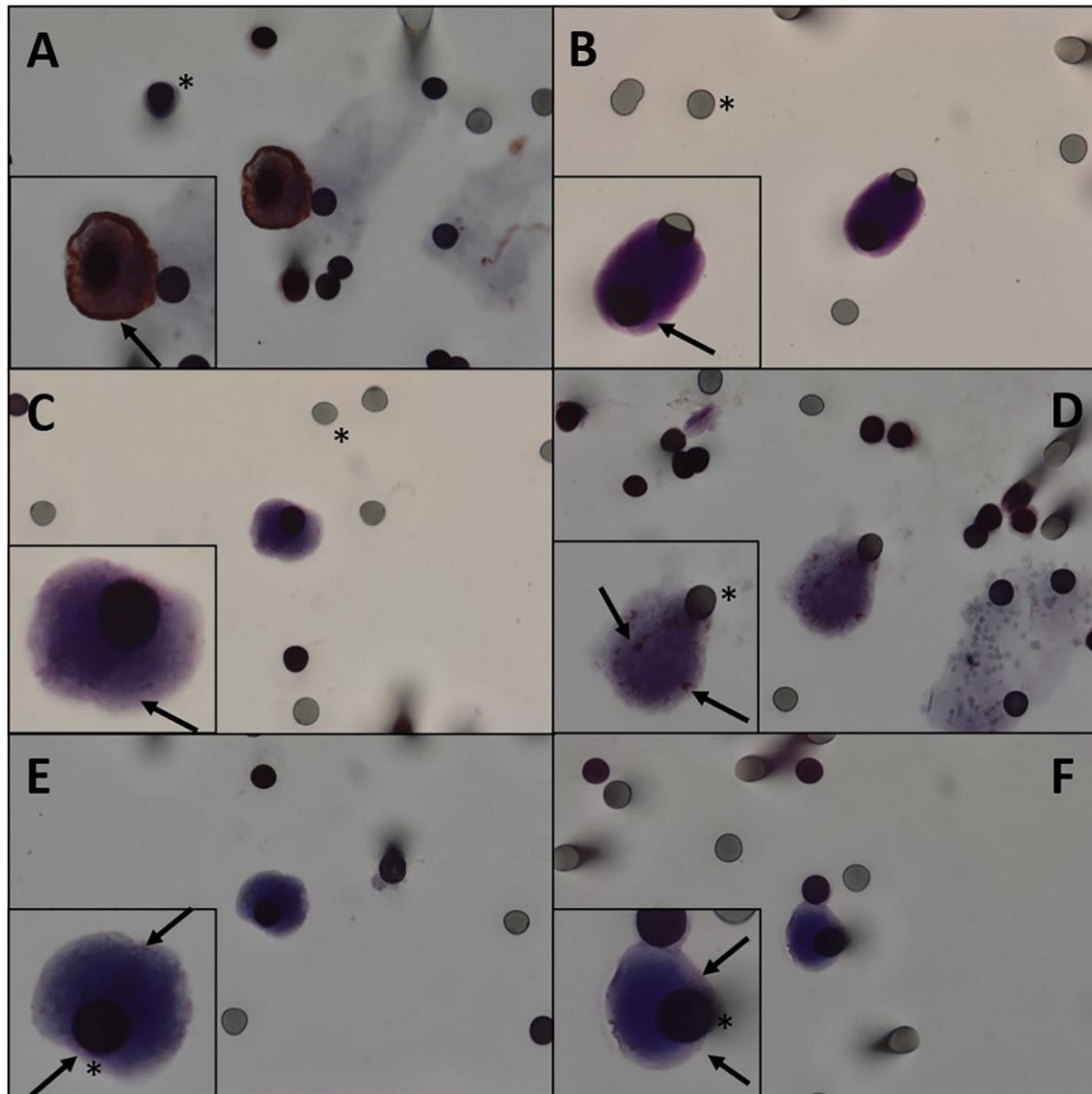


FIGURE 2 | (A) Immunocytochemistry of CTC with b-catenin antibody counterstaining with DAB. (B-F) Immunocytochemistry of CTC with b-catenin antibody and counterstaining with magenta chromogen. We can observe different degrees of staining. (A, B) b-Catenin highly positive staining in a patient. (C, D) b-Catenin middle staining in a patient. (E, F) b-Catenin weakly positive staining in a patient. Black asterisk: membrane spots. Black arrows: b-catenin. CTC, circulating tumor cell.

isolated from the blood of patients with DT can be appreciated, demonstrating the morphological differences between CTCs and macrophages.

