



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente
Área de Oncologia

**Identificação e Caracterização Funcional de Alterações Genéticas
em Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados e Fusocelulares**

Pós-Graduando: Ingrid Kaltheen Martinez Nakamuta

Nível: Mestrado

Orientador: Dr. Tiago Góss dos Santos

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Nakamuta, Ingrid Katlheen Martinez

Identificação e Caracterização Funcional de Alterações Genéticas em Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados e Fusocelulares/ Ingrid Katlheen Martinez Nakamuta – São Paulo, 2022

66p.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Tiago Góss dos Santos

Descritores: 1. Sarcoma de Partes Moles 2. Xenoenxertos/Patient-Derived Xenografts 3. Organoides/Patient-Derived Organoids 4. Sarcoma Pleomórfico Indiferenciado/ 5. Sarcoma Pleomórfico Fusocelular.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Evelyn e a minha avó por ter inspirado minha dedicação ao estudo em Oncologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Instituição por permitir meu crescimento intelectual e me permitir realizar este trabalho.

Agradeço também a meus pais por sempre apoiarem meus sonhos. Sem vocês isso não seria possível. Agradeço a meu namorado, Igor de Paula por todo o apoio que me deu durante a elaboração desse trabalho e por sempre me incentivar a continuar meus estudos na área de oncologia.

Agradeço a todos os técnicos do Centro Internacional de Pesquisa; Júlia, Danilo e Felipe. O apoio de vocês foi fundamental para a concretização deste trabalho. Um agradecimento especial ao Oraci que me guiou em todos os momentos que estive em experimentação no Biotério.

Agradeço a Ariane Cavalcante e a Ethiene Estevam, participantes do Laboratório de Biologia Tumoral e Biomarcadores por todo ensinamento e contribuição para que este trabalho acontecesse e por me acolherem tão bem. Sem vocês eu não teria muitos dos conhecimentos que tenho hoje.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Biologia Tumoral e Biomarcadores; Amanda Ikegami e Dimas Pontes Café Filho. As nossas discussões e ‘*fan fics*’ foram essenciais para a conclusão dessa etapa na minha vida. Não esquecerei das nossas tardes na Taguá e de que “podemos ser o que a gente quiser”.

Agradeço a todo o grupo da *Core Facility* de Bioinformática por todas as análises e por sanarem minhas dúvidas.

Agradeço ao grupo do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular por contribuírem com meu conhecimento em sequenciamento.

Por fim, agradeço ao meu orientador Dr. Tiago Góss dos Santos por me permitir participar e contribuir com os resultados do grupo.

RESUMO

Nakamuta, Ingrid Katlheen Martinez. Identificação e Caracterização Funcional de Alterações Genéticas em Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados e Fusocelulares [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

Os sarcomas de partes moles (SPM) são tumores malignos derivados de células mesenquimais, com grande capacidade de formar metástases e geralmente apresentam elevada resistência à terapia. Formam um grupo extremamente heterogêneo com mais de 100 subtipos tumorais, como os sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) e os sarcomas fusocelulares (SF). Em conjunto, esses dois subgrupos não compartilham semelhanças morfológicas com os outros subtipos. Adicionalmente, carecem de informações moleculares que auxiliem tanto no diagnóstico quanto no prognóstico da doença. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e caracterizar modelos pré-clínicos de SPI e SF baseados em Patient-derived xenografts (PDX) e organoids (PDO) para definir uma plataforma de estudos destes tumores e avaliar o potencial de alvos moleculares específicos. Utilizando amostras de 11 pacientes, foi possível estabelecer oito PDX de SPI ou SF. O estabelecimento de organóides de sarcoma se mostrou desafiador para amostras tumorais oriundas diretamente de pacientes ou de PDX e após testarmos diferentes protocolos, conseguimos obter organóides de culturas primárias tumorais. Os organóides e os PDXs gerados foram caracterizados por IHQ e foi possível observar a preservação das características moleculares. Para a caracterização genética, realizamos o sequenciamento de exoma de um conjunto de oito amostras (paciente/PDX/cultura celular) para identificação das principais alterações somáticas. Por fim, padronizamos o ensaio de citotoxicidade à doxorrubicina em três culturas primárias de SPI e SF.

Palavras-chaves: Modelos pré-clínicos, xenoenxertos, organóides.

ABSTRACT

Nakamuta, Ingrid Katlheen Martinez. Identification and Functional Characterization of Genetic Alterations in Undifferentiated and Fusocellular Pleomorphic Sarcomas [Dissertation].

São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

Soft tissue sarcomas (STS) are malignant tumors derived from mesenchymal cells, with a great capacity to form metastases and generally show high resistance to therapy. They form an extremely heterogeneous group with more than 100 tumor subtypes, such as undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS) and fusocellular sarcomas (SS). Taken together, these two subgroups do not share morphological similarities with the other subtypes. Additionally, they lack molecular information that helps both in the diagnosis and prognosis of the disease. The objective of this work was to establish and characterize preclinical models of UPS and SS based on Patient-derived xenografts (PDX) and organoids (PDO) to define a platform for studies of these tumors and to evaluate the potential of specific molecular targets. Using samples from eleven patients, it was possible to establish eight PDX of UPS and SS. The establishment of sarcoma organoids proved to be challenging for tumor samples derived directly from patients or from PDX and after testing different protocols, we were able to obtain organoids from primary tumor cultures. The generated organoids and PDXs were also characterized by IHC and immunofluorescence with sarcoma marker proteins and it was also possible to observe the preservation of molecular characteristics. For genetic characterization, we performed exome sequencing of a set of eight samples (patient/PDX/cell culture) to identify the main somatic alterations. Finally, we standardized the doxorubicin cytotoxicity assay in three primary cultures of SPI and SF.

Keywords: Preclinical models, xenografts, organoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfologia celular de alguns subtipos de SPI	18
Figura 2	Fluxograma da metodologia para chamada de variantes	33
Figura 3	Esquema empregado na análises de dados no software Xenofilter	34
Figura 4	Desenho esquemático da metodologia experimental empregada.....	35
Figura 5	Imunohistoquímica comparativa com marcadores padrões em SPM	37
Figura 6	Organoide derivado de sarcoma de pênis utilizando Matrigel.....	38
Figura 7	Organoides gerados pela técnica Nano3D	39
Figura 8	Organoides gerados a partir de tecido fresco (2° tentativa).....	40
Figura 9	Cultura primária realizada com novo protocolo de digestão enzimática.....	41
Figura 10	Organoide derivado de cultura primária caso W.S.	42
Figura 11	Organoide derivado de cultura primária caso K.J.H.	42
Figura 12	Organoide derivado de cultura primária caso M.F.S.	43
Figura 13	Imunofluorescência de organoides	44
Figura 14	Padronização do Kit LIVE/DEAD	45
Figura 15	Teste de sensibilidade a doxorrubicina caso K.J.H.	46
Figura 16	Teste de sensibilidade a doxorrubicina caso M.F.S.	47
Figura 17	Teste de sensibilidade a doxorrubicina caso W.S.	48
Figura 18, 19 e 20	Gráficos resultados do sequenciamento de exoma do tumor do paciente, PDX e células.....	52-53
Figura 21	Fluxograma com sequência de filtro utilizados no VarSeq para a amostra E.R.S.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela dos casos enviados para sequenciamento de exoma	32
Tabela 2	Dados da cobertura obtida no sequenciamento de exoma	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
BAM	Arquivo binário derivado do SAM (Sequence Alignment Map)
BSA	Bovine Serum Albumin
BWA	Burrows-Wheeler Alignment
CD34	Cluster Differentiation 34
CD99	Cluster Differentiation 99
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EGF	Endothelial Growth Factor
FCRL3	Fc Receptor Like 3
FGF	Fibroblast Growth Factor
GATK	Genome Analyses Toolkit
GFR	Growth Factor Reduced
HASPIN	Histone H3 Associated Protein Kinase
HE	Coloração Hematoxilina – Eosina
ITGAE	Integrin subunit alpha E
LoF	Lost of Function
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPK8IP3	Mitogen-Activated Protein Kinase 8 Interacting Protein 3
MTOR	Mechanistic Target of Rapamycin Kinase
MYO1G	Miosin 1 G
NHLRC2	NHL Repeat Containing 3
NPHP4	Nephrocystin 4
OWB	Organoid Washing Buffer
PAN2	Poly A Specific Ribonuclease Subunit Pan2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldeído

PDO Patient-Derived Organoids
PDX Patient-Derived Xenografts
RB1 Retinoblastoma
REVEL Rare Exome Variant Ensemble Learner
RPM Rotações por minuto
RPMI Roswell Park Memorial Institute médium
SMA Smooth Muscle Actin
SPM Sarcoma de Partes Moles
SPF Specific Pathogen Free
SPAM1 Sperm Adhesion Molecule
TCGA The Cancer Genome Atlas
TP53 Tumor Protein 53
VAF Variant Allele Frequency

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	SARCOMAS DE PARTES MOLES (SPM)	1
1.2	CLASSIFICAÇÃO ATUAL DOS SPM	2
1.3	ESTADIAMENTO DOS SPM	2
1.4	TRATAMENTO.....	3
1.5	SARCOMAS PLEOMÓRFICOS INDIFERENCIADOS (SPI) E SARCOMAS INDIFERENCIADOS FUSOCELULARES (SIF).....	4
1.6	PRINCIPAIS ALTERAÇÕES MOLECULARES EM SARCOMAS PLEOMÓRFICOS INDIFERENCIADOS E FUSOCELULAR	6
1.7	A IMPORTÂNCIA DO ESTABELECIMENTO DE MODELOS PRÉ-CLÍNICOS NO ESTUDO DE TUMORES	6
1.8	PATIENT-DERIVED XENOGRAFTS (PDX)	7
1.9	PATIENT-DERIVED ORGANOIDS (PDO).....	8
2	JUSTIFICATIVA.....	9
3	OBJETIVOS	9
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
4	MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1	CASUÍSTICA.....	10
4.2	ANIMAIS	11
4.3	INOCULAÇÃO DE FRAGMENTOS TUMORAIS DERIVADOS DE PACIENTES – ESTABELECIMENTO DE PDX	11
4.4	ESTABELECIMENTO DE CULTURAS PRIMÁRIAS E PDOs.....	12
4.5	IMUNOFLOURESCÊNCIA DE ORGANOIDES.....	15
4.6	PADRONIZAÇÃO DE TESTE DE VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE	17
4.7	TESTE DE CITOTOXICIDADE E SENSIBILIDADE A QUIMIOTERÁPICOS	18
4.8	EXTRAÇÃO DE DNA	18
4.9	SEQUENCIAMENTO DE EXOMA	19
4.10	ANÁLISE DE DADOS OBTIDOS NO SEQUENCIAMENTO	20
5	RESULTADOS.....	23
5.1	ESTABELECIMENTO DE PDX.....	23
5.2	ESTABELECIMENTO DE CULTURAS PRIMÁRIAS E PDOs.....	27
5.3	PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE	34
5.4	TESTE DE CITOTOXICIDADE E SENSIBILIDADE A QUIMIOTERÁPICOS	35
5.5	SEQUENCIAMENTO DE EXOMA	38
6	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	42
7	CONCLUSÕES	51

8	REFERÊNCIAS	52
---	-------------------	----

1 INTRODUÇÃO

1.1. Sarcomas de partes moles (SPM)

Trata-se de um grupo heterogêneo de tumores malignos com rara incidência na população, representando cerca de 1% de todas as neoplasias malignas anualmente (Ferrari et al. 2016). Os SPM são geralmente agressivos e apresentam capacidade de gerar metástases à longas distâncias, afetando principalmente órgãos como pulmão, fígado, ossos, cérebro, além de outros tecidos (Sbaraglia and Dei Tos 2018). Assim como os sarcomas, cerca de outros 200 subtipos tumorais são considerados raros devido a sua baixa incidência e prevalência. Geralmente, esses tumores apresentam elevada heterogeneidade clínica e molecular, além de acometer pacientes mais jovens do que outros subtipos tumorais mais comuns (Kondo 2020).

