

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio  
Prudente

Área de Oncologia

**PAPEL DO RECEPTOR LGR5 NO PROGNÓSTICO E NA  
BIOLOGIA DE SARCOMAS DE PARTES MOLES**

**ARIANE CAVALCANTE DOS SANTOS SOUSA**

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

**Área de Concentração:** Oncologia

**Orientador:** Dr. Tiago Góss dos Santos

**SÃO PAULO**

**2022**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

**Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente\***

**Sousa, Ariane Cavalcante.**

**Papel do receptor Lgr5 no prognóstico e na biologia de sarcomas de partes moles. / Ariane Cavalcante Sousa. São Paulo, 2022.**

**113f.**

**Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.**

**Orientador: Tiago Góss dos Santos.**

**1. Sarcomas de partes moles, 2. Biologia molecular, 3. PDX**

**CDU 616**

Elaborado por Ariane Cavalcante

\*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

Ariane Cavalcante dos Santos Sousa

**Papel do receptor Lgr5 no prognóstico e na biologia de sarcomas de partes moles**

**Aprovado em:** 15/08/2022

**Banca examinadora**

Orientador: Tiago Góss dos Santos

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Caroline Brunetto de Farias

Instituição: IPPMG - Instituto de Pediatria (UFRJ)

Membro da banca: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Instituição: Laboratório de Medicina Translacional do Núcleo de Pesquisa e Ensino da Rede São Camilo

Membro da banca: Maria Eugenia Leite Duarte

Instituição: Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad e do Instituto D'Or de Ensino e Pesquisa

Membro da banca: Celso Abdon Lopes de Mello

Instituição: Fundação Antônio Prudente

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

*Marthin Luther King*

## DEDICATÓRIA

Ao meu PAI Rui Cavalcante Bispo dos Santos. Você foi, é e sempre será a minha grande inspiração, meu parceiro, amigo, companheiro, ombro, minha raiz e toda a minha história. Sempre presente em todas as etapas; as de sucessos e as adversidades da minha vida. Essa etapa não tem o mesmo brilho porque essa sua luz, a minha luz foi brilhar no céu. Essa vitória é para e por você. TE AMO pai

Ao meu esposo Claudio Amorim, meu melhor amigo, companheiro, incentivador. Me deu todo suporte para prosseguir, principalmente nesse último ano, os dias mais desafiadores de toda minha vida. Sem você, não teria chegado até aqui.

A minha mãe Sônia Chaves, palavras não conseguem demonstrar a minha admiração. A mulher mais forte, inteligente, sábia, parceira que já conheci. A sua força me faz querer continuar. Obrigada por fazer minha vida ter sentido. Amo você.

Aos meus irmãos, Thiago Otávio Cavalcante e Ariadne Cavalcante, meus amigos, parceiros de vida. Presentes de Deus. Os seres humanos mais incríveis que eu pude conhecer. Cada um com qualidades incríveis e admiráveis. Obrigada por existirem.

Aos meus sobrinhos, Leonardo, Otávio, Bernardo, Arthur Cavalcante e Heitor. Meu mundo azul. Meus maiores tesouros dessa Terra.

Ao meu sogro Abdias Sousa que também foi brilhar no céu, um ser humano incrível. À minha sogra Eliene Amorim, uma mulher forte e admirável.

Ao cunhado Ronaldo Raval e cunhada Joselaine por fazerem parte da família, por estarem acompanhando toda a minha trajetória até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Tiago Góss dos Santos, meu orientador, o grande idealizador deste trabalho. Obrigada pelo intenso apoio, ensinamentos desde o início da minha jornada na Instituição. Obrigada por ter sido, além de orientador, um amigo, um incentivador, um facilitador para que eu pudesse ultrapassar todos os obstáculos que esses últimos 5 anos me trouxeram. Um excelente pesquisador, professor e ser humano.

À Dra. Ethiene Estevam, que me ajudou em todas as etapas no início deste projeto, dividindo seus conhecimentos e colaborando para superar as adversidades encontradas durante o processo de adaptação e aprendizado do grande desafio do Doutorado. Além claro, de ter sido uma excelente amiga, compartilhando os medos e as frustrações que o trajeto na Pesquisa nos apresenta.

À Bruna Katin, enfermeira de pesquisa que desde o início desse trabalho, colaborou, participou ativamente do processo de recrutamento dos pacientes, bem como a criação do Registro Institucional de Sarcomas de partes moles; além claro, de ter se tornado uma grande amiga e parceira. Sempre dando dicas, ensinando e compartilhando experiências e vivências profissional e pessoal também. Obrigada Bruna.

Ao Dr. Felipe D'Almeida Costa, um grande patologista colaborador, professor e parceiro desse trabalho. Sempre disposto a contribuir com seus conhecimentos e expertise admiráveis. Foi uma pessoa indispensável para a conclusão desse trabalho. Muito obrigada, aprendi muito nesse período.

Aos membros da banca de qualificação por contribuírem decisivamente com suas dicas e sugestões para a qualidade e evolução do estudo.

À Maristela, colaboradora do Centro cirúrgico da Instituição que foi fundamental para que conseguíssemos coletar as peças cirúrgicas e poder construir todo o trabalho. A Mari foi uma pessoa incrível e faz parte de toda essa jornada.

À Dra. Alexia Braun, ex doutoranda do grupo de Células tumorais circulantes (CTC) que compartilhou as angústias e conhecimentos no período do doutorado. Parceira de alguns futuros artigos científicos que estamos preparando. Uma amiga que fez parte de todo o processo e experiência.

À Dra. Ludmila Chinen, ex-pesquisadora do grupo de CTC que também me ensinou muito e contribuiu para uma grande parte do trabalho.

A todos os alunos e funcionários do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) e do A. C. Camargo Cancer Center que de alguma forma me ajudaram nesse período.

À instituição A. C. Camargo Cancer Center pela possibilidade de aprendizado inestimável proporcionada pelos seus professores e, principalmente, seus pacientes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Cavalcante, ASS. **Papel do Receptor Lgr5 no Prognóstico e na Biologia de Sarcomas de Partes Moles.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente, 2022.

**INTRODUÇÃO:** Os sarcomas de partes moles (SPM) de alto grau são neoplasias heterogêneas, de prognóstico ruim e que apresentam poucas alternativas de tratamento. A identificação de marcadores de resposta tumoral ao tratamento, prognóstico, e até ao desenvolvimento de novas drogas, é uma busca incessante para um melhor tratamento dos sarcomas. Neste aspecto, o receptor Lgr5 tem um grande potencial em ser um novo alvo molecular, sendo um marcador de células-tronco das criptas intestinais e glândulas mamárias que também atua como um modulador negativo da sinalização da via Wnt/ $\beta$ -catenina, uma das mais importantes na biologia de sarcomas emerge como um promissor candidato para estudos pré-clínicos, uma vez que já foi demonstrada sua importância em tumores do trato gastrointestinal. Para isso, os modelos de tumor de xenoinxerto derivado do paciente (PDX) representam uma plataforma valiosa para identificar novos biomarcadores e novos alvos, assim como o Lgr5 para avaliar a resposta à terapia e os mecanismos de resistência. **OBJETIVO:** Este estudo teve como objetivo estabelecer, caracterizar e testar a proteína Lgr5 através de ensaios *in vitro* e *in vivo* para desvendar a importância de Lgr5 na biologia de SPM e estabelecer uma estrutura integrada, convergente e translacional para o estudo deste tipo de tumor. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Para a determinação da expressão de Lgr5 foi estabelecida duas coortes de estudo, uma retrospectiva oriunda do Registro Institucional de Sarcomas e uma prospectiva, onde foram convidados pacientes operados na Instituição com o intuito de gerar *Patient-derived xenografts (PDX)*, um modelo-pré-clínico que possui a capacidade de manter as características moleculares dos tumores dos pacientes. Para isso, foram utilizados fragmentos implantados em camundongos imunossuprimidos para gerar esses modelos tumorais derivados de pacientes, além dos estudos funcionais *in vitro* utilizando linhagens de SPM para análise de perfil de expressão da proteína Lgr5 através de ensaios com imunofluorescência para verificar a capacidade de expressão de Lgr5, citometria de fluxo para verificar o padrão e quantidade de proteína nas amostras analisadas e western blotting para obter um padrão de marcação da proteína Lgr5. Além dos ensaios funcionais para avaliar a participação da proteína na proliferação, se a expressão da proteína interfere no poder migratório das células e tumores de SPM e capacidade de auto renovação, bem como sua associação com os dados clínicos e dados de sobrevida. **RESULTADOS:** O Registro Institucional retrospectivo conta com mais de 300 pacientes, já o Registro prospectivo com 70 pacientes que derivaram a geração de 33 PDX. Foi observado que pacientes com H-score superior a 20 apresentaram sobrevida global menor em 5 anos em comparação com o H-score de pacientes com valores inferiores a 20. Agora na outra análise feita, o H-score de pacientes com valores superiores a 25 é pior em comparação com os que apresentaram valores inferiores a 25 nos dados de sobrevida livre de doença. Além disso, células que superexpressam a proteína Lgr5 tem maior capacidade migratória ( $p=0.02$ ) e uma tendência de aumento na proliferação e auto renovação. Realizamos o teste de implante dessas populações positivas e negativas de Lgr5, separadas previamente por *cell sorting*. Para isso foram utilizados animais *Balb/c Nude*. Sugerindo que a expressão da proteína transduzida pode ser modulada por mecanismos compensatórios que precisam ser explorados. **CONCLUSÃO:** A construção do Registro Institucional de SPM é um grande passo para o melhor entendimento da biologia dos Sarcomas, além da possibilidade de estudar novos alvos terapêuticos desse tumor raro, uma vez que os estudos e artigos científicos ainda são muito escassos. A geração dos modelos PDX também foi uma estratégia implantada muito bem executada com a geração de 33 PDX de diversos subtipos histológicos. Além da proteína Lgr5



induzir a migração celular a sua expressão está relacionada a um pior prognóstico, uma vez que, quanto maior a expressão de Lgr5 menor é a sobrevida global do paciente. **PALAVRAS-CHAVE:** Sarcomas de partes moles, camundongos, PDX, Lgr5, biologia molecular, TMA.

## ABSTRACT

Cavalcante, ASS. [Role of the Lgr5 Receptor in the Prognosis and Biology of Soft Tissue Sarcomas]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente, 2022.

**INTRODUCTION:** High-grade soft tissue sarcomas (STS) are heterogeneous neoplasms with a poor prognosis and few treatment alternatives. The identification of tumor response markers to treatment, prognosis, and even the development of new drugs, is an incessant search for a better treatment of sarcomas. In this aspect, the Lgr5 receptor has great potential to be a new molecular target, being a marker of stem cells of the intestinal crypts and mammary glands that also acts as a negative modulator of the signaling of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, one of the most important in the biology of sarcomas emerges as a promising candidate for preclinical studies, since its importance in tumors of the gastrointestinal tract has already been demonstrated. To that end, patient-derived xenograft (PDX) tumor models represent a valuable platform to identify new biomarkers and new targets, as does Lgr5 to assess therapy response and resistance mechanisms. **OBJECTIVE:** This study aimed to establish, characterize, and test the Lgr5 protein through in vitro and in vivo assays to unravel the importance of Lgr5 in the biology of PMS and to establish an integrated, convergent and translational framework for the study of this type of tumor. **MATERIALS AND METHODS:** To determine the expression of Lgr5, two study cohorts were established, a retrospective one from the Institutional Registry of Sarcomas and a prospective one, in which patients operated on at the Institution were invited to generate Patient-derived xenografts (PDX), a pre-model -clinical that has the ability to maintain the molecular characteristics of patients' tumors. For this, fragments implanted in immunosuppressed mice were used to generate these tumor models derived from patients, in addition to in vitro functional studies using SPM strains to analyze the expression profile of the Lgr5 protein through immunofluorescence assays to verify the ability to express Lgr5, flow cytometry to verify the pattern and amount of protein in the analyzed samples and western blotting to obtain a pattern of labeling of the Lgr5 protein. In addition to functional assays to assess the protein's participation in proliferation, whether protein expression interferes with the migratory power of SPM cells and tumors and self-renewal capacity, as well as its association with clinical data and survival data. **RESULTS:** The Institutional Retrospective Registry has more than 300 patients, while the Prospective Registry has 70 patients who derived the generation of 33 PDX. It was observed that patients with an H-score greater than 20 had a lower overall survival at 5 years compared to the H-score of patients with values below 20. Now in the other analysis performed, the H-score of patients with values greater than 25 it is worse compared to those who had values less than 25 in the disease-free survival data. Furthermore, cells that overexpress the Lgr5 protein have greater migratory capacity ( $p=0.02$ ) and a tendency to increase proliferation and self-renewal. We performed the implant test of these positive and negative populations of Lgr5, previously separated by cell sorting. For this, Balb/c Nude animals were used. Suggesting that the expression of the transduced protein can be modulated by compensatory mechanisms that need to be explored. **CONCLUSION:** The construction of the Institutional Registry of PMS is a big step towards a better understanding of the biology of Sarcomas, in addition to the possibility of studying new therapeutic targets for this rare tumor, since studies and scientific articles are still very scarce. The generation of PDX models was also an implemented strategy very well executed with the generation of 33 PDX of several histological subtypes. In addition to the Lgr5 protein inducing cell migration, its expression is related to a worse prognosis, since the higher the Lgr5 expression, the lower the overall survival

of the patient. **KEYWORDS:** Soft tissue sarcomas, mice, PDX, Lgr5, molecular biology, TMA.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> - Novos casos de Sarcomas por histologia em 2008.....	19
<b>Figura 2</b> - Sobrevida global de pacientes portadores de sarcomas de partes moles.....	27
<b>Figura 3</b> - Localização histológica de células-tronco do epitélio intestinal. ....	28
<b>Figura 4</b> - Análise de sobrevida por Kaplan-Meier.....	30
<b>Figura 5</b> – Fotos demonstrando as etapas da geração do PDX. ....	39
<b>Figura 6</b> - Heterogeneidade de Expressão de Lgr5 em pacientes com SPM. ....	44
<b>Figura 7</b> - Etapas do Ensaio de migração. ....	45
<b>Figura 8</b> - Seleção de casos de SPM com história clínica para adição no Registro Institucional. ....	48
<b>Figura 9</b> - Sobrevida livre de doença em função do subtipo histológico. ....	51
<b>Figura 10</b> - Sobrevida global em função do grau histológico. ....	52
<b>Figura 11</b> - Sobrevida global em função do estadiamento histopatológico.....	53
<b>Figura 12</b> - Sobrevida livre de doença em função do estadiamento histopatológico. ....	53
<b>Figura 13</b> - Expressão de marcadores de sarcomas de partes moles. ....	54
<b>Figura 14</b> – Expressão de Lgr5 em sarcomas de partes moles em TMA de pacientes oriundos do registro retrospectivo. N = 168. ....	57
<b>Figura 15</b> – Expressão de Lgr5 em sarcomas de partes moles em TMA de pacientes oriundos do registro prospectivo. N = 33.....	57
<b>Figura 16</b> – Expressão de Lgr5 em pacientes com Sarcomas de partes moles. ....	58
<b>Figura 17</b> – Sobrevidas global (A) e livre de metástase (B) em pacientes com sarcomas de partes moles de acordo com a expressão de Lgr5. ....	59
<b>Figura 18</b> – Sobrevida global de pacientes com sarcomas de partes moles com metástase ao diagnóstico de acordo com a expressão de Lgr5. ....	59
<b>Figura 19</b> - Expressão de RNA mensageiro de Lgr5 em linhagens tumorais de sarcomas de partes moles. As células marcadas em vermelho (GCT, HT1080 e RD) estão incluídas no projeto. ....	60
<b>Figura 20</b> - Imunofluorescência para Lgr5 em linhagens celulares de sarcomas de partes moles. ....	63
<b>Figura 21</b> - Crescimento tumoral in vivo de linhagens de sarcomas de partes moles. ....	63
<b>Figura 22</b> - Pré sorting realizado com a linhagem HT1080 infectada com o Lentivírus Lgr5. ....	65
<b>Figura 23</b> - Imunofluorescência II para Lgr5 na linhagem HT1080 infectada com o lentivírus que superexpressa Lgr5.....	66
<b>Figura 24</b> - Cell Sorting realizado com a linhagem HT1080 infectada com o Lentivírus Lgr5. ....	66
<b>Figura 25</b> - Expressão de Lgr5 em linhagem da ATCC – HT1080 selvagem e HT1080 + Lgr5.....	67
<b>Figura 26</b> - Imunofluorescência para Lgr5 na linhagem HT1080 infectada com o lentivírus que superexpressa Lgr5.....	68
<b>Figura 27</b> - Crescimento tumoral in vivo da linhagem HT1080 Lgr5+ e Lgr5-. ....	69
<b>Figura 28</b> - Análise por Citometria de fluxo da expressão dos grupos Lgr5+ e Lgr5- dos camundongos pós ressecção tumoral. ....	70
<b>Figura 29</b> - Avaliação do efeito da expressão de Lgr5 sobre a proliferação de células HT1080. ....	71
<b>Figura 30</b> - Efeito da expressão de Lgr5 sobre a migração de células HT1080. ....	72
<b>Figura 31</b> - Avaliação do efeito de Lgr5 sobre a capacidade de auto-renovação de células HT1080. ....	72
<b>Figura 32</b> -Geração de PDX de sarcomas de partes moles.....	75
<b>Figura 33</b> -Imunohistoquímica comparativa entre Paciente e seus PDX gerados. ....	76
<b>Figura 34</b> -Expressão de Lgr5 em PDX derivados de paciente com SPM.....	77
<b>Figura 35</b> -Imunohistoquímica comparativa entre Paciente e seus PDX gerados de Lgr5. ....	77
<b>Figura 36</b> - Correlação entre o H-score de Lgr5 obtidos em amostras dos PDX vs. Seus respectivos pacientes. ....	78
<b>Tabela 1</b> - Anticorpos Lgr5 utilizados. ....	43
<b>Tabela 2</b> - Características clínico-demográficas da coorte de 361 pacientes.....	49

<b>Tabela 3</b> - Casos coletados de Sarcomas de partes moles. ....	55
<b>Tabela 4</b> - Características clínicas e patológicas de pacientes com SPM.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>CBC</b>	Células Colunares da Base da cripta
<b>CEUA</b>	Comissão de ética no uso de animais
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimental Animal
<b>EDTA</b>	Etilenodiamino tetra-acético
<b>GCT</b>	Giant cell tumor
<b>GIST</b>	Tumores estromais gastrointestinais
<b>GPCRs</b>	G protein-coupled receptors
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>Lgr5</b>	<i>Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5</i>
<b>LMSu</b>	Leiomiossarcoma uterino
<b>LPS</b>	Lipossarcoma
<b>LPSbd</b>	Lipossarcomas bem diferenciados
<b>LPSdd</b>	Lipossarcomas desdiferenciados
<b>LPSm</b>	Lipossarcoma mixóide
<b>LPSmp</b>	Lipossarcoma mixóide pleomórfico
<b>LPSp</b>	Lipossarcoma pleomórfico
<b>MSKCC</b>	<i>Memorial Sloan-Kettering Cancer Center</i>
<b>mTOR</b>	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
<b>NCHS</b>	<i>National Center for Health Statistics</i>
<b>NSG</b>	<i>NOD Scid Gamma</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
<b>PDO</b>	<i>Organoides derivados de pacientes</i>
<b>PDX</b>	<i>Patient Derived Xenograft</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>RIRSPM</b>	Registro Institucional Retrospectivo de Sarcomas de partes moles
<b>RMS</b>	Rabdomiossarcomas

<b>RMSa</b>	Rabdomiossarcoma alveolar
<b>RMSe</b>	Rabdomiossarcoma embrionário
<b>SMA</b>	actina de músculo liso
<b>SPF</b>	<i>Specific Pathogen Free</i>
<b>SPM</b>	Sarcomas de Partes Moles
<b>SEER</b>	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>
<b>TBS T</b>	<i>Tris Buffered Saline with Tween 20</i>
<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>TNM</b>	<i>Classificação de tumores malignos</i>
<b>TMA</b>	Tissue Microarray
<b>WHO</b>	World Health Organization

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 Epidemiologia e fatores de risco.....	18
1.2 Aspectos clínicopatológicos e diagnóstico .....	20
1.2.1 Subtipos histológicos mais frequentes.....	20
1.2.1.1 Tumores adipocíticos.....	20
1.2.1.2 Tumores vasculares .....	21
1.2.1.3 Tumores de músculo liso.....	21
1.2.1.4 Tumores do músculo esquelético .....	22
1.2.2 Estadiamento .....	23
1.2.3 Tratamento .....	24
1.2.4 Caracterização molecular de sarcomas de partes moles .....	26
1.2.5 O papel do receptor Lgr5 na biologia de células mesenquimais .....	27
1.2.6 Integração de dados genômicos com modelos pré-clínicos.....	30
1.2.7 Patient derived xenografts (PDX) - Uma abordagem para a medicina personalizada .....	31
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
2.1 Objetivo geral .....	33
2.2 Objetivos específicos .....	33
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
3.1 Casuística .....	35
3.1.1 Registro Institucional de Sarcomas de partes moles (RISPM) .....	35
3.1.2 Coorte prospectiva.....	36
3.2 Confecção de Tissue Microarray (TMA) .....	37
3.3 Animais .....	38
3.4 Inoculação de tumores e PDX .....	38
3.5 Culturas primárias .....	39
3.6 Linhagens celulares .....	39
3.7 Organoides derivados de pacientes – PDO.....	40
3.8 Transfecção com Lentivírus .....	40
3.9 Citometria de fluxo .....	41
3.10 Cell sorting .....	41
3.11 Imunofluorescência.....	42
3.12 Western blotting .....	42
3.13 Imunohistoquímica .....	42
3.14 Ensaio de Proliferação com BrdU. ....	44



3.15 Ensaio de Migração .....	45
3.16 Capacidade de auto-renovação das células HT1080 transfectadas com Lgr5.....	45
3.17 Análise por H-score .....	46
3.18 Análise estatística .....	46
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
4.1 Registro Institucional de Sarcomas de Partes moles .....	48
4.2 Registro Prospectivo de Sarcomas de Partes moles .....	54
4.3 Expressão de Lgr5 em sarcomas de partes moles.....	56
4.4 Papel do receptor Lgr5 nas capacidades tumorais .....	59
4.4.1 Ensaio <i>in vitro</i> .....	59
4.4.2 Ensaio <i>in vivo</i> .....	63
4.4.3. Transdução lentiviral .....	64
4.5 Criação da plataforma de estudos baseados em patient-derived xenografts .....	72
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo 1 – Parecer com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP n° 2488/18..</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO 2 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP n° 2498/18 .....</b>	<b>99</b>
<b>Anexo 3 – Carta de aprovação do Comitê de Ética do uso de Animais – CEUA n° 080/18.</b>	<b>100</b>
<b>Anexo 4 - Carta de aprovação do Comitê de Ética do uso de Animais – CEUA n° 082/18.</b>	<b>102</b>
<b>Adendo 1 - Variáveis incluídas no Registro retrospectivo de pacientes com Sarcomas de partes moles.....</b>	<b>103</b>
<b>Adendo 2 – Variáveis incluídas no Registro prospectivo de xenoenxertos de Sarcomas de partes moles.....</b>	<b>105</b>
<b>Adendo 3 – Tumores coletados e geração de PDX do Registro prospectivo.....</b>	<b>108</b>
<b>Adendo 4 – Subtipos histológicos adicionados no TMA do Registro Institucional de Sarcomas de partes moles (retrospectivo).....</b>	<b>110</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia e fatores de risco

Os sarcomas de partes moles (SPM) são neoplasias raras com diferentes padrões morfológicos de células mesenquimais (Fletcher et al., 2002). São responsáveis por cerca de 1% dos tumores malignos em adultos com uma incidência de aproximadamente cinco a seis novos casos para cada 100.000 pessoas por ano, podendo se desenvolver em qualquer idade e em praticamente todos os locais anatômicos (Doyle, 2014; Fletcher et al., 2002). Em 2015 nos Estados Unidos foram estimados o diagnóstico de cerca de 12.000 novos casos e mortalidade estimada em quase 5.000 mortes (Siegel et al., 2019). Segundo o *American Cancer Society*, em 2020, estimava-se que aproximadamente 13.460 novos Sarcomas serão diagnosticados (5.740 em mulheres e 7.720 nos homens), com uma mortalidade de cerca de 5.350 óbitos em decorrência deste tumor (American Cancer Society. About Soft Tissue Sarcoma, 2020). No Brasil não existem dados consolidados sobre a incidência de SPM, porém segundo o DATASUS (2022), em 2021 foram diagnosticados 10.571 novos casos de neoplasia maligna de tecido conjuntivo e de outros tecidos moles, onde 2.042 casos eram diagnosticados em peritônio e retroperitônio (Tabnet DATASUS, 2022).

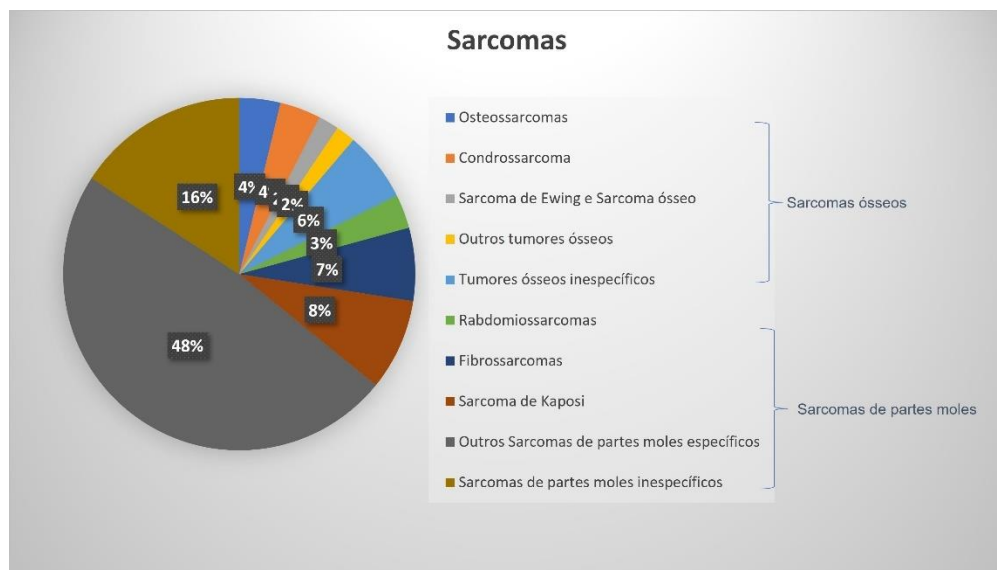
Os SPM são originados de células mesenquimais e, por isso, constituem um grupo de tumores muito heterogêneo, com mais de 100 subtipos (WHO, 5th, 2020), que muitas vezes apresentam comportamento clínico específico, assim como em abordagens terapêuticas específicas (Sbaraglia et al., 2021), podendo ter em sua constituição células bem diferenciadas como adipócitos e fibroblastos, assim como células epitelióides e neurais. Podem ainda ser constituídos de tipos celulares de origem incerta, como os sarcomas pleomórficos e os sinoviais (Fletcher, 2014; Fletcher et al., 2002; Sbaraglia et al., 2021).

Cerca de 50 a 60% dos SPM se desenvolvem nas extremidades (Aguiar Junior et al., 2009a); entre 30 à 40% dos casos são identificados no tronco e abdômen, especialmente o retroperitônio e, em menor frequência, na região de cabeça e pescoço (Fletcher et al., 2002). Os SPM de alto grau são tumores com elevada capacidade de gerar metástases, sendo o pulmão o principal órgão acometido. Podem, de modo mais raro e dependendo do tipo histológico, gerar metástases também para fígado, ossos e linfonodos (Fletcher et al., 2002).

Os sarcomas de partes moles são mais comumente diagnosticados nas extremidades, responsáveis por 12% em membros superiores e 28% nos membros inferiores. A coxa é o local mais comum de surgimento de SPM, sendo responsável por 44% de todos os diagnosticados nas extremidades classificados como lipossarcoma (LPS). Já os sarcomas diagnosticados nas vísceras representam 22% dos SPM e incluem tumores estromais gastrointestinais (GIST) e leiomiossarcoma uterino (LMSu). Os GISTs são mais comumente encontrados no estômago (59%), intestino delgado (31%), reto (3,3%), colón (2,7%) e esôfago (0,6%) (Hui, 2016).

Sarcomas retroperitoneais são responsáveis por 16% de todos os SPM, enquanto o tronco e outros locais (incluindo cabeça e pescoço) respondem por 10% e 12%, respectivamente. Sarcomas retroperitoneais são tipicamente LPS e LMS (Hui, 2016).

Segundo o *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER)*, entre 1973 e 2008 foi observado que os sarcomas de partes moles possuem uma incidência maior que os sarcomas ósseos; onde em 2008, os SPM representavam cerca de 87% contra cerca de 13% dos diagnósticos de sarcomas ósseos (**Figura 1**) (Burningham et al., 2012).



**Fonte:** Adaptado de: Burningham, Z; Hashibe, M; Spector, L; *et.al.* **The Epidemiology of Sarcomas**. 2012. *Clinical Sarcoma Research*, 2:14.

**Figura 1** - Novos casos de Sarcomas por histologia em 2008.

Segundo dados estatísticos do the *National Center for Health Statistics (NCHS)* e SEER, entre 2004 e 2008, a idade média de diagnóstico de SPM era de 58 anos (Burningham et al., 2012).

## 1.2 Aspectos clinicopatológicos e diagnóstico

A classificação dos SPM é baseada principalmente nas características microscópicas. Algumas pesquisas recentes demonstraram que diversos subtipos diferentes de SPM podem ser muito semelhantes microscopicamente. Contudo, os testes para classificação os vários tipos de sarcoma de partes moles são fundamentais para decidir o melhor tratamento para cada paciente (About Soft Tissue Sarcoma, 2020; Fletcher CDM, 2013).

### 1.2.1 Subtipos histológicos mais frequentes.

#### 1.2.1.1 Tumores adipocíticos

As entidades caracterizadas por diferenciação adipocítica, os sarcomas adipocíticos são classificados de acordo com o grau de agressividade: benignos, intermediários e malignos, onde cada subgrupo terá uma abordagem de tratamento diferente.

Os tumores malignos de origem adipocítica incluem lipossarcoma bem diferenciado (LPSbd), lipossarcoma mixóide (LPSm), lipossarcoma desdiferenciado (LPSdd), lipossarcoma pleomórfico (LPSp) e lipossarcoma mixóide pleomórfico (LPSmp) (Saifuddin et al., 2021). O LPSm é diferenciado de outros lipossarcomas baseado em características clínicas, incluindo idade no diagnóstico relativamente menor, preferência pelos membros inferiores, com um padrão único de metástases devido à sua tendência de se espalhar para sítios extrapulmonares, como retroperitônio, axila e outros locais em partes moles (Saifuddin et al., 2021).

Histologicamente, o LPSm é um tumor com múltiplos nódulos de celularidade baixa a intermediária com estroma mixóide proeminente abundante em ácido hialurônico e com vasculatura plexiforme. LPSm de alto grau é definido como > 5% do tumor com um componente de células redondas baseado em áreas hipercelularizadas com núcleos sobrepostos mostrando células com morfologia arredondada e alta relação núcleo/citoplasma. O ensaio por hibridização in situ por fluorescência (FISH) com sonda DDIT3 é um marcador sensível e específico para LPSm (Mujtaba et al., 2021; Saifuddin et al., 2021). Eles possuem translocações cromossômicas que levam a fusões gênicas, com translocação t (12;16) (q13; p12) a qual aparece citogeneticamente na maioria dos casos (cerca de 95%) (Mujtaba et al., 2021).

Já os LPSbd e LPSdd compartilham amplificações na região cromossômica 12q13-15; essas amplificações afetam constantemente murino duplo minuto 2 (MDM2) (100%) e

frequentemente quinase 4 dependente de ciclina (CDK4) (90%) (Kammerer-Jacquet et al., 2017; Thway, 2019). Essas amplificações podem ser detectadas usando o método FISH.

O lipossarcoma mixóide pleomórfico é descrito com maior ocorrência em crianças e adolescentes com predominância do sexo feminino. Os sítios anatômicos mais comuns são representados pelo mediastino seguido dos membros e região de cabeça e pescoço (Sbaraglia et al., 2021).

O LPSmp mostra característica mixóide (presença de uma rede vascular de tamanho capilar rico em fundo mixóide) além da presença de lipoblastos pleomórficos (lipossarcoma pleomórfico) (Sbaraglia et al., 2021).

#### 1.2.1.2 Tumores vasculares

Já o grupo de neoplasias com diferenciação endotelial também é muito heterogêneo tanto em termos de grau de morfologia de formação de vasos quanto de comportamento biológico. O hemangioma anastomosante que é frequentemente classificado como angiossarcoma, a atipia endotelial é leve e nunca está associada a multicamadas, como é tipicamente observado no angiossarcoma (Sbaraglia et al., 2021).