The high prevalence of CTCs in our patient population might be explained by the self-seeding hypothesis. It has been proposed that self-seeding can accelerate tumor growth, angiogenesis, and stromal recruitment through seed-derived factors (27). Therefore, tumor self-seeding might explain the relationships among anaplasia, tumor size, vascularity, and prognosis and also suggests that local recurrences may result from seeding of disseminated cells following complete tumor excision (1, 42, 43).

CTMs were isolated from a single patient (Figure 3 and Table 2) and were positive for b-catenin and vimentin

expressions. Interestingly, it was in a 57-year-old woman whose diagnosis was in 2013 with the blood collection in this study made in September 2019 and who has not yet progressed. She has received only one treatment line (tamoxifen + celecoxib). Knowledge regarding CTMs, also called CTC clusters, has evolved over the last decade, and increasing evidence suggests that they play an essential role on the pathophysiology of metastasis (44). Preclinical and clinical studies exploiting other cancers have demonstrated that CTMs are associated with increased metastatic potential and poor prognosis (36, 45-48). Hayashi et al. detected CTMs in sarcoma patients using CellSieve™, a low-pressure microfiltration device. Our group previously isolated CTMs in sarcoma patients using ISET® but

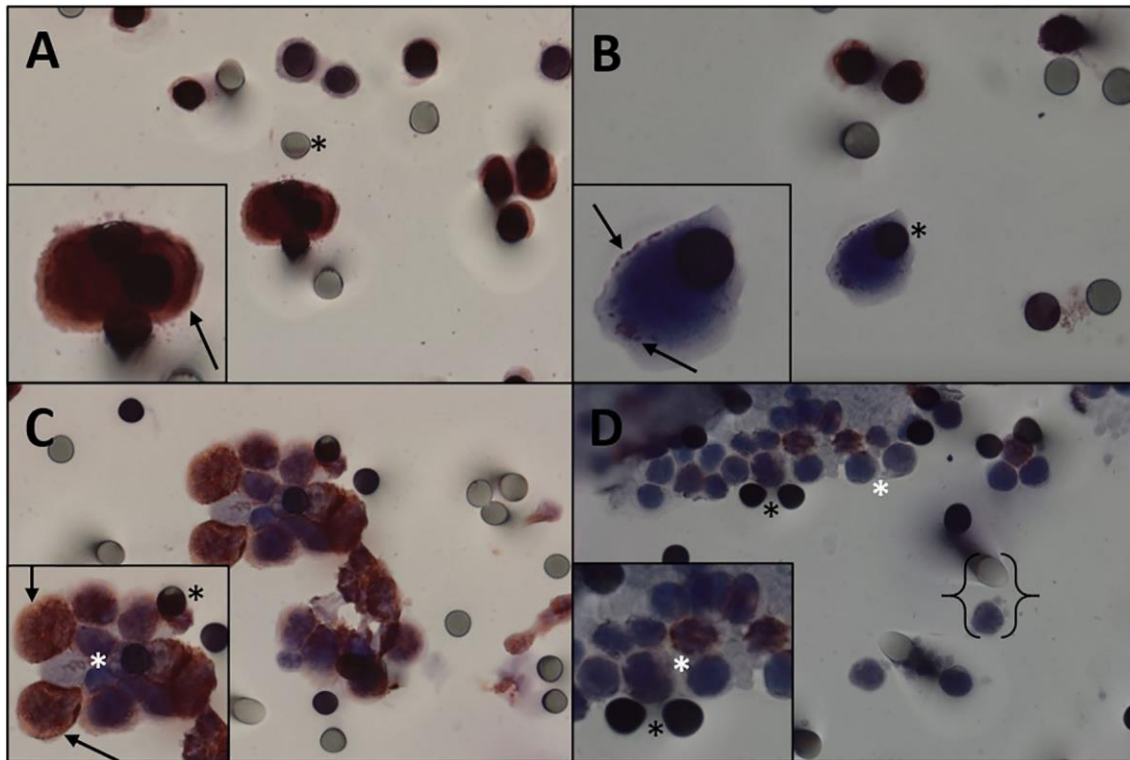


FIGURE 3 | Immunocytochemistry for vimentin. (A, B) Immunocytochemistry of CTC with vimentin antibody and counterstaining with DAB. (A) High staining. (B) Weak staining. (C) Desmoid tumor CTMs observed in the blood filtered using the ISET, stained with vimentin and counterstained with DAB chromogen. (D) Leukocytes from desmoid tumor patient. Black asterisk: membrane spots. Black arrows: vimentin expression. White asterisk: leukocytes. Keys: size comparison between a leukocyte and a spot. CTC, circulating tumor cell; CTMs, circulating tumor microemboli; ISET, isolation by size of epithelial tumor cells.