Sua heterogeneidade refere-se ao fato de que existem cerca de 110 subtipos histológicos diferenciados de sarcomas de partes moles (SPM), que apresentam diferentes alterações moleculares e biológicas, levando a respostas diferenciais aos tratamentos utilizados. Os SPM podem ocorrer em todas as idades e geralmente surgem em diversos locais anatômicos do corpo, como por exemplo, nos membros, cabeça e pescoço, cavidade abdominal e pélvica (Ferrari et al. 2016; Oda et al. 2017; Meyer and Seetharam 2019). Em 50% dos casos, o surgimento do tumor se dá nos membros, 30% ocorrem na região intra-abdominal e apenas 15% ocorrem no tronco, cabeça e pescoço (Sbaraglia and Dei Tos 2018).

Os SPM derivam de células tronco mesenquimais indiferenciadas, sendo classificados de acordo com o tecido que mais se assemelham morfológicamente. Em adultos, os subtipos mais frequentes são os lipossarcomas, leiomiossarcomas e sarcomas pleomórficos indiferenciados. Em crianças, os tipos mais frequentes são os rabdomiossarcomas e os SPM do tipo não rabdomiossarcoma (Ezuddin et al. 2018). Em alguns casos (8%), o sarcoma não apresenta uma classificação, pois não se encaixa em nenhum tipo tumoral já estabelecido (Oda et al. 2017).

1.2 Classificação atual dos SPM

Atualmente, os SPM são classificados pela Organização Mundial da Saúde, com a última revisão publicada em 2020 (Choi and Ro 2021). Nesta classificação os subtipos tumorais são agrupados de acordo com suas características morfológicas, genéticas e também imunofenotípicas.

A nova edição conta com as atualizações acerca do conhecimento sobre a biologia dos sarcomas de partes moles, levando em consideração novas alterações genéticas e novos marcadores. Os tumores seguem organizados em fibroblásticos e miofibrolásticos, vasculares, tumores pericíticos, tumores estromais gastrointestinais, tumores da bainha do nervo periférico e tumores com diferenciação incerta (Choi and Ro 2021).

O guia tem como função contribuir com o correto estadiamento dos tumores e assim permitir um melhor manejo do tratamento e prognóstico desse subtipo tumoral.

1.3 Estadiamento dos SPM

Um dos sistemas de estadiamento amplamente utilizado é o estabelecido pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC). Este sistema foi revisado recentemente e em sua oitava edição foram adicionadas algumas modificações importantes quando trata-se de SPM(TANAKA; OZAKI, 2019).

Geralmente, o sistema AJCC segue o padrão TNM, sendo T, tamanho do tumor;N, acometimento de linfonodos e M, presença de metástases à distância. Quando se trata de tumores ósseos e SPM, foi adicionado mais um parâmetro ao sistema TNM usual, sendo o parâmetro G referente ao grau histológico do tumor, assim o sistema de estadiamento ficou mais adequado para todos os subtipos de sarcomas (Tanaka and Ozaki 2019).

A partir desses parâmetros, os tumores são encaixados em estágio I, para tumores com grau I e são considerados tumores de baixo grau; estágio II ou III para tumores com alto grau e estágio IV para pacientes que apresentam metástases independentemente do tamanho. O

parâmetro T também contribui para subdividir os tumores em seu respectivo grau (Haas and van de Sande 2019; Tanaka and Ozaki 2019).

A aplicação do sistema de estadiamento é de suma importância, principalmente no diagnóstico inicial para avaliar alguns parâmetros como a taxa de recorrência tumoral e risco de ocorrência de metástase e mortalidade. Além disso, é útil para a formulação do plano de tratamento que será aplicado ao paciente, que pode envolver a ressecção cirúrgica do tumor, utilização de quimioterapia e/ou radioterapia (Pasquali et al. 2019).

1.4 Tratamento

Em SPM, quando o tumor é localizado, a ressecção cirúrgica, acompanhada ou não de radioterapia é o procedimento mais utilizado (Meyer and Seetharam 2019). A ressecção das margens do tumor e o uso de radioterapia são fatores que contribuem para o controle local da doença. Além disso, o uso de radioterapia antes ou depois da ressecção contribui para diminuir o risco de recorrência local do tumor em pacientes que apresentam tumores grandes ou que apresentam um alto grau histológico, além de diminuir a extensão do procedimento cirúrgico (Ezuddin et al. 2018; Pasquali et al. 2019).

Em pacientes com lesões ressecáveis, mas em locais nos quais um procedimento cirúrgico acarretaria resultados funcionais adversos, opta-se pela quimioterapia neoadjuvante, bem como para pacientes com lesões irressecáveis (Kelleher and O'Sullivan 2016; Pasquali et al. 2019). Existe também a possibilidade de uso de terapias adjuvantes para o tratamento de pacientes com SPM. A terapia sistêmica preferencial para sarcomas consiste no amplo uso de antraciclinas, como a doxorrubicina ou epirrubicina, uma ou outra em combinação com ifosfamida. Agentes alquilantes como a dacarbazina também podem ser utilizados em combinação com as antraciclinas. Outras opções recomendadas para serem utilizadas em combinação são gemcitabina, docetaxel, trabectedina.

Algumas drogas terapêuticas para segunda linha de tratamento podem ainda ser utilizadas em casos em que há recorrência tumoral ou em casos onde o tumor não responde as terapias padrões de primeira escolha. Com segunda escolha podem ser utilizados alguns inibidores de receptor Tirosina-Quinase, como o pazopanib ou inibidores de Histona-Desacetilase (HDAC) (Kasper 2019).

Estes são alguns dos quimioterápicos utilizados com maior frequência. Existem ainda terapias alvo específicas para alguns subtipos de sarcoma devido ao maior estudo voltado à caracterização genotípica e alterações moleculares existentes em SPM (Liu et al. 2018).

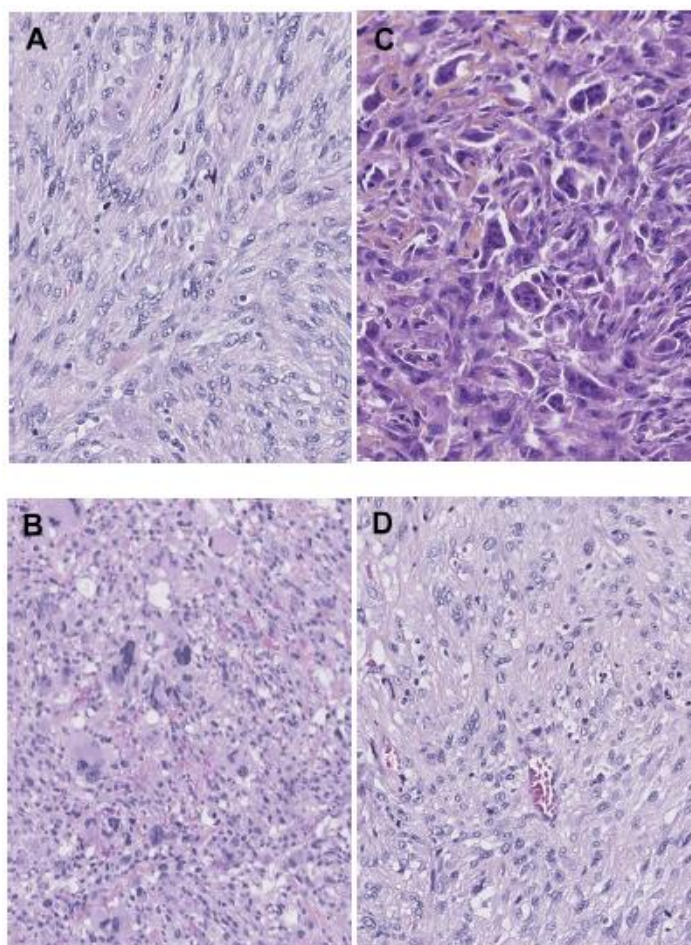
1.5 Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados (SPI) e Sarcomas indiferenciados Fusocelulares (SIF)

O sarcoma pleomórfico indiferenciado, anteriormente denominado como histiocitoma fibroso maligno (HFM), é o tipo mais comum de SPM em adultos, e possui 5 subtipos de acordo com o padrão histológico: estoriforme-pleomórfico, mixóide, inflamatório, angiomatóide e de células gigantes (Becker et al. 2016).

A ressecção cirúrgica ainda é a melhor opção terapêutica para este tipo de SPM. Frequentemente, este subtipo é caracterizado como um tumor de alto grau, que possui capacidade de formar metástases e também apresenta resistência aos tratamentos de quimioterapia e radioterapia (Becker et al. 2016).

As características morfológicas principais incluem diversas variações no formato e tamanho das células tumorais, refletindo assim a instabilidade genética desses tumores. Estima-se que cerca de 17% dos casos de SPM sejam diagnosticados como SPI (Villacis et al. 2014). Tumores classificados como SPI geralmente não apresentam uma linha de diferenciação celular exata e não se assemelham com nenhum outro subtipo tumoral já estabelecido, tratando-se, portanto, de um diagnóstico de exclusão. Geralmente, os SPI são tumores que apresentam grande extensão e profundidade (Lewin et al. 2018).

Quanto ao perfil morfológico, os SPI são variáveis, apresentando padrões arquiteturais diversos. As células apresentam características pleomórficas e podem variar em células epitelióides, multinucleadas ou células fusiformes (Carvalho et al. 2019)(Figura 1).



Fonte: Adaptado de Carvalho et al., 2019.

Figura 1 - Morfologia celular de alguns subtipos de SPI. A: Morfologia fusiforme; B: Morfologia epitelióide; C: Células gigantes osteoclasto-like; D: Morfologia mixóide.

Assim como os SPI, os sarcomas fusocelulares não possuem marcadores de diferenciação, e uma das características histológicas é a presença de células fusiformes em sua composição (Lewin et al. 2018). Tais células podem ter origem de regiões como a bainha dos nervos, tecido conjuntivo, músculos e outros órgãos. Os sarcomas fusocelulares podem ser caracterizados como fibromixóide e apresentam componentes de diferenciação neuroendócrina e mesenquimal. Além disso, os SF geralmente apresentam alterações genéticas referentes à translocação entre cromossomos 7 e 16 (Igarashi et al. 2018).

1.6 Principais alterações moleculares em sarcomas pleomórficos indiferenciados e fusocelular

Os SPI apresentam cariótipos complexos, com diversas aberrações genéticas que são responsáveis por ocasionar principalmente alterações de ciclo celular, com ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais, por exemplo *TP53* e *RB1* (LEWIN et al., 2018; ZHENG et al., 2019). Além dessas mutações, algumas vias moleculares importantes como Hippo, Ras/*MAPK* e *PI3K/MTOR* estavam ativas em SPI (Lewin et al. 2018; Zheng et al. 2019). Não foram descritas até o momento alterações específicas para SPI.