Outro subtipo histológico é o tumor fibroso solitário que representa um desafio diagnóstico porque pode simular muitas entidades tumorais mesenquimais e não mesenquimais. A presença da imunocoloração difusa de STAT6, revela uma fusão no gene ao qual certamente contribuiu para melhorar a acurácia diagnóstica. (Miyata et al., 2018).

#### 1.2.1.3 Tumores de músculo liso

Dentre os tumores de músculo liso, estão presentes os tumores que contêm atipia nuclear, atividade mitótica aos quais são comumente designados leiomiiossarcomas para demonstrar seu potencial maligno e capacidade para gerar metástases. A maioria dos casos diagnosticados como leiomiiossarcomas de partes moles são de grau alto ou intermediário, e os tumores de baixo grau são raros (Miettinen, 2014).

Imunohistoquimicamente, os leiomiiossarcomas são quase invariavelmente e fortemente positivos para actina de músculo liso (SMA), mas a positividade para SMA por si só não é suficiente, pois os tumores miofibroblásticos (fascíte nodular, sarcomas miofibroblásticos) também são positivos. A maioria também evidencia uma positividade (70–80%) para desmina. A maioria dos casos é positiva para caldesmon miosina de músculo liso (Miettinen, 2014).

#### 1.2.1.4 Tumores do músculo esquelético

Os tumores malignos que mostram diferenciação do músculo esquelético são mais raros, mantendo sua grande relevância por representarem o maior subconjunto de sarcomas de tecidos moles em bebês e crianças (J. H. Choi & Ro, 2021).

Com as diferenças significativas de prognóstico, muita ênfase tem sido colocada nos últimos anos na distinção mais precisa e reprodutível entre as variantes. Em 2020, a World Health Organization (WHO) subdividiu os Rbdomiossarcomas (RMS) em 4 tipos, embrionário, alveolar, pleomórfico e de células fusiformes/esclerosante (Kohashi et al., 2020). O RMS de células fusiformes/esclerosante é classificado em três subtipos com base em alterações genéticas: (1) RMS de células fusiformes congênitas com rearranjos VGLL2/NCOA2/CITED2, MYOD1 e alguns subtipos com rearranjos TFCP2/NCOA2 (J. H. Choi & Ro, 2021).

O rbdomiossarcoma embrionário (RMSe), histopatologicamente apresenta células estreladas com citoplasma levemente anfófilo e núcleos ovais centrais e representam a extremidade mais primitiva (Agaram, 2019). À medida que essas células se diferenciam, elas adquirem maior eosinofilia citoplasmática. Essa característica diferencial, tende a ser mais facilmente detectada após o tratamento com quimioterapia, pois os elementos diferenciados caracterizam-se pela população celular predominante, separados pela necrose e fibrose induzidas pela terapia (Moutinho et al., 2015). O estadiamento desse subtipo tumoral é preditivo do desfecho. Os tumores mistos embrionários/alveolares, no que diz respeito a um melhor desfecho, a localização tumoral é bastante importante, além da idade do paciente ao diagnóstico (Moutinho et al., 2015).

Já o Rbdomiossarcoma alveolar (RMSa) mostra algumas características citológicas de células redondas que se assemelham aos linfomas, mas com diferenciação mioblástica primitiva (Pappo & Gartrell, 2020). As características morfológicas variam de acordo com a presença ou ausência de estroma fibroso e histologia embrionária. Os RMSa típicos geram septos fibrovasculares que separam as células tumorais em espécies de ninhos, com aglomerados centrais de células com perda de coesão na periferia. Células gigantes com diferenciação rbdomioblástica são comumente encontradas. Casos ocasionais mostram morfologia de células claras e podem se assemelhar a carcinoma de células claras ou lipossarcoma (Moutinho et al., 2015). Dados preliminares indicam que as fusões genéticas predizem o resultado, com tumores positivos para PAX7/FKHR se comportam com características mais benignas do que

os positivos para fusões de PAX3/FKHR (Moutinho et al., 2015), além de alterações caracterizadas pela fusão das proteínas PAX3-FOXO1 e PAX7-FOXO1 (Pappo & Gartrell, 2020).

Os rhabdomyosarcomas pleomórficos são compostos por células indiferenciadas redondas a fusiformes e uma mistura de células poligonais com citoplasma denso e eosinofílico com contornos fusiformes (Domanski & Walther, 2017). Achados de rhabdomioblastos poligonais pleomórficos nas colorações de rotina de hematoxilina e eosina juntamente com evidência imunohistoquímica de pelo menos um marcador específico do músculo esquelético é necessário para o diagnóstico desse subtipo tumoral (Moutinho et al., 2015). O prognóstico, é ruim e fatores prognósticos confiáveis ainda precisam ser desenvolvidos. Análises de duas séries com seguimento, num total de 38 pacientes, 28 (74%) pacientes morreram da doença (Moutinho et al., 2015).

Além dos subtipos descritos acima, existem também os fibrossarcomas que geralmente se desenvolvem na fáscia e nos tendões dos SPM, mas também podem ocorrer nos ossos como um tumor primário ou secundário na medula. Os fibrossarcomas são caracterizados por células fusiformes, com núcleos ovais. Apresentam grau leve a moderado de pleomorfismo. A vimentina é um marcador que pode indicar a origem de células mesenquimais e pode ser o único marcador positivo desses tumores. Além disso, a actina do músculo liso e a desmina são marcadores miogênicos comuns, que muitas vezes servem para representar a diferenciação miofibroblástica. Em contrapartida, um marcador de proteína S-100 positivo seria indicativo de um tumor de bainha neural (Davis, 2022).

### 1.2.2 Estadiamento

Para os SPM, a classificação e o estadiamento é dependente da localização tumoral e foi revisado e atualizada na 8ª edição do Manual de Estadiamento do Câncer do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC).

O tumor é classificado de acordo com o grau histológico (baixo grau: grau 1, moderado e alto grau: graus 2 e 3) e na classificação TNM (T: extensão do tumor primário; N: ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; M: ausência ou presença de metástase à distância) de SPM. Com a análise desses fatores, o tumor é então classificado com o estadiamento, sendo estágio I, II, III e IV, sendo o estágio I o mais baixo e o IV o mais alto. Então, qualquer tumor de tronco e extremidade classificado como qualquer (qq) TN1M0 qq G

é um tumor de estágio IV. Já o tumor retroperitoneal qq TN1M0 qq G é classificado como estágio IIIB (Tanaka & Ozaki, 2019).

Vale destacar que existem hoje diversas entidades que classificam de maneiras diferentes os SPM, bem como outros tipos tumorais. A *Union for International Cancer Control* (UICC) sediada em Genebra na Suíça, *Fédération Nationale des Centers de Lutte Contre Cancer* (FNCLCC) com sede em Paris na França, são instituições que classificam os tumores com alguma modificação ou não em comparação com a AJCC, entidade esta que a Instituição usa para classificar os SPM.

### 1.2.3 Tratamento

A cirurgia com margem oncológica é uma importante estratégia terapêutica em SPM, sendo muitas vezes escolhida como tratamento primário, especialmente em tumores de baixo grau (Aguiar Junior et al., 2009a). A radioterapia, adjuvante ou neoadjuvante, reduz as taxas de recidiva local e é utilizada para os casos de tumores não passíveis de ressecção adequada ou de alto grau. Eventualmente pode haver combinação com radioterapia e quimioterapia antes da cirurgia, entretanto, ainda se debate o valor desse tipo de associação em SPM (Pasquali & Gronchi, 2017). O tratamento com Doxorrubicina, Dacarbazina e Ifosfamida é o mais utilizado e se mostrou com taxa de resposta completa próxima a 20% na doença metastática (Aguiar Junior et al., 2009b). No entanto, seu uso no cenário pré ou pós-operatório ainda é bastante controverso (Spencer et al., 2017).

Embora os tratamentos convencionais como a quimioterapia e radioterapia convencional continuam sendo a principal escolha para tratar muitos SPM, novos estudos vêm se concentrando na terapia-alvo, como a imunoterapia (Demetri et al., 2002).

Sabe-se que, a análise minuciosa da composição genética do tumor tem reflexos para a terapia-alvo. Os tumores estromais gastrointestinais (GIST) são uma classe de Sarcomas que surgem das células gastrointestinais intersticiais de Cajal, que são responsáveis pela contração da musculatura lisa. De maneira geral, os GISTs têm se mostrado resistentes à tratamentos tradicionais como a quimioterapia e radioterapia. Foram encontradas mutações em *KIT* e *PDGFRA*, o que é fundamental para distingui-los de outros sarcomas de origem gastrointestinais, como alguns leiomiossarcomas, por exemplo. Importante destacar que os inibidores de tirosina quinase se mostraram eficazes para GIST baseado nas mutações apresentadas. Imatinib (inibidor de tirosina quinase de c-Kit e PDGFR) é o padrão de tratamento



de primeira linha para GISTs no cenário neoadjuvante, adjuvante e metastático (Hall et al., 2019).

Outros subtipos com mutações definidas são os lipossarcomas bem diferenciados (LPSbd) e os lipossarcomas desdiferenciados (LPSdd) que compartilham mutações genéticas semelhantes, mas fenotipicamente se comportam de maneira muito diferente. O LPSdd, no geral, cresce mais rapidamente, pode invadir e obstruir estruturas e pode responder melhor à quimioterapia. Já o LPSbd o crescimento é mais lento e normalmente não responde à quimioterapia. Tanto o LPSdd quanto o LPSbd frequentemente têm amplificações homólogas de *MDM2*, que codifica uma proteína responsável pela ubiquitinação de p53 que direciona a proteína para degradação via proteassomo. Nutlins são uma classe de drogas que inibem a supressão de p53 mediada por MDM2 (Impicciatore et al., 2010). Alguns estudos mostram que muito embora a inibição de MDM2 possa aumentar os níveis de p53, ela não parece tornar a proteína p53 mais ativa, e terapias combinadas podem ser necessárias (Hall et al., 2019).

A imunoterapia, incluindo os inibidores *checkpoint* imunológico, tornou-se uma estratégia de tratamento nova e excitante para muitos tumores sólidos e tem demonstrado atividade notável em vários cânceres refratários à quimioterapia, induzindo longos períodos de remissão em algumas malignidades. Os inibidores de *checkpoint* imunológico PD-1/PD-L1 e CTLA-4 estão sendo explorados recentemente em sarcomas. A expressão de PD-L1 por imunohistoquímica em 221 sarcomas que mostrou que 57% expressavam PD-L1 e que 54,8% eram positivos para PD-1 (Ayodele & Abdul Razak, 2020), com respostas significativas e duráveis observadas em alguns pacientes, mas as respostas gerais são inferiores a 20%. Biomarcadores de resposta a inibidores de *checkpoint* imunológico no sarcoma continuam sendo uma área de grande interesse (Hall et al., 2019). Porém, essa integração é um desafio uma vez que, a atuação clínica de desses inibidores de checkpoint em SPM é bastante variável e está intimamente ligado ao subtipo histológico, perfil molecular e estratégia de tratamento neo e adjuvante (Italiano et al., 2020; Saerens et al., 2021).

A utilização de inibidores *checkpoint* como agente terapêutico para SPM como dito é desafiadora, dada a raridade e heterogeneidade da doença. Alguns estudos mostram que a resposta terapêutica foi considerável em sarcoma de Kaposi, sarcoma alveolar e sarcoma pleomórfico indiferenciado, embora outros subtipos também se beneficiem (Zhu et al., 2020).

Estudos recentes revelaram características a nível do DNA, onde os sarcomas podem ser de maneira geral categorizados em dois grupos principais: o primeiro contendo os sarcomas com alterações cromossômicas simples e específicas (muitas vezes translocações) além de uma carga mutacional baixa, e o segundo com características de numerosas aberrações no número

de cópias e com cargas mutacionais moderadas. Os subtipos comuns associados à translocação incluem sarcoma sinovial, lipossarcoma mixóide, sarcoma de Ewing, sarcoma alveolar e rabdomyossarcoma alveolar, já os subtipos relacionados ao número de cópias incluem sarcoma pleomórfico indiferenciado, lipossarcoma desdiferenciado, Tumor maligno da bainha do nervo periférico e leiomyossarcoma. As características biológicas desses dois grupos sugeriram um potencial particular para uso de inibidores *checkpoints* por serem mais imunogênicos (Italiano et al., 2020; Zhu et al., 2020).

#### 1.2.4 Caracterização molecular de sarcomas de partes moles

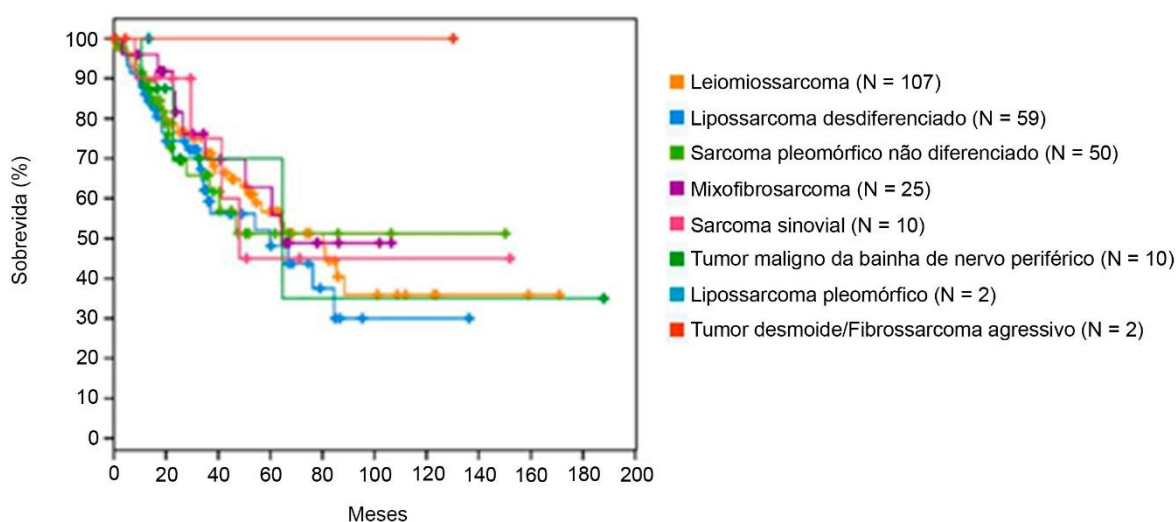
No ano de 2010 o estudo liderado pelo pesquisador Samuel Singer do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) analisou mais de 200 casos de SPM, incluídos nos sete subtipos histológicos mais comuns (mixofibrossarcoma, lipossarcoma pleomórfico, leiomyossarcoma, lipossarcoma desdiferenciado, lipossarcoma mixóide, sarcoma sinovial e GIST) (Barretina et al., 2010a). A análise integrada de genômica e transcriptômica demonstrou alterações moleculares mais frequentes em SPM que traz novas possibilidades para terapias-alvo (Barretina et al., 2010).

O estudo revelou que entre os genes frequentemente alterados estão o *TP53*, *NF1* e *PIK3CA* e também amplificação de *CDK4* (Barretina et al., 2010b). As alterações identificadas em *PIK3CA* e *CDK4* revelam um subconjunto de tumores que podem responder ao tratamento utilizando inibidores de *PI3K* e inibidores de mTOR em sarcomas deficientes em *NF1*, pois sua perda da função promove a ativação da via mTOR (Barretina et al., 2010).

É sabido que a caracterização do perfil de alterações moleculares [expressão gênica (RNA-seq), número de cópias e exoma completo] de mais de mil linhagens tumorais são utilizadas rotineiramente na pesquisa oncológica, a *The Cancer Cell Line Encyclopedia Consortium* (CCLE) (Barretina et al., 2012), liderada por pesquisadores da *Broad Institute* e *Novartis Institutes for Biomedical Research* e o *The Cancer Genome Project - Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* (GDSC) (Garnett et al., 2012), liderada pela *Wellcome Trust Sanger Institute* e *Massachusetts General Hospital*. Ambas as iniciativas além de realizar o sequenciamento completo das linhagens também realizaram análises *high-throughput* com centenas de drogas com o intuito de definir o perfil de sensibilidade e resistência das linhagens tumorais (Barretina et al., 2012; Haibe-Kains et al., 2013). Assim como o TCGA, os dados de sequenciamento estão acessíveis ao público e, portanto, disponíveis para análise.

O consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) conduziu um estudo semelhante (Abeshouse et al., 2017b). As principais alterações identificadas no estudo do *Memorial* foram encontradas também, como as alterações em *TP53*, *CDK4*, *NF1* e *PIK3CA* (Abeshouse et al., 2017). Ambos os estudos abrem inúmeras possibilidades de busca por novos alvos terapêuticos, uma vez que os dados estão abertos e disponíveis para a comunidade científica.

Nesse aspecto, o portal CBioportal (<http://www.cbioportal.org/>) permite que os dados desses consórcios (e de outros tipos tumorais) sejam facilmente visualizados. Por exemplo, a **Figura 2** apresenta a sobrevida dos pacientes portadores de SPM utilizados no estudo do TCGA.



**Fonte:** The Cancer Genome Atlas, gráfico adaptado do CBioportal (<http://www.cbioportal.org/>).

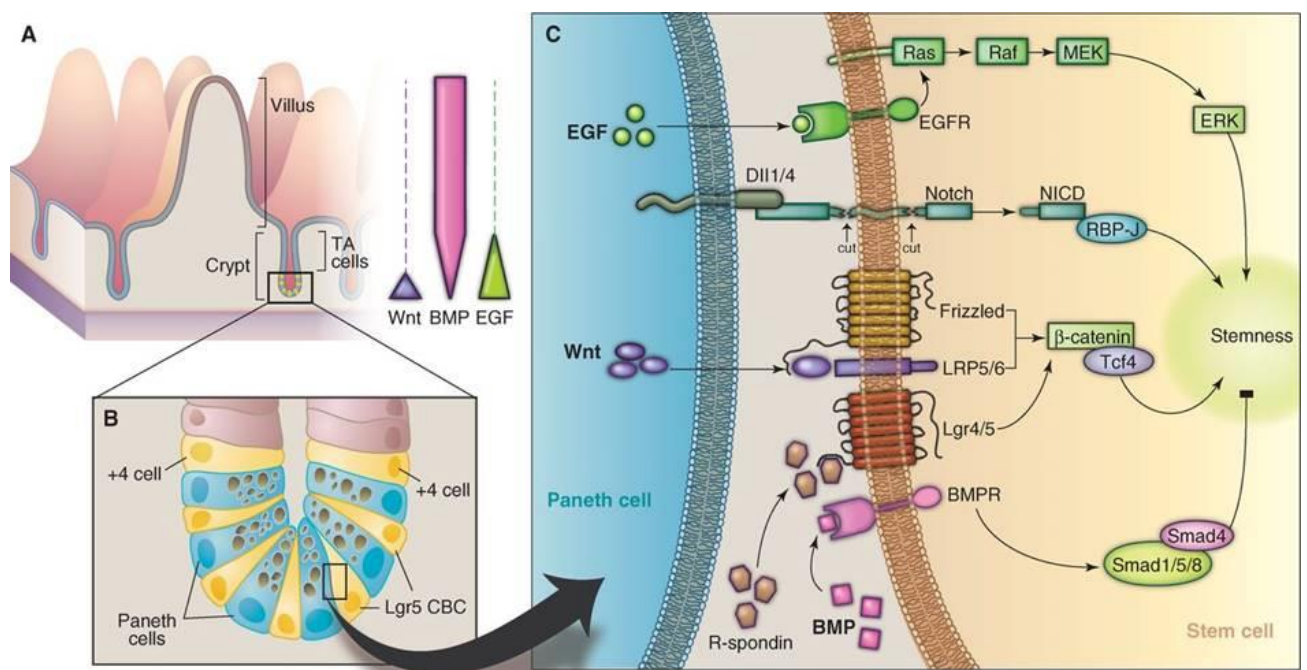
**Figura 2** - Sobrevida global de pacientes portadores de sarcomas de partes moles.

### 1.2.5 O papel do receptor Lgr5 na biologia de células mesenquimais

Os receptores acoplados à proteína G são uma classe importante de proteínas de membrana que transmitem sinais extracelulares através de hormônios, neurotransmissores, citocinas, entre outros (Hutchings et al., 2017). A disfunção desses receptores está associada a muitas doenças, e alvos de grande interesse para pesquisa e a indústria farmacêutica (Hutchings et al., 2017).

Um membro desta classe é a família de receptores Lgr (*Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor*) (de Lau et al., 2014). Os Lgr são subdivididos em 6 membros, onde se destaca o Lgr5, um marcador de células-tronco das criptas intestinais e glândulas mamárias

(de Lau et al., 2014). O Lgr5 também atua como um modulador negativo da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. Esta via é uma das mais importantes na biologia de sarcomas, inúmeras alterações moleculares em componentes desta via estão frequentemente associadas aos mecanismos de sarcogênese (Carmon et al., 2017; de Lau et al., 2014). As proteínas denominadas *R-spondins* são ligantes de alta afinidade de Lgr5 e também são capazes de modular a via de Wnt (Kumar et al., 2014). A **Figura 3** ilustra o papel do receptor Lgr5 na biologia de células epiteliais intestinais.



**Legenda:** (Sato & Clevers, 2013). **A)** Esquema da estrutura epitelial intestinal com a presença de células-tronco. Gradientes de concentração de Wnt, BMP e EGF são formados ao longo do eixo da cripta intestinal. **B)** Esquema do nicho de células-tronco intestinais. As células colunares da base da cripta (CBC) são Lgr5+ e estão intimamente associadas às células de Paneth que fornecem os sinais para a manutenção do estado de *stemness*. **C)** Três sinais (EGF, Notch e Wnt) são essenciais para a manutenção do potencial das células Lgr5+, enquanto BMP regula negativamente estes sinais. Para a ativação completa da via de Wnt são necessários estímulos oriundos da sinalização de R-Spondina e os receptores Lgr4/5.

**Figura 3** - Localização histológica de células-tronco do epitélio intestinal.

O estudo do papel do receptor Lgr5 impactou sobremaneira o desenvolvimento de modelos celulares em carcinoma colorretal e propiciou um grande salto na compreensão dos mecanismos associados à carcinogênese intestinal (Barker et al., 2010; de Lau et al., 2014; Sato & Clevers, 2013).

Lgr5 é o marcador de células-tronco mais amplamente reconhecido, incluindo língua, estômago, pâncreas, fígado, intestino grosso rim, glândula mamária e endométrio, sendo considerado como um potencial marcador universal de células-tronco do epitélio (Clevers, 2011; Yang et al., 2015).

O Lgr5 é regulado positivamente em uma fração substancial de tumores sólidos, encontrando-se expresso em câncer de ovário, fígado e pulmão. Um estudo demonstrou que o Lgr5 marca uma população de células-tronco localizadas na base das glândulas do epitélio gástrico e essas células também podem iniciar a tumorigênese gástrica (Leushacke et al., 2017; Phesse & Sansom, 2017).

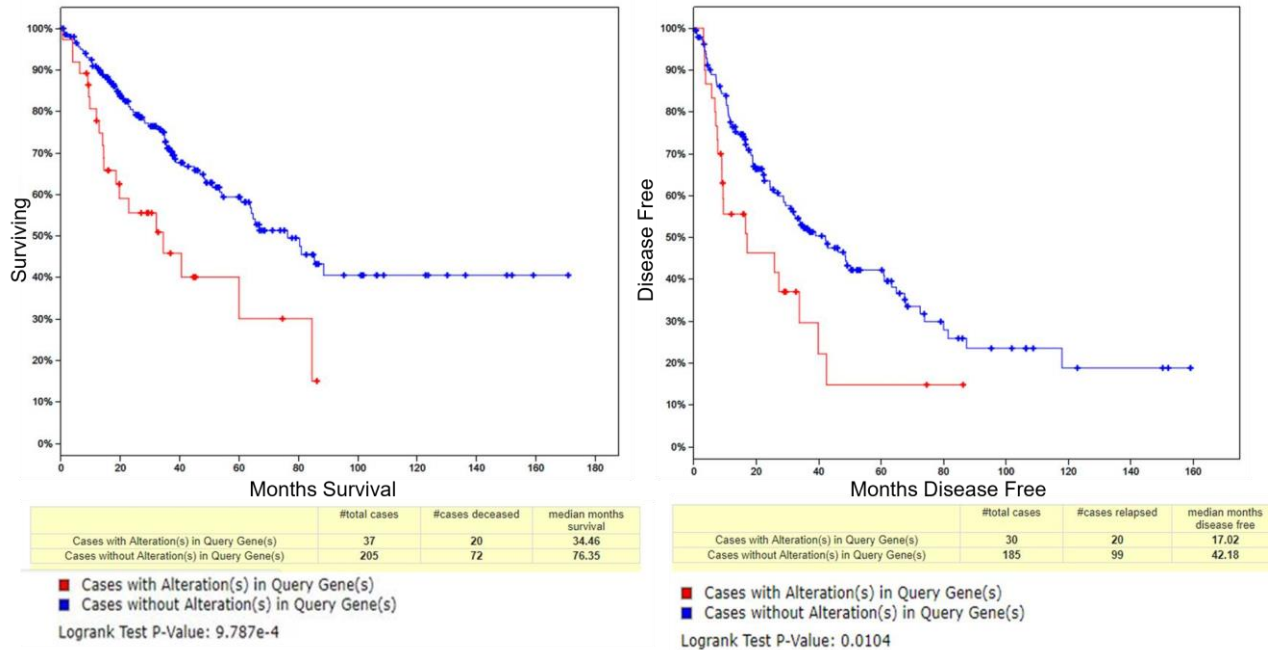
A função de Lgr5 em células tumorais parece ser dependente do tipo de tumor, com atividade semelhante ao supressor de tumor em células de câncer de cólon e fígado e atividade promotora destes em outros tipos de células de cancerígenas (Carmon et al., 2017; Fujii & Sato, 2017; Phesse & Sansom, 2017). A superexpressão de Lgr5 também foi detectada no câncer de mama, sendo associada com a promoção da mobilidade celular, formação de tumores e transição epitélio-mesênquima, através da ativação da via Wnt /  $\beta$ -catenina (Trejo et al., 2017; Yang et al., 2015).

Além disso, um estudo mostrou que células Lgr5+ possuem um potencial regenerativo de células miogênicas para o tratamento de doenças musculares degenerativas, além de evidenciarem a formação de sarcomas a partir dessas células (Kumar et al., 2014).

Poucos estudos ainda investigam a função de Lgr5 em sarcomas, com destaque a um tipo de sarcoma ósseo, os Sarcomas de Ewing (Pedersen et al., 2016; Scannell et al., 2013). No que se refere ao SPM foi conduzido um estudo onde foi avaliado o perfil de expressão de Lgr5 e foi verificado que a baixa expressão da variante denominada GPR49 $\Delta$ 5 está correlacionada a um pior prognóstico (Rot et al., 2011).

Contudo, uma análise dos dados gerados nos dois grandes estudos conduzidos pelo Memorial e pelo TCGA realizada no CBioportal indica que alterações em Lgr5 são relevantes para SPM. A expressão de Lgr5 indica uma alta prevalência de amplificação (*Copy number alteration*) e superexpressão de mRNA em ambos os grupos, onde foi verificado aumento de expressão em 15% e 25% dos casos, respectivamente.

Os dados do TCGA (Abeshouse et al., 2017a) também permitem que sejam calculadas as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença. Em ambas as análises é possível identificar uma diminuição significativa da sobrevida em pacientes que apresentam amplificação de Lgr5 (**Figura 4**).



**Legenda:** **A)** Comparação de sobrevida global entre pacientes portadores de SPM com alteração em Lgr5 (curva vermelha) e sem alteração (curva azul). **B)** Comparação de tempo livre de doença entre pacientes portadores de SPM com alteração em Lgr5 (curva vermelha) e sem alteração (curva azul).

**Fonte:** Dados obtidos do estudo conduzido pelo TCGA (Fletcher, 2017) e processados pelo CBioportal. Análise estatística pelo teste Logrank.

**Figura 4 - Análise de sobrevida por Kaplan-Meier.**

Esses resultados destacam a importância de Lgr5, em SPM e sugerem que seu papel não se restringe somente às células-tronco tumorais de neoplasias do sistema gastrointestinal, mas também em tumores de origem mesenquimal.

### 1.2.6 Integração de dados genômicos com modelos pré-clínicos

Uma característica importante sobre o estudo de sarcomas é a utilização de metodologias que permitam o desenvolvimento da pesquisa translacional e que, consequentemente, trazem benefícios clínicos com maior eficácia e velocidade, especialmente para pacientes com subtipos mais raros de SPM (Hoffmann, 2014). A heterogeneidade das células tumorais traz a necessidade de busca por novas terapias individualizadas, além da necessidade de desenvolvimento de modelos pré-clínicos que melhor representem a heterogeneidade tumoral (Day et al., 2015). Entre as tecnologias que tem se destacado encontram-se aquelas que são derivadas do material tumoral do paciente, como os xenoinxertos e os organoides.

### 1.2.7 Patient derived xenografts (PDX) - Uma abordagem para a medicina personalizada

Modelos animais para estudos de tumores são essenciais para desenvolver novas estratégias para o tratamento da doença, entre eles destacam-se os camundongos geneticamente modificados e xenoenxertos (Siolas & Hannon, 2013). Apesar da contribuição fundamental que os camundongos geneticamente modificados têm trazido para a compreensão da carcinogênese devido a uma grande heterogeneidade encontrada nos tumores humanos que não se reproduz nesses modelos (Gandara et al., 2015). Por outro lado, a disponibilidade de novas linhagens de camundongos imunodeficientes, como *NOD scid gamma* (NSG), fortaleceu os modelos de xenotransplantes por aumentarem a eficiência de enxertia de células humanas (Shultz et al., 2005). Isso permite explorar a individualidade e heterogeneidade de tumores dos pacientes e estudar suas características únicas, até mesmo as incertezas relacionadas a progressão tumoral (Aparicio et al., 2015a). A técnica é bastante simples e baseia-se na enxertia de um fragmento tumoral (fresco ou criopreservado) em camundongos imunodeficientes (Roque-Lima et al., 2019). Os tumores que se desenvolvem como PDX preservam a heterogeneidade genética dos tumores humanos e são bons preditores de resposta à terapia (Byrne et al., 2017). O uso deste modelo, porém, torna-se limitado caso os tumores sejam propagados por muitas passagens em camundongos (Ben-David et al., 2017). Portanto, os PDX emergem como uma plataforma promissora para a oncologia personalizada, com o potencial de identificar, em tempo real, a melhor droga para o tratamento de pacientes (Garralda et al., 2014; Picco et al., 2017). Vale destacar que o *National Cancer Institute* determinou que o painel de linhagens celulares conhecidos como NCI-60, utilizado durante décadas como plataforma de teste de novas drogas, será substituído por um repositório composto de PDX e culturas derivadas (Ledford, 2016). Outras iniciativas formadas ao redor do mundo estão criando Bancos de PDX, como o EurOPDX, um consórcio que reúne dezesseis instituições europeias com mais de 1500 PDX (Ledford, 2016); o Jackson Laboratoriais, Dana-Farber Cancer Institute (Townsend et al., 2016) e indústrias farmacêuticas, como a Novartis (Gao et al., 2015). Recentemente, o *National Institutes of Health* anunciou o *Precision Medicine Initiative* (PMI) que irá investir 142 milhões de dólares para criar na *Mayo Clinic* o maior biobanco do mundo. Em conjunto, esses dados nos encorajam a ser protagonistas neste campo no Brasil e América Latina através do estabelecimento do primeiro biorrepositório de PDX no Brasil.

Um estudo demonstrou que PDX de sarcomas apresentam um índice de “pega” de 76% dos casos implantados deram origem a xenoenxertos e com alta taxa de correlação (81%) entre

o perfil de resposta dos PDX com a resposta terapêutica observada nos pacientes (Stebbing et al., 2014). A integração entre achados genômicos com PDX para identificação de alvos terapêuticos também tem sido amplamente estudado, como em um caso raro de sarcoma pediátrico onde foi identificado que inibidores de CDK4/6 e XPO1 podem ser utilizados para o tratamento deste tipo particular de tumor (Haibe-Kains et al., 2013). Estratégia semelhante foi realizada em rhabdomyosarcoma alveolar, onde foi observado que esse tipo de tumor apresenta alterações da via de mal-dobramento de proteínas (*unfolded protein response*) que pode ser tratado com inibidores de HSP90 e WEE1 (Stewart et al., 2018). Proteínas associadas à biologia de células-tronco, como ALDH1 e LOX também foram identificadas como moduladoras de tumores rhabdóides malignos, um sarcoma pediátrico raro (Golan et al., 2018).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi explorar a expressão da proteína Lgr5 em um Registro Institucional de Sarcomas e criar uma plataforma de experimentação baseada em *patient-derived xenografts* (PDX) para estudo da biologia tumoral de sarcomas de partes moles.

### 2.2 Objetivos específicos

#### 1. Criação do Registro Institucional de Sarcomas de Partes Moles.

- a. Criação e estruturação do registro de dados clínicos de pacientes atendidos na instituição com diagnóstico de sarcoma através da criação de registro de dados retrospectivo e prospectivo, de caráter institucional, para que seja disponibilizado aos pesquisadores do A.C. Camargo Cancer e utilizado em pesquisas relacionadas ao tema.
- b. Confecção de *Tissue microarrays* (TMA) com amostras tumorais oriundas de pacientes do Registro Institucional e de uma coorte prospectiva das quais foram gerados *patient-derived xenografts*. Os TMAs foram utilizados para caracterização por imuno-histoquímica.