did not address DTs (41). Taking this into account, together with our current data, it is reasonable to hypothesize that the inability of DTs to metastasize can be explained in part by their failure to generate CTMs (as we rarely found CTMs in our cohort of 18 patients). However, this hypothesis needs to be interpreted cautiously, due to the small sample size of our cohort.

b-Catenin is broadly used for DT diagnosis. In line with this, we thought that this protein could also be expressed in CTCs. Analysis of b-catenin protein expression in CTCs showed 35.7% of concordance with primary tumors (considering both i) patients from whom reports of the primary tumor were available and ii) those patients in whom the spots analyzed for b-catenin did not present CTCs). b-Catenin is encoded by the *CTNNB1* gene in humans and is involved in cell signaling, acting primarily as a transcription factor. It has an essential role on developmental biology and cell adhesion. Mutations and overexpression of this gene are associated with several types of cancers, such as lung, breast, ovarian, endometrial, hepatocellular, and colorectal carcinomas (19–21, 49). We also identified vimentin expression in the CTCs of five patients (27.7%). Vimentin is required for plasticity of mesenchymal cells under normal physiological conditions and migration of cancer cells that have undergone epithelial/mesenchymal transition. In a previous study of sarcoma CTCs conducted by

our group, we detected vimentin in CTCs of three patients in a cohort of 11 (29).

TGF- $\beta$  is a secreted cytokine that regulates cell migration, differentiation, and proliferation (50). Depending on its expression level, TGF- $\beta$  has both proangiogenic and antiangiogenic properties. Angiogenic factors (vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor) increase TGF- $\beta$  expression when its levels are low. At high levels, TGF- $\beta$  rebuilds basement membrane and inhibits the growth of endothelial cells and smooth muscle cells (51, 52). In this study, curiously, nine patients (50%) were positive for TGF- $\beta$ -RI expression in CTCs. In another study by our group (37), TGF- $\beta$ -RI expression was associated with poor prognosis of locally advanced head and neck cancer. The identification of TGF- $\beta$ -RI in CTCs opens paths for the comprehensive exploitation of this pathway in DT.

COX enzymes play important roles on human physiology and various pathological conditions (53, 54). There is evidence for the critical involvement of COX-2 in many pathologies, including cancer (55, 56). Here, we also found a high frequency of DT patients expressing COX-2 in CTCs. Considering that DTs do not form metastases but show aggressive local invasion, it is possible that COX-2 plays an essential role on this process, which needs to be further investigated.



In general, we found that b-catenin was highly expressed in CTCs. Except for patient #6, we also found that at least one marker was expressed by CTCs across the whole cohort analyzed in this study, suggesting that evolution of protein expression in CTCs might be used as a biomarker that allows the non-invasive diagnosis of DT patients.

In this study, we showed that CTCs are composed of highly heterogeneous cell populations with very different phenotypes. This difference in phenotypes makes the identification of CTCs challenging, due to their similarities with other cells of the immune system, such as giant monocytes and micromegakaryocytes. However, training in analysis with the help of cytopathological criteria can overcome these difficulties. Laget et al. (30) described results that consistently show the feasibility of isolating live and fixed tumor cells with a lower limit of detection (LLOD) of a cancer cell per 10 ml of blood and an LLOD sensitivity ranging from 83% to 100%. Those results demonstrated that ISET<sup>®</sup> allows highly sensitive and impartial isolation of fixed tumor cells from blood for reliable identification of CTCs, as well as the development of immuno-molecular studies. Here, we were able to demonstrate the expression of mesenchymal proteins in CTCs by ICC, which are probably involved in tumorigenesis process.