Amostras de SPI utilizadas no estudo realizado pelo TCGA, apontam a amplificação significativa dos genes *VGLL3* e *YAP1*, que são importantes cofatores responsáveis por induzir a proliferação celular por meio de ativação da via de sinalização molecular Hippo. Foi verificada também a deleção de *RB1* (Demicco et al. 2017).

Além dessas alterações, os subtipos tumorais podem apresentar mecanismos de oncogênese próprios e devido a heterogeneidade encontrada em SPM, cada subtipo pode responder de maneira diferente às terapias disponíveis. Sendo assim, o entendimento das diferentes alterações genômicas de cada subtipo torna-se essencial para impulsionar o surgimento de novas terapias alvo-específicas para pacientes com SPM (Yen and Chen 2018; Carvalho et al. 2019).

1.7 A importância do estabelecimento de modelos pré-clínicos no estudo de tumores

Dada a grande variedade de subtipos de SPM, a realização de estudo clínicos torna-se algo extremamente dispendioso, e muitas vezes quando realizado, normalmente envolve diversos pacientes, não levando em consideração os tipos histológicos envolvidos no estudo. O estabelecimento de novos modelos pré-clínicos leva ao melhor entendimento das características moleculares e a patogênese tumoral, além de contribuir para o surgimento de novas terapias por meio da integração das características biológicas e genéticas, sendo modelos úteis inclusive para prever respostas terapêuticas (Day et al. 2015; Hamacher and Bauer 2017).

Além disso, pouco se sabe sobre quais são os efeitos da heterogeneidade tumoral sobre a resposta terapêutica dos pacientes, e como essa heterogeneidade pode se modificar durante esse processo (Byrne et al. 2017). Existem diversos modelos pré-clínicos para o estudo de tumores, sendo os roedores os animais mais utilizados. Os animais (modificados por engenharia genética ou do tipo selvagem) podem ser utilizados em modelos do tipo xenográfico/singráficos por técnica ectópica ou ortotópica, para colocação de enxertos de tumores primários humanos ou para indução tumoral por meio de carcinógenos (Galuschka et al. 2017).

1.8 Patient-Derived Xenografts (PDX)

Os modelos PDX baseiam-se no implante direto de tecido tumoral derivado do paciente em animais imunodeficientes e podem ser estabelecidos a partir de linhagens celulares ou por meio de pequenos fragmentos (Byrne et al. 2017).

No modelo PDX, o tumor consegue se estabelecer sem o ganho de muitas alterações genéticas, já que se desenvolve em um sítio fisiologicamente parecido com o sítio de desenvolvimento no paciente. Com isso, o tumor consegue manter as alterações genéticas e epigenéticas originais, além de conservar até mesmo a resposta a drogas que são observadas no paciente. As características do microambiente tumoral também são semelhantes, já que o implante direto do fragmento mantém as conexões célula-célula, conservando também parte da arquitetura do tumor primário (Jung et al. 2018).

O uso de PDX torna-se útil para o descobrimento de moléculas candidatas à fármacos para o tratamento do câncer, assim como permite a detecção de novos biomarcadores, promovendo um estudo mais aprofundado sobre a biologia tumoral (Hamacher and Bauer 2017; Karamboulas and Ailles 2019).

Além disso, o modelo PDX pode ser amplamente utilizado em estudos clínicos, já que permite testar a eficiência de drogas, aprimorar estratégias terapêuticas e prever resposta terapêutica dos tratamentos utilizados nos pacientes, tendo grande importância na medicina de precisão (Hernandez et al. 2019; Karamboulas and Ailles 2019).

De acordo com a literatura, alguns estudos já documentam o uso da metodologia PDX em SPM. Um estudo apontou o desenvolvimento de cerca de 32 PDX de amostras de diversos histotipos de SPM, incluindo de sarcoma pleomórfico indiferenciado (Zheng et al. 2019).

1.9 Patient-Derived Organoids (PDO)

Sabe-se que as células tumorais interagem de diversas formas com o microambiente ao seu redor e são submetidas a condições extremas durante a proliferação, como hipóxia e pouca disponibilidade de nutrientes. Além disso, as células acabam sofrendo também a influência direta dos sinais enviados por células vizinhas, sejam elas tumorais ou não. O modelo de cultura celular em 2D impossibilita essa interação com o microambiente tumoral (Ishiguro et al. 2017; Colella et al. 2018).

O surgimento de novos modelos de cultura celular 3D derivadas de paciente contribui para solucionar a problemática encontrada nas culturas convencionais, sendo possível reproduzir o microambiente tumoral, assim como toda a complexidade e a heterogeneidade molecular encontrada nos sarcomas. Um exemplo de cultura celular 3D é o estabelecimento de organoides in vitro (Hernandez et al. 2019).

Os PDOs são modelos caracterizados pela formação de estruturas multicelulares em 3D, originadas do tumor primário do paciente. A amostra é imersa em uma matriz extracelular de origem animal, como o *Matrigel*® por exemplo, gerando o organoide (Gaebler et al. 2017; Shah and Singh 2017; Colella et al. 2018).

Tal técnica permite a manutenção das características tumorais, como sua arquitetura, o padrão de interação célula-célula e o microambiente tumoral, além de reproduzir o padrão de velocidade de crescimento, as taxas de oxigênio, nutrientes e de proliferação celular, que seriam vistas no crescimento tumoral in vivo. O modelo também conserva as características genéticas e a heterogeneidade do tumor primário (Gaebler et al. 2017; Shah and Singh 2017; Colella et al. 2018).

A utilização desse modelo é diversa. Em comparação com o modelo PDX, o uso de PDO para testar a resposta terapêutica pode ser uma alternativa interessante, já que o resultado pode ser obtido em poucas semanas. Aplicado à medicina personalizada, os modelos PDO podem contribuir para escolher qual a melhor opção terapêutica, assim como podem ser úteis para entender os mecanismos de resistência e seleção, caso haja múltiplos modelos para cada paciente. Além disso, a utilização desse modelo pode ser uma alternativa para o melhor entendimento das principais vias de sinalização alteradas em sarcomas e que podem consequentemente levar à progressão tumoral (Gaebler et al. 2017; Colella et al. 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Os SPM são considerados tumores raros devido a sua baixa incidência na população (cerca de 5 novos casos por ano a cada 100,000 indivíduos na Europa). Apesar da baixa incidência, sabe-se que a taxa de sobrevivência de pacientes acometidos com tumores considerados raros é menor (46%), comparado com tumores com incidência mais frequente na população (63%) (Kasper 2019).

Além disso, a grande diversidade de subtipos tumorais faz com que os pacientes apresentem respostas diferenciais as terapias padrões utilizadas. Isso por que os subtipos existentes são altamente heterogêneos e diferem em seus aspectos clínicos, moleculares e morfológicos (Thway et al. 2016). Em conjunto, esses fatores tornam a realização de estudos clínicos em um desafio (Hamacher and Bauer 2017; Liu et al. 2018).

Para isso, o estabelecimento de modelos pré-clínicos é essencial e pode enriquecer o estudo dos SPM. Os modelos PDX e PDO, por exemplo, conservam características moleculares e histológicas intrínsecas do tumor primário, incluindo sua heterogeneidade intra e intertumoral (Hamacher and Bauer 2017; Colella et al. 2018; Karamboulas and Ailles 2019).

Além disso, o uso de modelos PDX e PDO pode servir como uma plataforma para a realização de testes de eficácia de drogas, previsão de resposta à terapia, estabelecimento de prognósticos e o encontro de candidatos a alvos moleculares, tendo grande aplicação na medicina de precisão para SPM (Hamacher and Bauer 2017; Colella et al. 2018; Karamboulas and Ailles 2019).

3 OBJETIVOS

Este projeto visou identificar alterações genéticas clinicamente relevantes em sarcomas através do emprego de sequenciamento de exoma de xenoinxertos e organoides derivados de pacientes diagnosticados com SPI e SF e atendidos no A.C. Camargo Cancer Center.

3.1 Objetivos específicos

1. Estabelecer PDX e PDO de sarcomas pleomórficos indiferenciados e fusocelulares.
2. Realizar sequenciamento de exoma em ambos os modelos pré-clínicos utilizados (PDX e PDO) de casos de sarcomas pleomórficos indiferenciados e fusocelulares.
3. Realizar a comparação entre os sequenciamentos obtidos dos tumores humanos com os obtidos dos modelos PDX e PDO.
4. Identificar as alterações moleculares acionáveis e vulnerabilidades genéticas de cada caso e identificar vias alvo para diminuir o crescimento tumoral.
5. Realizar estudos de sensibilidade e crescimento tumoral em PDX e PDO com drogas-alvo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Trata-se de um estudo prospectivo em modelos pré-clínicos estabelecidos a partir de amostras de pacientes com sarcoma de partes moles pleomórficos indiferenciados e fusocelulares tratados no A. C. Camargo Cancer Center. Serão utilizadas amostras de pacientes mediante a autorização por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Antônio Prudente (processo número 2498/18).

As amostras utilizadas foram obtidas a partir de material cirúrgico e serviram para o estabelecimento de culturas primárias e xenoenxertos em animais imunodeficientes. As amostras coletadas foram identificadas e separadas por um patologista e transportadas em até 24 horas após a ressecção em tubo estéril sob refrigeração, contendo meio de cultura e antibiótico. Ao longo do trabalho obtemos um total de 11 amostras (sendo 4 amostras diagnosticadas como SPI e 4 amostras como SF).

Critérios de inclusão: para o estabelecimento dos xenoenxertos e organoides foram utilizados fragmentos tumorais de SPM pleomórficos e fusocelulares, provenientes de pacientes atendidos no A. C. Camargo Cancer Center que aceitaram participar do estudo. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de SPM não metastáticos sem tratamento prévio, pacientes não metastáticos com tratamento de quimioterapia e/ou radioterapia prévios, pacientes metastáticos que forem submetidos a ressecção de metástases pós tratamento. Também foram incluídos

pacientes que foram submetidos à tratamentos prévios (quimioterapia e radioterapia) que tiveram progressão de doença, resposta parcial e/ou recidivas locais e metástases.

Critérios de exclusão: Foram excluídos pacientes com diagnóstico de sarcomas de partes moles de baixo grau ou neoplasias benignas.

4.2 Animais

Para os estudos *in vivo* foram utilizados animais *NOD Scid Gamma* (NSG) machos com 2 a 4 meses de idade. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em biotério SPF (*Specific Pathogen Free*), onde os mesmos passaram por testes periódicos para garantir a ausência de possíveis patógenos. Os camundongos foram mantidos em microisoladores à temperatura controlada de 22° C e sob ciclo de luz de 12 horas e receberam água estéril e ração irradiada *ad libitum*. Todos os procedimentos estão aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Fundação Antônio Prudente (processo número 082/18).

4.3 Inoculação de fragmentos tumorais derivados de pacientes – Estabelecimento de PDX

Os materiais obtidos de pacientes (biópsia ou cirurgia) foram primeiramente seccionados com auxílio de bisturi estéril em fragmentos menores (1 – 3 mm) e foram implantados subcutaneamente com auxílio de uma agulha do tipo *cancer implant needles* 11G (Cadence Science) em animais NSG previamente anestesiados. A solução anestésica é composta por uma solução diluída de Ketamina (500 µl) e Xilazina (250 µl) em água ultrapura (4,25 ml). Os animais foram anestesiados com um volume de solução anestésica que variou de 200 – 300 µl por meio de inoculação intraperitoneal. A aplicação de solução anestésica foi feita

com agulhas hipodérmicas 26G (Solidor®) e seringas para insulina estéreis de 1 ml/cc U-100 (Injex®). Cada animal recebeu no máximo cinco fragmentos que foram posicionados na região dorsal, acima da pata direita traseira.