#### 2. Criação da plataforma de estudos pré-clínicos baseadas em *patient-derived xenografts*.

A partir de amostras tumorais frescas oriundas de peça cirúrgica de pacientes operados no A.C. Camargo Cancer Center.

#### 3. Realização de imuno-histoquímica para Lgr5 em *Tissue Microarrays* de sarcomas de partes moles de alto grau.

Avaliou-se todos os subtipos histológicos adicionados no Registro Institucional de Sarcomas de partes moles e na coorte prospectiva do objetivo 2.

#### 4. Realização de estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial terapêutico de Lgr5 em sarcomas de partes moles

- a. Investigar o efeito de perda e ganho de função de Lgr5 (superexpressão) em relação a proliferação, migração, invasão e capacidade de formação de metástases.

- b. Os estudos *in vivo* em camundongos imunodeficientes *nudes* para as linhagens celulares comerciais.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Casuística

Para esse estudo, foi estabelecida duas coortes de estudo, uma retrospectiva oriunda do Registro Institucional de Sarcomas e uma prospectiva, onde foram convidados pacientes que receberam o diagnóstico de sarcomas de partes moles e que foram operados na Instituição para que a partir de fragmentos tumorais oriundos das cirurgias dos pacientes fosse possível a geração de uma plataforma de *Patient-derived xenografts (PDX)*.

##### 3.1.1 Registro Institucional de Sarcomas de partes moles (RISPM)

A estratégia para elaboração do registro retrospectivo foi baseada na busca dos dados demográficos clínicos, epidemiológicos e dados relacionados ao tratamento dos pacientes atendidos na instituição desde a sua inauguração (1953), através da pesquisa de prontuários físicos digitalizados e prontuário eletrônico.

Para a identificação dos pacientes tratados na instituição, foi realizada uma busca dos seguintes unitermos: sarcoma; CID-10 C49; CID-10 C41; como se trata de registro amplo e institucional, selecionamos pacientes atendidos de todas as idades, com todos os subtipos e graus histológicos, todas as topografias, com ou sem tratamento (cirurgia, quimioterapia e radioterapia) e que operaram no hospital, sendo excluídos os pacientes que realizaram apenas revisão de lâminas ou que foram avaliados como consulta única.

Considerando o elevado número de casos de sarcomas atendidos no hospital, esta iniciativa foi iniciada com os dados anatomopatológicos do banco elaborado pela Dra. Isabela Werneck da Cunha do Departamento de Anatomia Patológica, que foi estimado em aproximadamente 2 mil casos, ao qual passou por revisão histológica e foi usado como ponto de partida para a seleção dos primeiros casos a serem adicionados no Registro ao qual foi constituído segundo aprovação do CEP n° 2488/18 (**Anexo 1**).

O Registro foi elaborado na plataforma online e gratuita *Research Electronic Data Capture (REDCap)*, disponível no endereço <http://project-redcap.org/>) dentro das políticas da Instituição com autorização do Comitê de ética. O *REDCap* permite o armazenamento de dados de forma segura, em domínio institucional com os dados criptografados e protegidos por senha e permite o acesso aos dados apenas por pessoas autorizadas pelo guardião que é a própria Instituição e pelo responsável descrito pelo Comitê de ética.

As variáveis definidas para construção do registro retrospectivo estão descritas no **Adendo 1**.

A estruturação do registro foi coordenada pela equipe responsável pelo presente projeto, ficando sob responsabilidade da enfermeira de pesquisa do núcleo de tumores colorretais e sarcomas a criação do registro de dados na plataforma escolhida, bem como suporte de treinamento a alunos vinculados a projetos relacionados à temática, de forma a garantir que todos os responsáveis pela coleta de dados sejam autorizados pela equipe para esta função e capazes de garantir a confiabilidade das informações registradas.

No que se refere ao Registro Prospectivo, foi criado um registro de dados na mesma plataforma REDCap com acesso aos dados apenas a pessoas autorizadas, contendo as mesmas características de segurança descritas acima. A perspectiva é de que este projeto, bem como os registros gerados, continue sendo alimentado. As variáveis definidas para construção do registro prospectivo estão descritas no **Adendo 2**.

O compartilhamento dos dados, tanto do registro retrospectivo como do prospectivo, com demais membros da instituição poderão ser viabilizados mediante solicitação formal e avaliação pela equipe responsável pelo registro, com a intenção de garantir a segurança dos dados, utilização exclusiva para projetos de pesquisa e será realizada de forma a preservar a identidade dos pacientes.

### 3.1.2 Coorte prospectiva

Para este estudo, foram convidados 70 pacientes com sarcomas de partes moles de vários subtipos histológicos mediante autorização através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número 2498/18 (Anexo 2). As amostras eram oriundas de peças cirúrgicas (em um caso foi coletado biópsia) para derivar culturas primárias e para estabelecimento de tumores (xenoinxertos) em animais imunodeficientes. As regiões tumorais foram identificadas na peça cirúrgica e de forma estéril por um patologista, encarregado de identificar fragmentos representativos do tumor. As amostras foram acondicionadas em tubos estéreis contendo meio de cultura (DMEM High + 20% soro fetal bovino (SFB)), transportadas resfriadas até a chegada no laboratório para que parte seja inoculada nos animais e a outra congelada.

Critérios de inclusão: pacientes com diagnóstico de qualquer subtipo histológico de SPM, submetidos ou não a tratamento prévio.

Critérios de exclusão: pacientes que apresentavam lesões benignas ao diagnóstico.

Conforme descrito anteriormente, a criação da plataforma foi iniciada com as coletas de fragmentos tumorais oriundos de peça cirúrgica. Foi necessário o estabelecimento de um fluxo de atividades que envolveu inúmeros profissionais, cirurgiões, oncologistas, patologistas, enfermeiras de pesquisa, corpo técnico do centro cirúrgico, pesquisadores e alunos. Os casos eram apresentados pelos médicos que identificavam os pacientes, os pesquisadores e alunos avaliavam a elegibilidade, as enfermeiras de pesquisa se encarregavam de convidar os pacientes e providenciavam a assinatura do TCLE. A equipe ficava preparada para que, no dia da cirurgia, houvesse meio de coleta, os técnicos do centro cirúrgico eram avisados e, após o encaminhamento da peça cirúrgica, o patologista de plantão separava um fragmento do tumor e acondicionava em um tubo com meio de coleta gelado. A retirada do tubo com a amostra era feita pelos responsáveis pelo projeto e, imediatamente, era encaminhado para o biotério do CIPE onde o fragmento era implantado no camundongo.

O **Adendo 3** mostra a relação de subtipos de tumores coletados, período do curso do projeto, bem como, informações de cada caso clínico.

### 3.2 Confeção de Tissue Microarray (TMA)

A confecção dos TMAs do Registro Institucional foi realizada após a inserção dos casos na plataforma REDCap e após revisão dos blocos e lâminas de HE (hematoxilina e eosina) por um patologista (Dr. Felipe D’Almeida Costa). Para isso, contamos com a colaboração da equipe de histologia através do Core facility da Instituição.

Para o Registro Institucional de sarcomas de partes moles foram confeccionados 2 TMAs, contendo 71 e 80 casos (cada amostra adicionada foi realizada uma duplicata) com diversos subtipos para analisar o perfil de expressão de Lgr5. Para a confecção desse TMA, foram selecionados os pacientes que já haviam sido adicionados no RIRSPM, previamente selecionados a partir das 8 histologias mais comuns, como já dito anteriormente. Com isso foi iniciado a busca pelo material (blocos e lâminas) dos pacientes no arquivo mantido pela Instituição. Como essa busca foi bastante trabalhosa, decidimos iniciarmos a montagem e confecção do TMA.

A partir do registro, foi iniciada uma busca pelo material (blocos anatomopatológicos e lâminas) de cada paciente no arquivo que a Instituição mantém, porém mesmo com um trabalho intenso não foi possível localizar todos os casos já adicionados ao registro, pois tivemos situações em que o material foi retirado pelos próprios pacientes ou blocos que não foram localizados no arquivo.

Uma vez reunidos, o material foi submetido a uma reavaliação pelo patologista responsável. Alguns casos mais antigos foram reclassificados e o TMA foi confeccionado. A lista com todos os casos está presente no **Adendo 4**.

Já para o Registro Prospectivo, foram confeccionados 2 TMAs, sendo um para as amostras clínicas dos pacientes e outro para os respectivos PDX. Cada TMA consta 33 amostras de pacientes e PDX de diferentes subtipos histológicos feitos também em duplicatas.

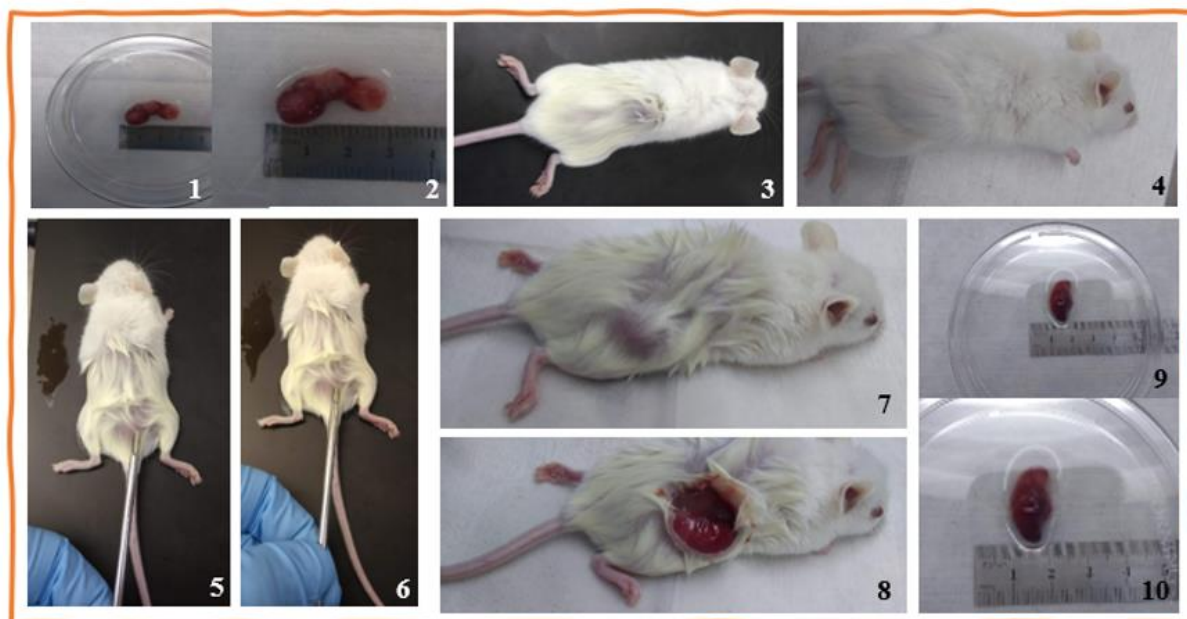
### 3.3 Animais

Para os estudos *in vivo* foram utilizados dois tipos de animais imunodeficientes, os NSG e os camundongos atímicos *nudes*. Os animais NSG foram utilizados para os experimentos de PDX e os *nudes* para os experimentos de inoculação das linhagens comerciais.

Foram usados NSGs machos e fêmeas com idade entre 6 a 12 semanas. Os animais foram mantidos em biotério SPF (*Specific Pathogen Free*), onde os animais são livres de patógenos específicos, para os quais são periodicamente testados. Os camundongos foram mantidos em microisoladores à temperatura controlada de 22° C e sob ciclo de luz de 12 horas, tratados com água autoclavada e ração irradiada *ad libitum*. A manipulação dos animais respeitou o manual de boas práticas científicas em uso de animais indicada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimental Animal (CONCEA). O projeto foi avaliado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) – processo número 082/18 para os animais NSG (**Anexo 4**) e o processo número 080/18 para os animais Nudes (**Anexo 3**).

### 3.4 Inoculação de tumores e PDX

Os fragmentos tumorais (medindo entre 1 - 3 mm) obtidos de pacientes (biópsia ou cirurgia) foram implantados subcutaneamente com auxílio de uma cânula (*cancer implant needles* 11G (Cadence Science)) em animais NSG previamente anestesiados. Foram implantados 5 a 7 fragmentos por animal. O material tumoral que deu origem ao PDX também foi utilizado para estabelecimentos de culturas primárias.



**Figura 5** – Fotos demonstrando as etapas da geração do PDX.

A inoculação de células tumorais dissociadas (comerciais ou culturas primárias) foi realizada com a administração de  $1 \times 10^6$  células em 200  $\mu$ L de PBS estéril subcutaneamente no flanco esquerdo de camundongos.

Todos os procedimentos que envolveram animais foram submetidos à apreciação do CEUA da instituição e aprovado sob o protocolo nº 082/18 (**Anexo 4**).

### 3.5 Culturas primárias

As amostras de tecido tumoral foram fragmentadas e parte delas foram utilizadas para transplantes e outra parte destinada à derivação de culturas celulares. Os fragmentos tumorais foram mecanicamente dissociados com auxílio de um bisturi seguido de homogeneização hidromecânica. O homogenato foi então submetido à digestão enzimática em colagenase e tripsina (1:1) entre 30 min à 2h a 37° C sob agitação. A atividade enzimática foi finalizada com a adição de 20% de soro fetal bovino, as células filtradas em *cell strainer* 100  $\mu$ m e plaqueadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi monitorado e as células foram repicadas quando atingiram 70-80% de confluência. Estoques das células foram criopreservados e mantidos em nitrogênio líquido.

### 3.6 Linhagens celulares

Foi adquirido o painel de linhagens de sarcoma de partes moles da ATCC (*Soft-Tissue Sarcoma Cell Panel* (ATCC® TCP-1019™). Esse painel é constituído de seis linhagens com capacidade tumorigênica e de diferentes subtipos de SPM, são elas: SW684 (fibrossarcoma, HTB-91), HT-1080 (fibrossarcoma, CCL-121), SW982 (sarcoma sinovial, HTB-93), RD (rabdomiossarcoma, CCL-136), GCT (Giant cell tumor) - histiocitoma fibroso maligno, TIB-223) e SW872 (lipossarcoma, HTB-92). As linhagens foram mantidas de acordo com a recomendação da ATCC e estoques foram mantidos criopreservados em nitrogênio líquido. Todos os procedimentos que envolvam animais foram submetidos à apreciação do CEUA da instituição e aprovado sob o protocolo nº 080/18 (**Anexo 3**).

### 3.7 Organoides derivados de pacientes – PDO

As amostras de tecido tumoral (cirurgia ou biópsia) foram fragmentadas e parte delas foi utilizada para transplantes e outra parte destinada à derivação de organoides. Os fragmentos tumorais foram mecanicamente dissociados com auxílio de um bisturi seguido de homogeneização hidromecânica. O homogenato foi então submetido à digestão enzimática em colagenase/tripsina (1:1) entre 30 min à 2h a 37° C sob agitação. A atividade enzimática foi finalizada com a adição de 20% de soro fetal bovino, as células foram filtradas em *cell strainer* 100 µm e submetidas à levitação magnética com o sistema Nano 3D (*Greiner Bio-one*). As células em suspensão foram magnetizadas com *nanoshuttle* (partículas constituídas de Poli-L-lisina com óxido de ferro) que aderem às células e através de magnetos evitam a adesão celular e privilegia a adesão célula-célula. O conjunto formado pelas células e *nanoshuttle* foram cultivados em placas de 24 poços de baixa adesão por até sete dias ou até observação da formação das estruturas 3D em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Uma vez formados, os organoides podem ser enzimaticamente dissociados e replaqueados para propagação e experimentação.

### 3.8 Transfecção com Lentivírus

Células HT1080 foram plaqueadas (1.000 por poço) em meio de cultura DMEM HIGH+20% de SFB, as células foram mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após cerca de 1 dia, com as células atingindo uma confluência de 40/50% foi adicionado o lentivírus Lgr5 LH848602, Vetor: pLenti-SV40-Puro-CMV; Promotor: CMV; Tag: FLAG, Myc; Vigene (Amsbio) (25µL) por poço. Após o período de infecção, as células foram mantidas em estufa



até que se recuperassem do processo e após aproximadamente 4 dias, foi adicionada Puromicina (0,2 $\mu$ g) já previamente testada e estabelecida para o processo de seleção somente das células que foram infectadas com o lentivírus Lgr5.

A escolha da linhagem HT1080 foi devido a literatura já mostrar que é uma célula que expressa pouco a proteína Lgr5. A superexpressão de Lgr5 nessa linhagem possibilitou a análise *in vivo* e *in vitro* do papel dessa proteína nos SPM.

### 3.9 Citometria de fluxo

As células foram cultivadas em placas P100, lavadas 2x com solução *Phosphate-buffered Saline* (PBS) e Etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e removidas da placa por digestão enzimática com tripsina 0,25% por 1 min a 37°C. A reação enzimática foi interrompida com a adição de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino. As células foram ressuspensas e mantidas a 37°C por 30 min para recuperação de membrana. As células foram lavadas 2x com PBS e incubadas com anticorpo anti-Lgr5 diluído em solução PBS com 1% de BSA por 1h a 4°C. A reação foi finalizada com adição de PBS com 1% de BSA, as células centrifugadas e ressuspensas em solução contendo anticorpo secundário anti-rabbit conjugado a AlexaFluor 488. As células foram analisadas no citômetro BD FACSCanto II pela *core facility* do Centro de Excelência em Citometria de Fluxo Avançada do A.C. Camargo Cancer Center.

### 3.10 Cell sorting

As células foram cultivadas, ressuspensas e dissociadas por digestão enzimática com tripsina 0,25% por 1 min a 37°C. A reação enzimática foi interrompida com a adição de meio de cultura com 20% de SFB. Ressuspensas e mantidas em tubos cônicos a 37°C por 30 min para recuperação de membrana. Após essa etapa, foram lavadas 2x com PBS e incubadas com anticorpo anti-Lgr5 diluído em solução PBS com 1% de BSA por 1h a 4°C. A reação foi finalizada com adição de 10x volume de PBS com 1% de BSA e o homogenato centrifugado e ressuspensado em solução contendo anticorpo secundário anti-mouse conjugado a AlexaFluor 488. As células foram analisadas e a população positiva foi separada da população negativa no citômetro BD FACSDiva 8.0.2 pela *core facility* do Centro de Excelência em Citometria de Fluxo Avançada do A.C. Camargo Cancer Center.

### 3.11 Imunofluorescência

Para a imunofluorescência foram preparadas lâminas contendo lamínulas em sua base para que as células adicionadas aderissem a esta lamínula sob armazenamento e cultivo em estufa CO<sub>2</sub> 5%, 37 °C. Foram utilizadas nos experimentos células (linhagens de sarcomas da ATCC) com seus respectivos meios de cultura. Após as lamínulas adquirirem sua confluência aproximada de 90%, as placas foram fixadas em PFA 4% por 20 minutos. Após este tempo são lavadas com PBS 1X por 3 vezes. Os anticorpos nesta etapa são preparados de acordo com o descrito a seguir: anticorpo primário (LGR5 (1:500); actina músculo liso (1:100); S-100 (1:500); Citoceratina 18 (1:100) em PBS + BSA 1%. Os anticorpos secundários preparados: *anti-mouse* (1:700) e o *anti-rabbit* (1:1000) em solução de PBS + BSA 1%. Após incubação dos anticorpos primários (*overnight*) e os anticorpos secundários (1 hora), as imagens das lamínulas analisadas em microscópio confocal.

### 3.12 Western blotting

Após as células atingirem confluência de 90%, foi adicionado o tampão de lise (RIPA Buffer (200 µL de Buffer)) com inibidor de fosfatase (50 µL) e inibidor de protease (50 µL). A solução foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante coletado em eppendorf. Quantificação com Bradford (1:5 em H<sub>2</sub>O Milli Q) e a Curva com BSA 1mg/mL (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/mL). O bloqueio foi realizado com solução de leite a 5%, incubando *overnight* em câmara fria sob agitação. Após as lavagens com *Tris Buffered Saline with Tween 20* (TBS T) 1,5% a membrana foi incubada com uma solução contendo anticorpo primário (Lgr5 1:1000) em BSA 5% (*overnight*) em câmara fria sob agitação com posterior lavagens com TBS T 1,5%. Em seguida, foi adicionado anticorpo secundário (1:2500 em leite 5% por 1 hora sob agitação. A revelação foi realizada com Kit Millipore (Peroxido + Luminol (1:1) *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate*).

### 3.13 Imunohistoquímica

Para padronizar os ensaios de imunohistoquímica para determinar o perfil de expressão de Lgr5 em sarcomas de partes moles, foram utilizados anticorpos contra essa proteína que estão descritos na **Tabela 1** com suas diluições.

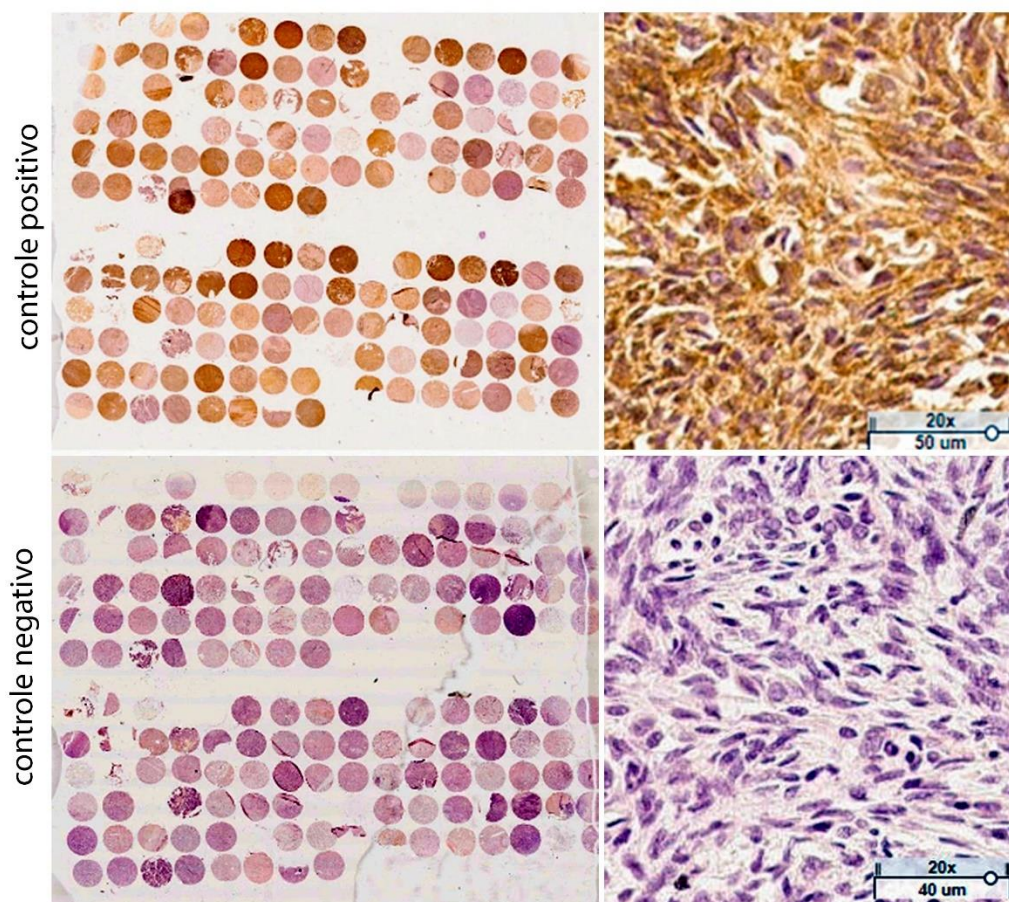
**Tabela 1 - Anticorpos Lgr5 utilizados.**

<b>Anticorpo Anti-Lgr5 para Imunohistoquímica</b>			
<i>Fabricante</i>	<i>Descrição</i>	<i>Catálogo n°</i>	<i>Diluição</i>
<b>Sigma-Aldrich</b>	Anti-Lgr5 policlonal produzido em rabbit	HPA012530	1:500
<b>ThermoFisher</b>	Anti-Lgr5 monoclonal produzido em mouse	MA5-25644	1:100

A padronização foi supervisionada pelo patologista da Instituição, profissional experiente em sarcomas e que contribuiu para que uma melhor condição fosse escolhida (anticorpo ThermoFisher em uma concentração 1:100).

A escolha da técnica de avaliação da marcação foi o H-Score, baseado em porcentagem de células nucleares positivas  $\times$  intensidade de coloração. O Histoscore (H-score) foi calculado por uma avaliação semiquantitativa da intensidade da coloração (graduada como: 0 - sem coloração; 1 - fraca; 2 - mediana; ou 3 - forte) e a porcentagem de células positivas (0 a 100). O intervalo de pontuações possíveis foi de 0 a 300.

Iniciamos a desparafinização da lâmina com o tecido tumoral. Onde as lâminas passaram em 3 banhos de 5 minutos cada, em xilol. Após isso, foram 4 banhos rápidos em álcool absoluto e em seguida, 5 minutos em água corrente. A segunda etapa consiste em realizar a recuperação antigênica, utilizando o Citrato em pH:6,0. No recipiente para banho-maria a uma temperatura de 96 °C, incubamos as lâminas em Citrato já em banho-maria, onde foi incubado por 40 minutos. Após isso, realizado o bloqueio de proteínas. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (água oxigenada) vol.10 por cinco minutos, realizando a mesma etapa por 3 vezes. Após isso, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. A etapa seguinte consiste no bloqueio de proteínas inespecíficas, utilizando um bloqueador da Dako – *Protein Block Serum-free*. Após essa etapa, as lâminas contendo as amostras foram incubadas com anticorpo primário usando um diluente da Dako (Antibody diluente with Background Reducing Components ou com BSA 1%. As lâminas também foram incubadas com anticorpo secundário, utilizando o Envision G/2 System/ AP rabbit / mouse (Dako). A próxima etapa consistiu na coloração das lâminas com DAB por aproximadamente 05 a 15 minutos. As lâminas coradas com hematoxilina por aproximadamente 2 a 4 minutos e em seguida, o diferenciador composto por álcool 50%/ ácido clorídrico (500mL de álcool 50% e 27 gotas de ácido clorídrico). E por fim, a montagem das lâminas previamente submetidas a desidratação: 4 banhos de álcool absoluto; 1 banho de álcool absoluto + xilol; 3 banhos em xilol 100% e após, a leitura em microscópio.



**Legenda:** Controle positivo marcado com Lgr5 mostrando a heterogeneidade de expressão da proteína em diferentes subtipos histológicos. Controle negativo: condição em que não foi incubado o anticorpo primário.

**Figura 6 -** Heterogeneidade de Expressão de Lgr5 em pacientes com SPM.

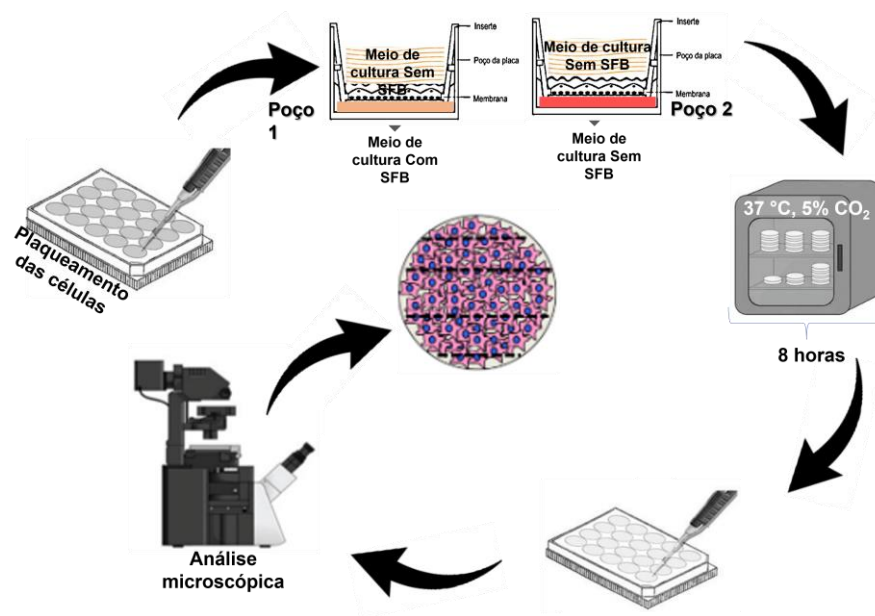
### 3.14 Ensaio de Proliferação com BrdU.

Para as células usadas neste trabalho (HT1080, RD, GCT, SW684, SW872 e SW982), foram incubadas em cada poço 3 mil células. O tempo de incubação foi de 24 horas. Após 24 horas, retiramos o meio de cultura com SFB e adicionamos em todos os poços meio de cultura sem SFB. As células foram incubadas por mais 24 horas. Após esse tempo, foi adicionado SFB, passando a ter uma concentração de 1% SFB e acrescido em alguns grupos RSPO1 10ng/mL e 100ng/mL, respectivamente e foram incubados por 20 horas. Em seguida, adicionamos o BrdU 10X do kit (BrdU Cell Proliferation Assay Kit #6813; *Cell Signaling*). O tempo de incubação foi de 3 horas em estufa com controle de temperatura (37 °C) e CO<sub>2</sub> (5%). Adicionou-se a solução de fixação e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado o anticorpo de detecção e a placa incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Adicionamos o anticorpo secundário preparado HRP-conjugado e a placa foi mantida

em temperatura ambiente por 30 minutos. Acrescentamos o substrato TMB e observamos a mudança de coloração (amarelo). A leitura da absorbância é feita a 450nm.

### 3.15 Ensaio de Migração

Os grupos celulares HT1080 imediatamente congeladas pós *sorting*, células sub-cultivadas pós *sorting* e células HT1080 que foram sub-cultivadas a partir do material de tumores crescidos *in vivo* foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, foram plaqueadas em placa de 24 poços com insertes (contendo 3mil células) de 6,5mm/ poro de 8µm. Foram preparados um poço controle com meio de cultura (DMEM HIGH) sem SFB e outro poço com meio de cultura com SFB. A placa foi incubada em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> por 8 horas. Após esse período as células foram fixadas com PFA 4% por 20 minutos e os poços lavados 3 vezes com PBS 1X. As células foram marcadas com marcador específico nuclear (DAPI) 1:1000 por 30 minutos. Em seguida, as placas lavadas 4 vezes por 3 minutos cada com PBS 1X. Os insertes com as células migradas foram colocados em lâmina e levados ao microscópio de fluorescência para análise. A figura abaixo ilustra o protocolo de migração.



**Figura 7** - Etapas do Ensaio de migração.

### 3.16 Capacidade de auto-renovação das células HT1080 transfectadas com Lgr5

O teste de auto-renovação, onde avaliamos a capacidade de *stemness* das células com alta e baixa expressão de Lgr5. Ensaio realizado em triplicata com 200 células em cada poço de todas as condições anteriores foram plaqueadas e após 21 dias, a quantidade de esferas formadas foi quantificada. Foram consideradas para o ensaio somente a formação de esferas das células com maior e menor positividade para Lgr5.

A formação de esferas foi realizada a partir de células em ~80% de confluência em meio DMEM HIGHT+10% SFB, as células foram dissociadas com tripsina-EDTA. Após a centrifugação, as células foram incubadas em meio DMEM/F12+1% de metilcelulose na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços. Alíquotas de fator de crescimento epidérmico recombinante humano (EGF; 10 ng/mL) e fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF- $\beta$ ; 10 ng/mL) foram adicionados. Após 15-18 dias em cultura, as colônias que continham > 10 células foram quantificadas por microscopia para análise da formação de esferas.

### 3.17 Análise por H-score

A interpretação dos resultados foi baseada no *H-score*, onde analisamos se havia marcação (sim, não), intensidade da marcação ((0) nenhuma marcação, (1) fraca, (2) moderada e (3) forte) e porcentagem da marcação (0-25%; 25-70%; 70-100%). O valor final da análise foi dado usando uma escala de 0-300. O *H-score* foi calculado da seguinte forma: Pontuação de expressão final = porcentagem de células positivas multiplicada pela intensidade da coloração. Isso resulta em uma pontuação final variando de 0 a 300. A pontuação final da expressão foi dividida em 4 categorias (0=sem expressão,  $\leq 100$ = expressão fraca,  $\leq 200$ =expressão moderada,  $\leq 300$ = expressão forte).