To conclude, our study opens the prospect of using CTCs to predict desmoid dynamics throughout the course of the disease. In addition, it demonstrates that DTs release CTCs, opening new avenues for studying the biology of this tumor and improving our understanding of its high local relapse rates without distant metastasis. Additional studies with larger sample sizes should be conducted to validate our findings and explore the mechanism of DT development and progression.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary Material.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by AC Camargo Cancer Center. The patients/

participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AB: design, data analysis and interpretation, manuscript writing and collection and/or assembly of data. FC, MS and FP: clinical survey/review and writing. EA and AR: collection and/or assembly of data. TM: English review. CM: conception/design and writing of the clinical part of the manuscript. LC: conception/design, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

We thank the National Institute for Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation (INCT) for financial support for this study. ACB had a PhD fellowship from São Paulo Research Foundation FAPESP (2019/18100-8).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.622626/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | (A, B) Positive control, A549 cell line "spiked" in healthy blood and stained for b-catenin and TGF b-RI respectively. (C, D) Positive control, U-87 cell line "spiked" in healthy blood and stained for COX-2 and Vimentin respectively. (E) Negative control, A-549 cell line "spiked" in healthy blood and negative for b-catenin. Cells were analyzed by light microscopy (BX61-Olympus).

Supplementary Figure 2 | (A-I) Haematoxylin stained cells. Examples of isolated desmoid tumor CTCs with characteristic cytomorphological features (nucleus size  $\geq 12 \mu\text{m}$ , hyperchromatic and irregular nucleus, visible presence of cytoplasm, and a high nucleus-cytoplasm ratio (31). White asterisk: leukocytes. Black asterisks: ISET membrane pore.

Supplementary Figure 3 | (A) Leukocytes from desmoid tumor patient. (B, C) Examples of macrophages isolated from the blood of patients with desmoid tumor. In (B), a macrophage stained with COX-2. In (C), a macrophage visualized with haematoxylin.

## REFERENCES

- Wu C, Nik-Amini S, Nadesan P, Stanford WL, Alman BA. Aggressive Fibromatosis (Desmoid Tumor) Is Derived From Mesenchymal Progenitor Cells. *Cancer Res* (2010) 70(19):7690-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1656
- Ratan R, Roland CL BA. Desmoid Fibromatosis: Management in an Era of Increasing Options. *Curr Oncol Rep* (2021) 23(4):41. doi: 10.1007/s11912-021-01026-w
- de Camargo VP, Keohan ML, D'Adamo DR, Antonescu CR, Brennan MF, Singer S, et al. Clinical Outcomes of Systemic Therapy for Patients With Deep Fibromatosis (Desmoid Tumor). *Cancer* (2010) 116(9):2258-65. doi: 10.1002/cncr.25089
- Penel N, Coindre J-M, Bonvalot S, Italiano A, Neuville A, Le Cesne A, et al. Management of Desmoid Tumours: A Nationwide Survey of Labelled Reference Centre Networks in France. *Eur J Cancer* (2016) 58:90-6. doi: 10.1016/j.ejca.2016.02.008
- Fiore M, MacNeill A, Gronchi A, Colombo C. Desmoid-Type Fibromatosis. *Surg Oncol Clin N Am* (2016) 25(4):803-26. doi: 10.1016/j.soc.2016.05.010
- Garcia-Ortega DY, Martín-Fellez KS, Cuellar-Hubbe M, Martínez-Said H, Alvarez-Cano A, Brener-Chaoul M, et al. Desmoid-Type Fibromatosis. *Cancers (Basel)* (2020) 12(7):1851. doi: 10.3390/cancers12071851
- Penel N, Chibon F, Salas S. Adult Desmoid Tumors: Biology, Management and Ongoing Trials. *Curr Opin Oncol* (2017) 29(4):268-74. doi: 10.1097/CCO.0000000000000374