Os camundongos foram periodicamente monitorados para medição e verificação de crescimento tumoral. Animais no qual foi constatado pelo desenvolvimento de tumores acima de 1 cm³ foram eutanasiados por excesso de anestésico e o tumor retirado. Parte do material foi utilizado para fazer novas passagens em outros animais NSG, totalizando no máximo, 3 passagens (PDX P3). O material retirado também foi seccionado e armazenado em criotubos com solução de vitrificação e a seco, em freezers com temperatura de -80°C.

A solução de vitrificação é composta por 75% de meio de cultura DMEM *high glucose*, 20% de soro fetal bovino (Gibco®) e 10% de DMSO (Merck®). A solução garante a viabilidade do fragmento e permite sua inoculação posterior. Materiais congelados a seco foram utilizados para extração e sequenciamento de DNA. Fragmentos armazenados em solução de paraformaldeído a 4% foram utilizados para confecção de lâminas histológicas. O restante do material retirado foi destinado para o estabelecimento de culturas primárias. A obtenção de PDX foi realizada em parceria com a aluna de doutorado Ariane Cavalcante.

4.4 Estabelecimento de culturas primárias e PDOs

As culturas primárias já estabelecidas no laboratório foram geradas a partir de um protocolo de digestão enzimática que utiliza uma combinação de tripsina e collagenase. Os fragmentos frescos retirados do PDX foram mecanicamente dissociados com auxílio de um bisturi descartável com lâmina de tamanho 22 (Wiltex®) em uma placa de Petri descartável estéril (Corning®) contendo 5 ml de HBSS gelado (Gibco™ - Cód. 14025092).

O homogenato (fragmento já dissociado) foi então transferido para um tubo e centrifugado por 2 minutos à 1500 rpm. Em seguida, todo o sobrenadante foi retirado e adicionou-se uma solução contendo Collagenase IV 0,2% e Tripsina 2% na proporção 1:1. O tubo foi colocado no Thermo-mixer (Eppendorf®) à 37°C por 1 hora à 600 rpm.

Após a digestão enzimática, o tubo foi novamente centrifugado por 10 minutos à 1500 rpm. O sobrenadante foi novamente retirado e o conteúdo foi ressuspensão em 5 ml de meio de cultura DMEM *high* e transferido para um novo tubo com *cell strainer* de 40 µm (Corning® - Cód.CLS431750). O tubo foi novamente centrifugado e o sobrenadante retirado. O pellet restante foi ressuspensão em 5 ml de meio de cultura fresco e as células foram colocadas em cultura em garrafas pequenas. O protocolo foi capaz de gerar algumas culturas primárias imortalizadas que estão armazenadas na instituição, porém apenas fragmentos de apenas 5 casos geraram culturas viáveis por esse método.

Visando então a obtenção de organoides derivados de fragmentos frescos, foi padronizado um novo protocolo de digestão enzimática. Para o estabelecimento de culturas primárias, o fragmento retirado do PDX foi dissociado com auxílio de bisturi em 5 ml de Colagenase IV (Gibco™ - Cód. 17104019) a 5 mg/ml, de acordo com o protocolo descrito por Nguyen e Soragni (2020). Fragmentos congelados em vitrificação, foram previamente descongelados em banho-maria a 37°C e submetidos a lavagens com soluções para retirar resíduos de sucrose e DMSO da solução de congelamento, antes da dissociação mecânica com bisturi. Os fragmentos foram mantidos por 10 minutos em cada uma das soluções descritas abaixo em gelo.

Soluções de lavagem:

Solução 1 –

80% de meio de cultura DMEM *High glucosis* (Gibco™ – cód. 12800-017) suplementado com bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®- cód: S5761)

20% de Soro Fetal Bovino (Gibco™- cód: 12657)

0,5 M de sucrose (Sigma-Aldrich®- cód: s9378)

Solução 2 –

80% de meio de cultura DMEM *High glucosis* (Gibco™ – cód. 12800-017) suplementado com bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®- cód: S5761)

20% de Soro Fetal Bovino (Gibco™ - cód: 12657)

0,25 M de sucrose (Sigma-Aldrich®- cód: s9378)

Solução 3 –

80% de meio de cultura DMEM *High glucosis* (Gibco™ – cód. 12800-017)

20% de Soro Fetal Bovino (Gibco™ - cód: 12657)

O homogenato foi então submetido à digestão enzimática em 10 ml de Colagenase IV (Gibco™ - Cód. 17104019) por 120 min a 37° C sob agitação de 600 RPM em Thermo Mixer (Eppendorf©). Ao fim da digestão enzimática, o conteúdo foi filtrado em *cell strainer* de 100 µm (Falcon - Corning®), seguido de 10 minutos de centrifugação a 1500 RPM. O sobrenadante foi então retirado e o pellet resultante foi ressuspensionado em meio RPMI 1650 (Gibco™ – cód. 31800-022) suplementado com piruvato de sódio (SIGMA – cód. P2256) gelado sem soro. Em casos onde ainda foi possível ver fragmentos, o mesmo foi novamente submetido a um novo ciclo de digestão enzimática.

As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 182 cm² (600ml) (TCF011600 - BIOFIL®) com meio DMEM *high glucose* suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina até que estivessem com 80% de confluência. As células foram contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em 75 µL/poço de *Matrigel® Growth Factor Reduced* (Corning®) a uma densidade que variou de 10.000 a 25.000 células por poço de acordo com o comportamento da mesma em cultura (utilizamos placas de 96 poços (Costar - Corning®). Após a colocação do *Matrigel*, a placa foi deixada em estufa a 37°C por 10 minutos para polimerização do mesmo. Em seguida, adicionou-se 60 µL/poço de meio DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de Penicilina/Estreptomicina e 20ng/ml de bFGF. As placas foram incubadas em estufa de cultura celular com umidade controlada, 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi feita a cada 2 dias, juntamente com o registro fotográfico do experimento.

Também realizamos a geração de organoides por meio de levitação magnética. A técnica Nano3D, que utiliza nano partículas. Nesse protocolo utilizamos nanopartículas biocompatíveis de ouro, óxido de ferro e poli-L lisina (*nanoshuttle*) em conjunto com placas magnéticas para formação de organoides (n3D, Biosciences®, Greiner Bio-One®). A técnica foi empregada primeiramente em células derivadas de cultura primária em monocamada (utilizamos para isso as células do Sarcoma Fusocelular de alto grau – K.J.H.). As células foram destacadas da garrafa de cultura com 5 ml de tripsina e contadas em câmara de Neubauer com adição de Nanoshuttle (10ul a cada 1000 células). Após a adição das nano partículas a garrafa foi colocada em agitação por 1 hora a 350 rpm e 39°C. As células foram ressuspensas em meio de cultura (DMEM High + 20% de SFB) para retirar o excesso de nanopartículas. As células foram plaqueadas em microplacas do tipo *cell-repellent* em estufa a 37°C e 5% de CO₂ sob os ímãs de concentração por 48 horas. Após esse período, os ímãs de concentração foram substituídos pela placa de levitação. Após 1 semana, os organoides gerados por esse protocolo foram fixados utilizando paraformaldeído 4% e emblocados em parafina, para posterior confecção de lâminas

histológicas. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e foi feita a imuno-histoquímica para a marcação de algumas proteínas tipicamente expressas em SPM, como citoceratina, CD34, CD99, Desmina, Miogenina, S-100 e SMA (*Smooth-muscle Actin*).

Em paralelo, decidimos padronizar uma nova técnica para geração de organoides por meio da formação de ‘*mini-rings*’, utilizando células provenientes de um fragmento fresco derivado de PDX. Utilizamos a metodologia descrita por NGUYEN; SORAGNI (2020), visando principalmente minimizar a quantidade de Matrigel utilizada e também facilitar a troca de meio de cultura. Para tal metodologia, foi utilizado uma quantidade de 10.000 células/poço em uma proporção de 3:4 de meio de cultura DMEM F-12 (Gibco™ - cód. 11320033e *Matrigel® Growth Factor Reduced* (Corning®)). Cada anel utilizou 10 µl dessa mistura. Após a solidificação, foi adicionado 120 µl de meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina. A placa foi mantida em estufa própria para cultura celular com temperatura controla a 37°C e 5% de CO₂.

4.5 Imunofluorescência de organoides

Em paralelo, utilizamos o protocolo descrito por Van Ineveld e colaboradores (2020) para padronizar a técnica de imunofluorescência de organoides. A princípio, utilizamos os organoides gerados a partir de uma cultura celular primária de um sarcoma pleomórfico indiferenciado. Essa cultura foi previamente estabelecida a partir de um PDX.

As células foram descongeladas e cultivadas primeiramente em monocamada. Ao atingir a confluência de 80%, as células foram tripsinizadas e cultivadas em *Matrigel GFR* (Corning®) a partir do método convencional, já padronizado. Após 15 dias, os organoides estavam desenvolvidos o suficiente para dar início ao protocolo.

Utilizamos a metodologia descrita por NGUYEN e SORAGNI (2020) para despolimerizar o Matrigel e recuperar os organoides gerados. Para isso foi utilizado a Dispase II (Sigma-Aldrich© - cód. 42613-33) a uma concentração de 5 mg/ml. Cada poço foi incubado com 200 µl de dispase, por 50 minutos a 37°C. Após isso, a placa foi mantida em temperatura ambiente. O conteúdo dos poços foi então transferido para um tubo Falcon contendo mais 2 ml de Dispase II, visando a retirada total do Matrigel que ainda estava polimerizado. Após esta

etapa, o tubo foi centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos para dar início ao protocolo de imunofluorescência.

Os organoides foram fixados em uma solução de PFA 4% por 45 minutos a 4°C. Após o processo de fixação, os organoides foram lavados gentilmente com PBS gelado por 2 vezes, centrifugando o tubo entre uma lavagem e outra, por 5 minutos à 1500 RPM, caso não haja a decantação dos organoides por gravidade. O tubo e a ponteira utilizados foram previamente recobertos com PBS 1% BSA, para evitar que os organoides se prendessem na superfície.

A etapa de bloqueio foi feita com a adição de 10 ml de PBS-Tween 20 (Sigma-Aldrich® - cód. 9005-64-5) gelado por 10 minutos, seguido de centrifugação a 1500 RPM a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi totalmente retirado e os organoides foram ressuspensos em 200 µl/poço de OWB (*Organoid Washing Buffer*). Essa solução é composta por Triton X-100 (Sigma-Aldrich® - cód. 9036-19-5), 10% de SDS (Sigma-Aldrich® - cód. 151-21-3) e BSA, em quantidades especificadas no artigo original. Os organoides ficaram ressuspensos em OWB por 15 minutos a 4°C.