### 3.18 Análise estatística

A análise de H-score, foi feita pelo coeficiente de correlação não paramétrica de *rô* de Spearman. A análise de sobrevida foi calculada através do estimador de KAPLAN E MEIER para estimar a sobrevida do indivíduo de acordo com a análise do estadiamento agrupado em determinado período de tempo, truncado em até 60 meses. Quanto mais superior for a curva no gráfico, maior é a chance de estar livre de formação do tumor até o tempo considerado. A comparação entre as curvas foi realizada utilizando o teste não-paramétrico de Log-Rank, e o

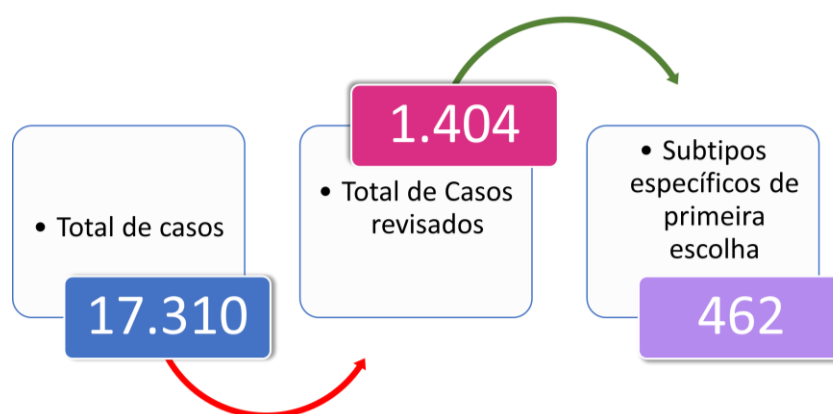
nível de significância adotado foi de 5%. O valor de  $P < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Registro Institucional de Sarcomas de Partes moles

A estratégia para elaboração do registro retrospectivo se baseou na busca dos dados clínicos, epidemiológicos e dados relacionados ao tratamento dos pacientes atendidos na instituição desde a sua inauguração (1953), através da pesquisa de prontuários físicos digitalizados e prontuário eletrônico, utilizando-se os sistemas H<sup>2</sup>TC, Recruit (*softwares* desenvolvidos internamente pelo próprio laboratório de Informática Médica, como o H<sup>2</sup>TC é um sistema integrado de registros médicos com foco em pesquisa; o Recruit, facilita a identificação dos pacientes por critérios clínicos) e MV.

Essa primeira busca resultou em mais de 17 mil casos registrados eletronicamente na plataforma institucional H<sup>2</sup>TC que reúne os prontuários digitais (desde 2007) e um volume não dimensionado de documentos digitalizados desde a fundação do hospital. Por se tratar de um alto volume de casos, optamos em incluir no registro um conjunto de mais de 1.400 casos que foram revisados pela equipe de patologistas. Desta lista, optamos por iniciar a coleta por subtipos mais comuns dentre os Sarcomas de partes moles aos quais foram descritos no trabalho realizado pelo TCGA (**Figura 2**). Além desse critério, também preconizamos iniciar o levantamento e coleta dos dados dos casos que já haviam sido revisados pelo grupo de Patologia da Instituição e obtivemos o seguinte cenário, descrito na **Figura 8**.



**Legenda:** Total de 17.310 mil casos de pacientes do A. C. Camargo Cancer Center já catalogados; dentre esses casos, identificamos os laudos que haviam sido revisados, totalizando 1404 pacientes sendo que 462 com diagnóstico de SPM dos 8 subtipos citados anteriormente (leiomiossarcoma; lipossarcoma desdiferenciado; sarcoma pleomórfico não diferenciado; mixofibrossarcoma; sarcoma sinovial; tumor maligno de bainha de nervo periférico; lipossarcoma pleomórfico; tumor desmoide; fibrossarcoma agressivo).

**Figura 8** - Seleção de casos de SPM com história clínica para adição no Registro Institucional.



Com os critérios de primeira escolha, iniciamos o preenchimento do Registro Retrospectivo de sarcomas de partes moles da Instituição. Recuperamos nas plataformas digitais, informações clínicas de 361 pacientes que estão disponíveis no sistema REDCap. A lista de variáveis está incluída no **Adendo 1**.

A **Tabela 2** mostra as características clínico-demográficas da coorte de 361 pacientes.

**Tabela 2** - Características clínico-demográficas da coorte de 361 pacientes.

<b>Características clínico-demográficas da coorte de 361 pacientes</b>			
<b>Gênero</b>	Masculino	188	52%
	Feminino	173	48%
<b>Etnia</b>	Branca	153	44%
	Negra	2	1%
	Amarela	9	3%
	Parda	11	3%
	Ignorado	171	49%
<b>Idade ao diagnóstico</b>	Mínima	Menor de 1 ano	
	Máxima	87 anos	
	Mediana	43,8 anos	
<b>Localização tumoral</b>	Cabeça e pescoço	24	6,7%
	Extremidades	161	45%
	Tórax	31	8,6%
	Abdômen	67	18,7
	Pelve	65	18,2
	Outros	8	2,2%
<b>Estadiamento</b>	IA	20	5,6%
	IB	59	16,6%
	II	46	12,9%
	IIIA	52	14,6%
	IIIB	73	20,5%
	IV	58	16,3%
	Ignorado	46	12,9%
<b>Recorrência a distância</b>	Pulmão	91	26,4%
	Fígado	10	2,9%
	Osso	11	3,2%
	SNC	4	1,2%
	Peritônio	11	3,2%
	Linfonodos	4	1,2%

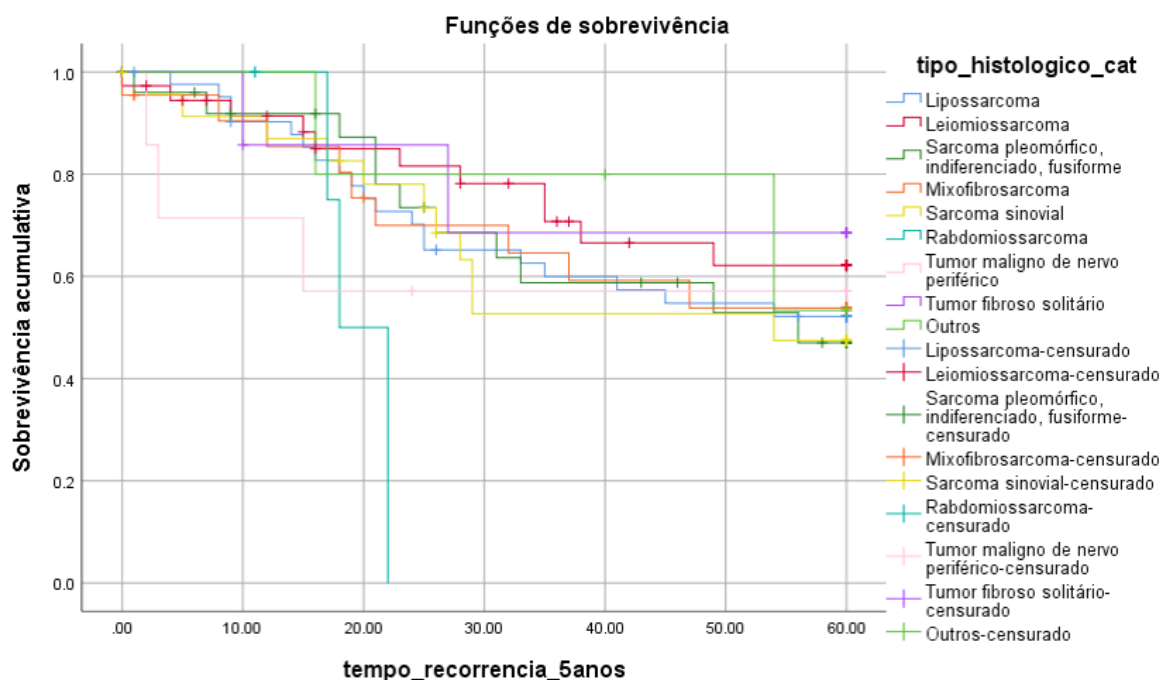
	Outros	28	8,1%
	Nenhum	200	58,0%
<b>Tratamento Neoadjuvante</b>	Sim	98	27,2%
	Não	247	68,6%
	Ignorado	12	3,3%
	Não se aplica	3	0,8%
<b>Tratamento Adjuvante</b>	Sim	218	60,6%
	Não	122	33,9%
	Ignorado	16	4,4%
	Não se aplica	4	1,1%

A frequência de estadiamento agrupado e é possível verificar uma distribuição bastante heterogênea nesse dado. Mas existe uma maior prevalência nos casos classificados como alto grau, totalizando 51,4% (IIIA+IIIB+IV).

Avaliando os dados referentes a terapias neo e adjuvantes, foi possível concluir que os pacientes avaliados e adicionados ao Registro Institucional de Sarcomas de partes moles a maior parte destes não realizaram tratamento neoadjuvante (27,2%). Porém, se avaliarmos o tratamento adjuvante, é possível identificar que a maioria dos pacientes realizaram tratamento adjuvante (60,6%), seja quimioterapia ou radioterapia.

Já os pacientes que foram acompanhados após realizarem a cirurgia e tratamentos na Instituição mostraram que 26% apresentaram recorrência pulmonar e que a maioria dos pacientes foram monitorados por cerca de 5 anos e não houve registro de recidiva no período de acompanhamento.

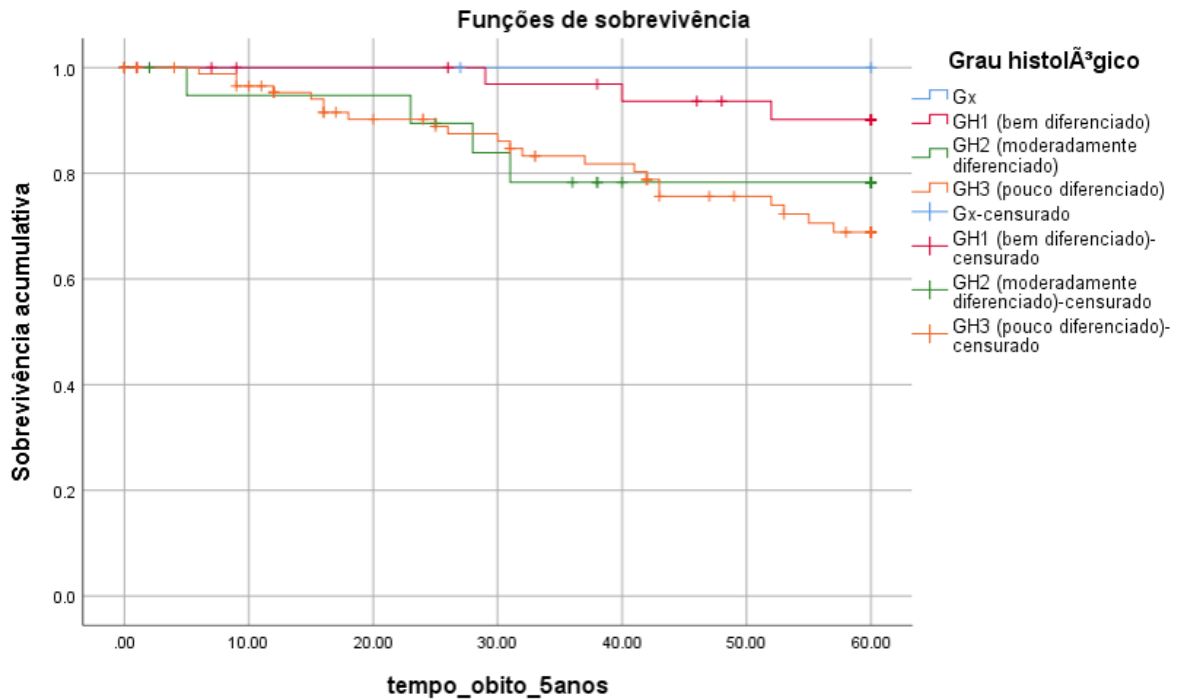
A próxima etapa foi avaliar as sobrevidas global e livres de recidiva para todos os subtipos histológicos. A **Figura 9** mostra a sobrevida livre de recidiva em cinco, a mediana foi de 40 meses.



**Legenda:** Total de casos por subtipo histológico: Lipossarcoma: 44; Leiomiossarcoma: 37; Sarcoma pleomórfico, indiferenciado, fusiforme: 26; Mixofibrossarcoma: 22; Sarcoma sinovial: 24; Rabdomiossarcoma: 6; Tumor maligno de nervo periférico: 7; Tumor fibroso solitário: 7; Outros: 5; Total geral: 178. Média para tempo de sobrevivência: Lipossarcoma: 42,3; Leiomiossarcoma: 46,7; Sarcoma pleomórfico, indiferenciado, fusiforme: 42,9; Mixofibrossarcoma: 42,5; Sarcoma sinovial: 40,7; Rabdomiossarcoma: 19,7; Tumor maligno de nervo periférico: 37,1; Tumor fibroso solitário: 47,2; Outros: 49,6; Total geral: 42,7. Fonte: Análise estatística realizada pela Core Facility da Instituição.

**Figura 9** - Sobrevida livre de doença em função do subtipo histológico.

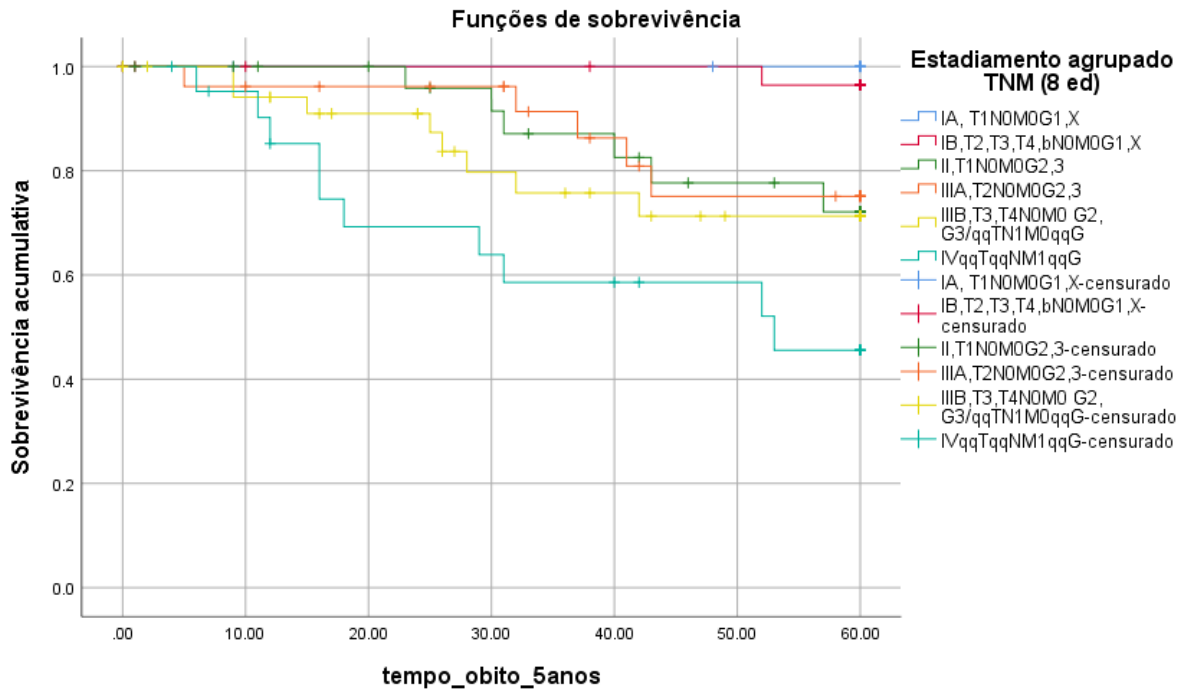
Já a sobrevida global em relação ao grau histológico (**Figura 10**), traz uma caracterização de que os tumores com maiores graus histológico gera uma pior sobrevida para o paciente.



**Legenda:** Gx: 2; GH1 (bem diferenciado): 39; GH2 (moderadamente diferenciado): 21; GH3 (pouco diferenciado): 92;  $n$  total: 154 casos. Média para tempo de sobrevivência: Gx: 38,0; GH1: 45,9; GH2: 45,7; GH3: 37,67;  $n$  total: 40,9. Core facility.

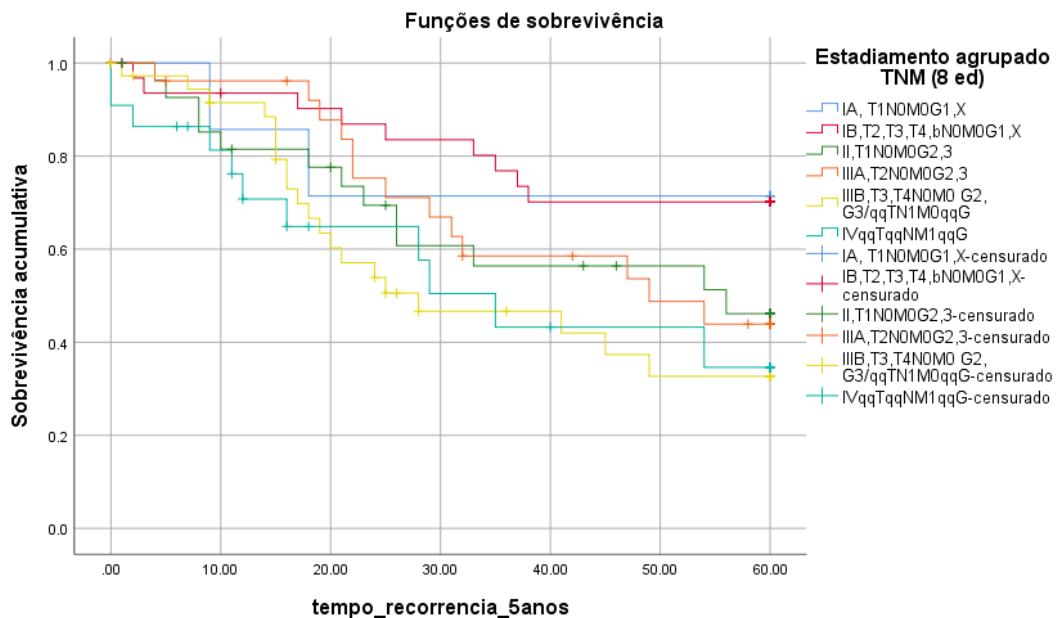
**Figura 10** - Sobrevida global em função do grau histológico.

Além disso, também foi realizada a análise de sobrevida em função do estadiamento patológico. É possível verificar que a sobrevida está relacionada com o estadiamento patológico, quanto maior o grau histopatológico, menor a sobrevida do paciente. Analisando também a sobrevida livre de doença, o gráfico da **Figura 11** mostra que quanto maior o grau histopatológico menor será a sobrevida livre de doença.



**Legenda:** IA: 7; IB: 33; II: 29; IIIA: 26; IIIB: 37; IV: 22; *n* total: 154. Média para tempo de sobrevivência: IA: 46,7; IB: 49,1; II: 40,8; IIIA: 42,9; IIIB: 34,9; IV: 34,7; Total: 41,1. Core facility.

**Figura 11** - Sobrevida global em função do estadiamento histopatológico.

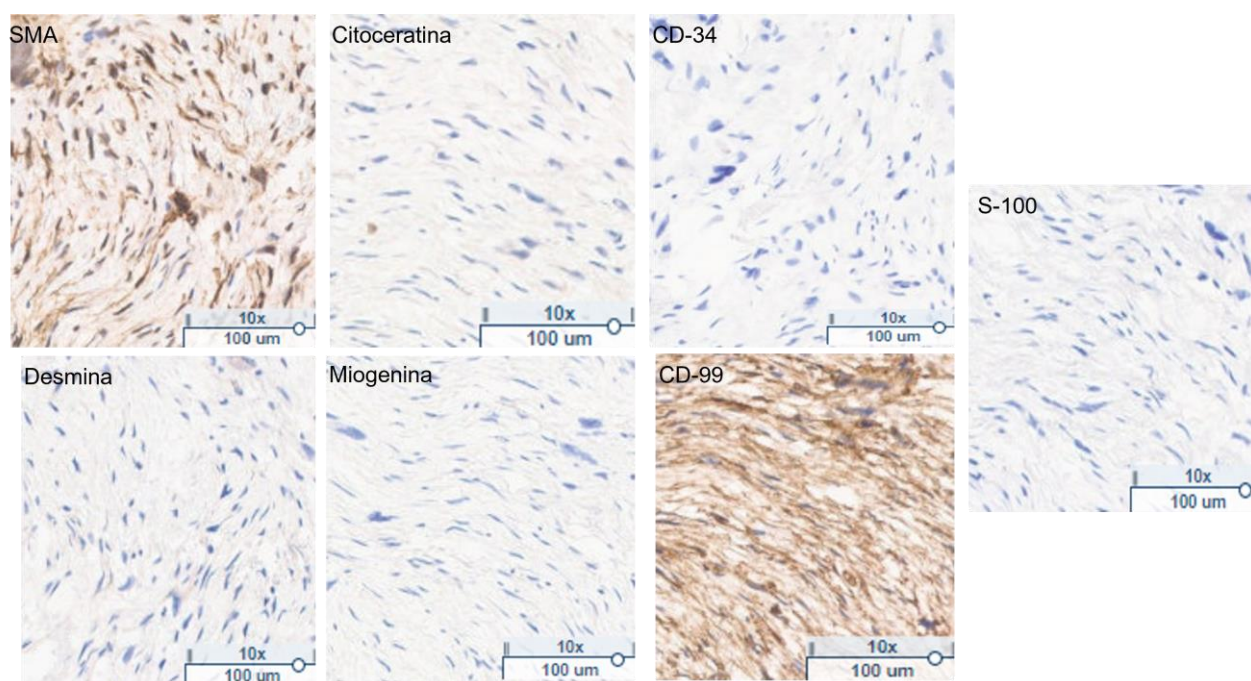


**Legenda:** IA: 7; IB: 34; II: 29; IIIA: 26; IIIB: 38; IV: 22; *n* total: 156. Core facility.

**Figura 12** - Sobrevida livre de doença em função do estadiamento histopatológico.

Com o TMA confeccionado a partir de amostras de material parafinado dos pacientes adicionados no Registro Institucional de Sarcomas de partes moles, construído no início deste projeto com um levantamento retrospectivo de todos os casos de Sarcomas tratados no A. C. Camargo Cancer Center já citado anteriormente.

As amostras dos tecidos foram preparadas e organizadas em duplicatas. Iniciamos a marcação e caracterização por imunohistoquímica, utilizando os principais marcadores da rotina para diagnóstico de Sarcomas (Desmina, Miogenina, Actina de músculo liso, CD34, CD99, Citoceratina, S-100), onde foi aplicada a mesma técnica e protocolo que já descrito anteriormente (item 3.13) (**Figura 13**).



**Legenda:** Representação da caracterização de um Sarcoma pleomórfico indiferenciado. Verificando a marcação positiva para SMA e CD-99 e negativa para Citoceratina, CD-34, Desmina, Miogenina e S-100. Imagens de um caso de sarcoma constante no TMA confeccionado em aumento de 10x.

**Figura 13** - Expressão de marcadores de sarcomas de partes moles.

#### 4.2 Registro Prospectivo de Sarcomas de Partes moles

Em paralelo à construção do registro retrospectivo, realizamos coletas prospectivas a partir de março de 2018 até outubro de 2021, com o intuito de estabelecer a plataforma de *patient-derived xenografts* (PDX). Dados dos pacientes adicionados ao estudo estão descritos na tabela constante no **Adendo 3**. Os resultados sobre a geração de PDX serão discutidos adiante. Amostras tumorais dos pacientes que deram origem a tumores nos animais

imunodeficientes também foram organizadas em TMA e foram utilizadas como uma casuística complementar à coorte retrospectiva. A **Tabela 3** mostra a relação de subtipos de tumores coletados, período do curso do projeto, bem como, informações de cada caso clínico.

**Tabela 3** - Casos coletados de Sarcomas de partes moles.

<b>Características clínico-demográficas da coorte de 33 Pacientes que geraram PDX</b>			
<b>Gênero</b>	Masculino	28	41%
	Feminino	40	59%
<b>Etnia</b>	Branca	6	9%
	Negra	0	0%
	Amarela	0	0%
	Parda	0	0%
	Indígena	0	0%
	Ignorado	64	91%
<b>Idade ao diagnóstico</b>	Mínima	1 ano	
	Máxima	92 anos	
	Mediana	49,6 anos	
<b>Localização tumoral</b>	Cabeça e pescoço	4	6%
	Extremidades	28	41%
	Tórax	5	7%
	Abdômen	22	32%
	Pelve	9	13%
	Outros	0	0%
<b>Estadiamento</b>	IA	2	6%
	IB	2	6%
	II	11	33%
	IIIA	6	18%

	IIIB	10	30%
	IV	2	6%
	Ignorado	0	0%
<b>Recorrência a distância</b>	Pulmão	7	18%
	Fígado	0	0%
	Osso	1	3%
	SNC	4	11%
	Peritônio	2	5%
	linfonodos	4	11%
	Outros	1	3%
	Nenhum	25	66%

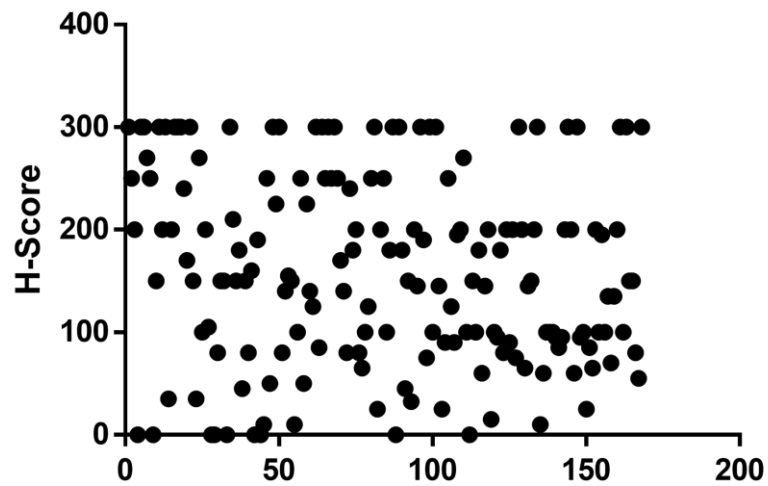
Apesar de toda a heterogeneidade mostrada na **Tabela 3**, verifica-se que há uma maior incidência de tumores abdominais. Baseado no estadiamento agrupado, é possível ver que a maioria dos pacientes, com um total de 87% (II, IIIA, IIIB e IV) já eram diagnosticados com tumores de moderado a alto grau histológico.

Quando analisamos os pacientes e se eles fizeram tratamento neoadjuvante, foi possível constatar que a maior parte dos pacientes não fizeram tratamento neoadjuvante (46 - 66%), já os que fizeram somam um total de 24 (34%). Além disso, a maioria dos pacientes operados no A. C. Camargo Cancer Center também não fizeram tratamento adjuvante (quimioterapia 28 – 40% e radioterapia 27 – 38%); já os que fizeram somam: quimioterapia 7 – 10% e radioterapia 8 – 11%.

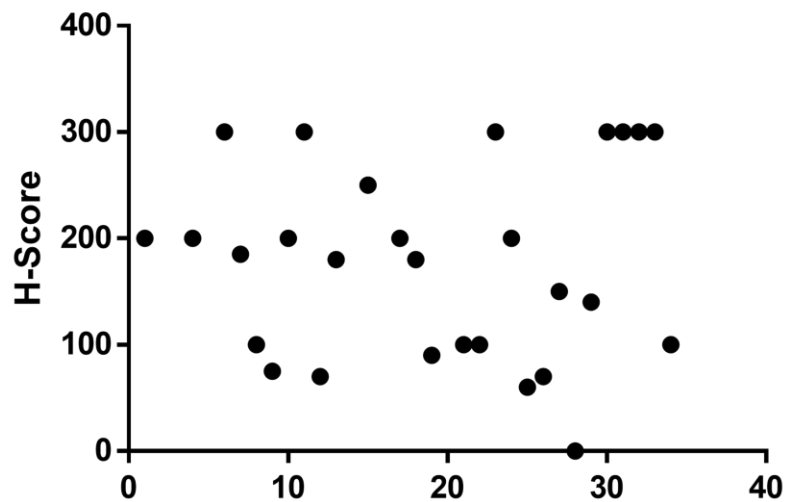
#### 4.3 Expressão de Lgr5 em sarcomas de partes moles

Com a padronização da marcação de Lgr5, iniciamos a avaliação da expressão deste receptor no TMA com os pacientes oriundos do registro retrospectivo (**Figura 14**) e no TMA com amostras de pacientes coletadas de forma prospectiva para a plataforma PDX (Figura 15). A quantificação foi realizada por HSCORE e os resultados indicam uma extensa variabilidade na expressão de Lgr5 em sarcomas de partes moles.



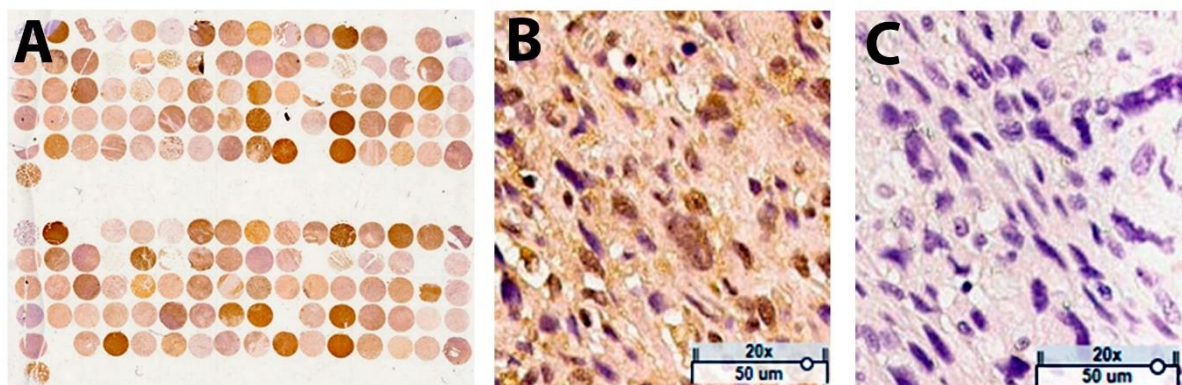


**Figura 14** – Expressão de Lgr5 em sarcomas de partes moles em TMA de pacientes oriundos do registro retrospectivo. N = 168.



**Figura 15** – Expressão de Lgr5 em sarcomas de partes moles em TMA de pacientes oriundos do registro prospectivo. N = 33.

A Figura 16 mostra imagens representativas da marcação de Lgr5.

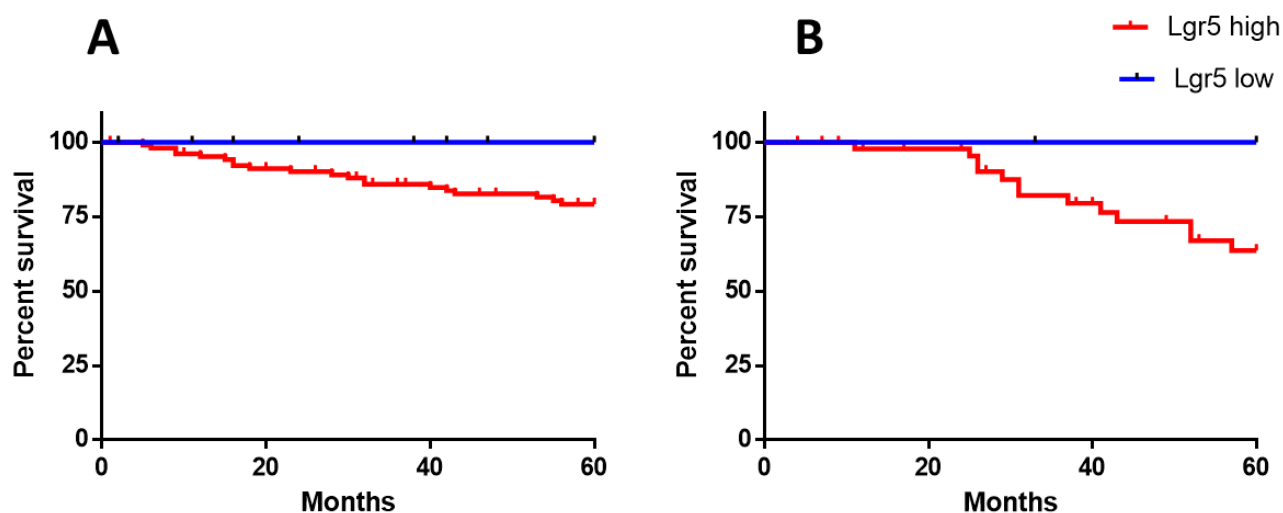


**Legenda:** A: Imagem representativa da vista geral do TMA mostrando a heterogeneidade da marcação de Lgr5 nos diferentes casos de SPM. B: Imagem representativa de um Sarcoma (Mixofibrossarcoma  $h$ -score= 125) com alta expressão de Lgr5 e C: imagem representativa do mesmo Sarcoma (Mixofibrossarcoma) com nenhuma expressão de Lg5.