8. Group DTW The Management of Desmoid Tumours: A Joint Global Consensus-Based Guideline Approach for Adult and Paediatric Patients. *Eur J Cancer* (2020) 127:96-107. doi: 10.1016/j.ejca.2019.11.013
9. Peng PD, Hyder O, Mavros MN, Turley R, Groeschl R, Firoozmand A, et al. Management and Recurrence Patterns of Desmoids Tumors: A Multi-Institutional Analysis of 211 Patients. *Ann Surg Oncol* (2012) 19(13):4036-42. doi: 10.1245/s10434-012-2634-6
10. Kotiligm D, Lazar AJF, Pollock RE, Lev D. Desmoid Tumor: A Disease Opportunity for Molecular Insights. *Histol Histopathol* (2008) 23(1):117-26. doi: 10.14670/HH-23.117
11. Owens CL, Sharma R, Ali SZ. Deep Fibromatosis (Desmoid Tumor). *Cancer* (2007) 111(3):166-72. doi: 10.1002/cncr.22689
12. Koskenvuo L, Ristimäki A, Lepistö A. Comparison of Sporadic and FAP-Associated Desmoid-Type Fibromatoses. *J Surg Oncol* (2017) 116(6):716-21. doi: 10.1002/jso.24699
13. Escobar C, Munker R, Thomas JO, Li BD, Burton GV. Update on Desmoid Tumors. *Ann Oncol* (2012) 23(3):562-9. doi: 10.1093/annonc/mdr386
14. Chilov D, Sinjushina N, Rita H, Taketo MM, Mäkelä TP, Partanen J. Phosphorylated b-Catenin Localizes to Centrosomes of Neuronal Progenitors and is Required for Cell Polarity and Neurogenesis in Developing Midbrain. *Dev Biol* (2011) 357(1):259-68. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.06.029
15. Colombo C, Bolshakov S, Hajibashi S, Lopez-Terrada L, Wang W-L, Rao P, et al. 'Difficult to Diagnose' Desmoid Tumours: A Potential Role for CTNNB1 Mutational Analysis. *Histopathology* (2011) 59(2):336-40. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03932.x
16. Dömöt J, Salas S, Lacroix L, Brouste V, Saulnier P, Terrier P, et al. High Frequency of b-Catenin Heterozygous Mutations in Extra-Abdominal Fibromatosis: A Potential Molecular Tool for Disease Management. *Br J Cancer* (2010) 102(6):1032-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6605557
17. Lazar AJF, Tuvin D, Hajibashi S, Habeeb S, Bolshakov S, Mayordomo-Aranda E, et al. Specific Mutations in the b-Catenin Gene (CTNNB1) Correlate With Local Recurrence in Sporadic Desmoid Tumors. *Am J Pathol* (2008) 173(5):1518-27. doi: 10.2353/ajpath.2008.080475
18. Braggio D, Zewdu A, Londhe P, Yu P, Lopez G, Batte K, et al. b-Catenin S45F Mutation Results in Apoptotic Resistance. *Oncogene* (2020) 39(34):5589-600. doi: 10.1038/s41388-020-1382-5
19. Lecarpentier Y, Schussler O, Hébert J-L, Vallée A. Multiple Targets of the Canonical WNT/b-Catenin Signaling in Cancers. *Front Oncol* (2019) 9:1-17. doi: 10.3389/fonc.2019.01248
20. Liu Y, Patel L, Mills GB, Lu KH, Sood AK, Ding L, et al. Clinical Significance of CTNNB1 Mutation and Wnt Pathway Activation in Endometrioid Endometrial Carcinoma. *INCI J Natl Cancer Inst* (2014) 106(9):1-8. doi: 10.1093/jnci/dju245
21. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G. b-Catenin Dysregulation in Thyroid Neoplasms. *Am J Pathol* (2001) 158(3):987-96. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64045-X
22. Pantel K, Alix-Panabières C. Cell Lines From Circulating Tumor Cells. *Oncoscience [Internet]* (2015) 202(10):815-6. doi: 10.18632/oncoscience.195
23. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clin Chem* (2013) 59(1):110-8. doi: 10.1373/clinchem.2012.194258
24. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the Metastatic Cascade. *Nat Rev Cancer* (2004) 4(6):448-56. doi: 10.1038/nrc1370
25. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic Colonization by Circulating Tumor Cells. *Nature* (2016) 529(7586):298-306. doi: 10.1038/nature17038
26. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating Tumor Cells (CTC) Detection: Clinical Impact and Future Directions. *Cancer Lett* (2007) 253(2):180-204. doi: 10.1016/j.canlet.2006.12.014
27. Kim M-Y, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH-F, Norton L, et al. Tumor Self-Seeding by Circulating Cancer Cells. *Cell* (2009) 139(7):1315-26. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.025
28. Chang L, Asatrian G, Dry SM, James AW. Circulating Tumor Cells in Sarcomas: A Brief Review. *Med Oncol* (2015) 32(11):430. doi: 10.1007/s12032-014-0430-9
29. Chinen L, Mello C, Abdallah E, Ocea L, Buim M, Mingues N, et al. Isolation, Detection, and Immunomorphological Characterization of Circulating Tumor Cells (CTCs) From Patients With Different Types of Sarcoma Using Isolation by Size of Tumor Cells: A Window on Sarcoma-Cell Invasion. *Onco Targets Ther* (2014) 7:1609-17. doi: 10.2147/OTT.S62349
30. Laget S, Broncy L, Hormigos K, Dhingra DM, BenMohamed F, Capiod T, et al. Technical Insights Into Highly Sensitive Isolation and Molecular Characterization of Fixed and Live Circulating Tumor Cells for Early Detection of Tumor Invasion. *PLoS One* (2017) 12(1):e0169427. doi: 10.1371/journal.pone.0169427
31. Krebs MG, Hou J-M, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al. Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches. *J Thorac Oncol* (2012) 7(2):306-15. doi: 10.1097/JTO.0b013e31823c5c16
32. Chinen LTD, de Carvalho FM, Rocha BMM, Aguiar CM, Abdallah EA, Campanha D, et al. Cytokeratin-Based CTC Counting Unrelated to Clinical Follow Up. *J Thorac Dis* (2013) 5(5):593-9. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.09.18
33. Abdallah EA, Fanelli MF, Buim MEC, Machado Netto MC, Gasparini Junior JL, Souza e Silva V, et al. Thymidylate Synthase Expression in Circulating Tumor Cells: A New Tool to Predict 5-Fluorouracil Resistance in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Int J Cancer* (2015) 137(6):1397-405. doi: 10.1002/ijc.29495
34. Buim ME, Fanelli MF, Souza VS, Romero J, Abdallah EA, Mello C AL, et al. Detection of KRAS Mutations in Circulating Tumor Cells From Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Biol Ther* (2015) 16(9):1289-95. doi: 10.1080/15384047.2015.1070991
35. Abdallah EA, Fanelli MF, Souza e Silva V, Machado Netto MC, Gasparini Junior JL, Araújo DV, et al. MRP1 Expression in CTCs Confers Resistance to Irinotecan-Based Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Cancer* (2016) 139(4):890-8. doi: 10.1002/ijc.30082
36. Corassa M, Fanelli MF, Oliveira TB, Mello CL, Machado Netto MC, Nicolau UR, et al. Circulating Tumor Microemboli as a Prognostic Factor for Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors. *J Clin Oncol* (2016) 34(15\_suppl):e23067-7. doi: 10.1200/JCO.2016.34.15\_suppl.e23067
37. Fanelli MF, Oliveira TB, Braun AC, Corassa M, Abdallah EA, Nicolau UR, et al. Evaluation of Incidence, Significance, and Prognostic Role of Circulating Tumor Microemboli and Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor I in Head and Neck Cancer. *Head Neck* (2017) 39(11):2283-92. doi: 10.1002/hed.24899
38. Abdallah EA, Braun AC, Flores BCTPC, Senda L, Urvanegia AC, Calsavara V, et al. The Potential Clinical Implications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Gastric Cancer. *Oncologist* (2019) 24(9):1-10. doi: 10.1634/theoncologist.2018-0741
39. Troncarelli Flores BC, Souza e Silva V, Ali Abdallah E, Mello CAL, Gobo Silva ML, Gomes Mendes G, et al. Molecular and Kinetic Analyses of Circulating Tumor Cells as Predictive Markers of Treatment Response in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Cells* (2019) 8(7):641. doi: 10.3390/cells8070641
40. Abdallah EA, Souza e Silva V, Braun AC, Gasparini VA, Kupper BEC, Tariki MS, et al. A Higher Platelet-To-Lymphocyte Ratio is Prevalent in the Presence of Circulating Tumor Microemboli and is a Potential Prognostic Factor for Non-Metastatic Colon Cancer. *Transl Oncol* (2021) 14(1):100932. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100932
41. Braun AC, de Mello CAL, Corassa M, Abdallah EA, Urvanegia AC, Alves VS, et al. EGFR Expression in Circulating Tumor Cells From High-Grade Metastatic Soft Tissue Sarcomas. *Cancer Biol Ther* (2018) 19(6):454-60. doi: 10.1080/15384047.2018.1433498
42. Sakorafas GH, Nissotakis C, Peros G. Abdominal Desmoid Tumors. *Surg Oncol* (2007) 16(2):131-42. doi: 10.1016/j.suronc.2007.07.009
43. Nieuwenhuis MH, Casparie M, Mathus-Vliegen LMH, Dekkers OM, Hogendoorn PCW, Vasen HFA. A Nation-Wide Study Comparing Sporadic and Familial Adenomatous Polyposis-Related Desmoid-Type Fibromatoses. *Int J Cancer* (2011) 129(1):256-61. doi: 10.1002/ijc.25664
44. Amintas S, Bedel A, Moreau-Gaudry F, Boutin J, Buscail L, Merlio J-P, et al. Circulating Tumor Cell Clusters: United We Stand Divided We Fall. *Int J Mol Sci* (2020) 21(7):2653. doi: 10.3390/ijms21072653
45. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell* (2014) 158(5):1110-22. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013
46. Hou J-M, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* (2012) 30(5):525-32. doi: 10.1200/JCO.2010.33.3716
47. Zhang D, Zhao L, Zhou P, Ma H, Huang F, Jin M, et al. Circulating Tumor Microemboli (CTM) and Vimentin+ Circulating Tumor Cells (CTCs)