Após as etapas de bloqueio, os organoides foram transferidos para uma placa de 24 poços para dar prosseguimento ao protocolo. Os organoides foram mantidos em 200 µl de OWB. Nessa padronização resolvemos escolher 2 anticorpos de acordo com o laudo anatomopatológico do paciente. No caso da imunohistoquímica, o tumor do paciente foi positivo para SMA (*Smooth muscle actin*) e foi negativo para S-100. Os anticorpos primários escolhidos foram: SMA Anti-human host mouse (Dako® - cód. IR611) e Anti-S100A9 host rabbit (Abcam® - cód. Ab92507). Os anticorpos foram diluídos em OWB, mantendo o dobro da concentração em relação ao que seria utilizado em uma imunofluorescência comum. A concentração do SMA utilizada foi [1:100] e S-100 foi [1:250]. Junto com os anticorpos secundário, utilizamos como corante de núcleo o Draq5 (Thermo Scientific™ - cód. 62251) na concentração de [1:125].

Os anticorpos primários já diluídos em OWB foram colocados na placa, totalizando 400 µl de OWB. A placa foi então incubada overnight em shaker horizontal a 40 RPM. No dia seguinte a incubação, foram feitas 2 lavagens com 100 ml de OWB por 1 hora cada uma. A placa ficou incubada a 4°C durante as lavagens.

Após as lavagens, retirou-se o OWB restante, deixando apenas 200 µl para seguir com a incubação de anticorpos secundário. Nesta padronização, utilizamos Alexafluor 488 plus (Donkey anti-mouse – Invitrogen cód. A32766) e Alexa fluor 546 (Goat anti-rabbit – Invitrogen cód. A11035). Os anticorpos secundários foram diluídos, mantendo também o dobro da concentração, assim como os primários, em 200 µl de OWB. A concentração do Alexa fluor

488 foi [1:1000] e do Alexa fluor 546 foi [1:2000]. A placa foi novamente incubada overnight a 4°C no shaker horizontal. Após a incubação, o processo de lavagem foi repetido e os organoides foram transferidos para um microtubo. Os organoides foram então centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos e o OWB foi totalmente retirado com auxílio de uma ponteira de 200 µl.

A montagem da lâmina foi feita em seguida. Os organoides foram ressuspensos em 50µl de FluorSave (cód. 345789 - Millipore®) prevenindo a formação de bolhas. Para evitar que os organoides fossem danificados durante a montagem da lâmina, utilizamos um selante de silicone translúcido para desenhar um retângulo na lâmina, a fim de formar uma barreira e assim colocar os organoides ressuspensos em FluorSave no seu interior. Em seguida, os organoides foram gentilmente colocados no interior do retângulo. Uma lamínula retangular foi depositada sobre os organoides, sempre tomando cuidado para não formar bolhas. A lâmina já montada foi armazenada em um laminário coberto até o dia seguinte para que pudesse ser observada no microscópio confocal.

4.6 Padronização de teste de viabilidade e citotoxicidade

Para realizar o teste, utilizamos o *LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity kit* (Invitrogen™ - cód. L3224). Para realizar a padronização do protocolo, utilizamos a cultura primária de um sarcoma fusocelular proveniente de PDX. A célula foi cultivada em meio DMEM High suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina em uma densidade de 10.000 células/poço em microplaca de 96 poços. Ao atingir a confluência necessária, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se 100 µl da solução estoque corante.

Ao atingir uma confluência de 70%, o meio de cultura foi retirado e foi adicionada a solução de DPBS contendo os componentes A e B, de acordo com as especificações do fabricante. Para 10 ml de solução estoque, o fabricante recomenda a utilização de 5 µl do componente A e 20 µl do componente B.

Como controle de células mortas, utilizou-se os dois métodos recomendados pelo fabricante. Foram feitos 2 poços com células mortas por calor (deixadas por 20 minutos a 60°C) e 2 poços com células mortas por suspensão de álcool 70. As células foram centrifugadas e ressuspensas na mesma solução corante e colocadas na placa. Como controle negativo,

utilizou-se 2 poços contendo apenas os corantes do kit. A placa foi observada e fotografada em microscópio de fluorescência.

4.7 Teste de citotoxicidade e sensibilidade a quimioterápicos

Decidimos iniciar a padronização dos testes de sensibilidade a quimioterápicos, utilizando a cultura primária em monocamada de 3 casos inclusos em nossa casuística.

As células foram plaqueadas com meio DMEM High suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina em placas de 6 poços com cerca de 100.000 células cada um. Antes de iniciar o tratamento, as células ficaram na estufa por 24 horas até que aderissem à superfície. Nesse primeiro momento, optamos por iniciar os testes com doxorubicina (Fauldoxo – Cloridrato de Doxorubicina 50 mg/ml – Libbs ®). As concentrações escolhidas foram 30/300/2000 ng/ml e os testes foram realizados em triplicata para cada uma das condições.

Após 24 horas, o quimioterápico foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações estabelecidas. A placa foi mantida em estufa por mais 24 horas após a colocação da droga. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e a placa foi lavada com PBS por 2 vezes. Em seguida, prosseguimos com a utilização do kit *LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity*, como descrito anteriormente. Decidimos ajustar o protocolo original do fabricante visando a obtenção de imagens com um sinal mais claro. Nesse experimento, utilizamos 1,25 µl do componente A e 5µl diluídos em 10 ml de PBS. O tempo de incubação com os componentes do kit seguiu o recomendado pelo fabricante. A placa foi observada em microscópio de fluorescência em seguida.

4.8 Extração de DNA

A extração foi realizada seguindo o protocolo operacional padrão já estabelecido do Banco de Macromoléculas do A. C. Camargo Cancer Center pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1) (Sigma Aldrich Corporations) ou kits para extração de DNA de amostras parafinadas (Qiagen e Promega), de acordo com as recomendações dos fabricantes. A qualidade e quantidade foi avaliada pelo Bioanalyzer (RNA 6000 NanoLabChip kit 2100 Agilent) e NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade), respectivamente.

4.9 Sequenciamento de Exoma

O DNA previamente extraído de 8 conjuntos de amostras (cada conjunto incluiu amostras do tumor e leucócitos do paciente, PDX e células obtidas de cultura primária) (Tabela 1), foi enviado e sequenciado pela empresa MacroGen, localizada na Coreia do Sul. Todos os conjuntos foram sequenciados pela plataforma Illumina com leitura do tipo *paired-end*. O kit utilizado foi o *SureSelect V6-Post*.

Inicialmente, o DNA genômico extraído das amostras foi previamente selecionado pelas etapas de controle de qualidade (QC) e em seguida, foi feita a montagem de biblioteca. Essa etapa consiste na quebra do material genético em fragmentos aleatório com subsequente ligação de adaptadores às extremidades 5' e 3' ("tagmentação"). Após a ligação dos adaptadores, os fragmentos foram amplificados por PCR e colocados no interior de uma "*flow-cell*", dando início ao sequenciamento propriamente dito. Cada base incorporada a fita molde emite um sinal fluorescente, que é captado e interpretado pelo sequenciador, gerando no final os dados brutos que serão utilizados na análise.

Todas as amostras enviadas foram aprovadas pelo controle de qualidade interno realizado antes do início do sequenciamento propriamente dito. Os dados gerados foram enviados por meio de arquivo eletrônico e foram tratados e analisados pela equipe do Laboratório de Biologia Computacional e Biomarcadores.

Tabela 1 - Relação de casos enviados para sequenciamento de exoma.

Paciente	Tumor do paciente	Tumor do PDX	Célula
A.C.V	Sim	Sim	Sim
E.R.S	Sim	Sim	Sim
J.G.L.F	Sim	Sim	Sim
J.P.V	Sim	Sim	Não
K.J.H	Sim	Sim	Sim
M.A.N.R	Sim	Sim	Não
M.F.S	Sim	Sim	Sim
W.S	Sim	Sim	Não

Tabela 1 - Relação dos casos presentes na casuística deste estudo que foram enviados para realização do sequenciamento. Em 3 casos, não houve o envio de culturas primárias devido ao não crescimento das mesmas em cultura. No caso de W.S, a cultura primária estava com crescimento lento e decidimos não enviá-la.

4.10 Análise de dados obtidos no sequenciamento

A análise dos dados foi feita em colaboração com a equipe da Facility de Bioinformática do A. C. Camargo Cancer Center e foi realizado a partir do pipeline já estabelecido de acordo com as boas práticas do Genome-Analysis-Toolkit (GATK) para análise de variantes somáticas. Em primeiro momento, as análises foram realizadas com a versão GATK3, e em seguida com a versão mais atualizada do software (GATK4). Ambas as análises foram comparadas para verificar possíveis diferenças nos dados gerados. As boas práticas do GATK compreendem as etapas de alinhamento, pré-processamento e por fim, a chamada de variantes. O alinhamento dos arquivos FASTQ (*reads* geradas no sequenciamento) com o genoma humano de referência (versão hg19/GRCh37) foi feito pelo software BWA (versão 0.7.17-r1188) no modo MEM.

Após a etapa de alinhamento, os arquivos BAMs seguiram para a etapa de pré-processamento com o software GATK (versão 3.8) com os passos *MarkDuplicates*, *BaseRecalibrator* e *PrintReads*. O programa *MarkDuplicates* foi utilizado para identificar pares de *reads* que possam ter sido gerados a partir de uma duplicata de um mesmo fragmento de DNA e foi executado de acordo com os parâmetros padrões. Os programas *BaseRecalibrator* e *PrintReads* também foram executados seguindo os parâmetros padrões. Ambos aplicam

algoritmo de *Machine Learning* que detecta e corrige possíveis erros na qualidade de cada base gerada pelo sequenciador. O número de *threads* será ajustado para 8, o que permitiu um processamento mais rápido dos dados.

A metodologia resumida que será empregada na análise de exoma está representada no fluxograma a seguir (Figura 2).