**Fonte:** Imagem retirada do Aperio, sistema de digitalização das lâminas de imunohistoquímica.

**Figura 16** – Expressão de Lgr5 em pacientes com Sarcomas de partes moles.

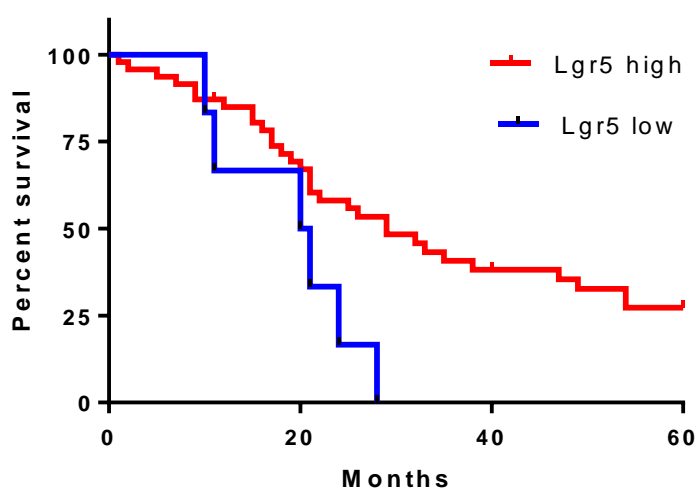
Para avaliar se há influência da expressão de Lgr5 na sobrevida global de pacientes com sarcomas de partes moles que foram diagnosticados com ausência de metástase, utilizamos o teste de *log-rank* para estabelecer o *cutoff* e dividir a população de pacientes em duas, com maior e menor valores de expressão da proteína. Os valores analisados basearam-se na análise de imunohistoquímica através do *H-score* e obtivemos um *cut-off* de 20 tanto de sobrevida global quanto para a sobrevida livre de metástase. O número de pacientes com valores de *H-score* abaixo de 20 foi baixo ( $N = 12$ ) e, portanto, não observamos diferença estatística. Entretanto, há uma clara separação das curvas de sobrevida o que sugere que uma pequena quantidade de expressão desta proteína já é capaz de influenciar a sobrevida (**Figura 17**).



**Legenda:** Análise de Kaplan-Meyer, Lgr5 *low*, N = 12; Lgr5 *high*, N = 112  $p = 0,168$ .

**Figura 17** – Sobrevidas global (A) e livre de metástase (B) em pacientes com sarcomas de partes moles de acordo com a expressão de Lgr5.

Quando analisamos a sobrevida global em pacientes com metástase ao diagnóstico, observamos uma inversão no padrão de sobrevida (**Figura 18**). Pacientes com baixa expressão de Lgr5 apresentam pior sobrevida global ( $p = 0.026$ ).



**Legenda:** Análise de Kaplan-Meyer, Lgr5 *low*, N = 6; Lgr5 *high*, N = 48. Log-rank test,  $p = 0.026$ .

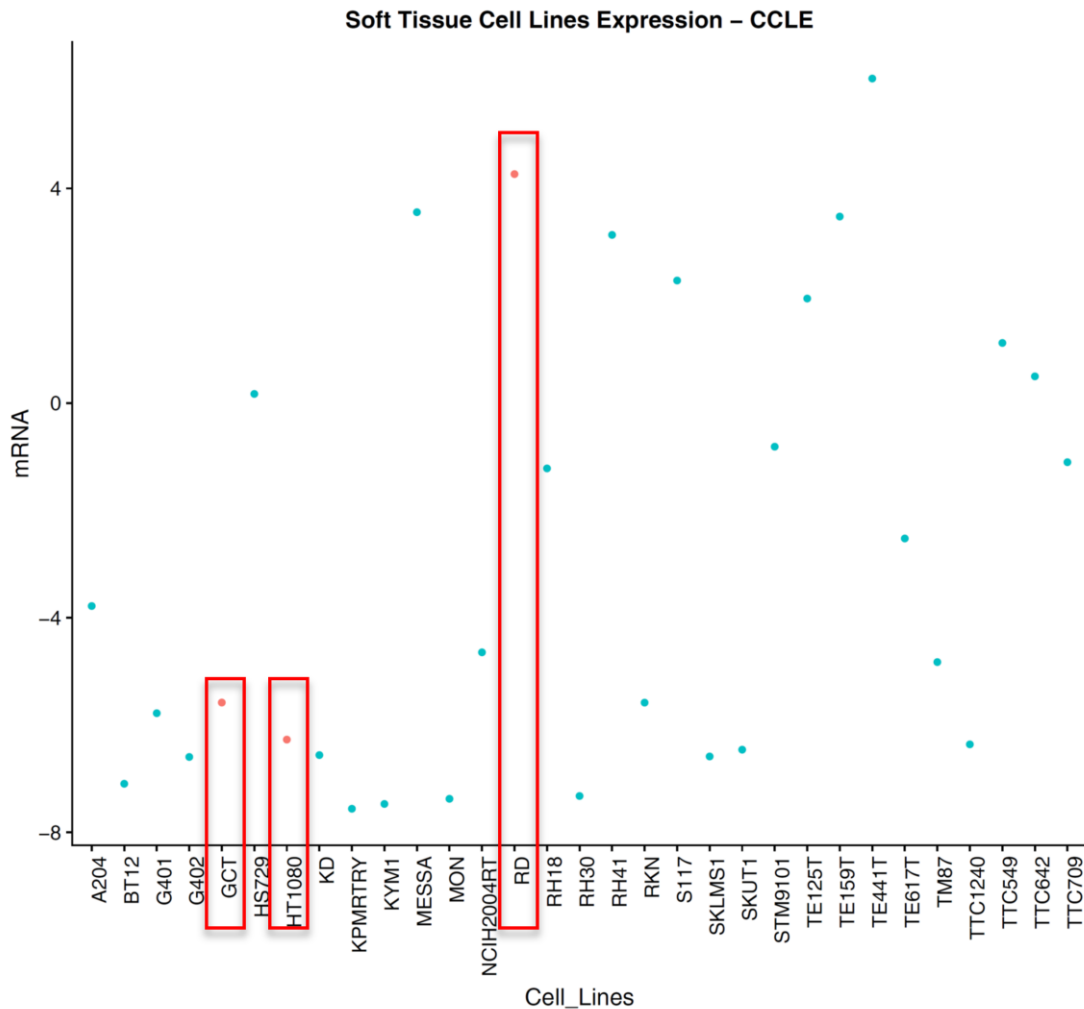
**Figura 18** – Sobrevida global de pacientes com sarcomas de partes moles com metástase ao diagnóstico de acordo com a expressão de Lgr5.

Em conjunto, esses resultados sugerem que existe relação entre a expressão de Lgr5 com a sobrevida de pacientes com sarcomas de partes moles. Pacientes com ausência de metástase ao diagnóstico e que apresentam expressão de Lgr5 tem pior sobrevida quando comparados com aqueles que não expressam a proteína. Por outro lado, pacientes metastáticos ao diagnóstico com menor expressão de Lgr5 apresentam pior sobrevida global. Estes dados corroboram os resultados obtidos com o banco de dados públicos disponibilizados pelo TCGA (**Figura 4**).

#### 4.4 Papel do receptor Lgr5 nas capacidades tumorais

##### 4.4.1 Ensaios *in vitro*

Adquirimos um painel de linhagens tumorais de sarcomas de partes moles contendo as células SW684, SW872, SW982, GCT, RD e HT10180, sendo que as três últimas estão presentes no CCLE. A **Figura 19** mostra a expressão do mRNA de Lgr5 no conjunto de células de sarcoma e mostra uma variabilidade no perfil de expressão, as células GCT e HT1080 apresentam baixa expressão relativa, enquanto a RD apresenta alta expressão.

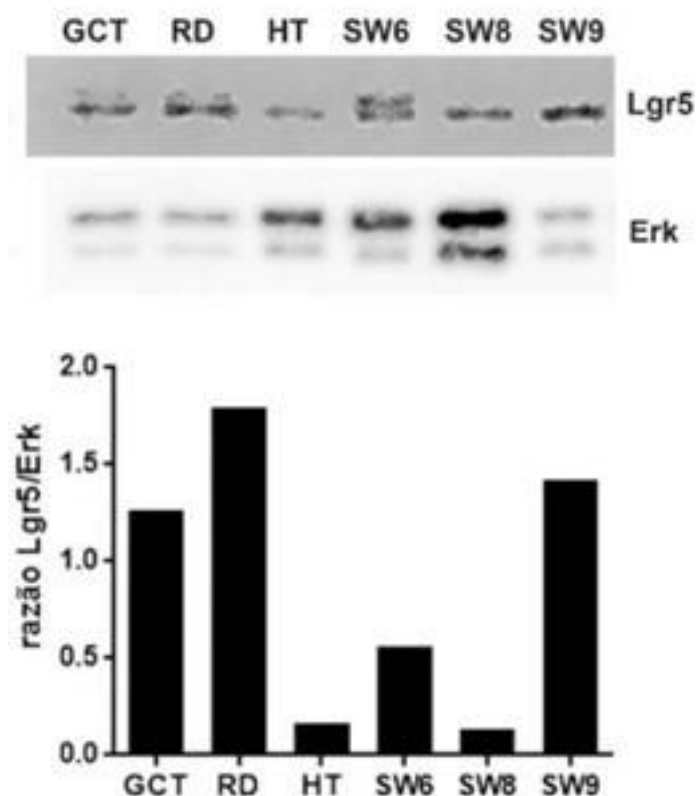


**Fonte:** Dados disponíveis no portal *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) no endereço <https://portals.broadinstitute.org/ccle>.

**Figura 19** - Expressão de RNA mensageiro de Lgr5 em linhagens tumorais de sarcomas de partes moles. As células marcadas em vermelho (GCT, HT1080 e RD) estão incluídas no projeto.

Iniciamos os estudos com as linhagens com ensaios de imunofluorescência, citometria de fluxo e *western blot* para estabelecer a caracterização da expressão de Lgr5 nas linhagens celulares e os resultados preliminares sugerem que, de fato, a expressão dessa proteína é

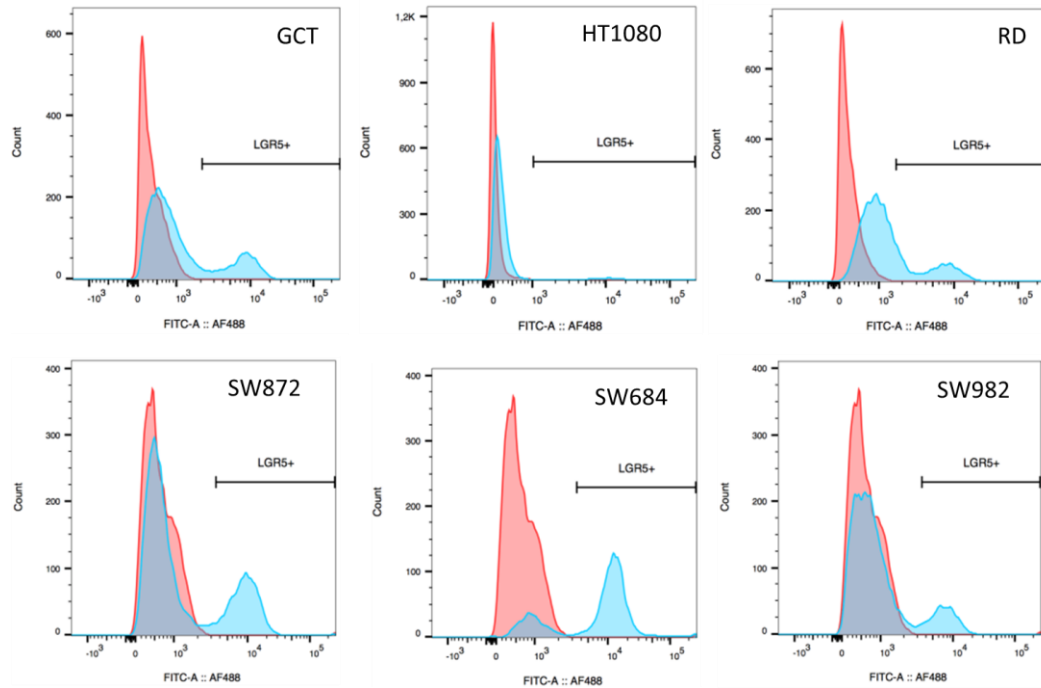
diferente entre as linhagens testadas. Os ensaios de *western blotting* (**Figura 20**) sugerem que a linhagem HT1080 é a linhagem que expressa menores quantidades de Lgr5, isso também corrobora os dados do CCLE.



**Legenda:** O extrato proteico das células foi submetido a SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a expressão de Lgr5 foi realizada com o anticorpo anti-Lgr5 (MA5-25644, Thermo Scientific). Como controle de carregamento foi utilizado anti-Erk total (#9102, Cell Signaling). A intensidade das bandas foi determinada com o software ImageJ.

**Figura 20** - Expressão de Lgr5 em linhagens de sarcoma de partes moles.

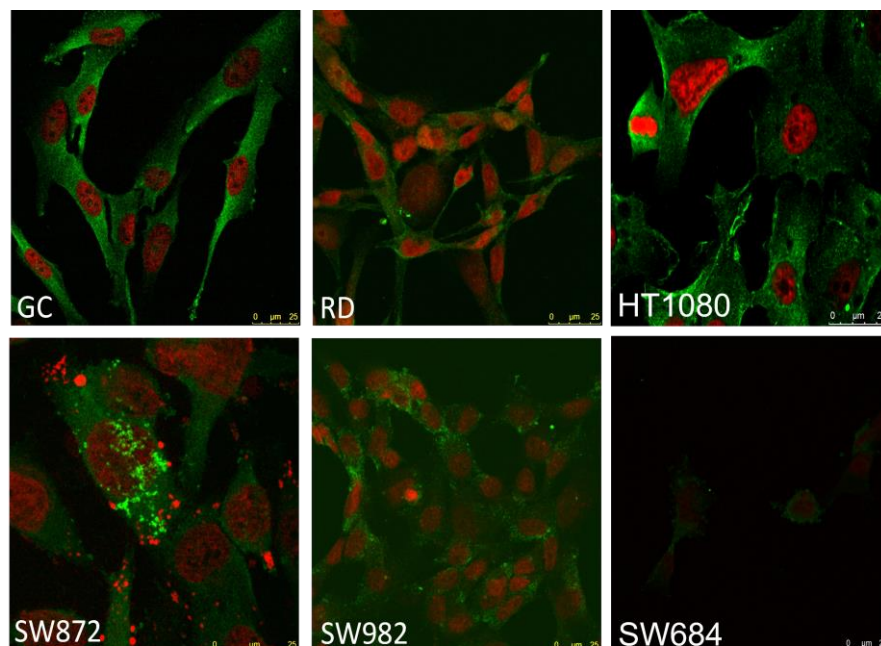
Ensaio e resultados obtidos de citometria de fluxo (**Figura 21**) vão de encontro ao que foi observado por *western blot*, ou seja, a linhagem HT1080 é a linhagem que expressa menores quantidades de Lgr5.



**Legenda:** As células foram ressuspensas e marcadas com anticorpo Lgr5 (Sigma, HPA012530). As curvas em vermelho indicam células marcadas somente com anticorpo secundário (Molecular Probes, anti-rabbit AlexaFluor 488), as curvas em azul indicam as células marcadas com Lgr5 e anticorpo secundário. As células foram analisadas no BD FACS Canto II e os dados processados pelo software FlowJo.

**Figura 21** - Citometria de fluxo para Lgr5 em linhagens de sarcomas de partes moles.

Ensaio de imunofluorescência também demonstram que a expressão de Lgr5 é heterogênea em todas as linhagens testadas (**Figura 22**).

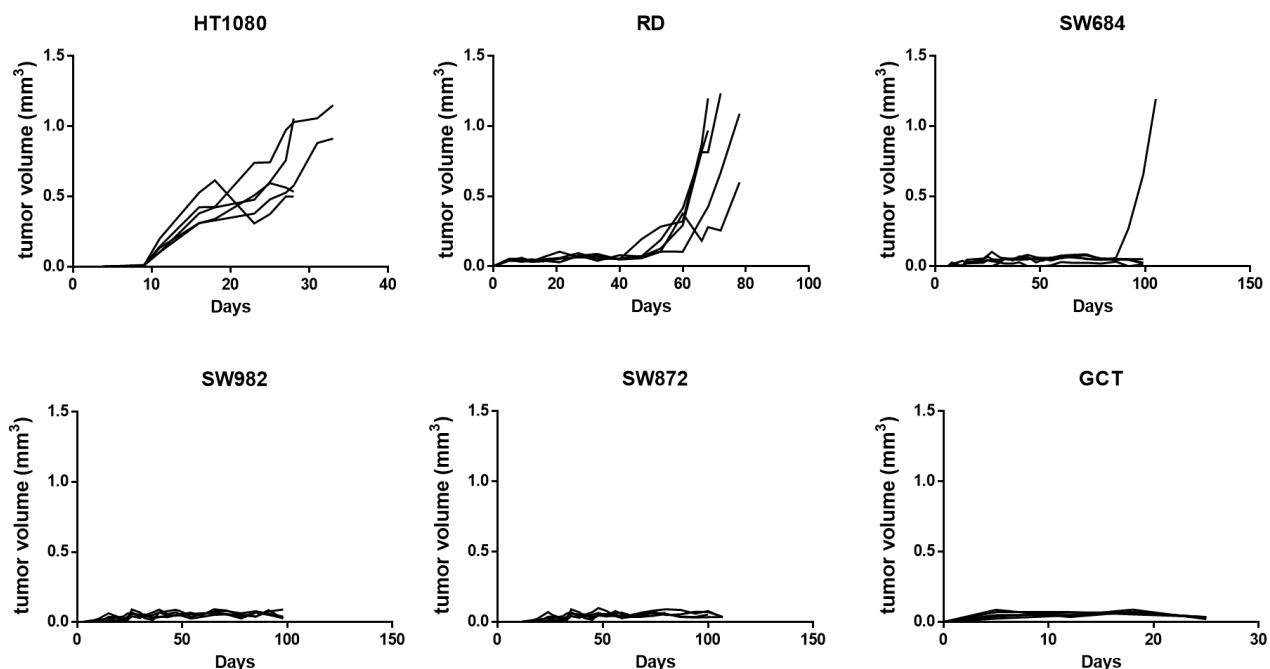


**Legenda:** As células SW684, SW872, SW982, HT1080, RD e GCT foram marcadas com anti-Lgr5 (LGR5 (Anti LGR5 policlonal; Sigma; cat. HPA012530) e o núcleo marcado com Draq5 (Thermo Fisher; cat.62251).

**Figura 20** - Imunofluorescência para Lgr5 em linhagens celulares de sarcomas de partes moles.

#### 4.4.2 Ensaios *in vivo*.

Determinado o padrão de expressão de Lgr5 nas linhagens tumorais, o estabelecimento do perfil de tumorigenicidade das células é fundamental para uma melhor compreensão dos resultados. De acordo com informações da literatura e do fornecedor (ATCC), todas as células deveriam ser capazes de gerar tumores em animais imunodeficientes. Entretanto, dentro das nossas condições experimentais (inoculação de  $1 \times 10^6$  células ressuspendidas em 200 $\mu$ L de PBS/ no flanco direito de cada animal) foi possível observar o crescimento tumoral com apenas três linhagens, sendo HT1080 e RD capazes de gerar tumores em 100% dos animais e a SW684 em apenas um animal (de um conjunto de 5) (**Figura 23**). A cinética de crescimento não foi a mesma. Enquanto a HT1080 apresenta crescimento a partir do 10º dia pós-inoculação e desenvolvendo tumores que alcançam aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> em 30 dias, as células RD começam a apresentar crescimento após 50 dias.



**Legenda:**  $1 \times 10^6$  células foram inoculadas no flanco direito de animais imunodeficientes nudes (5 animais por tipo celular).

**Figura 21** - Crescimento tumoral *in vivo* de linhagens de sarcomas de partes moles.

Em três linhagens (GCT, SW982 e SW872), não foi possível observar crescimento tumoral. As lesões mensuradas não adquiriram volume expressivo até 100 dias pós-inoculação, permanecendo como massas menores que 0,1 cm<sup>3</sup>.

#### 4.4.3. Transdução lentiviral

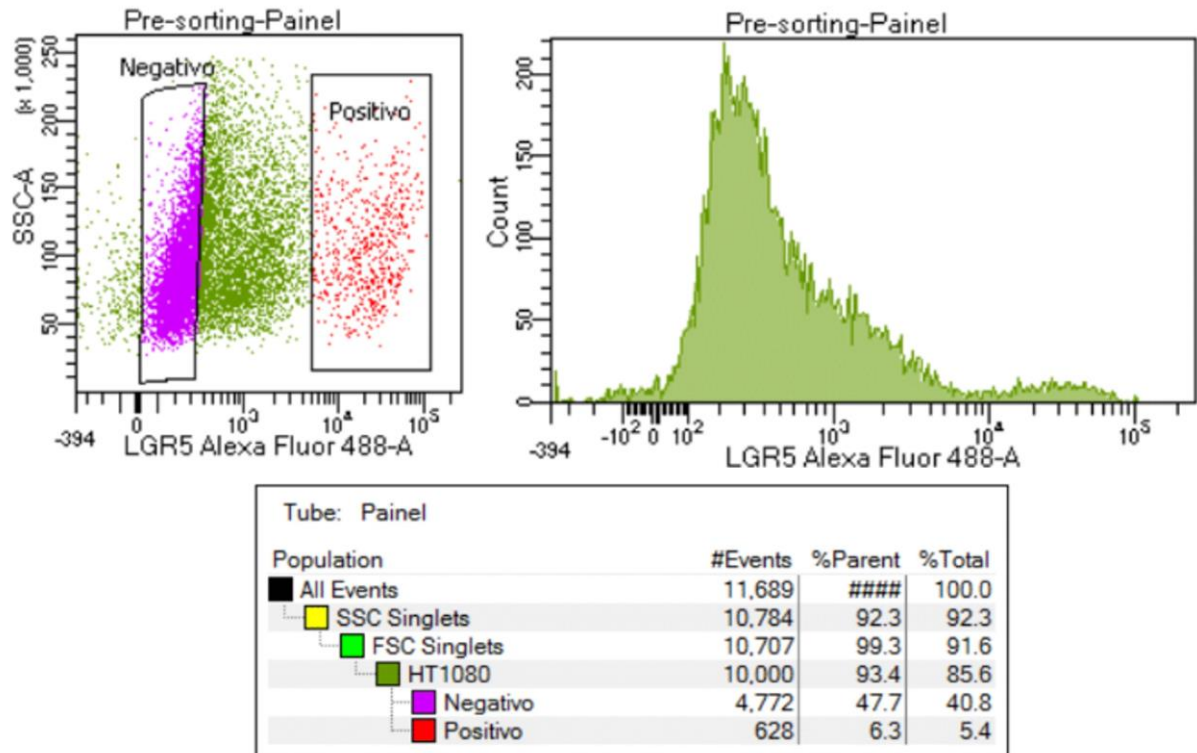
De maneira geral, os resultados obtidos até o momento indicavam que as linhagens de sarcomas expressam baixos níveis de Lgr5. Portanto, os ensaios de perda-de-função através de silenciamento ou depleção não trariam informações relevantes quanto ao papel da proteína na biologia de sarcomas. Decidimos então estudar a função da proteína em ensaios de ganho-de-função onde as células seriam transduzidas com partículas lentivirais para indução da expressão de Lgr5.

Todas as células foram inicialmente caracterizadas quanto à sensibilidade frente ao antibiótico puromicina e a concentração de 800 ng/ml foi a escolhida para o processo de seleção pós-transdução.

Os ensaios de crescimento tumoral *in vivo* foram realizados somente com a célula HT1080, uma das seis células de sarcoma de partes moles disponíveis no laboratório que apresentou crescimento tumoral de forma reprodutível. Outra célula que observamos crescimento foi a RD, porém com cinética mais lenta. Além disso, houve a limitação dos vetores lentivirais que apresentaram baixa eficiência de transdução. Por isso, só foi possível realizar a transdução em das duas linhagens e optamos pela HT1080 devido a sua cinética de crescimento e também por ser a célula mais adotada para abordagens em sarcoma, isso nos daria um poder de comparação com a literatura que a célula RD não tem.

As células HT1080 foram, então, submetidas à transdução lentiviral. As células transduzidas foram selecionadas com puromicina e expandidas até obtermos um estoque razoável para os futuros experimentos. Ensaios de citometria foram realizados com as células transduzidas e observamos que a expressão de Lgr5 não estava presente na totalidade de sua população (**Figura 22**).

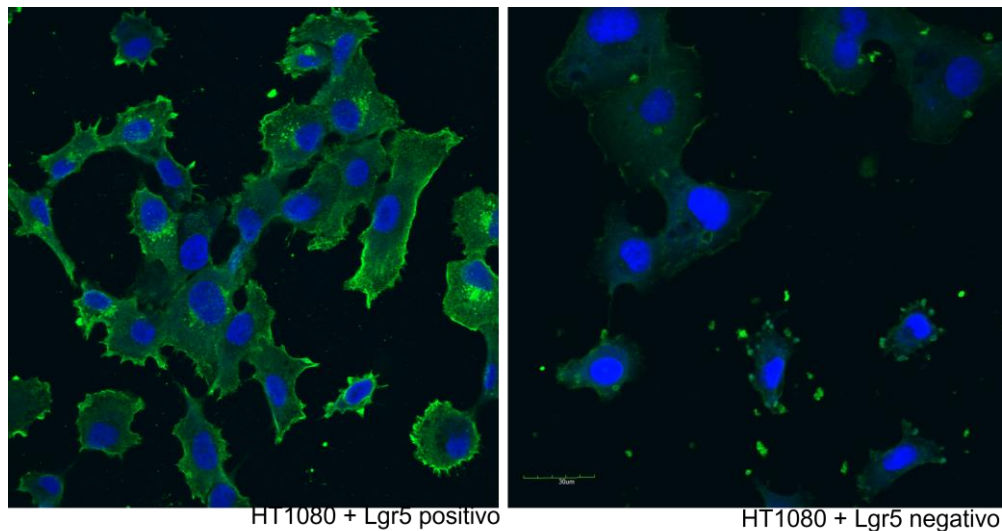




**Fonte:** As células foram analisadas e separadas no BD FACS Canto II e os dados processados pelo software FlowJo.

**Figura 22** - Pré sorting realizado com a linhagem HT1080 infectada com o Lentivírus Lgr5.

Na imagem a seguir (**Figura 23**), é possível observar que há uma diferença significativa na marcação de Lgr5 nas populações positiva e negativa porém, é visto também que dentro da população positiva há uma variação de marcação celular. Isso sugere algum mecanismo de compensação no decorrer das passagens na expressão da proteína e com isso, algumas células passaram a expressar mais proteína do que as outras da mesma população.

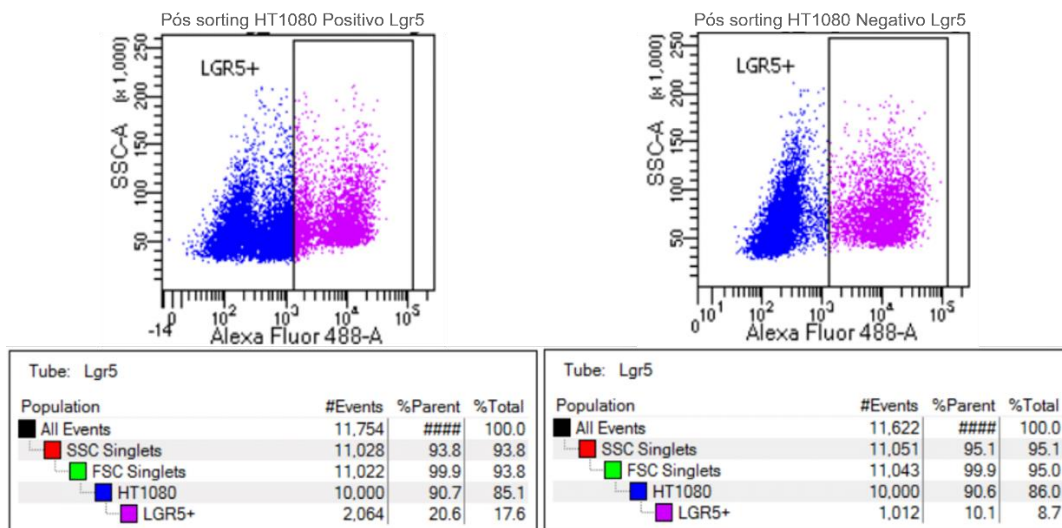


**Legenda:** As células HT1080+Lgr5+ foram marcadas com anti-Lgr5 (LGR5 (Anti LGR5 monoclonal; Envitrogen; cat: MA5-25644) e o núcleo marcado com DAPI (Thermo Fisher; cat. D1306).

**Figura 23** - Imunofluorescência II para Lgr5 na linhagem HT1080 infectada com o lentivírus que superexpressa Lgr5.

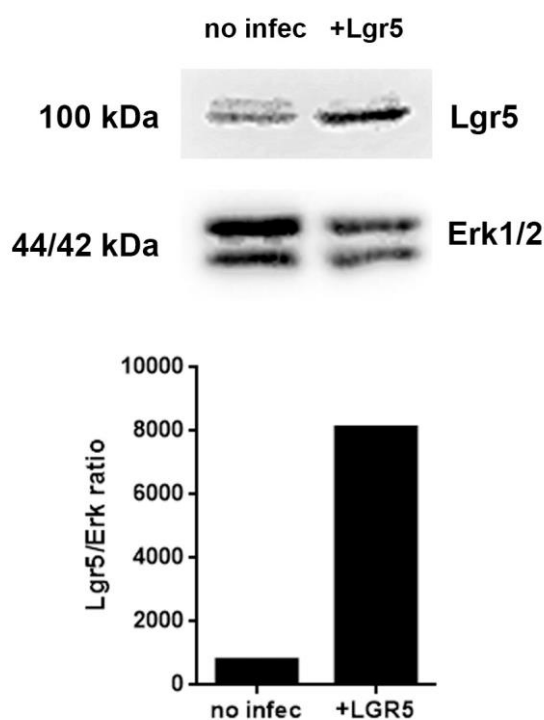
Os ensaios de *cell sorting* foram então realizados para separar duas populações de HT1080, Lgr5<sup>+</sup> e Lgr5<sup>-</sup>.

Esse resultado nos levou a realizar um *cell sorting* das células transduzidas para separar a população positiva e negativa. A **Figura 24** mostra que foi possível separar duas populações celulares, a Lgr5<sup>-</sup>, com nenhuma ou baixa expressão de Lgr5 e a Lgr5<sup>+</sup> com alta expressão. A superexpressão da proteína foi observada por *western blot* (**Figura 25**).



**Legenda:** As células foram analisadas e separadas no BD FACS Canto II e os dados processados pelo software FlowJo.

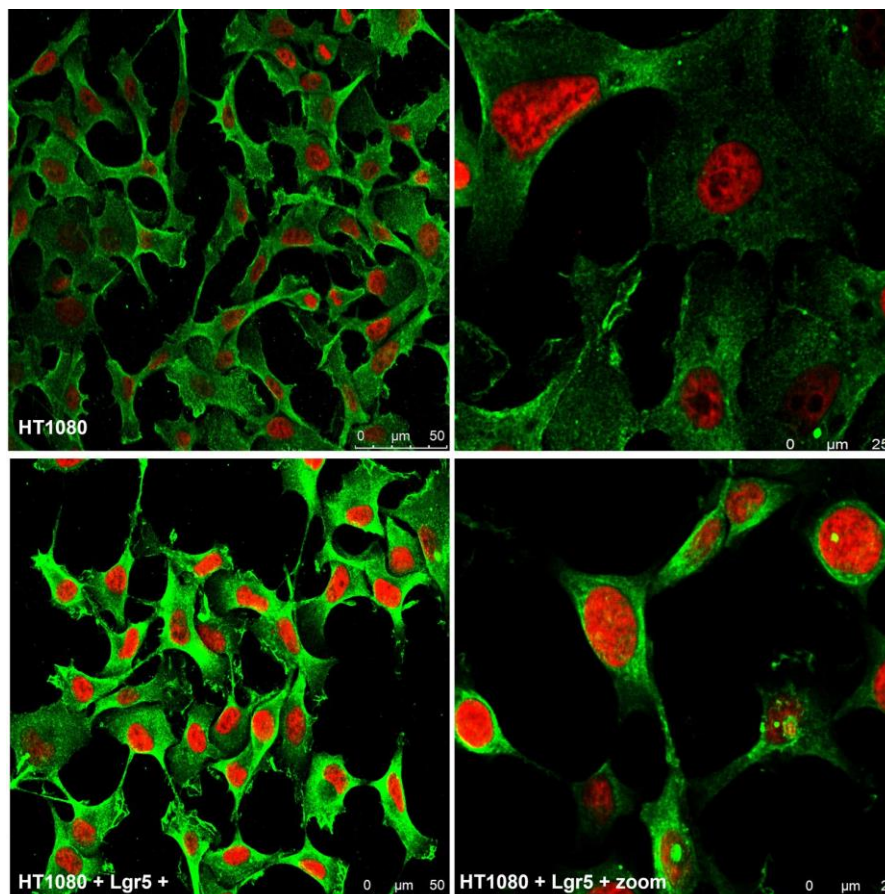
**Figura 24** - Cell Sorting realizado com a linhagem HT1080 infectada com o Lentivírus Lgr5.



**Legenda:** O extrato proteico das células foi submetido a SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a expressão de Lgr5 foi realizada com o anticorpo anti-Lgr5 (MA5-25644, Thermo Scientific). Como controle de carregamento foi utilizado anti-Erk total (#9102, Cell Signaling). A intensidade das bandas foi determinada com o software ImageJ.