- Detected by a Size-Based Platform Predict Worse Prognosis in Advanced Colorectal Cancer Patients During Chemotherapy. *Cancer Cell Int* (2017) 17(1):6. doi: 10.1186/s12935-016-0373-7
48. Wu G, Zhu R, Li Y, Zhao Y, Dai M. Prognostic Significance of Circulating Tumor Microemboli in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Oncol Lett* (2018) 5:7376-82. doi: 10.3892/ol.2018.8264
  49. Cieply B, Zeng G, Proverbs-Singh T, Geller DA, Monga SPS. Unique Phenotype of Hepatocellular Cancers With Exon-3 Mutations in Beta-Catenin Gene. *Hepatology* (2009) 49(3):821-31. doi: 10.1002/hep.22695
  50. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2010) 15(2):117-34. doi: 10.1007/s10911-010-9178-9
  51. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the Tgfb Pathway for Cancer Therapy. *Pharmacol Ther* (2015) 147:22-31. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.001
  52. Sakurai T, Kudo M. Signaling Pathways Governing Tumor Angiogenesis. *Oncology* (2011) 81(s1):24-9. doi: 10.1159/000333256
  53. Smith WL, Urade Y, Jakobsson P-J. Enzymes of the Cyclooxygenase Pathways of Prostanoid Biosynthesis. *Chem Rev* (2011) 111(10):5821-65. doi: 10.1021/cr2002992
  54. Marnett LJ. The COXIB Experience: A Look in the Rearview Mirror. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2009) 49(1):265-90. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145638
  55. Wang D, DuBois RN. The Role of Anti-Inflammatory Drugs in Colorectal Cancer. *Annu Rev Med* (2013) 64(1):131-44. doi: 10.1146/annurev-med-112211-154330
  56. Méric J-B, Rottey S, Olausson K, Soria J-C, Khayat D, Rixe O, et al. Cyclooxygenase-2 as a Target for Anticancer Drug Development. *Crit Rev Oncol Hematol* (2006) 59(1):51-64. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.01.003