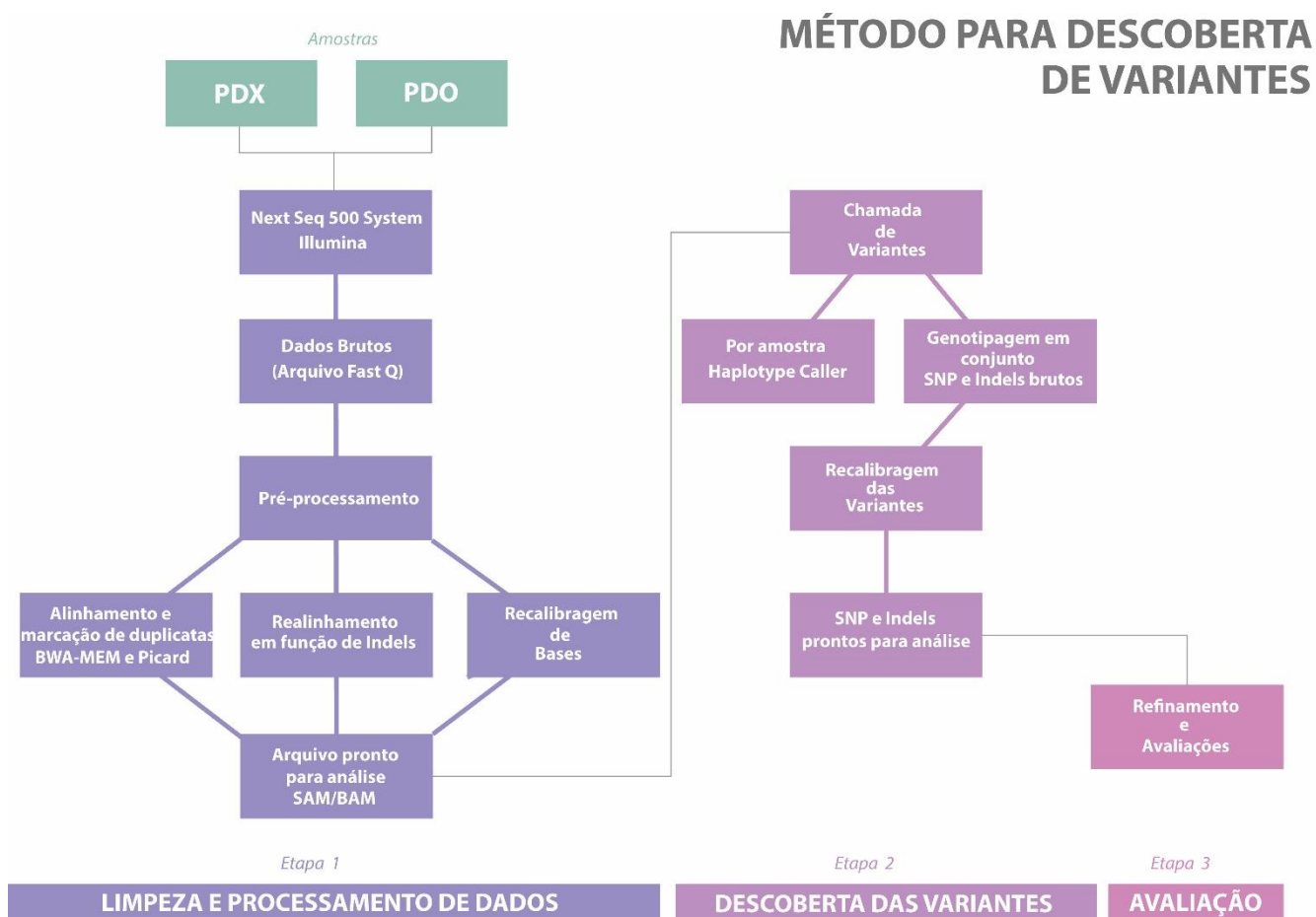
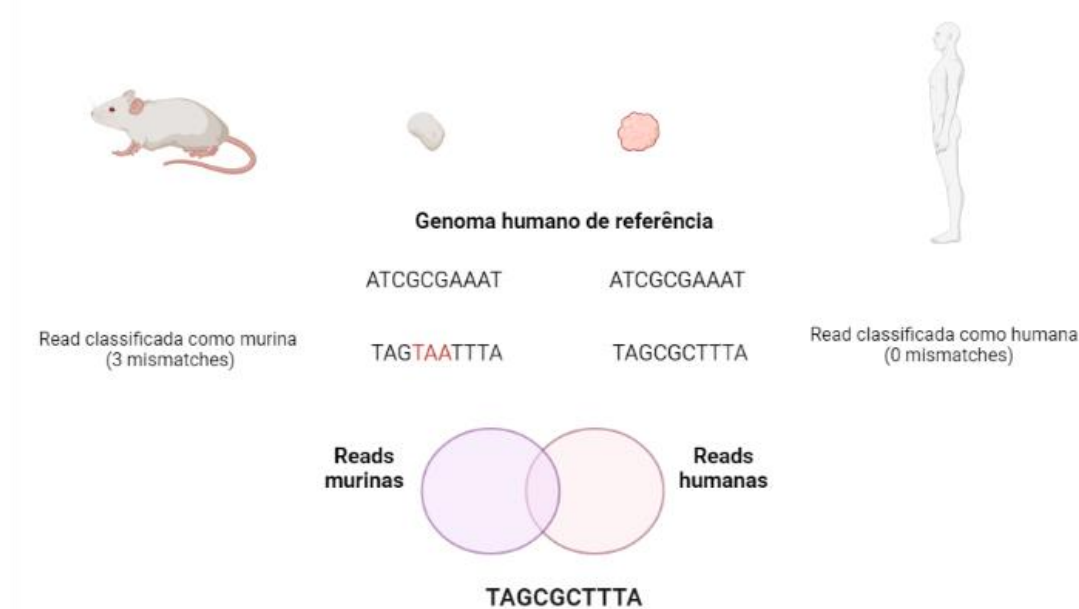


Figura 2 - Fluxograma esquemático contendo a metodologia que será empregada para a chamada de variantes a partir do sequenciamento de exoma de PDO e PDX correspondente. Parte da metodologia utilizada, segue as boas práticas do GATK (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>).

Os dados de sequenciamento de tumores gerados em PDX tendem a apresentar *reads* referentes ao hospedeiro murino. Nesse caso, o processamento dos dados utilizou o pacote *Xenofilter* (Kluin et al. 2018). Essa ferramenta permite a exclusão das *reads* murinas, gerando um novo arquivo BAM que corresponde às sequências que de fato alinharam com o genoma de

referência. Em seguida, os dados seguem as mesmas etapas citadas anteriormente, seguindo as boas práticas do GATK (Figura 3).



Fonte: Adaptado de Kluin *et al.*

Figura 3 - Esquema de processamento de dados de amostras geradas em PDX utilizando o *software* XenofilterR. Após esta etapa, é gerado um novo arquivo BAM contendo apenas as *reads* (humanas) que alinham com o genoma humano utilizado como referência.

Os dados foram submetidos a uma análise mais detalhada com o *software* VarSeq™ (Golden Helix®). Aplicamos filtros para refinar ainda mais os dados, restando apenas as variantes possivelmente verdadeiras e que estavam presentes nas amostras que foram enviadas para sequenciamento. Os filtros são descritos em seguida.

Para garantir a qualidade dos dados, selecionamos sequências com mais de 10 leituras, sendo maior que 3 em cada um dos sentidos forward e reverse. Selecionamos também fragmentos com frequência alélica maior que 5%. Em seguida aplicamos filtros relacionados com a relevância das alterações, selecionando apenas as variantes codificantes com alterações do tipo “*missense*” ou que levem a perda de função da proteína (*Lof – Lost of function*). Por último, selecionamos também apenas as variantes que possuíam REVEL acima de 0,5. REVEL é um método utilizado para prever a patogenicidade de variantes “*missense*” (Ioannidis et al. 2016). O resumo da metodologia empregada no trabalho está disposto abaixo (Figura 4).

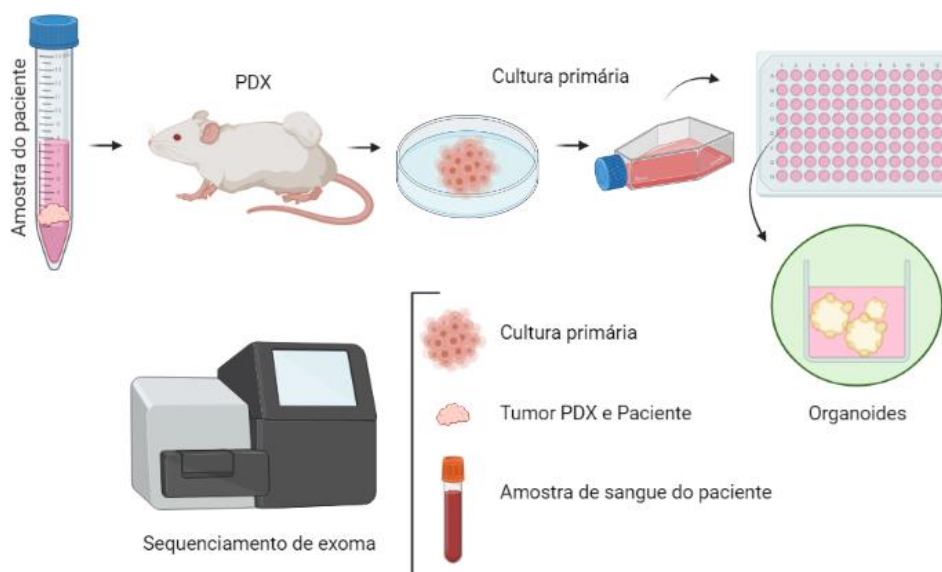


Figura 4 - Desenho esquemático da metodologia experimental utilizada.

5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento de PDX

Das 11 amostras, foram obtidos oito PDXs. Alguns fatores como o grau histológico, adoção de tratamentos neoadjuvantes e presença de tecido tumoral viável (livre de necrose) no fragmento enviado para estudo podem ser a causa para o não desenvolvimento de PDX nas outras duas amostras. O tempo médio para crescimento tumoral variou de 2-12 meses. Os animais que não apresentaram desenvolvimento de tumor foram eutanasiados.

Um breve resumo do histórico dos pacientes é apresentado abaixo:

A.C.V: Paciente do gênero feminino com lesão no braço direito. Recebeu diagnóstico de sarcoma fusocelular pleomórfico de alto grau após ressecção cirúrgica em 2019 com 48 anos. O tumor foi submetido a análise histológica e não apresentou positividade para nenhum dos marcadores utilizados. A paciente não foi submetida a terapia neoadjuvante e adjuvante e não houve recidiva tumoral até o presente momento.

E.R.S: Paciente do sexo feminino que recebeu o diagnóstico inicial de rabdomiossarcoma alveolar de alto grau em 2019, aos 11 anos. A paciente em questão não fez uso de terapia neoadjuvante ou adjuvante. Em 2020 foi detectada metástase no sistema nervoso central. As lâminas foram revisadas pelo patologista e foi reclassificado sarcoma indiferenciado.

J.G.L.F: Paciente do gênero masculino com lesão no antebraço esquerdo. Recebeu diagnóstico de sarcoma fusocelular de alto grau após ressecção cirúrgica em 2017 com 61 anos. O tumor foi submetido a análise histológica por imunohistoquímica apresentando positividade para SMA e S-100. O paciente em questão apresentou recidiva tumoral em 2018 e fez uso de terapia ainda nesse ano.

J.P.V: Paciente do gênero masculino que recebeu o diagnóstico de sarcoma sinonasal bifenotipo em 2019 após ressecção de uma lesão na face, próximo a mandíbula. O paciente tinha 48 anos ao diagnóstico e não fez uso de terapia neoadjuvante ou adjuvante. Após revisão das lâminas histológicas, o diagnóstico foi redefinido como sarcoma indiferenciado.

K.J.H: Paciente do gênero masculino com lesão de pênis e diagnosticado com sarcoma fusocelular indiferenciado de alto grau em 2017 com 52 anos. O paciente foi submetido a penectomia total sem o uso de terapia neoadjuvante. O material cirúrgico foi submetido a imunohistoquímica apresentando positividade para desmina. Em 2019 o paciente apresentou acometimento secundário na região da bacia e no corpo vertebral e passou por tratamento adjuvante. O paciente veio a óbito em 2021.

M.A.N.R: Paciente do gênero feminino com histórico de atendimento na instituição desde 1994. A paciente teve um extenso histórico, apresentando diagnóstico para câncer de mama ductal bilateral, carcinoma basocelular em 2002, metástase em tireoide em 2005, e recidiva com lesão na pele em 2013. Fez uso de quimioterapia em 2006 com uso de trastuzumabe e herceptin e radioterapia. Teve recidiva pulmonar e fez uso de docetaxel e pertuzumabe. Em 2018 foi diagnosticada com sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grau radioinduzido com lesão no tórax. O material cirúrgico foi submetido a análise histológica e apresentou negatividade para todos os marcadores. A paciente ainda segue acompanhamento e está livre de progressão até o momento.