**Figura 25** - Expressão de Lgr5 em linhagem da ATCC – HT1080 selvagem e HT1080 + Lgr5.

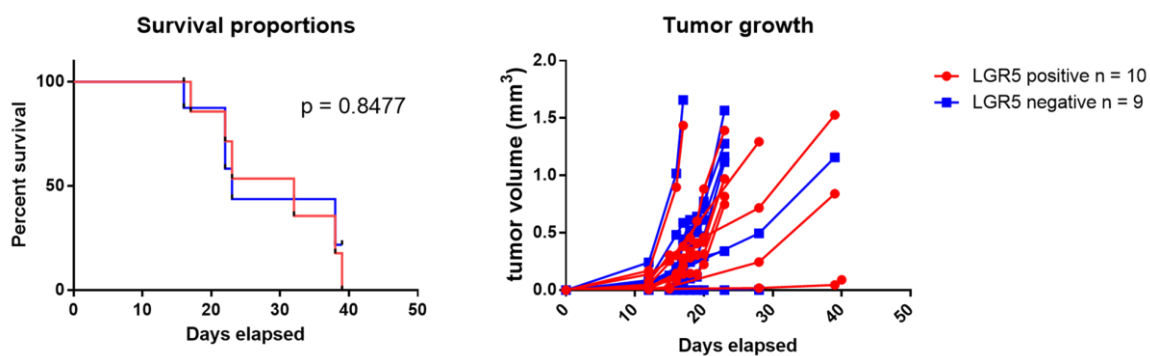
Além disso, a **Figura 26** representa a imunofluorescência que foi realizada nas células infectadas (HT1080+Lgr5+). Para este experimento as células foram plaqueadas e fixadas com PFA 4%, em seguida, realizado o protocolo já descrito anteriormente. A obtenção das imagens foi feita em microscopia confocal.



**Legenda:** As células HT1080+Lgr5+ foram marcadas com anti-Lgr5 (LGR5 (Anti LGR5 monoclonal; Envitrogen; cat: MA5-25644) e o núcleo marcado com DRAq5 (Thermo Fisher; cat.62251).

**Figura 26** - Imunofluorescência para Lgr5 na linhagem HT1080 infectada com o lentivírus que superexpressa Lgr5.

Realizamos o teste de implante dessas populações positivas e negativas de Lgr5. Para isso utilizamos animais *Balb/c Nude* e foram implantados  $1 \times 10^6$  células em ressuspendidas em  $200 \mu\text{L}$  de PBS em cada animal, sendo para o grupo de células HT1080 positivas 10 animais e para o grupo de células negativas 10 animais. Após 10 a 13 dias do implante, foi possível observar o crescimento tumoral de todos os animais da população positiva. Já na população negativa, houve crescimento tumoral em apenas 7 animais. Baseado nas evidências da literatura, quando há superexpressão de Lgr5, há também um pior prognóstico tumoral, então, acreditávamos que não haveria crescimento tumoral nessa população negativa, ou que fosse possível identificarmos um crescimento mais lento dos tumores.



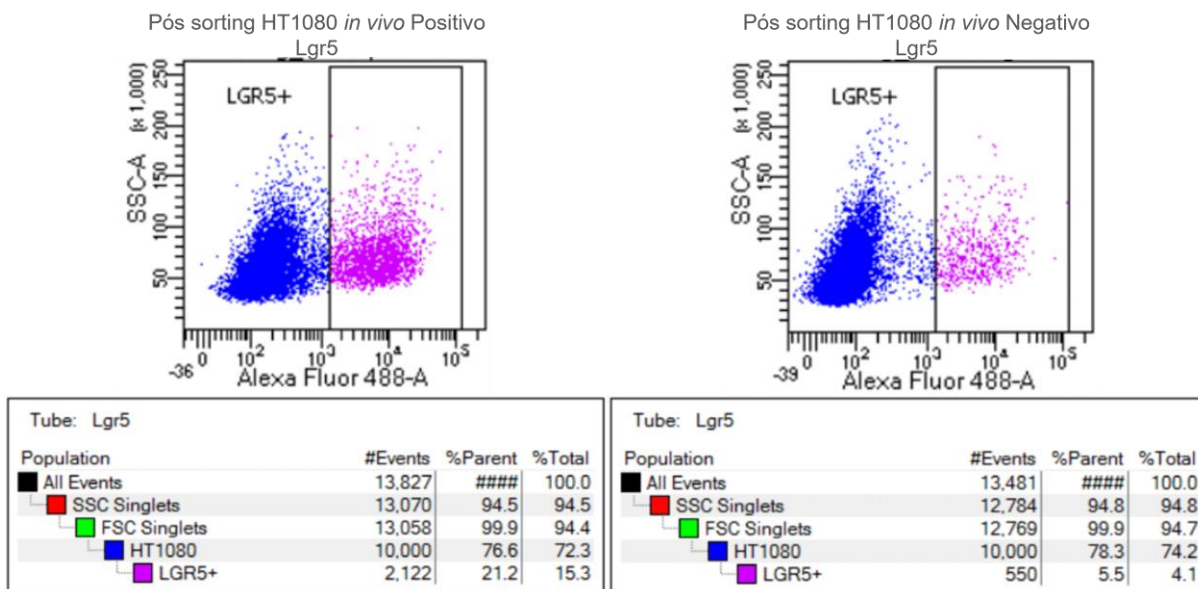
**Legenda:**  $1 \times 10^6$  células foram inoculadas no flanco direito de animais imunodeficientes *Nudes* (10 animais por grupo). Durante o experimento ocorreu o óbito de 1 animal que não foi relacionado ao crescimento da célula, esse animal foi eliminado da análise.

**Figura 27** - Crescimento tumoral *in vivo* da linhagem HT1080 Lgr5+ e Lgr5-.

Após a remoção dos tumores, foram feitos ensaios de citometria de fluxo para avaliar a expressão de Lgr5. Curiosamente, observamos a expressão da proteína nos tumores de ambos os grupos (**Figura 28**), esse resultado sugere que a expressão da proteína transduzida pode ser modulada por mecanismos que precisamos explorar.

Esse resultado motivou a interrupção dos ensaios *in vivo* até que consigamos determinar o mecanismo pelo qual a expressão da proteína está sendo controlada. Novas citometrias e *sortings* foram realizados com células HT1080 de várias origens: 1- células *näive*, 2- células transduzidas, 3- células transduzidas derivadas imediatamente após a remoção dos tumores *in vivo* (frescas) e 4- células transduzidas removidas dos tumores *in vivo* e sub-cultivadas. Tentamos analisar todas as possibilidades para que encontrássemos uma situação em que, de fato, a expressão de Lgr5 se mostrasse estável e não conseguimos. Todas as citometrias indicavam que a expressão da proteína se altera de forma substancial em todos os cenários.

Nas atuais condições para avaliar a função de Lgr5 na biologia de sarcomas de parte moles, o papel da mesma no crescimento tumoral *in vivo* só seria possível através de um *cell sorting* de uma grande quantidade de células (entre  $1$  a  $5 \times 10^7$  células) para que as populações Lgr5+ e - pudessem ser inoculadas imediatamente após o *sorting*, nessa condução a nossa hipótese é de que as células Lgr5- teriam menor capacidade de formar tumores (*seeding*) quando comparadas com a população positiva.



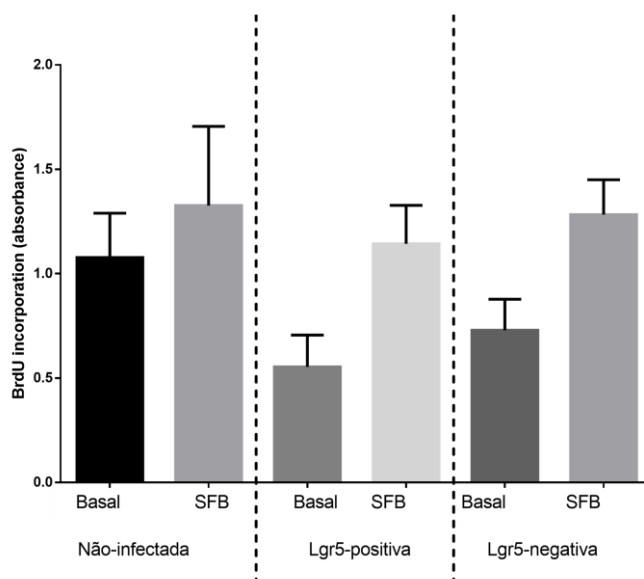
**Legenda:** As células foram analisadas e separadas no BD FACS Canto II e os dados processados pelo software FlowJo.

**Figura 28** - Análise por Citometria de fluxo da expressão dos grupos Lgr5<sup>+</sup> e Lgr5<sup>-</sup> dos camundongos pós ressecção tumoral.

Apesar das dificuldades em obter populações com expressão estável de Lgr5, realizamos ensaios de proliferação com as células Lgr5<sup>+</sup> e Lgr5<sup>-</sup>. A proliferação foi avaliada através de experimentos de incorporação de BrdU (Cell Signaling, BrdU cell Proliferation kit).

Diversas populações foram testadas, HT1080 selvagem (WT); HT1080 Lgr5<sup>+</sup>; HT1080 Lgr5<sup>-</sup>; HT1080 Lgr5<sup>+</sup> *in vivo* (oriundas de cultura primária de tumores que cresceram nos animais inoculados com as células Lgr5<sup>+</sup>) e HT1080 Lgr5<sup>-</sup> *in vivo* (oriundas de cultura primária de tumores que cresceram nos animais inoculados com as células negativas).

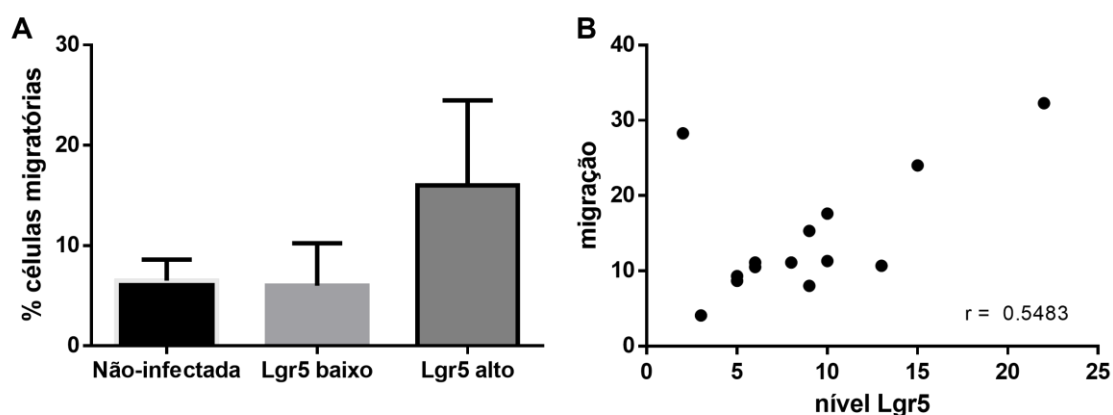
Não foi possível observar crescimento homogêneo no transcorrer de todo o experimento, com isso, houve dificuldades de concluirmos e estabelecermos alguns parâmetros analisados com este ensaio, bem como a identificação das células apresentarem diferenças na expressão da proteína, gerando incertezas em afirmar que as células estavam mantendo os níveis da proteína ao longo dos 3 ou 4 dias de ensaio de proliferação.



**Legenda:** Ensaio de proliferação utilizando o protocolo descrito no item 3.12 deste trabalho.  $n=4$ .

**Figura 29** - Avaliação do efeito da expressão de Lgr5 sobre a proliferação de células HT1080.

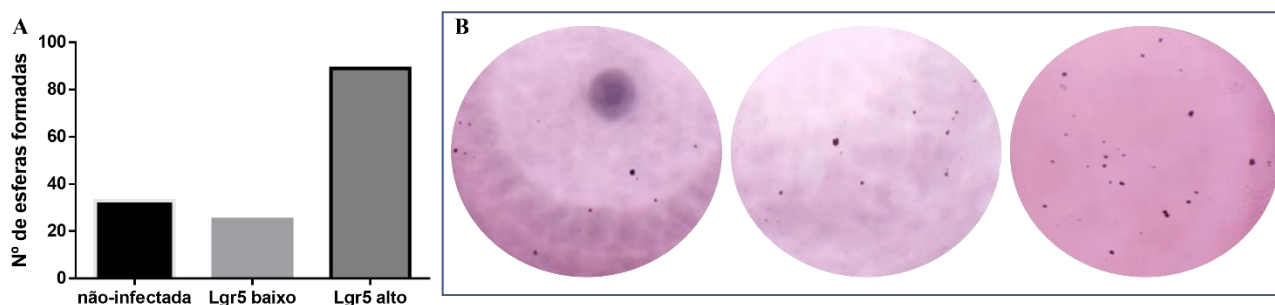
Optamos em fazer ensaios onde as células seriam desafiadas por tempos mais curtos, como no ensaio de migração. Nestes ensaios, as células foram plaqueadas nos transwell e, paralelamente, foram analisadas por citometria de fluxo. Neste ensaio foram utilizadas células pós-sorting congeladas, células pós-sorting que foram inoculadas e sub-cultivadas, pós-sorting sub-cultivadas por 1 passagem, pós-sorting inoculadas e que geraram tumores. Todas essas condições foram plaqueadas para os ensaios de migração e analisadas por citometria de fluxo. Foram consideradas no ensaio somente a migração das células com maior e menor positividade para Lgr5 (**Figura 30**).



**Legenda:** A. Comparação do perfil de migração entre células HT1080 não infectadas, com baixa e alta expressão de Lgr5,  $N = 2$ . B. Correlação entre os níveis de expressão de Lgr5 e a porcentagem de células que migraram.

Neste ensaio, foram avaliadas células não infectadas, células pós-sorting congeladas, células pós-sorting que foram inoculadas e sub-cultivadas, pós-sorting sub-cultivadas por 1 passagem, pós-sorting inoculadas e que geraram tumores. O valor de expressão de Lgr5 obtido por citometria de fluxo foi correlacionado com a capacidade migratória das células,  $p = 0.02$ .

**Figura 30** - Efeito da expressão de Lgr5 sobre a migração de células HT1080.



**Legenda:** A: As células foram cultivadas na densidade de 200 células por poço durante 17 dias. B: Imagens representativas das esferas geradas. A formação de esferas foi quantificada por microscopia. Imagens Dados:  $n=3$  com 200 células plaqueadas por poço. Espera-se que na condição de esfera, o máximo de esferas formadas corresponda com o mesmo número de células plaqueadas.

**Figura 31** - Avaliação do efeito de Lgr5 sobre a capacidade de auto-renovação de células HT1080.

Resumidamente, os resultados *in vitro* sugerem que o receptor Lgr5 está envolvido em múltiplos processos tumorais. Apesar de preliminares, os resultados nos permitem associar a função da proteína com os processos de migração celular, auto-renovação e proliferação pois, como pode ser observado nas figuras 30 e 31, é possível afirmar que quanto maior a expressão de Lgr5 nas células, maior a capacidade de elas migrarem e auto-renovação. Experimentos adicionais serão necessários para confirmar estas relações, mas é importante destacar que estas evidências corroboram os resultados obtidos com o TMA dos pacientes e também com os achados oriundos do TCGA aos quais apresentam o papel da proteína na tumorigênese de sarcomas de partes moles pois, pacientes que superexpressam a proteína terá um pior prognóstico.

#### 4.5 Criação da plataforma de estudos baseados em patient-derived xenografts

Um total de 70 pacientes foram selecionados para este trabalho, 33 geraram PDX. Um TMA com os 33 tumores humanos e seus respectivos PDX foi confeccionado e caracterizado,



seguindo os mesmos protocolos descritos anteriormente. A expressão de Lgr5 foi avaliada juntamente com o resultado de expressão das amostras dos pacientes que geraram PDX e o TMA do dos pacientes adicionados no Registro Institucional de Sarcomas de partes moles.

A **Tabela 4** apresenta todos os casos coletados e a frequência de obtenção de PDX. Das 70 amostras coletadas para o estudo, 9 apresentaram ausência de neoplasia após a emissão do laudo histopatológico e 3 eram de baixo grau (grau histológico 1); destes, não foi possível observar crescimento tumoral em nenhum caso. Do total, 24 pacientes realizaram tratamento neoadjuvante, onde 2 foram classificados como tumores de baixo grau e 13 destes 24 que realizaram neoadjuvância não tiveram crescimento tumoral, ou seja, não deram origem a PDX.

**Tabela 4 - Características clínicas e patológicas de pacientes com SPM.**

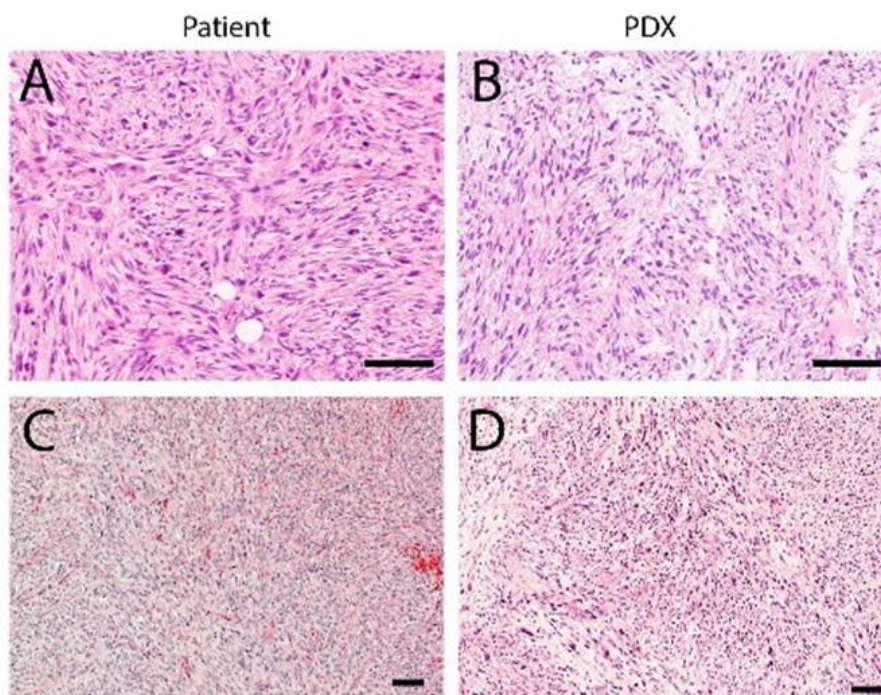
		Gerou PDX?		
		Sim	Não	TOTAL
<b>Gênero</b>	Masculino	15	14	29
	Feminino	18	23	41
	<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>37</b>	<b>70</b>
<b>Neoadjuvância</b>	Sim	10	14	24
	Não	23	23	46
	<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>37</b>	<b>70</b>
<b>Idade (anos)</b>	Mediana	48 (1 - 91)	48,5 (8 - 76)	48 (1 - 91)
<b>Tempo</b>	Média	4,65	n.a.	n.a.
<b>crescimento</b>	Mínimo	0,1	n.a.	n.a.
	Máximo	12	n.a.	n.a.
<b>Subtipo</b>	Lipossarcoma (todos)	7	16	23
	Indiferenciado Pleomófico fusocelular	9	4	13
	Leiomiossarcoma	4	4	8
	Rabdomiossarcoma (todos)	5	0	5
	Tumor fibroso solitário	1	1	2
	Mixofibrossarcoma	2	1	3
	Condrossarcoma	1	1	2
	Tumor desmoplásico células redondas pequenas	1	1	2
	Sarcoma Alveolar	0	2	2
	Mioepitelioma	1	0	1
	Sarcoma Histiocítico	0	1	1
	Osteocondroma	0	1	1
	Ewing	0	1	1
	Lipoma	0	1	1
	Tumor maligno da bainha neural	0	1	1
	Fibrossarcoma	0	1	1
Sinonasal bifenotípico	1	0	1	

	Sarcoma Sinovial	1	0	1
	Sarcoma de Kaposi	0	1	1
	<b>TOTAL</b>	33	37	70
<b>Sítio anatômico</b>	Extremidades	16	15	31
	Retroperitônio	12	17	29
	Cabeça e pescoço	2	1	3
	Tórax	3	4	7
	<b>TOTAL</b>	33	37	70

Com essas variáveis, que podem ser consideradas obstáculos para a pega dos tumores nos animais, obtivemos uma taxa global de crescimento de 49,2%. Agora se avaliarmos somente os pacientes que não fizeram tratamento neoadjuvante e excluirmos os de baixo grau, obtivemos uma taxa global de crescimento de 73%.

É sabido que o tratamento com quimioterapia pode selecionar os clones tumorais mais resistentes o que pode aumentar muito os índices de pega, mas nos casos destacados acima, aos quais os pacientes realizaram tratamento neoadjuvante (quimioterapia e radioterapia) podemos constatar a pós a confecção de bloco e lâminas, HE e análise histológica desse material coletado que os fragmentos coletados tinham em sua maioria a presença de muita necrose, poucas células viáveis e, por isso, não é possível correlacionar com a resistência após tratamento.

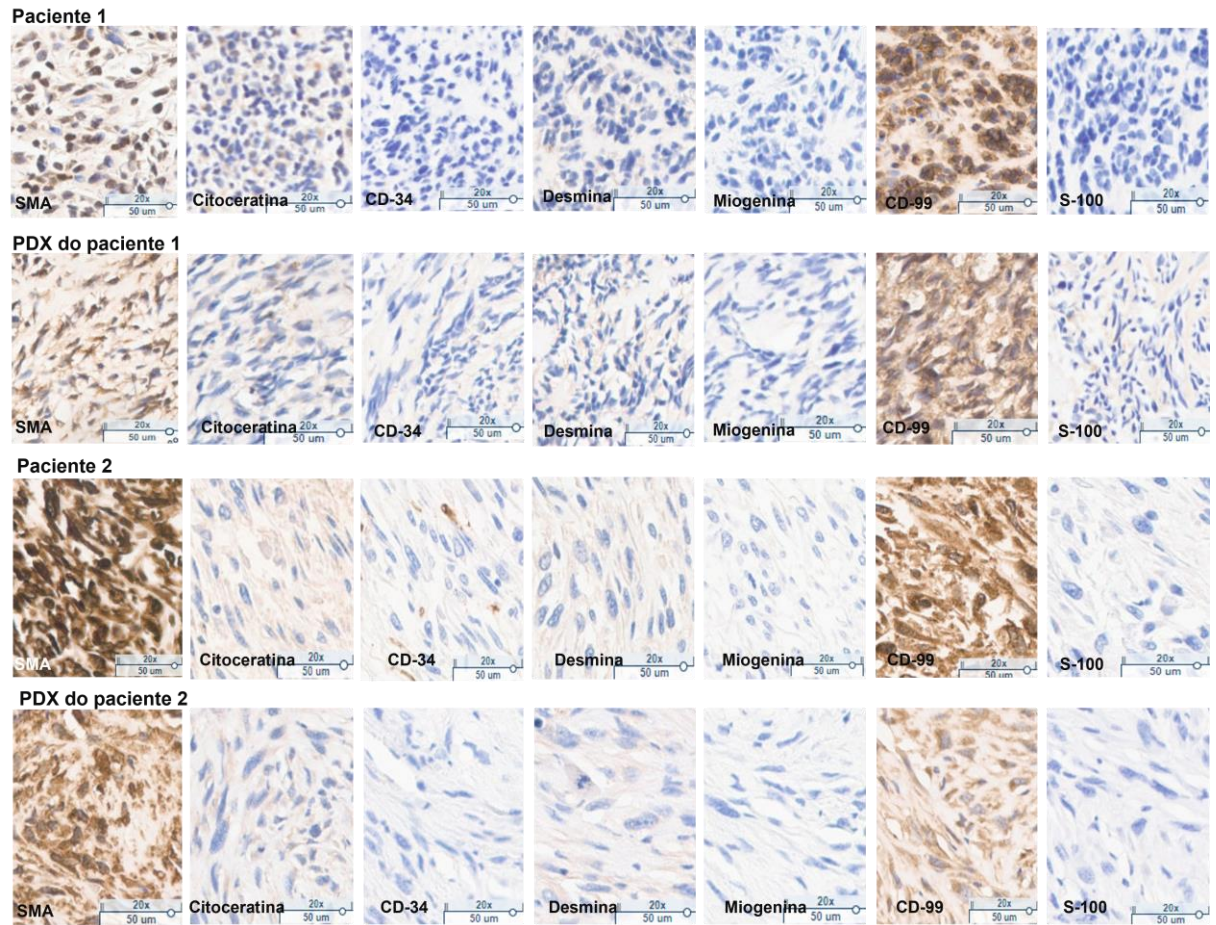
Dentre os PDX gerados, destacamos o de um sarcoma fusocelular indiferenciado de corpo cavernoso (pênis), o primeiro a ser estabelecido. Trata-se de um sarcoma de alto grau de um paciente de 52 anos que apresentou uma lesão de crescimento progressivo na base do pênis (corpo cavernoso). A **Figura 34** ilustra a caracterização por imuno-histoquímica do tumor do paciente e do PDX gerado, também foram obtidos organoides desse tumor.



**Legenda:** Coloração com hematoxilina e eosina. (A e B) tumor primário do paciente (esquerda) e o PDX gerado do mesmo paciente (direita). A: sarcoma fusocelular pleomórfico de alto grau de região inguinal paciente atendido no A. C. Camargo Cancer Center; B: sarcoma fusocelular pleomórfico de alto grau de região inguinal PDX gerado. C: sarcoma fusocelular de alto grau de pênis paciente e D: sarcoma fusocelular de alto grau de pênis PDX (dados da literatura).

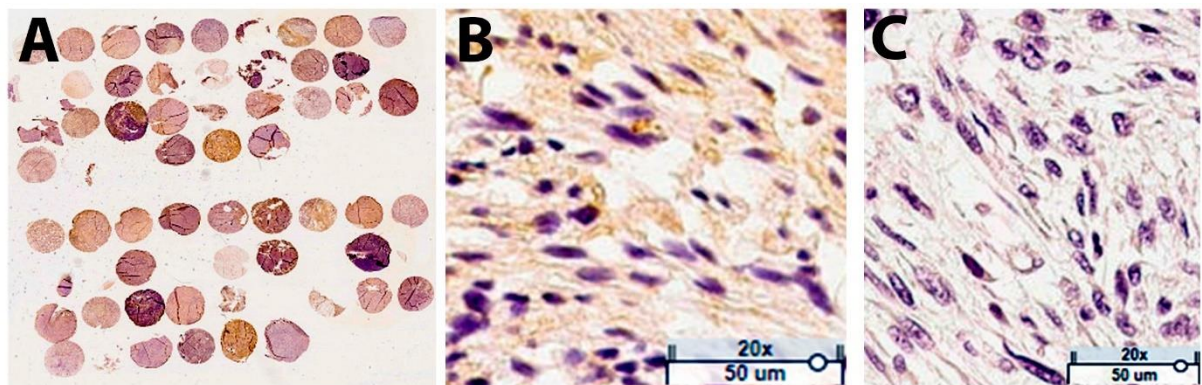
**Figura 32** -Geração de PDX de sarcomas de partes moles.

Uma caracterização por imunohistoquímica dos principais marcadores para diagnóstico de SPM (Desmina, Citoceratina, CD34, CD99, Miogenina e S-100) foi realizado de todos os casos que geraram PDX e que foram incluídos no TMA tanto de pacientes quanto no TMA de PDX.



**Legenda:** Representação da caracterização por imunohistoquímica de 2 casos incluídos no TMA do Registro prospectivo. Verificando a marcação positiva para SMA e CD-99 e negativa para Citoceratina, CD-34, Desmina, Miogenina e S-100. Paciente 1: Rbdomiossarcoma de alto grau; PDX do paciente 1: Respectivo Rbdomiossarcoma de alto grau gerado a partir do xenoinxerto do tumor do paciente 1; Paciente 2: Sarcoma fusocelular e pleomórfico de alto grau; PDX do paciente 2: Respectivo Sarcoma fusocelular e pleomórfico de alto grau gerado a partir do xenoinxerto do tumor do paciente 2. Imagens constante no TMA confeccionado e obtidas a partir do Aperio em aumento de 20x.

**Figura 33** -Imunohistoquímica comparativa entre Paciente e seus PDX gerados.



**Legenda:** A: Imagem representativa da vista geral do TMA mostrando a heterogeneidade da marcação de Lgr5 nos diferentes casos de PDX dos SPM. B: Imagem representativa de um Sarcoma (Leiomiiossarcoma de alto grau

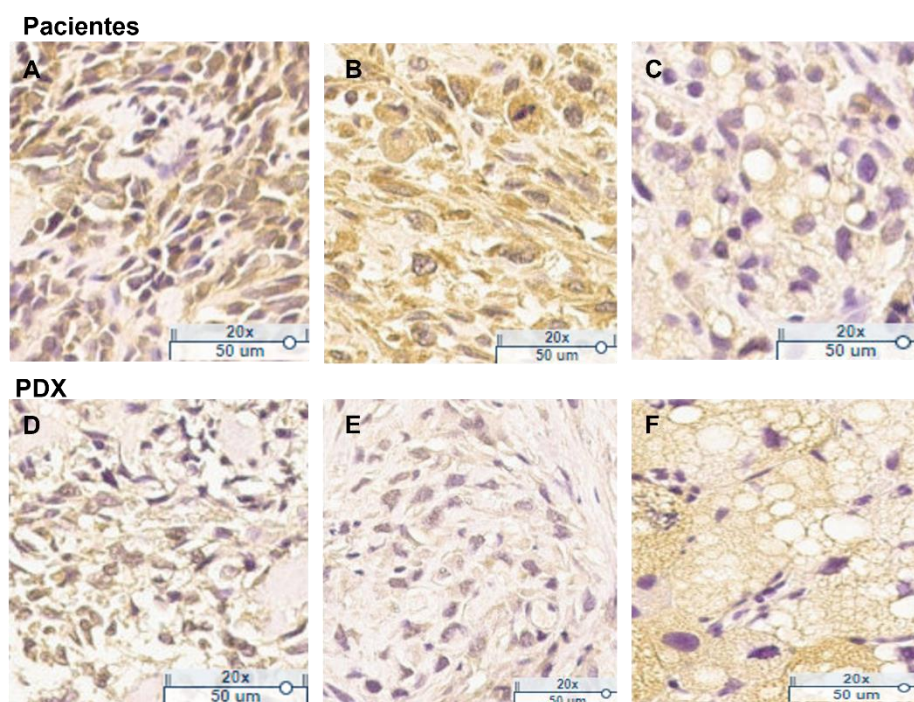
*h-score*= 10) com baixa expressão de Lgr5 e C: Imagem representativa de um Condrossarcoma que não expressa Lg5.

**Fonte:** Imagem retirada do Aperio, sistema de digitalização das lâminas de imunohistoquímica.

**Figura 34** -Expressão de Lgr5 em PDX derivados de paciente com SPM.

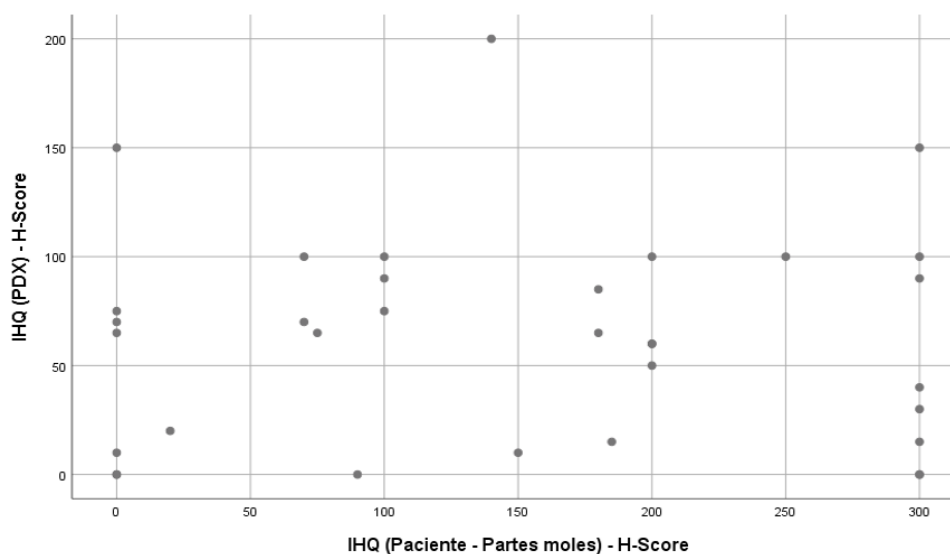
Também foi realizada a avaliação por imunohistoquímica da expressão de Lgr5 nos PDX para investigarmos se o padrão de marcação permanece o mesmo. As **Figuras 35 e 36** mostram que há diferença de intensidade de marcação entre os pacientes comparados aos seus respectivos PDX gerados.

De acordo com os dados obtidos *in vitro* e *in vivo* com a célula HT1080, isso não deixa de ser um resultado surpreendente, pois os nossos dados sugerem que a expressão de Lgr5 pode ser modulada até nas células que superexpressam a proteína.