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Braun, Campos, Abdallah, Ruano, Medina, Tariki, Pinto, de Mello and Chinen. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em **22/12/2017**, **aprovaram “ad referendum”**, a realização do projeto nº **2427/17** intitulado: **“Análise de Marcadores Sanguíneos em Pacientes com Osteossarcoma, Sarcomas de Partes Moles e Tumor Desmóide.”**

**Pesquisador responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen.**  
**Aluna: Alexcia Camila Braun (Doutorado).**

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

São Paulo, 22 de dezembro de 2017.

Atenciosamente,

**Dra. Sandra Caires Serrano**  
**2ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa**



## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **Análise de Marcadores Sanguíneos em Pacientes com Osteossarcoma, Sarcomas de Partes Moles e Tumor Desmóide**

Investigador Responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Co-Investigador: Dr. Celso A. L. Mello

Nome do (a) participante da pesquisa: \_\_\_\_\_

RGH: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa.

Por favor, leia cuidadosamente este formulário, pois ele informa o que você necessita saber sobre os objetivos deste estudo. Se concordar em tomar parte neste estudo, deverá assinar e datar este formulário. A sua assinatura significa que recebeu as informações necessárias e que deseja participar deste estudo.

#### **OBJETIVOS DO ESTUDO**

Usar um equipamento laboratorial novo no mercado para detectar células tumorais circulantes (CTCs) (são células que se desprendem do tumor) no sangue periférico e correlacionar seus níveis com:

- Marcadores tumorais sanguíneos (substâncias que podem ser encontradas no corpo, normalmente no sangue ou na urina, quando o câncer está presente), observados pelo exame de sangue que você faz a pedido do seu médico;
- Resposta ao tratamento (verificaremos se há diminuição dos níveis dessas células durante e após o seu tratamento);
- Resistência a drogas;
- Tempo de vida após o tratamento;
- Avaliar mutações encontradas nas CTCs e correlacioná-las com mutações encontradas no tumor primário; (entende-se por mutação qualquer mudança no material genético)
- Avaliar a proporção neutrófilo/linfócito (células de defesa do organismo) e correlacionar com as contagens de CTCs;

#### **PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Ao concordar em participar deste estudo, você será submetido a duas coletas de sangue (aproximadamente 12 ml na primeira e 10 ml na segunda) nos seguintes momentos: antes do tratamento sistêmico e no final.