M.F.S: Paciente do gênero feminino com lesão na perna esquerda. Foi diagnosticada com 58 anos com leiomiossarcoma em 2018. Houve ressecção tumoral com amputação do membro e revisão do diagnóstico. Após análise histológica, foi diagnosticada com sarcoma fusocelular e pleomórfico de alto grau com positividade para SMA e desmina. A paciente não fez uso de terapia neoadjuvante. Como 1 º linha de terapia adjuvante fez uso de doxorubicina e

ifosfamida. Apresentou lesão pulmonar decorrente do tumor primário em 2019 e fez uso de gencitabina e docetaxel. A paciente veio a óbito no mesmo ano.

W.S: Paciente do gênero feminino com lesão na coxa esquerda e diagnóstico de sarcoma pleomórfico de alto grau em 2019, aos 38 anos após ressecção cirúrgica. A paciente não fez uso de terapia neoadjuvante. Como tratamento adjuvante, utilizou radioterapia no local da lesão. O material cirúrgico foi também submetido a análise histológica e não apresentou positividade para nenhum dos marcadores.

Os tumores dos pacientes e dos PDX gerados foram submetidos a imuno-histoquímica para os marcadores comumente encontrados em sarcomas, como citoceratina, CD34, CD99, Desmina, Miogenina, S-100 e actina de músculo liso (SMA, de *Smooth-muscle Actin*). A Figura 5 ilustra uma figura representativa, oriundas do paciente A.C.V, onde é possível identificar que o tumor do paciente (painel à esquerda) e o PDX apresentam o mesmo padrão de marcação. Neste caso, positividade para as proteínas CD99 e desmina e negativas para actina de músculo liso, S100, miogenina e citoceratinas. O mesmo padrão de marcação foi observado nos demais casos (dados não mostrados).

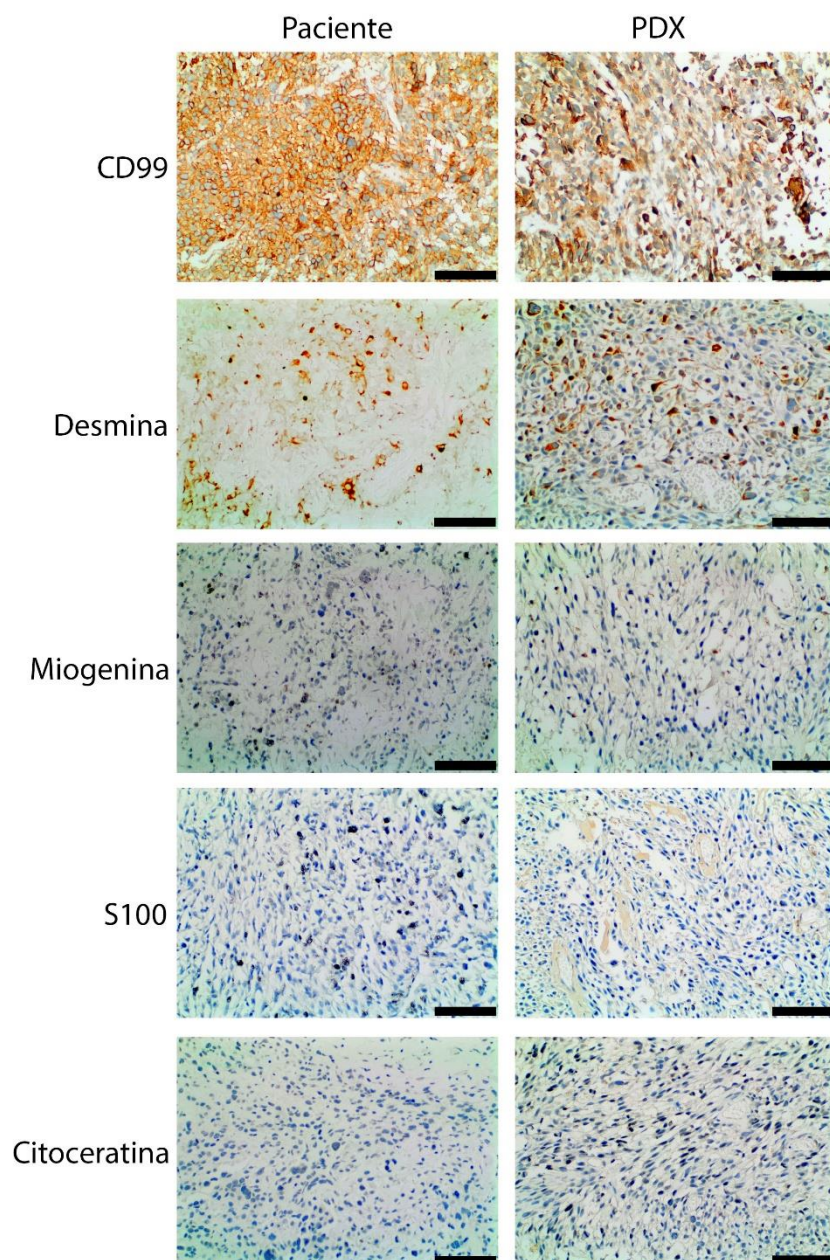


Figura 5 - Imunohistoquímica comparativa para os principais marcadores utilizados no diagnóstico clínico de sarcomas (caso A.C.V.). As marcações foram positivas para Desmina tanto no tumor do paciente, quanto no tumor do PDX, indicando a manutenção das características do tumor primário no PDX. Barra de calibração = 100 μ m.

5.2 Estabelecimento de culturas primárias e PDOs

Optamos em iniciar o protocolo de estabelecimento de PDO utilizando culturas primárias ao invés de fragmentos frescos devido ao fato de se tratar de uma metodologia nova no nosso laboratório. A ideia seria determinar as condições mínimas para migrarmos para os fragmentos. Escolhemos a cultura derivada do sarcoma fusocelular do paciente K.J.H (sarcoma fusocelular). A cultura foi realizada a partir de um protocolo padronizado, utilizando *Matrigel® Growth Factor Reduced* (Corning® Matrigel® Matrix) com adição de 20 ng/ml de FGF. A condição permitiu a geração de esferoides visíveis ao microscópio com cerca de 3 dias. A cultura foi acompanhada e fotografada durante 20 dias aproximadamente (Figura 6).

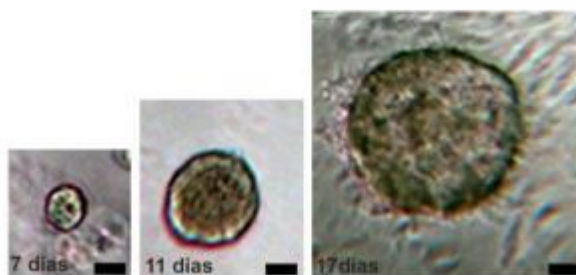


Figura 6 - Organoide derivado de um caso de sarcoma fusocelular de pênis a partir da técnica padronizada com o uso de *Matrigel® Growth Factor Reduced* associado a adição de 20 ng/ml de FGF. A técnica demonstrou grande efetividade quando realizada a partir de células derivadas de cultura em monocamada.

Na sequência, também conseguimos obter organóides com o protocolo Nano3D. É possível verificar que os PDOs expressam proteínas como CD99 e SMA, igual ao observado no paciente (informações do prontuário) e não expressa citoceratina (CK), S100 e desmina. A utilização das nanopartículas resultou no aparecimento de marcações escuras em algumas regiões da lâmina e estão apontadas pela seta na imagem abaixo (Figura 7).

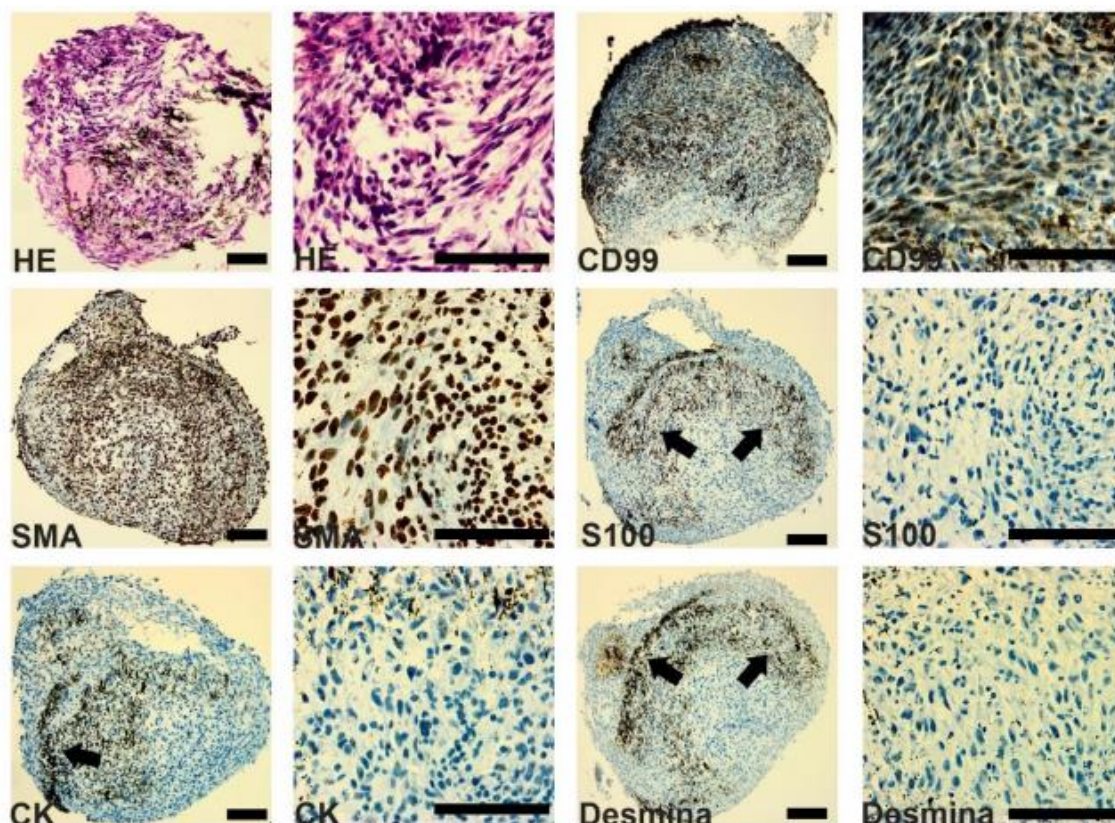


Figura 7 - *Patient-Derived Organoids* (PDO) gerados pela técnica Nano3D. Após fixação e emblocamento em parafina, os organoides foram seccionados (3 μ m) e as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Parte das lâminas foi utilizada para realização de ensaio de imuno-histoquímica para as proteínas comumente expressas em SPM (CD99, actina de músculo liso (SMA), citoqueratina (CK), S100 e Desmina). As marcações inespecíficas oriundas das nanopartículas estão apontadas pela seta. Barra de calibração = 100 μ m.

Com as condições estabelecidas em culturas primárias, partimos para o uso de fragmentos tumorais. Inicialmente, utilizamos um fragmento de sarcoma fusocelular que foi digerido e 1×10^5 células foram cultivado em placa de 96 poços em *Matrigel® GrowthFactor Reduced*. Os esferoides foram visíveis em 2 dias, mas mesmo com troca de meio a cada 2 dias (Figura 8), não foi observado crescimento das esferas e a cultura foi descartada após quinze dias.