**Legenda:** Imagens representativas da marcação para Lgr5. Imagens constante no TMA confeccionado e obtidas a partir do Aperio em aumento de 20x. Dados dos Pacientes: A – Rbdomiossarcoma de alto grau, H-score: 70; B – Sarcoma fusocelular e pleomórfico de alto grau, H-score: 300; C – Lipossarcoma pleomórfico de alto grau, H-score: 140. Dados dos PDX: D - Rbdomiossarcoma de alto grau, H-score: 100; E – Sarcoma fusocelular e pleomórfico de alto grau, H-score: 90; F – Lipossarcoma pleomórfico de alto grau, H-score: 200

**Figura 35** -Imunohistoquímica comparativa entre Paciente e seus PDX gerados de Lgr5.



**Fonte:** Análise estatística realizada pela Core Facility da Instituição.

**Figura 36** - Correlação entre o H-score de Lgr5 obtidos em amostras dos PDX vs. Seus respectivos pacientes.

O estabelecimento da plataforma de PDX para sarcomas foi bem-sucedido. Hoje, dispomos de mais trinta casos que se encontram criopreservados e prontos para serem utilizados em projetos que busquem investigar aspectos da biologia destes tumores e também para o desenvolvimento e triagem de novos/reposicionamento de fármacos. Para este projeto, temos como expectativa utilizar PDX com diferentes padrões de expressão de Lgr5 para complementar os ensaios realizados com linhagens comerciais. Importante salientar, que a plataforma de PDX também é uma fonte para estabelecimento de outras abordagens que necessitem de células de pacientes, especialmente para desenvolvimento de organoides, metodologia que ainda necessita de avanços dentro da área de sarcomas.

## DISCUSSÃO

Os sarcomas de partes moles são responsáveis por apenas 1% de todos os tumores em adultos. Por isso, gerar evidências que traga uma maior compreensão e tratamentos mais eficazes é um grande desafio (Gamboa et al., 2020).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) não dispõe de estimativas para esses tumores. Entretanto, segundo o DATASUS (2022), em 2021 foram diagnosticados 10.571 novos casos de neoplasia maligna de tecido conjuntivo e de outros tecidos moles (Tabnet DATASUS, 2022).

Sendo assim, a criação de um Registro de Sarcomas é de fato um grande avanço para a possibilidade de novas pesquisas e descobertas para esse tumor raro mas que tem acometido muitas pessoas em todo o mundo.

Estima-se que o número de casos de sarcomas (de baixo e alto grau) que foram diagnosticados e tratados no A.C. Camargo Cancer Center pode ultrapassar 20 mil desde a sua criação, um número expressivo frente a outras instituições no mundo, além do que, no Brasil, são poucas Instituições que têm disponível ferramentas como o registro contendo informações clínicas demográficas e histopatológicas, pode trazer protagonismo nos estudos que orientam decisões em prevenção, diagnóstico e tratamento. Além disso, como discutido anteriormente, os sarcomas são neoplasias nas quais o conhecimento molecular ainda é escasso quando comparado com outros tipos tumorais e as informações moleculares ainda são pouco impactantes em termos de implicações terapêuticas (Aguilar et al., 2010; da Cunha et al., 2012). Portanto, com a criação do Registro Institucional foi e será possível a realização de novos estudos para o entendimento da biologia tumoral, identificação de características moleculares que possam prever desfechos clínicos, melhores escolhas de tratamento e identificação de novos alvos moleculares.

Os modelos animais (PDX) para pesquisa de câncer são essenciais, pois retêm principalmente as principais características histológicas e genéticas do tumor do paciente e geralmente permanecem estáveis ao longo das passagens, permitindo explorar a individualidade e heterogeneidade de tumores em pacientes e estudar suas características únicas, incluindo a imprevisibilidade da progressão tumoral (Aparicio et al., 2015b). Os PDX demonstraram ser preditivos de resultados clínicos e são usados para avaliação pré-clínica de medicamentos, identificação de novos biomarcadores (Hidalgo et al., 2014; Jung et al., 2018; Rivera et al., 2021).

A confecção deste registro de xenoinxertos é uma plataforma valiosa para identificar novos biomarcadores e novos alvos, para avaliar a resposta à terapia e os mecanismos de resistência tumoral a drogas.

O nosso registro hoje conta com 33 PDX estabelecidos, com a obtenção de uma taxa global de crescimento de 73%. Muito condizente com o que a literatura traz (cerca de 76%) (Lu et al., 2018; Stebbing et al., 2014) com a diferença da grande variedade de subtipos tumoral que pudemos ter acesso e fazem parte deste trabalho.

Os tumores de pênis são, em sua grande maioria, pertencentes ao grupo dos carcinomas de células escamosas, um tipo de tumor raro, mas com maior incidência em países em desenvolvimento como o Brasil (Guimarães et al., 2009). Sarcomas de pênis são ainda mais raros e de pior prognóstico (Compérat, 2018; Rajan, 2016). O PDX de um sarcoma de pênis foi o primeiro a ser estabelecido. Trata-se de um sarcoma fusocelular de alto grau de um paciente de 52 anos que apresentou uma lesão de crescimento progressivo na base do pênis (corpo cavernoso). Para esse tumor e PDX gerados especificamente, está sendo desenvolvido um manuscrito para descrever e apresentar a caracterização celular e molecular desse subtipo tão raro.

As aplicações para este modelo são variadas dentro do campo da medicina de precisão. Podemos utilizar os PDOs para aprofundar o conhecimento em alterações moleculares, identificar novos possíveis biomarcadores e também realizar ensaios de sensibilidade a drogas, além claro, do modelo PDX (Maier et al., 2021; Rae et al., 2021). Em todos os casos a obtenção dos organoides foi excelente. Já para o sequenciamento do exoma, o primeiro nível de análise realizado envolveu a cobertura de algumas amostras e verificamos que amostras, incluindo o conjunto de amostra do paciente e PDX do Sarcoma de pênis, tiveram coberturas muito baixas e, portanto, foram descartadas das análises posteriores. Ainda precisam de maiores análises.

Os PDX gerados mostraram ser semelhantes aos tumores humanos pois apresentaram as mesmas características histológicas, porém a expressão de Lgr5 evidenciou diferenças. Isso não invalida o modelo, mas indica que a proteína pode ser determinante para crescimento ou também pode indicar que a diferença na expressão possa ser explicada por diferentes evoluções clonais, onde uma população de células do sarcoma que estava pouco representada no tumor do paciente, pode ter crescido de forma predominante no animal.

O receptor Lgr5 impactou sobremaneira o desenvolvimento de modelos celulares em carcinoma colorretal e propiciou um grande salto na compreensão dos mecanismos associados à tumorigênese intestinal (Barker et al., 2010; de Lau et al., 2014; Sato & Clevers, 2013). Há também evidências da superexpressão de Lgr5 no câncer de mama, sendo associada com a



promoção da mobilidade celular, formação de tumores e transição epitélio-mesênquima, através da ativação da via Wnt /  $\beta$ -catenina (Trejo et al., 2017; Yang et al., 2015).

Em se tratando dos SPM, ainda são muito escassos os estudos baseados na progressão, agressividade associados com o Lgr5. Existem estudos evidenciando que os tumores que expressam Lgr5 podem ter a capacidade de maior progressão e invasão, com isso maior poder metastático (Liu et al., 2018). Mas a literatura mostra em tumores colorretais metastáticos com Lgr5 + que estes não possuem capacidade de invasão e migração tão eficiente como as células Lgr5- desses tumores (Fumagalli et al., 2020; Zhou et al., 2017). Essas constatações reforçam os resultados obtidos no trabalho. Os gráficos de sobrevida global, analisados de acordo com a expressão de Lgr5, em pacientes não metastáticos ao diagnóstico, mostraram que a superexpressão da proteína leva a um pior prognóstico, ou seja, o paciente tem uma sobrevida menor. Já se compararmos o gráfico de sobrevida livre de doença, ou o poder metastático tumoral, pacientes metastáticos ao diagnóstico, a hipótese de que quanto menor for a expressão de Lgr5 mais poder metastático o tumor irá possuir. A possibilidade é que em pacientes já com alto grau da doença, ou já metastatizados, a proteína pode não ter função. Mas mais estudos nesse sentido precisam ser avaliados, uma vez que os dados obtidos não foram bem descritos e estabelecidos na literatura para SPM, somente para outros tipos tumorais. Além disso, outros experimentos realizados, como é o caso dos ensaios de migração e formação de esferas, sugerem que as células com maior expressão de Lgr5, têm uma maior capacidade de migração e formação de esferas, reforçando ainda mais o potencial de formação e agressividade tumoral e a superexpressão de Lgr5 (Leung et al., 2020; Zhou et al., 2017).

Um outro estudo, analisou um outro tipo de tumor, os gliomas. A recorrência deste tipo tumoral e o pior prognóstico, está intimamente ligado às células-tronco do glioma e à transição epitélio-mesênquima. No entanto, os mecanismos entre eles permanecem desconhecidos. Por isso a investigação do papel do Lgr5 nesse tipo tumoral. As células Lgr5+ possuíam propriedades de *stemness* mais fortes em comparação com as células Lgr5-. Tanto a diminuição da expressão de Lgr5 quanto de Wnt-C59 reduziram a invasão e migração do tumor e bloquearam a transição epitélio-mesênquima, inibindo a via Wnt/ $\beta$ -catenina *in vitro* e suprimiram o crescimento do xenoinxerto ortotópico intracraniano, prolongando a sobrevida dos camundongos. Podendo sugerir que pacientes diagnosticados com glioma e com uma alta expressão de Lgr5 apresentaram prognóstico significativamente pior (Zhang et al., 2018).

Além disso, quando analisamos os SPM, um estudo realizado em 2011, demonstrou que baixo nível de expressão de mRNA Lgr5/GPR49 é um pior marcador prognóstico para a sobrevida livre de recorrência (Rot et al., 2011).

Essas evidências corroboram com a análise já realizada anteriormente de sobrevida livre de doença, onde foi possível observar uma inversão na curva, o que pode estar relacionado com o fato de que células Lgr5<sup>-</sup> têm a capacidade intrínseca de restabelecer a hierarquia celular, e, conseqüentemente, podem ter um deslocamento e velocidade ligeiramente maiores do que as células Lgr5<sup>+</sup> por estarem em um estado mais diferenciado.

Outra constatação que foi observada é a capacidade de regulação de Lgr5 durante as passagens em cultura. As populações separadas por *cell sorting*, tanto negativa quanto positiva sofrem um processo compensatório de expressão no decorrer das passagens dos cultivos celulares. Acreditamos que isso se dá pela metilação do DNA em casos de infecção lentiviral que também pode ser afetada por heterogeneidade do ambiente genético (K. H. Choi et al., 2013; Hofmann et al., 2006).

Com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que a construção RIRSPM é um grande passo para o melhor entendimento da biologia dos Sarcomas, além da possibilidade de estudar novos alvos terapêuticos desse tumor raro, uma vez que os estudos e artigos científicos ainda são muito escassos.

A geração dos modelos PDX de Sarcomas de partes moles foi uma estratégia implantada muito bem executada com a geração de 33 PDX de diversos subtipos histológicos.

Essa tese traz um conteúdo muito rico no que se refere a diversidade de técnicas e abordagens para se alcançar resultados com grande potencial de contribuir com o avanço no tratamento dessa doença.

Em se tratando da proteína Lgr5, os dados obtidos nesse estudo, mostraram que a expressão da proteína está relacionada ao pior prognóstico, corroborando as análises realizados com o TCGA. Uma vez que, quanto maior a expressão de Lgr5 menor é a sobrevida global. Além disso, as células tumorais de Sarcomas são dependentes da expressão de Lgr5 para migrarem mais ou menos, e com isso, o poder de formação de esferóides também é dependente da sua expressão. Apesar de a proteína Lgr5 ser um alvo terapêutico muito promissor, os estudos dessa proteína nos Sarcomas de partes moles ainda precisam ser mais aprofundados, devido aos mecanismos compensatórios sugestivos do poder de metilação estarem ligados a uma tentativa celular de regulação da proteína, não sendo possível concluir as análises *in vivo* de geração de tumores que superexpressam a proteína Lgr5.

Poucos estudos trazem um melhor conhecimento e compreensão da biologia de Sarcomas de partes moles, principalmente em se tratando da proteína Lgr5, muito bem estabelecida em outros tipos tumorais, mas em Sarcomas os estudos ainda são muito escassos.

Por isso esse trabalho pode contribuir para uma melhor compreensão e para possíveis novos alvos terapêuticos para os Sarcomas de partes moles.

## 5. CONCLUSÕES

- O Registro Institucional de Sarcomas foi criado e, no momento, contém informações clínicas e demográficas de aproximadamente 400 pacientes. O registro também contém um TMA com 200 casos, com histologia revisada de diversos subtipos.
- A plataforma de estudos pré-clínicos baseada em *patient-derived xenografts* foi estabelecida e contém 33 modelos de sarcomas que apresentam semelhanças morfológicas
- Pacientes com sarcomas de partes moles que apresentam alta expressão de Lgr5 mostraram uma menor sobrevida global. Em se tratando da sobrevida livre de doença aparentemente tem comportamento contrário e precisa ser melhor investigada.
- Os resultados preliminares indicam que Lgr5 atua em processos relacionados à migração celular e a auto-renovação, processos estes que são fundamentais para a biologia tumoral. Estes achados sugerem que esta proteína pode ser um alvo terapêutico para sarcomas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeshouse, A., Adebamowo, C., Adebamowo, S. N., Akbani, R., Akeredolu, T., Ally, A., Anderson, M. L., Anur, P., Appelbaum, E. L., Armenia, J., Auman, J. T., Bailey, M. H., Baker, L., Balasundaram, M., Balu, S., Barthel, F. P., Bartlett, J., Baylin, S. B., Behera, M., ... Zmuda, E. (2017a). Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell*, *171*(4), 950-965.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.014>.

Abeshouse, A., Adebamowo, C., Adebamowo, S. N., Akbani, R., Akeredolu, T., Ally, A., Anderson, M. L., Anur, P., Appelbaum, E. L., Armenia, J., Auman, J. T., Bailey, M. H., Baker, L., Balasundaram, M., Balu, S., Barthel, F. P., Bartlett, J., Baylin, S. B., Behera, M., ... Zmuda, E. (2017b). Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell*, *171*(4), 950-965.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.014>.

*About Soft Tissue Sarcoma.* (n.d.-a).

Agaram, N. P. (2019). Update on Myogenic Sarcomas. In *Surgical Pathology Clinics* (Vol. 12, Issue 1, pp. 51–62). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.path.2018.10.003>

Aguiar Junior, S., Ferreira, F. de O., Rossi, B. M., Santos, É. M. M., Salvajoli, J. V., & Lopes, A. (2009a). Neoadjuvant chemoradiation therapy for soft tissue sarcomas of the extremities. *Clinics*, *64*(11), 1059–1064. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322009001100005>

Aguiar Junior, S., Ferreira, F. de O., Rossi, B. M., Santos, É. M. M., Salvajoli, J. V., & Lopes, A. (2009b). Neoadjuvant chemoradiation therapy for soft tissue sarcomas of the extremities. *Clinics*, *64*(11), 1059–1064. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322009001100005>

Aguiar, S., da Cunha, I. W., & Lopes, A. (2010). Genomic expression, chemotherapy response, and molecular targets in soft tissue sarcomas of the extremities: Promising strategies for treatment selection. *Journal of Surgical Oncology*, *101*(1), 92–96. <https://doi.org/10.1002/jso.21422>

Aparicio, S., Hidalgo, M., & Kung, A. L. (2015a). Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nature Reviews Cancer*, *15*(5), 311–316. <https://doi.org/10.1038/nrc3944>

Ayodele, O., & Abdul Razak, A. R. (2020). Immunotherapy in soft-tissue sarcoma. In *Current Oncology* (Vol. 27, pp. 17–23). Multimed Inc. <https://doi.org/10.3747/co.27.5407>.

Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H. J., van Es, J. H., Sato, T., Stange, D. E., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., van den Brink, S., Korving, J., Abo, A., Peters, P. J., Wright, N., Poulsom, R., & Clevers, H. (2010). Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. *Cell Stem Cell*, *6*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.013>.

Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., Wilson, C. J., Lehár, J., Kryukov, G. v., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M. F., Monahan, J. E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A., Jané-Valbuena, J., ... Garraway, L. A. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, *483*(7391), 603–607. <https://doi.org/10.1038/nature11003>.

Barretina, J., Taylor, B. S., Banerji, S., Ramos, A. H., Lagos-Quintana, M., Decarolis, P. L., Shah, K., Socci, N. D., Weir, B. A., Ho, A., Chiang, D. Y., Reva, B., Mermel, C. H., Getz, G., Antipin, Y., Beroukhim, R., Major, J. E., Hatton, C., Nicoletti, R., ... Singer, S. (2010a). Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nature Genetics*, *42*(8), 715–721. <https://doi.org/10.1038/ng.619>.

Ben-David, U., Ha, G., Tseng, Y.-Y., Greenwald, N. F., Oh, C., Shih, J., McFarland, J. M., Wong, B., Boehm, J. S., Beroukhim, R., & Golub, T. R. (2017). Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nature Genetics*, *49*(11), 1567–1575. <https://doi.org/10.1038/ng.3967>.

Burningham, Z., Hashibe, M., Spector, L., & Schiffman, J. D. (2012). *The Epidemiology of Sarcoma*. <http://www.clinicalsarcomaresearch.com/content/2/1/14>.

Byrne, A. T., Alférez, D. G., Amant, F., Annibaldi, D., Arribas, J., Biankin, A. v., Bruna, A., Budinská, E., Caldas, C., Chang, D. K., Clarke, R. B., Clevers, H., Coukos, G., Dangles-Marie, V., Eckhardt, S. G., Gonzalez-Suarez, E., Hermans, E., Hidalgo, M., Jarzabek, M. A., ... Trusolino, L. (2017). Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nature Reviews Cancer*, *17*(4), 254–268. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.140>.

Carmon, K. S., Gong, X., Yi, J., Wu, L., Thomas, A., Moore, C. M., Masuho, I., Timson, D. J., Martemyanov, K. A., & Liu, Q. J. (2017). LGR5 receptor promotes cell-cell adhesion in stem cells and colon cancer cells via the IQGAP1-Rac1 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(36), 14989–15001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.786798>.

Choi, J. H., & Ro, J. Y. (2021). The 2020 WHO Classification of Tumors of Soft Tissue: Selected Changes and New Entities. In *Advances in Anatomic Pathology* (Vol. 28, Issue 1, pp. 44–58). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000284>.

Choi, K. H., Park, J. K., Kim, H. S., Uh, K. J., Son, D. C., & Lee, C. K. (2013). Epigenetic changes of lentiviral transgenes in porcine stem cells derived from embryonic origin. *PLoS ONE*, *8*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072184>.

Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, *17*(3), 313–319. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>.

Compérat, E. (2018). Pathology of Penile Cancer. *European Urology Supplements*, *17*(6), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2017.08.005>.

da Cunha, I. W., de Brot, L., Carvalho, K. C., Rocha, R. M., Fregnani, J. H., Falzoni, R., de Oliveira Ferreira, F., Júnior, S. A., Lopes, A., Muto, N. H., Reis, L. F. L., Soares, F. A., & Vassallo, J. (2012). Prognostication of Soft Tissue Sarcomas Based on Chromosome 17q Gene and Protein Status: Evaluation of TOP2A, HER-2/neu, and Survivin. *Annals of Surgical Oncology*, *19*(6), 1790–1799. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-2184-3>.

Davis, D. D. S. S. J. K. S. M. (2022). Fibrossarcoma. *Free Books & Documents*.

Day, C.-P., Merlino, G., & Van Dyke, T. (2015). Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges. *Cell*, 163(1), 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.068>.

de Lau, W., Peng, W. C., Gros, P., & Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: Regulator of Wnt signal strength. In *Genes and Development* (Vol. 28, Issue 4, pp. 305–316). <https://doi.org/10.1101/gad.235473.113>.

Demetri, G. D., von Mehren, M., Blanke, C. D., van den Abbeele, A. D., Eisenberg, B., Roberts, P. J., Heinrich, M. C., Tuveson, D. A., Singer, S., Janicek, M., Fletcher, J. A., Silverman, S. G., Silberman, S. L., Capdeville, R., Kiese, B., Peng, B., Dimitrijevic, S., Druker, B. J., Corless, C., ... Joensuu, H. (2002). Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate in Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors. *New England Journal of Medicine*, 347(7), 472–480. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020461>.

Domanski, H. A., & Walther, C. S. (2017). Skeletal-Muscle Tumors. In *Monographs in Clinical Cytology* (Vol. 22, pp. 71–79). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000475098>.

Doyle, L. A. (2014). Sarcoma classification: An update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer*, 120 (12), 1763–1774. <https://doi.org/10.1002/cncr.28657>.

Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F eds. World Health Organization classification of tumours of soft tissue and bone, 4th ed. Lyon: IARC Press, 2013. Fletcher CDM, B. J. H. P. M. F. (2013). WHO Classification of tumours of soft tissue and bone. *Lyon: International Agency for Research on Cancer.*, 5(4).

Fujii, M., & Sato, T. (2017). Defining the role of Lgr5+ stem cells in colorectal cancer: from basic research to clinical applications. *Genome Medicine*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0460-y>



Fumagalli, A., Oost, K. C., Kester, L., Morgner, J., Bornes, L., Bruens, L., Spaargaren, L., Azkanaz, M., Schelfhorst, T., Beerling, E., Heinz, M. C., Postrach, D., Seinstra, D., Sieuwerts, A. M., Martens, J. W. M., van der Elst, S., van Baalen, M., Bhowmick, D., Vriskoop, N., ... van Rheenen, J. (2020). Plasticity of Lgr5-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell*, 26(4), 569-578.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.02.008>.

Gamboa, A. C., Gronchi, A., & Cardona, K. (2020). Soft-tissue sarcoma in adults: An update on the current state of histiotype-specific management in an era of personalized medicine. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(3), 200–229. <https://doi.org/10.3322/caac.21605>.

Gandara, D. R., Mack, Philip. C., Bult, C., Li, T., Lara, P. N., Riess, J. W., Astrow, S. H., Gandour-Edwards, R., Cooke, D. T., Yoneda, K. Y., Moore, E. H., Pan, C., Burich, R. A., David, E. A., Keck, J. G., Airhart, S., Goodwin, N., de Vere White, R. W., & Liu, E. T. (2015). Bridging Tumor Genomics to Patient Outcomes Through an Integrated Patient-Derived Xenograft Platform. *Clinical Lung Cancer*, 16(3), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.clc.2015.03.001>.

Gao, H., Korn, J. M., Ferretti, S., Monahan, J. E., Wang, Y., Singh, M., Zhang, C., Schnell, C., Yang, G., Zhang, Y., Balbin, O. A., Barbe, S., Cai, H., Casey, F., Chatterjee, S., Chiang, D. Y., Chuai, S., Cogan, S. M., Collins, S. D., ... Sellers, W. R. (2015). High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nature Medicine*, 21(11), 1318–1325. <https://doi.org/10.1038/nm.3954>.

Garnett, M. J., Edelman, E. J., Heidorn, S. J., Greenman, C. D., Dastur, A., Lau, K. W., Greninger, P., Thompson, I. R., Luo, X., Soares, J., Liu, Q., Iorio, F., Surdez, D., Chen, L., Milano, R. J., Bignell, G. R., Tam, A. T., Davies, H., Stevenson, J. A., ... Benes, C. H. (2012). Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature*, 483(7391), 570–575. <https://doi.org/10.1038/nature11005>.

Garralda, E., Paz, K., López-Casas, P. P., Jones, S., Katz, A., Kann, L. M., López-Rios, F., Sarno, F., Al-Shahrour, F., Vasquez, D., Bruckheimer, E., Angiuoli, S. v., Calles, A., Diaz, L. A., Velculescu, V. E., Valencia, A., Sidransky, D., & Hidalgo, M. (2014).

Integrated Next-Generation Sequencing and Avatar Mouse Models for Personalized Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research*, 20(9), 2476–2484. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3047>.

Golan, H., Shukrun, R., Caspi, R., Vax, E., Pode-Shakked, N., Goldberg, S., Pleniceanu, O., Bar-Lev, D. D., Mark-Danieli, M., Pri-Chen, S., Jacob-Hirsch, J., Kanter, I., Trink, A., Schiby, G., Bilik, R., Kalisky, T., Harari-Steinberg, O., Toren, A., & Dekel, B. (2018). In Vivo Expansion of Cancer Stemness Affords Novel Cancer Stem Cell Targets: Malignant Rhabdoid Tumor as an Example. *Stem Cell Reports*, 11(3), 795–810. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.010>.

Guimarães, G. C., Cunha, I. W., Soares, F. A., Lopes, A., Torres, J., Chaux, A., Velazquez, E. F., Ayala, G., & Cubilla, A. L. (2009). Penile Squamous Cell Carcinoma Clinicopathological Features, Nodal Metastasis and Outcome in 333 Cases. *Journal of Urology*, 182(2), 528–534. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.04.028>.

Haibe-Kains, B., El-Hachem, N., Birkbak, N. J., Jin, A. C., Beck, A. H., Aerts, H. J. W. L., & Quackenbush, J. (2013). Inconsistency in large pharmacogenomic studies. *Nature*, 504(7480), 389–393. <https://doi.org/10.1038/nature12831>.

Hall, F., Villalobos, V., & Wilky, B. (2019). Future directions in soft tissue sarcoma treatment. In *Current Problems in Cancer* (Vol. 43, Issue 4, pp. 300–307). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2019.06.004>.

Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. v., Budinská, E., Byrne, A. T., Caldas, C., Clarke, R. B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G. M., Roman-Roman, S., Seoane, J., Trusolino, L., & Villanueva, A. (2014). Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discovery*, 4(9), 998–1013. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001>.

Hoffmann, J. (2014). Integrative oncology drug discovery accompanied by preclinical translational research as prerequisite for clinical development. In *Chinese Clinical Oncology* (Vol. 3, Issue 2). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3865.2014.05.09>.

Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Kabermann, A., Brem, G., Wolf, E., & Pfeifer, A. (2006). Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Molecular Therapy*, *13*(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.07.685>.

Hui, J. Y. C. (2016). Epidemiology and Etiology of Sarcomas. In *Surgical Clinics of North America* (Vol. 96, Issue 5, pp. 901–914). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2016.05.005>.

Hutchings, C. J., Koglin, M., Olson, W. C., & Marshall, F. H. (2017). Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 16, Issue 11, pp. 787–810). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.91>.

Impicciatore, G., Sancilio, S., Miscia, S., & di Pietro, R. (2010). Nutlins and Ionizing Radiation in Cancer Therapy. In *Current Pharmaceutical Design* (Vol. 16).

Italiano, A., Bellera, C., & D'Angelo, S. (2020). PD1/PD-L1 targeting in advanced soft-tissue sarcomas: A pooled analysis of phase II trials. *Journal of Hematology and Oncology*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00891-5>.

Jung, J., Seol, H. S., & Chang, S. (2018). The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research. In *Cancer Research and Treatment* (Vol. 50, Issue 1, pp. 1–10). Korean Cancer Association. <https://doi.org/10.4143/crt.2017.307>.

Kammerer-Jacquet, S. F., Thierry, S., Cabillic, F., Lannes, M., Burtin, F., Henno, S., Dugay, F., Bouzillé, G., Rioux-Leclercq, N., Belaud-Rotureau, M. A., & Stock, N. (2017). Differential diagnosis of atypical lipomatous tumor/well-differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma: utility of p16 in combination with MDM2 and CDK4 immunohistochemistry. *Human Pathology*, *59*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.08.009>.

Kohashi, K., Kinoshita, I., & Oda, Y. (2020). Soft Tissue Special Issue: Skeletal Muscle Tumors: A Clinicopathological Review. *Head and Neck Pathology*, *14*(1), 12–20. <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01113-2>.

Kumar, K. K., Burgess, A. W., & Gulbis, J. M. (2014). Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells. In *Protein Science* (Vol. 23, Issue 5, pp. 551–565). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.2446>.

Ledford, H. (2016). US cancer institute to overhaul tumour cell lines. *Nature*, *530*(7591), 391–391. <https://doi.org/10.1038/nature.2016.19364>.

Leung, C., Murad, K. B. A., Tan, A. L. T., Yada, S., Sagiraju, S., Bode, P. K., & Barker, N. (2020). Lgr5 Marks Adult Progenitor Cells Contributing to Skeletal Muscle Regeneration and Sarcoma Formation. *Cell Reports*, *33*(12). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108535>.

Leushacke, M., Tan, S. H., Wong, A., Swathi, Y., Hajamohideen, A., Tan, L. T., Goh, J., Wong, E., Denil, S. L. I. J., Murakami, K., & Barker, N. (2017). Lgr5-expressing chief cells drive epithelial regeneration and cancer in the oxyntic stomach. *Nature Cell Biology*, *19*(7), 774–786. <https://doi.org/10.1038/ncb3541>.

Liu, W., Zhang, J., Gan, X., Shen, F., Yang, X., Du, N., Xia, D., Liu, L., Qiao, L., Pan, J., Sun, Y., & Xi, X. (2018). LGR5 promotes epithelial ovarian cancer proliferation, metastasis, and epithelial–mesenchymal transition through the Notch1 signaling pathway. *Cancer Medicine*, *7*(7), 3132–3142. <https://doi.org/10.1002/cam4.1485>.

Lu, W., Chao, T., Ruiqi, C., Juan, S., & Zhihong, L. (2018). Patient-derived xenograft models in musculoskeletal malignancies. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1487-6>.

Maier, C. F., Zhu, L., Nanduri, L. K., Kühn, D., Kochall, S., Thepkaysone, M.-L., William, D., Grützmann, K., Klink, B., Betge, J., Weitz, J., Rahbari, N. N., Reißfelder, C., & Schölch, S. (2021). Patient-Derived Organoids of Cholangiocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8675. <https://doi.org/10.3390/ijms22168675>.

Miettinen, M. (2014). Smooth muscle tumors of soft tissue and non-uterine viscera: Biology and prognosis. *Modern Pathology*, 27(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.178>.

Miyata, S., Deus, L., Prado, F., Paula, P., Marques, H., Souza, T., Lustosa, T., Oliveira, M., Amaral, F., Amaral, H., Rezende, G., Craide, M., Rodrigues, C., Ferreira, L., & Almeida, L. (2018). Tumor fibroso solitário retroperitoneal. *Relatos de Casos Cirúrgicos Do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 4(2), 1–3. <https://doi.org/10.30928/2527-2039e-20181903>.

Moutinho, M., Silva, E., Amorim, P., Freitas, H., Evangelista, A., & Fernandes e Fernandes, J. (2015). Tratamento cirúrgico de um leiomiossarcoma do membro inferior. *Angiologia e Cirurgia Vascular*, 11(2), 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.ancv.2015.03.005>.

Mujtaba, B., Wang, F., Taher, A., Aslam, R., Madewell, J. E., & Nassar, S. (2021). Myxoid Liposarcoma With Skeletal Metastases: Pathophysiology and Imaging Characteristics. In *Current Problems in Diagnostic Radiology* (Vol. 50, Issue 1, pp. 66–73). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1067/j.cpradiol.2019.10.008>.

Pappo, A., & Gartrell, J. (2020). Recent advances in understanding and managing pediatric rhabdomyosarcoma. In *F1000Research* (Vol. 9). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22451.1>.

Pasquali, S., & Gronchi, A. (2017). Neoadjuvant chemotherapy in soft tissue sarcomas: Latest evidence and clinical implications. In *Therapeutic Advances in Medical Oncology* (Vol. 9, Issue 6, pp. 415–429). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1758834017705588>.

Pedersen, E. A., Menon, R., Bailey, K. M., Thomas, D. G., van Noord, R. A., Tran, J., Wang, H., Qu, P. P., Hoering, A., Fearon, E. R., Chugh, R., & Lawlor, E. R. (2016). Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin in Ewing Sarcoma Cells Antagonizes EWS/ETS Function and Promotes Phenotypic Transition to More Metastatic Cell States. *Cancer Research*, 76(17), 5040–5053. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3422>.

Phesse, T. J., & Sansom, O. J. (2017). Lgr5 joins the club of gastric stem cell markers in the corpus. *Nature Cell Biology*, *19*(7), 752–754. <https://doi.org/10.1038/ncb3567>.

Picco, G., Petti, C., Sassi, F., Grillone, K., Migliardi, G., Rossi, T., Isella, C., di Nicolantonio, F., Sarotto, I., Sapino, A., Bardelli, A., Trusolino, L., Bertotti, A., & Medico, E. (2017). Efficacy of NEDD8 Pathway Inhibition in Preclinical Models of Poorly Differentiated, Clinically Aggressive Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *109*(2), djw209. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw209>.

Rae, C., Amato, F., & Braconi, C. (2021). Patient-derived organoids as a model for cancer drug discovery. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22073483>.

Rajan, S. (2016). Penile Sarcoma: Report of a Rare Malignancy. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/20315.8178>.

Rivera, M., Fichtner, I., Wulf-Goldenberg, A., Sers, C., Merk, J., Patone, G., Alp, K. M., Kanashova, T., Mertins, P., Hoffmann, J., Stein, U., & Walther, W. (2021). Patient-derived xenograft (PDX) models of colorectal carcinoma (CRC) as a platform for chemosensitivity and biomarker analysis in personalized medicine. *Neoplasia (United States)*, *23*(1), 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.11.005>.