Você também se compromete a trazer seus exames de imagem (caso não os tenha realizado aqui neste hospital) para que possamos tomar nota das medidas do seu tumor e tentar correlacioná-las com nossos achados de célula tumoral circulante.

A identificação do seu material será feita por códigos para preservar sua confidencialidade.

#### **RISCOS**

O seu tratamento será exatamente o mesmo, caso você participe ou não deste estudo. Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo.

Os riscos a que você estará sujeito são os riscos inerentes a qualquer punção venosa como: dor local no ato da punção, sangramento no local, hematoma e raramente flebite (infecção na veia punccionada), mas isto será evitado pela limpeza adequada do local de punção e realização do procedimento por profissional capacitado. Apesar de raro, pode ser que ocorra equimose (quando o sangue sai para a pele, resultando em uma mancha azul ou púrpura, redonda não elevada ou irregular) após a coleta de sangue. Caso isso aconteça com você, não há nada a ser feito, a não ser esperar que desapareça (desaparece em até 7 dias).

Os exames realizados em seu sangue não implicarão em nenhuma mudança em seu tratamento ou qualquer conduta médica que esteja sendo realizada ou venha a ser realizada no seu seguimento, uma vez que a pesquisa de CTCs no Brasil ainda é experimental, não havendo nenhum prejuízo para o sucesso das condutas médicas outras aos quais você esteja se submetendo.

### **BENEFÍCIOS**

Não haverá benefícios de qualquer espécie para os voluntários, apenas a importância de contribuir para uma pesquisa científica cujos dados obtidos poderão trazer benefícios para pessoas com câncer. A recusa em participar, não acarretará prejuízo na qualidade do tratamento. O pesquisador responsável se compromete a suspender a pesquisa imediatamente ao perceber algum risco ou dano à sua saúde, que não previsto neste termo de consentimento.

### **MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES**

Apesar de métodos alternativos serem aprovados e usados na prática clínica em outros países, no Brasil, esses métodos ainda não estão disponíveis.

### **ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS**

Os pesquisadores se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo, porém, por se tratar de nova tecnologia, os resultados não poderão indicar cura ou piora do seu quadro, pois ainda não temos valores de referência para estabelecer uma comparação. Contatos da pesquisadora: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189-5000, ramal 2776).

### **CUSTOS**

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para os voluntários por sua participação neste estudo.

### **CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS**

Seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos neste estudo. Os dados obtidos pela análise do seu sangue são confidenciais, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante ainda que informações do registro médico sejam utilizadas para publicação.

### **BASES DA PARTICIPAÇÃO**

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais tem direito.

### **SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE**

A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato. Você terá acesso aos seus dados de exames, atendimentos médicos e administração de terapia, quando solicitados.

### **ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA**

Você não terá nenhum tipo de remuneração ao aceitar participar deste estudo. A pesquisa não envolve nenhuma forma de compensação financeira aos participantes. Ao participar dessa pesquisa você não abre mão de nenhum dos seus direitos.

#### **ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA**

A sua participação no estudo é voluntária. Você tem o direito de sair do estudo a qualquer momento e por qualquer motivo. Caso venha a abandonar o estudo ou decidir não participar do mesmo, o seu tratamento não será prejudicado. No entanto, se você decidir sair da pesquisa, deverá informar ao seu médico.

#### **INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS**

Esclarecimentos para questões sobre os direitos dos participantes na pesquisa e/ou danos relacionados à pesquisa, contatar a pesquisadora Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189 5000, ramais 2776/2936/2993). Se o pesquisador principal não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente- Hospital do Câncer- A.C. Camargo/ SP, cujo horário de funcionamento é de segunda a quinta-feira, das 07:00 às 18:00h e de sexta-feira das 07:00 às 16:00h (Telefone 2189-5020; endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211- Liberdade- São Paulo, SP).

Você receberá cópia deste documento e o original será arquivado no prontuário do médico. Somente assine este documento se consentir integralmente com seus termos.

#### **GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS**

Nós lhe estimulamos a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Se tiver perguntas relacionadas aos seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital A. C. Camargo.

#### **DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA**

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo. Entendo que não serei submetido a nenhum exame adicional e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) voluntário (a)      dia    mês    ano

\_\_\_\_\_  
Nome do (a) voluntário (a) - letra de forma

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
(Assinatura de Testemunha, se necessário)      dia    mês    ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento)      dia    mês    ano