Roque-Lima, B., Roque, C. C. de T. A., Begnami, M. D., Peresi, P., Lima, E. N. P., Mello, C. A. L. de, Coimbra, F. J., Chojniak, R., & Goss Santos, T. (2019). Development of patient-derived orthotopic xenografts from metastatic colorectal cancer in nude mice. *Journal of Drug Targeting*, *27*(9), 943–949. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1509983>.

Rot, S., Taubert, H., Bache, M., Greither, T., Würfl, P., Eckert, A. W., Schubert, J., Vordermark, D., & Kappler, M. (2011). 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. <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/FN820440>.

Saerens, M., Brusselaers, N., Rottey, S., Decruyenaere, A., Creytens, D., & Lapeire, L. (2021). Immune checkpoint inhibitors in treatment of soft-tissue sarcoma: A systematic review and meta-analysis. In *European Journal of Cancer* (Vol. 152, pp. 165–182). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.04.034>.

Saifuddin, A., Andrei, V., Rajakulasingam, R., Oliveira, I., & Seddon, B. (2021). Magnetic resonance imaging of trunk and extremity myxoid liposarcoma: diagnosis, staging, and response to treatment. In *Skeletal Radiology* (Vol. 50, Issue 10, pp. 1963–1980). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00256-021-03769-w>.

Sato, T., & Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: Mechanism and applications. In *Science* (Vol. 340, Issue 6137, pp. 1190–1194). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1234852>.

Sbaraglia, M., Bellan, E., & Dei Tos, A. P. (2021). The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: News and perspectives. In *Pathologica* (Vol. 113, Issue 2, pp. 70–84). Pacini Editore S.p.A./AU-CNS. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-213>.

Scannell, C. A., Pedersen, E. A., Mosher, J. T., Krook, M. A., Nicholls, L. A., Wilky, B. A., Loeb, D. M., & Lawlor, E. R. (2013). LGR5 is Expressed by Ewing Sarcoma and Potentiates Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Frontiers in Oncology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00081>.

Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S. D., King, M., Mangada, J., Greiner, D. L., & Handgretinger, R. (2005). Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-*scid* *IL2R*  $\gamma^{null}$  Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *The Journal of Immunology*, 174(10), 6477–6489. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6477>.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.

Siolas, D., & Hannon, G. J. (2013). Patient-Derived Tumor Xenografts: Transforming Clinical Samples into Mouse Models. *Cancer Research*, 73(17), 5315–5319. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1069>.

Spencer, R. M., Aguiar Junior, S., Ferreira, F. O., Stevanato Filho, P. R., Kupper, B. E., Silva, M. L., Mello, C. A., Bezerra, T. S., & Lopes, A. (2017). Neoadjuvant Hypofractionated Radiotherapy and Chemotherapy in High-Grade Extremity Soft Tissue Sarcomas: Phase 2 Clinical Trial Protocol. *JMIR Research Protocols*, 6(5), e97. <https://doi.org/10.2196/resprot.6806>.

Stebbing, J., Paz, K., Schwartz, G. K., Wexler, L. H., Maki, R., Pollock, R. E., Morris, R., Cohen, R., Shankar, A., Blackman, G., Harding, V., Vasquez, D., Krell, J., Ciznadija, D., Katz, A., & Sidransky, D. (2014). Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma. *Cancer*, 120(13), 2006–2015. <https://doi.org/10.1002/cncr.28696>.

Stewart, E., McEvoy, J., Wang, H., Chen, X., Honnell, V., Ocarz, M., Gordon, B., Dapper, J., Blankenship, K., Yang, Y., Li, Y., Shaw, T. I., Cho, J.-H., Wang, X., Xu, B., Gupta, P., Fan, Y., Liu, Y., Rusch, M., ... Dyer, M. A. (2018). Identification of Therapeutic Targets in Rhabdomyosarcoma through Integrated Genomic, Epigenomic, and Proteomic Analyses. *Cancer Cell*, 34(3), 411-426.e19. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.012>.

*Tabnet*                      *DATASUS*.                      (2022,                      August                      22).  
[http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/webtabx.exe?PAINEL\\_ONCO/PAINEL\\_ONCOLOGIA BR.def](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/webtabx.exe?PAINEL_ONCO/PAINEL_ONCOLOGIA BR.def).

Tanaka, K., & Ozaki, T. (2019). New TNM classification (AJCC eighth edition) of bone and soft tissue sarcomas: JCOG Bone and Soft Tissue Tumor Study Group. In *Japanese Journal of Clinical Oncology* (Vol. 49, Issue 2, pp. 103–107). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy157>.

Thway, K. (2019). Well-differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma: An updated review. In *Seminars in Diagnostic Pathology* (Vol. 36, Issue 2, pp. 112–121). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.02.006>.



Townsend, E. C., Murakami, M. A., Christodoulou, A., Christie, A. L., Köster, J., DeSouza, T. A., Morgan, E. A., Kallgren, S. P., Liu, H., Wu, S.-C., Plana, O., Montero, J., Stevenson, K. E., Rao, P., Vadhi, R., Andreeff, M., Armand, P., Ballen, K. K., Barzaghi-Rinaudo, P., ... Weinstock, D. M. (2016). The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. *Cancer Cell*, 29(4), 574–586. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.008>.

Trejo, C. L., Luna, G., Dravis, C., Spike, B. T., & Wahl, G. M. (2017). Lgr5 is a marker for fetal mammary stem cells, but is not essential for stem cell activity or tumorigenesis. *Npj Breast Cancer*, 3(1), 16. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0018-6>.

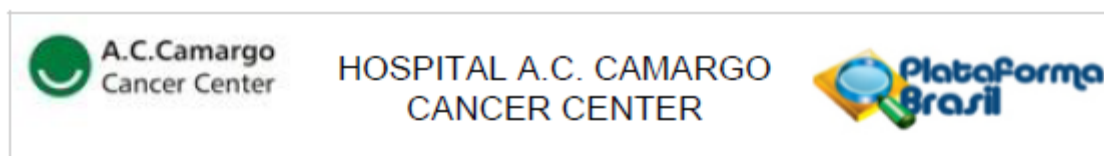
*WHO Classification of Tumours, 5th edition: Soft Tissue and Bone Tumours Corrections made in the second print run.* (n.d.).

Yang, L., Tang, H., Kong, Y., Xie, X., Chen, J., Song, C., Liu, X., Ye, F., Li, N., Wang, N., & Xie, X. (2015). LGR5 Promotes Breast Cancer Progression and Maintains Stem-Like Cells Through Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Stem Cells*, 33(10), 2913–2924. <https://doi.org/10.1002/stem.2083>.

Zhang, J., Cai, H., Sun, L., Zhan, P., Chen, M., Zhang, F., Ran, Y., & Wan, J. (2018). LGR5, a novel functional glioma stem cell marker, promotes EMT by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and predicts poor survival of glioma patients. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0864-6>.

Zhou, X., Geng, L., Wang, D., Yi, H., Talmon, G., & Wang, J. (2017). R-Spondin1/LGR5 activates TGF $\beta$  signaling and suppresses colon cancer metastasis. *Cancer Research*, 77(23), 6589–6602. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0219>.

Zhu, M. M. T., Shenasa, E., & Nielsen, T. O. (2020). Sarcomas: Immune biomarker expression and checkpoint inhibitor trials. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 91). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102115>.

**Anexo 1** – Parecer com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP n° 2488/18.**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** REGISTRO INSTITUCIONAL DE SARCOMAS

**Pesquisador:** Tiago Góss dos Santos

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 82218218.7.0000.5432

**Instituição Proponente:** FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.503.673

**Apresentação do Projeto:**

O projeto tem introdução bem descrita e os métodos para obtenção de seus objetivos estão adequados.

**Objetivo da Pesquisa:**

Organização de um banco de dados institucional de sarcomas. É factível e relevante.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Trata-se de uma coleta de dados retrospectivos. Mesmo o componente prospectivo descrito não envolve nenhuma intervenção ou diferentes exposições a que os sujeitos de pesquisa estivesse expostos. O único risco associado é o de não-confidencialidade.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

É um projeto relevante para a prática clínica e para a instituição, à medida que fornece meios para que os dados sejam organizados, padronizados e estejam disponíveis a futuros pesquisadores.

## ANEXO 2 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP nº 2498/18



COMITÊ DE ÉTICA  
EM PESQUISA - CEP

## APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua reunião de **17/04/2018**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **03/04/2018**, **aprovaram** a realização do projeto nº. **2498/18** intitulado: **“Papel do Receptor Lgr5 no Prognóstico e na Biologia de Sarcomas de Partes Moles.”**


**Pesquisador Responsável:** Tiago Góss dos Santos.

**Aluna:** Ariane Cavalcante dos Santos (Doutorado)

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

São Paulo, 14 de maio de 2018.

Atenciosamente,



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

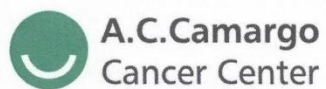
1/1

**Anexo 3** – Carta de aprovação do Comitê de Ética do uso de Animais – CEUA n° 080/18.**A.C. Camargo**  
Cancer Center**CEUA/FAP**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA**  
**FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE****PARECER CONSUBSTANCIADO****Ref. Projeto de Pesquisa n° 080/18****Título:** Papel do Receptor Lgr5 no Prognóstico e na Biologia de Sarcomas de Partes Moles**Pesquisador responsável:** Tiago Góss dos Santos**Executor:** Tiago Góss dos Santos**APRECIÇÃO GERAL**

A proposta do projeto é estudar o papel do Receptor Lgr5 na biologia dos sarcomas de partes moles. Na primeira parte do projeto, o pesquisador descreve a necessidade de se conhecer o comportamento das linhagens tumorais comerciais de sarcoma adquiridas recentemente para desenvolver o melhor modelo de estudo. Para isso solicita o uso de 5 camundongos do tipo nude por linhagem celular para implantação subcutânea e avaliação da capacidade de formação de tumores. De posse destes dados, o pesquisador irá selecionar o melhor modelo para a modulação da expressão de Lgr5. Neste caso, os procedimentos experimentais são apropriados, simples e o executor dos experimentos está apto a realizá-los. As condições de criação e manutenção dos animais são adequadas para a linhagem a ser utilizada.

Por outro lado, o pesquisador solicita animais do tipo NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> //2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) para a realização de xenoinxertos tumorais humanos (PDXs). No entanto, como não é possível modular a expressão de Lgr5 nos modelos de PDX acreditamos que este modelo não está de acordo com o objetivo do projeto. Adicionalmente, observamos que no projeto enviado para o CEUA, a autora descreve que o fragmento tumoral implantado terá de 1-3mm e no outro projeto anexado, ela cita primeiramente a medida de 2-5mm e na sequência 1-3mm. Sugerimos que padronize o valor.

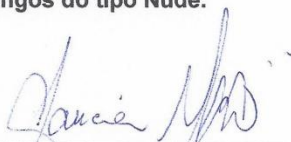
Deste modo, serão aprovados para uso somente os animais do tipo nude solicitados para o primeiro modelo de estudo. Sugerimos que os animais para realização de PDX sejam solicitados em projeto independente, com a devida justificativa e objetivos correspondentes.



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

De acordo com o parecer supracitado, consideramos o projeto: **Aprovado**

**Descrição dos animais aprovados (linhagem/quantidade/sexo): 30**  
**camundongos do tipo Nude.**



---

**Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais**  
**Dra. Glauca Noeli Maroso Hajj**

**Anexo 4** - Carta de aprovação do Comitê de Ética do uso de Animais – CEUA nº 082/18.

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

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

**Ref. Projeto de Pesquisa nº 082/18**

**Título:** "Plataforma de estudo de tumores raros e menos comuns baseados em xenoinxertos derivados de pacientes"

**Pesquisador responsável:** Tiago Góss dos Santos

**Executor:** Tiago Góss dos Santos

**APRECIÇÃO GERAL**

Este Comitê avaliou o projeto supracitado e considerou-o de suma relevância para a evolução do entendimento/tratamento dos tumores raros. Parabéns pela iniciativa. O projeto é muito bonito.

Contudo, entendemos também que o número de animais solicitados causa espanto, apesar de estarem muito bem justificados. Por isto, pedimos ao pesquisador responsável que nos apresente seus dados preliminares após 6 meses, contando da data deste parecer.

De acordo com o parecer supracitado, consideramos o projeto: **Aprovado**. Contudo, a aprovação está vinculada a uma apresentação (em forma expositiva ou escrita) dos dados preliminares em 6 meses da data deste parecer.

**Descrição dos animais aprovados (linhagem/quantidade/sexo):** 100 animais. Após a apresentação dos dados preliminares, este comitê irá deliberar pelos demais 450 animais solicitados.

Vice- Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
**Dra. Michele Christine Landemberger**

**Adendo 1** - Variáveis incluídas no Registro retrospectivo de pacientes com Sarcomas de partes moles.

**REGISTRO INTITUCIONALDE SARCOMAS DE PARTES  
MOLES**

	<b>Variável</b>
<b>1</b>	ID
<b>2</b>	RGH
<b>3</b>	Iniciais do nome do paciente
<b>4</b>	Gênero
<b>5</b>	Data de nascimento
<b>6</b>	Raça/cor
<b>7</b>	Data de admissão do paciente
<b>8</b>	Data do diagnóstico
<b>9</b>	Idade ao diagnóstico
<b>10</b>	Situação do tumor na admissão
<b>11</b>	Houve tratamento anterior à admissão
<b>12</b>	Tipo de tratamento anterior à admissão
<b>13</b>	Localização do tumor
<b>14</b>	Realizou tratamento pré-operatório no ACCCC
<b>15</b>	Realizou quimioterapia NEO adjuvante no ACCCC
<b>16</b>	Realizou radioterapia NEO adjuvante no ACCCC
<b>17</b>	Realizou cirurgia no ACCCC
<b>18</b>	Data da cirurgia
<b>19</b>	Profundidade da lesão
<b>20</b>	Grau histológico
<b>21</b>	Tamanho do tumor (mm - maior eixo)
<b>22</b>	Estadiamento patológico T (sarcoma)
<b>23</b>	Estadiamento patológico N (sarcoma)
<b>24</b>	Estadiamento patológico M (sarcoma)
<b>25</b>	Estadiamento agrupado TNM (8 ed)
<b>26</b>	Tipo histológico (sarcoma)
<b>27</b>	Local de metástase ao diagnóstico
<b>28</b>	Número laudo interno patologia
<b>29</b>	Material revisado pela patologia
<b>30</b>	Realizou tratamento adjuvante
<b>31</b>	Realizou radioterapia adjuvante
<b>32</b>	Realizou quimioterapia adjuvante
<b>33</b>	Houve recorrência
<b>34</b>	Extensão da recorrência
<b>35</b>	Data de recorrência local
<b>36</b>	Data de recorrência à distância
<b>37</b>	Sítio de recorrência a distância
<b>38</b>	Data da última informação ou data do óbito
<b>39</b>	Status na data de último retorno

<b>40</b>	Comentários sobre a ficha preenchida
<b>41</b>	Possui outros blocos anatomopatológicos
<b>42</b>	Número do bloco anatomopatológico adicional
<b>43</b>	Tipo de material do bloco anatomopatológico



**Adendo 2** – Variáveis incluídas no Registro prospectivo de xenoenxertos de Sarcomas de partes moles.

**REGISTRO DE XENOTRANSPLANTES DERIVADOS DE  
PACIENTES**

	<b>Variável</b>
1	Qual tipo de Projeto
	Projeto Sarcoma de Partes Moles
	Projeto Tumores Raros
	Projeto Tumores Renais
2	Iniciais do nome do paciente
3	Gênero
4	Raça/cor/etnia
5	Data de nascimento
6	Data de admissão do paciente
7	Situação do tumor na admissão
8	Grau histológico
9	Tamanho do tumor (mm - maior eixo)
10	Estadiamento patológico T (sarcoma)
11	Estadiamento patológico N (sarcoma)
12	Estadiamento patológico M (sarcoma)
13	Estadiamento clínico T (desmoide) do tumor primário
14	Estadiamento agrupado TNM (8 ed)
15	Realizou cirurgia no ACCCC
16	Data da cirurgia
17	Idade na data da cirurgia
18	Tipo histológico
19	Morfologia (CID-O 3a. ed)
20	Topografia (CID-O 3a. ed)
21	Número laudo interno patologia
22	Tipo de material do bloco anatomopatológico
23	Possui outros blocos anatomopatológicos?
24	Número do bloco anatomopatológico adicional
25	Outro tipo de material do bloco anatomopatológico
26	Realizou tratamento pré-operatório no ACCCC
27	Realizou quimioterapia neoadjuvante
28	Realizou quimioterapia NEO adjuvante no ACCCC
29	Realizou radioterapia neoadjuvante
30	Realizou radioterapia NEO adjuvante no ACCCC
31	Realizou quimioterapia adjuvante
32	Realizou radioterapia adjuvante
33	Lista de comorbidades
34	Status na data de último retorno
35	Tipo de xenoenxerto
36	Data do implante

37	Linhagem do animal
38	Número de animais com xenoenxertos derivados de pacientes (PDX1)
39	Data do implante (PDX1)
40	Sexo do animal (PDX1)
41	Data de nascimento do animal (PDX1)
42	Idade (semanas) do animal ao implante (PDX1)
43	Morfologia (PDX1)
44	Número de animais com xenoenxertos derivados de pacientes (PDX2)
45	Data do implante (PDX1)
46	Sexo do animal (PDX1)
47	Data de nascimento do animal (PDX1)
48	Idade (semanas) do animal ao implante (PDX1)
49	Morfologia (PDX1)
50	Número de animais com xenoenxertos derivados de pacientes (PDX3)
51	Data do implante (PDX1)
52	Sexo do animal (PDX1)
53	Data de nascimento do animal (PDX1)
54	Idade (semanas) do animal ao implante (PDX1)
55	Morfologia (PDX1)
56	Quantidade de xenoenxertos
57	Realizou cultura primária de células
58	Houve crescimento de célula - Pacientes
59	Qual passagem - Pacientes
60	Houve crescimento de célula - PDX
61	Qual passagem - PDX
62	IHQ (Paciente - Partes moles)
63	Se sim quais marcadores
64	Avaliação - Actina de musculo liso
65	Avaliação - CD34
66	Avaliação - CD99
67	Avaliação - Citoceratina
68	Avaliação - Desmina
69	Avaliação - Miogenina
70	Avaliação - S100
71	IHQ (Paciente - Partes moles) - H-Score
72	IHQ (PDX)
73	Se sim quais marcadores
74	Avaliação - Actina de musculo liso
75	Avaliação - CD34
76	Avaliação - CD99
77	Avaliação - Citoceratina
78	Avaliação - Desmina
79	Avaliação - Miogenina
80	Avaliação - S100

81	IHQ (PDX) - H-Score
82	Foi feito sequenciamento
83	Se feito sequenciamento quais alterações
84	Houve recorrência
85	Data de recorrência local
86	Extensão Recorrência
87	Sítio de recorrência a distância
88	Data de recorrência à distância
89	Data da última informação ou data do óbito

### Adendo 3 – Tumores coletados e geração de PDX do Registro prospectivo.

ID	Idade	Gênero	Tipo histológico	Local	Neoadjuvância	PDX P1	PDX P2	PDX P3	Crescimento
1	50	M	Sarcoma fusocelular de alto grau	Sarcoma de Pênis	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 2 meses)
2	52	F	Leiomiossarcoma de alto grau (grau 2)	Metástase em Retroperitônio	Sim	Não	Não	Não	Não
3	62	M	Mixofibrossarcoma	Antebraço esquerdo	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 4 meses)
4	67	F	Sarcoma pleomórfico indiferenciado	Região dorsal	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (após 6 meses)
5	68	M	Tumor fibroso solitário	Antebraço esquerdo	Sim	Sim	Não	Não	Sim (após 12 meses)
6	57	F	Sarcoma fusocelular e pleomórfico de alto grau	Região inguinal perna esquerda	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 30 dias)
7	40	M	Leiomiossarcoma de alto grau	Retroperitônio	Não	Sim	Não	Não	Sim (após 11 meses)
8	46	M	Sarcoma de Kaposi* (ausência de neoplasia)	Canal anal	Não	Não	Não	Não	Não
9	50	F	Mioepitelioma de baixo grau	Dorso	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 7 meses)
10	51	M	Condrossarcoma mixóide de baixo grau	Coxa esquerda	Não	Não	Não	Não	Não
11	1	M	Rabdomiossarcoma alveolar	Cabeça e pescoço	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (após 7 meses)
12	56	F	Lipossarcoma desdiferenciado de alto grau	Retroperitônio	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (após 3 meses)
13	91	M	Sarcoma fusocelular de alto grau	Coxa direita	Não	Sim	Não	Não	Sim (após 12 meses)
14	32	F	Condrossarcoma (grau 2)	Pulmão	Não	Sim	Sim	Não	Sim (após 7 meses)
15	66	M	Lipossarcoma mixóide (ausência de neoplasia residual)	Panturrilha	Sim	Não	Não	Não	Não
16	32	F	Sarcoma partes moles (ausência de neoplasia)	Pelve/coxa direita	Sim	Não	Não	Não	Não
17	54	M	Sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grau	Coxa esquerda	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (após 2 meses)
18	10	F	Sarcoma Alveolar	Perna esquerda	Sim	Não	Não	Não	Não
19	41	M	Leiomiossarcoma de alto grau metastático	Retroperitônio	Sim	Não	Não	Não	Não
20	72	F	Leiomiossarcoma de alto grau (Síndrome Li-Fraumeni)	Coxa direita	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 5 meses)
21	47	F	Leiomiossarcoma pleomórfico de alto grau (Síndrome Li-Fraumeni)	Tumor de cava	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 10 meses)
22	63	M	Lipossarcoma desdiferenciado de alto grau	Retroperitônio	Não	Não	Não	Não	Não
23	38	F	Lipossarcoma mixóide de baixo grau residual	Coxa direita	Sim	Não	Não	Não	Não
24	38	F	Lipossarcoma mixóide de baixo grau residual (Ausência de neoplasia residual)	Retroperitônio	Sim	Não	Não	Não	Não
25	70	M	Lipossarcoma desdiferenciado de alto grau	Retroperitônio	Não	Sim	Sim	Não	Sim (após 3 meses)
26	30	F	Sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grau	Coxa esquerda	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 3 meses)
27	64	F	Lipoma intramuscular com focos de esteatonecrose (não tumoral)	Coxa direita	Não	Não	Não	Não	Não
28	46	M	Rabdomiossarcoma esclerosante recidivado	Retroperitônio	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (após 7 meses)
29	46	M	Rabdomiossarcoma esclerosante recidivado	Braço (punho)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (após 4 meses)
30	48	M	Sarcoma sinonasal bifenotípico de baixo grau	Nasal	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 50 dias)
31	47	F	Sarcoma fusocelular pleomórfico de alto grau	Braço direito	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 40 dias)
32	68	F	Leiomiossarcoma pleomórfico de alto grau	Antebraço direito	Sim	Não	Não	Não	Não
33	49	M	Lipossarcoma mixóide anaplásico de alto grau recidivado	Membro inferior bilateral	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 30 dias)
34	41	F	Lipossarcoma mixóide de alto grau	abdominal	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (após 5 meses)
35	51	F	Lipossarcoma mixóide bem diferenciado de baixo grau	Coxa esquerda	Não	Não	Não	Não	Não
36	29	F	Sarcoma Histiocítico unicêntrico	Retroperitônio	Sim	Não	Não	Não	Não
37	33	M	Osteocondroma	Ramo púbico	Não	Não	Não	Não	Não

38	36	F	Lipossarcoma desdiferenciado (Síndrome Li-Fraumeni)P/Fibroblasto	Coxa esquerda	Não	Sim	Não	Não	Sim (após 12 dias)
39	20	F	Tumor desmoplásico de pequenas células redondas	Pélve esquerda	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (após 4 meses)
40	2	M	Rabdomiossarcoma embrionário anaplásico	Panturrilha esquerda	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 8 meses)
41	22	F	Sarcoma sinovial (suspeita Síndrome Li-Fraumeni)	MSD	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim (após 5 meses)
42	70	F	Lipossarcoma bem diferenciado	Retroperitônio	Não	Não	Não	Não	Não
43	45	F	Tumor fibroso solitário	Rim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 2 meses)
44	36	F	Sarcoma Alveolar	Pulmão	Sim	Não	Não	Não	Não
45	66	F	Lipossarcoma bem diferenciado (grau 1)	Retroperitônio	Sim	Não	Não	Não	Não
46	11	F	Rabdomiossarcoma	Perna direita	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 3 meses)
47	8	F	Sarcoma de Ewing (ausência de neoplasia residual)	Pré-sacral	Não	Não	Não	Não	Não
48	65	F	Lipossarcoma desdiferenciado de alto grau	Retroperitônio	Não	Não	Não	Não	Não
49	36	M	Lipossarcoma mixóide (ausência de neoplasia residual)	Coxa direita	Sim	Não	Não	Não	Não
50	45	M	Tumor fibroso solitário	Fossa poplíteia direita	Não	Não	Não	Não	Não
51	73	F	Lipossarcoma (ausência de neoplasia residual)	Glúteo direito	Não	Não	Não	Não	Não
52	65	M	Sarcoma fusocelular de alto grau	Coxa direita	Não	Não	Não	Não	Não
53	71	F	Lipossarcoma desdiferenciado grau 2	Perna esquerda	Não	Não	Não	Não	Não
54	65	M	Sarcoma fusocelular e pleomórfico de alto grau	Pelve à esquerda	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 2 meses)
55	72	F	Mixofibrossarcoma	Coxa esquerda	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 2 meses)
56	33	M	Tumor desmoplásico	Abdômen	Não	Não	Não	Não	Não
57	76	M	Sarcoma fusocelular e pleomórfico de alto grau	Inguinal	Não	Sim	Sim	Sim	Sim (após 45 dias)
58	56	F	Leiomiossarcoma de alto grau	Abdômen	Não	Sim	Não	Não	Sim (após 7 dias)
59	60	F	Mixofibrossarcoma de alto grau	Glúteo direito	Não	Não	Não	Não	Não
60	47	M	Lipossarcoma mixóide (ausência de neoplasia residual)	Coxa esquerda	Não				Não implantado
61	60	M	Lipossarcoma pleomórfico de alto grau	Retroperitônio	Não	Sim	Sim	Não	Sim (após 57 dias)
62	76	F	Lipossarcoma desdiferenciado de alto grau	Retroperitônio	Não	Não	Não	Não	Não
63	46	F	Sarcoma indiferenciado de alto grau	Lombar esquerda	Não	Não	Não	Não	Não
64	28	F	Tumor maligno da bainha neural	Cervical a esquerda	Não	Não	Não	Não	Não
65	76	F	Lipossarcoma desdiferenciado de alto grau	Retroperitônio	Sim	Não	Não	Não	Não
66	61	F	Lipossarcoma desdiferenciado de alto grau	Rim	Não	Não	Não	Não	Não
67	57	M	Lipossarcoma desdiferenciado de alto grau	Retroperitônio direita	Não				Não implantado
68	40	F	Fibrossarcoma epitelióide esclerosante	Retroperitônio (útero)	Sim				Não implantado
69	70	F	Leiomiossarcoma uterino	Útero	Não	Não	Não	Não	Não
70	32	M	Sarcoma fusocelular	Cabeça e pescoço	Não	Não	Não	Não	Não

**Adendo 4** – Subtipos histológicos adicionados no TMA do Registro Institucional de Sarcomas de partes moles (retrospectivo).

<b>ID</b>	<b>Histologia</b>
1	Sarcoma pleomórfico
3	Mixofibrossarcoma de alto grau
4	Sarcoma pleomórfico
5	Lipossarcoma bem diferenciado
6	Sarcoma sinovial
7	Sarcoma pleomórfico
8	Mixofibrossarcoma
9	Sarcoma sinovial
10	Leiomiossarcoma
12	Mixofibrossarcoma
13	Sarcoma fusocelular
14	Lipossarcoma
15	Sarcoma pleomórfico
16	Lipossarcoma desdiferenciado
17	Lipossarcoma
18	Leiomiossarcoma
19	Fibrossarcoma
20	Sarcoma pleomórfico
21	Lipossarcoma mixóide
23	Leiomiossarcoma
24	Lipossarcoma bem diferenciado
25	Sarcoma Sinovial
26	Sarcoma sinovial
27	Fibrossarcoma
28	Fibrossarcoma
29	Fibrossarcoma
30	Mixofibrossarcoma
31	Fibrossarcoma
33	Sarcoma pleomórfico
34	Lipossarcoma
35	Lipossarcoma
36	Lipossarcoma desdiferenciado
37	Lipossarcoma
38	Leiomiossarcoma
39	Leiomiossarcoma
40	TMBNP
41	Sarcoma sinovial
43	Lipo desdiferenciado
44	Leiomiossarcoma
45	Leiomiossarcoma
46	Sarcoma Sinovial
47	Leiomiossarcoma

48	Lipossarcoma bem diferenciado
49	Lipossarcoma bem diferenciado
50	Sarcoma Sinovial
51	Fibrossarcoma
52	Tumor de bainha de nervo
54	Mixofibrossarcoma
55	Sarcoma pleomórfico
56	Sarcoma sinovial
57	Leiomiossarcoma
58	Leiomiossarcoma
59	Leiomiossarcoma
60	Leiomiossarcoma
61	Lipossarcoma
62	Sarcoma pleomórfico
64	Sarcoma pleomórfico
65	Sarcoma Sinovial
66	Lipossarcoma
67	Tumor maligno de nervo periférico
68	Tumor maligno de nervo periférico
69	Lipossarcoma
70	Sarcoma Sinovial
71	Sarcoma Sinovial
72	Lipossarcoma
74	Tumor neuroectodérmico Primitivo (PNET)
75	Tumor neuroectodérmico Primitivo (PNET)
76	Sarcoma sinovial
77	Lipossarcoma desdiferenciado
78	Sarcoma fusocelular de alto grau
79	Mixofibrossarcoma
80	Mixofibrossarcoma
81	Lipossarcoma bem diferenciado
82	Sarcoma sinovial
83	Tumor maligno de bainha neural
85	Lipossarcoma
86	Lipossarcoma bem diferenciado
87	Tumor fibroso solitário
88	Sarcoma pleomórfico
89	Lipossarcoma mixóide alto grau
90	Leiomiossarcoma
91	Mixofibrossarcoma
92	Lipossarcoma
93	Leiomiossarcoma
95	Sarcoma sinovial
96	Sarcoma sinovial
97	Lipossarcoma
98	Mixofibrossarcoma epitelióide

99	Lipossarcoma bem diferenciado
100	Lipossarcoma bem diferenciado
101	Sarcoma pleomórfico
102	Leiomiossarcoma de alto grau
103	Leiomiossarcoma
105	Lipossarcoma bem diferenciado
106	Lipossarcoma mixóide
107	Lipossarcoma bem diferenciado
108	Mixofibrossarcoma
109	Lipossarcoma mixóide baixo grau
110	Lipossarcoma desdiferenciado
111	Leiomiossarcoma
112	Lipossarcoma
113	Leiomiossarcoma
114	Leiomiossarcoma
116	Mixofibrossarcoma
117	Leiomiossarcoma
118	Sarcoma pleomórfico
119	Sarcoma sinovial
120	Mixofibrossarcoma
121	Sarcoma pleomórfico
122	Lipossarcoma
123	Lipossarcoma desdiferenciado
124	Condrossarcoma
126	Leiomiossarcoma
127	Lipossarcoma desdiferenciado
128	Mixofibrossarcoma
129	Leiomiossarcoma
130	Leiomiossarcoma
131	Lipossarcoma bem diferenciado
132	Lipossarcoma bem diferenciado
133	Lipossarcoma desdiferenciado
134	Leiomiossarcoma
136	Lipossarcoma desdiferenciado
137	Leiomiossarcoma
138	Lipossarcoma
139	TMBNP
140	Sarcoma sinovial
141	Leiomiossarcoma
142	Leiomiossarcoma
143	Sarcoma sinovial
144	TMBNP
145	Tumor fibroso solitário
147	Sarcoma sinovial
148	Sarcoma sinovial
149	Fibrossarcoma



<b>150</b>	Leiomiossarcoma
<b>151</b>	Sarcoma sinovial
<b>152</b>	Leiomiossarcoma
<b>153</b>	Sarcoma sinovial
<b>154</b>	Sarcoma sinovial
<b>155</b>	Tumor fibroso solitário
<b>157</b>	Tumor fibroso solitário
<b>158</b>	Tumor fibroso solitário
<b>159</b>	Rabdomiossarcoma de células fusiforme
<b>160</b>	Tumor fibroso solitário
<b>161</b>	Sarcoma alveolar de partes moles
<b>162</b>	Sarcoma pleomórfico
<b>163</b>	Sarcoma sinovial
<b>164</b>	Sarcoma sinovial
<b>165</b>	Sarcoma fusocelular
<b>167</b>	Mixofibrossarcoma
<b>168</b>	Sarcoma indiferenciado
<b>169</b>	Tumor fibroso solitário
<b>170</b>	Sarcoma do estroma endometrial
<b>171</b>	Tumor fibroso solitário