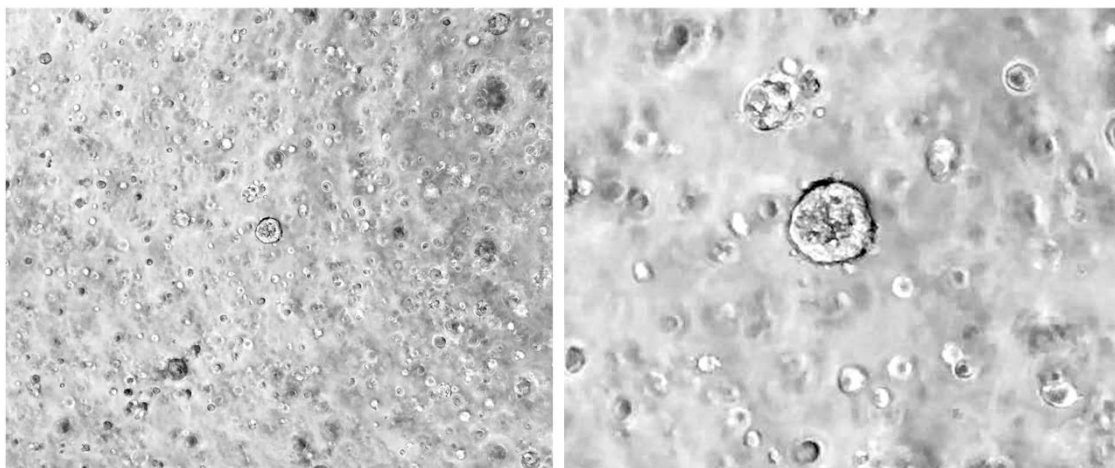


Figura 8 - Geração de organoides a partir de tecido fresco (2º tentativa) utilizando um fragmento de PDX derivado de um sarcoma fusocelular. Utilizamos a mesma técnica já estabelecida, com Matrigel Growth Factor Reduced e adição de 20 ng/ml de FGFb. A quantidade de células plaqueadas foi maior e foi possível verificar a formação de mais esferoides e em maior tamanho. As fotos foram registradas após 7 dias de cultura.

Repetimos o protocolo com outros fragmentos de outros casos, porém, foram frequentes os problemas com o protocolo de digestão enzimática. Por se tratar de um tumor extremamente heterogêneo, tivemos dificuldade em estabelecer um protocolo padronizado que leve a um resultado satisfatório para todas as condições teciduais variáveis que são típicas de sarcomas.

O meio de cultura utilizado assim como os suplementos adicionados, variam de acordo com o tecido, o que torna o protocolo algo demasiadamente variável. O tempo de formação dos organoides também é bastante variável e está relacionado com o tecido de origem do fragmento utilizado. Além disso, a própria heterogeneidade celular dos fragmentos pode dificultar o processo de adaptação das células as condições em que são submetidas no sistema *in vitro*.

Levando em consideração os fatores que dificultam o estabelecimento de organoides a partir de fragmentos congelados e frescos, decidimos testar um novo protocolo de dissociação, que utiliza apenas a enzima Colagenase IV (Nguyen e Soragni, 2020). A técnica permitiu o estabelecimento de uma cultura em monocamada a partir de um tumor fibroso solitário proveniente de PDX. A cultura obteve uma confluência de 90% em uma semana com utilização de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (Figura 9).

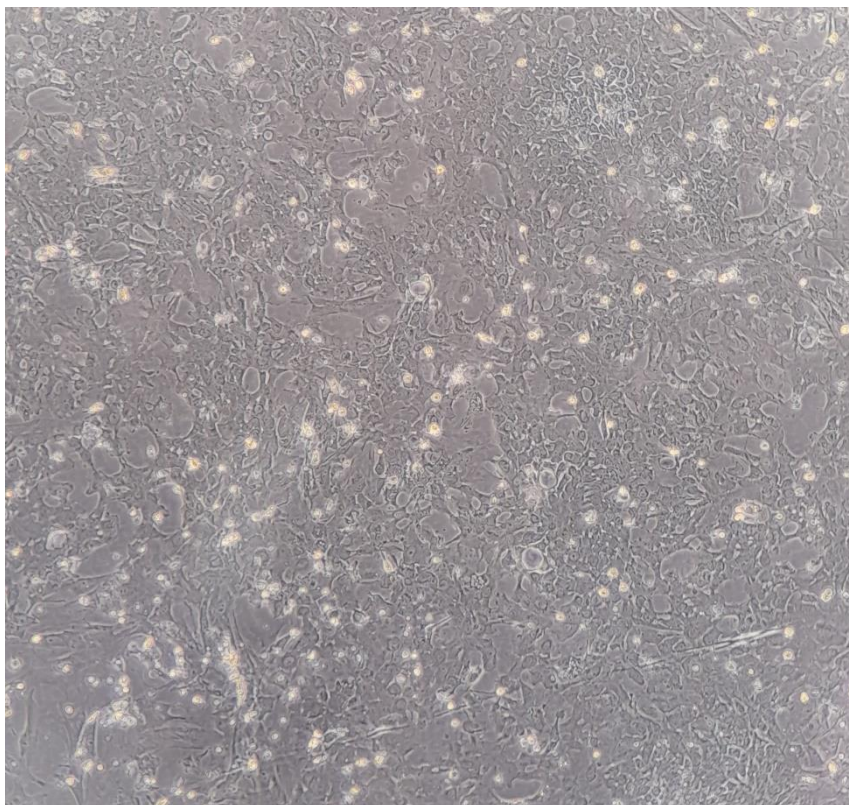


Figura 9 - Cultura primária de Tumor Fibroso Solitário estabelecido a partir da otimização do protocolo de digestão enzimática. A utilização da metodologia descrita por Nguyen e Soragni (2020) contribuiu na manutenção da viabilidade celular e consequente sucesso no desenvolvimento da cultura.

Visando testar qual seria a condição ideal para a formação de organoides, utilizamos a cultura primária já estabelecida de 4 subtipos de sarcomas pleomórficos e fusocelulares. Foram selecionadas células com até 10 passagens. As células foram descongeladas e cultivadas em estufa até que atingissem a confluência de 90%. Em seguida, foram cultivadas pela metodologia já estabelecida para geração de organoides.

As Figuras 10, 11 e 12 mostram o teste de 3 condições que variavam em número de células (5.000, 10.000 e 45.000 células por poço) e com ou sem presença de suplementação com FGF a 20 ng/ml.

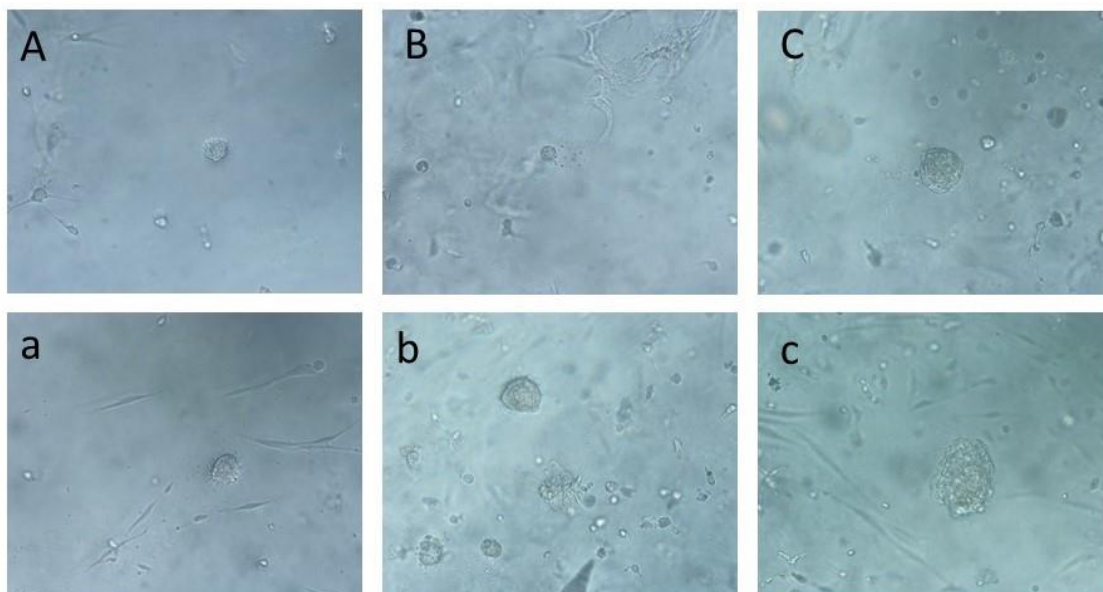


Figura 10 - Organoides provenientes de uma cultura celular primária em monocamada de um Sarcoma Fusocelular Pleomórfico de Alto Grau. As células derivam de um tumor gerado em PDX. Condições experimentais: (A) 5.000 células/ poço; (B) 10.000 células por poço e (C) 45.000 células/poço. Em (a) 5.000 células/ poço + 20 ng/ml de FGF; (b) 45.000 células/poço + 20 ng/ml de FGF e (c) 45.000 células/poço + 20 ng/ml de FGF.

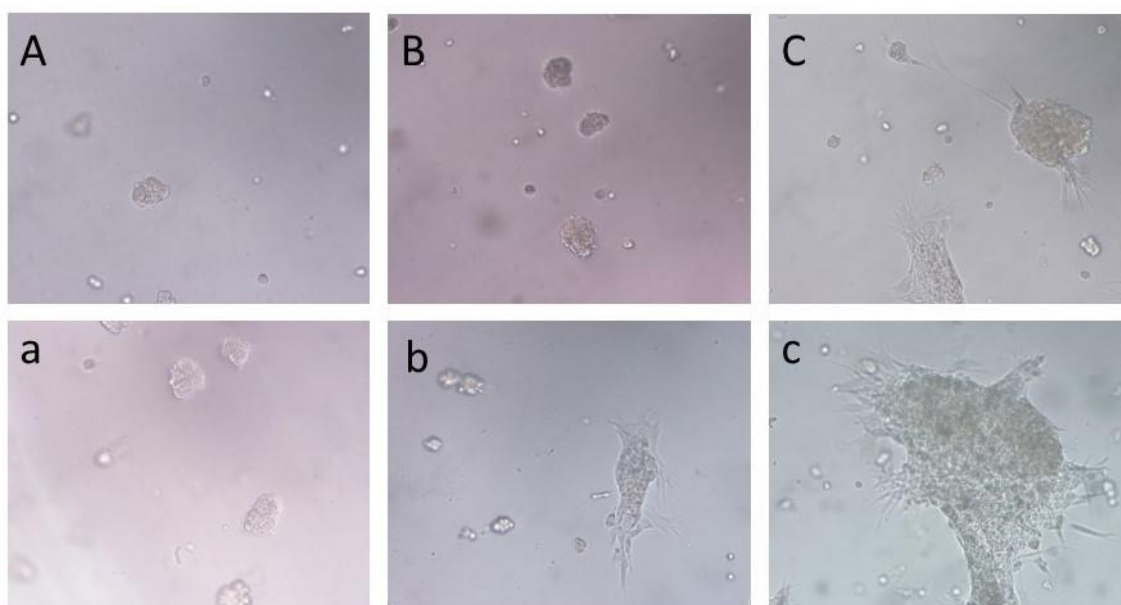


Figura 11 - Organoides provenientes de uma cultura celular primária em monocamada de um Sarcoma Fusocelular de pênis. As células derivam de um tumor gerado em PDX. Condições experimentais: (A) 5.000 células/ poço; (B) 10.000 células por poço e (C) 45.000 células/poço.

Em (a) 5.000 células/ poço + 20 ng/ml de FGF; (b) 45.000 células/poço + 20 ng/ml de FGF e (c) 45.000 células/poço + 20 ng/ml de FGF.

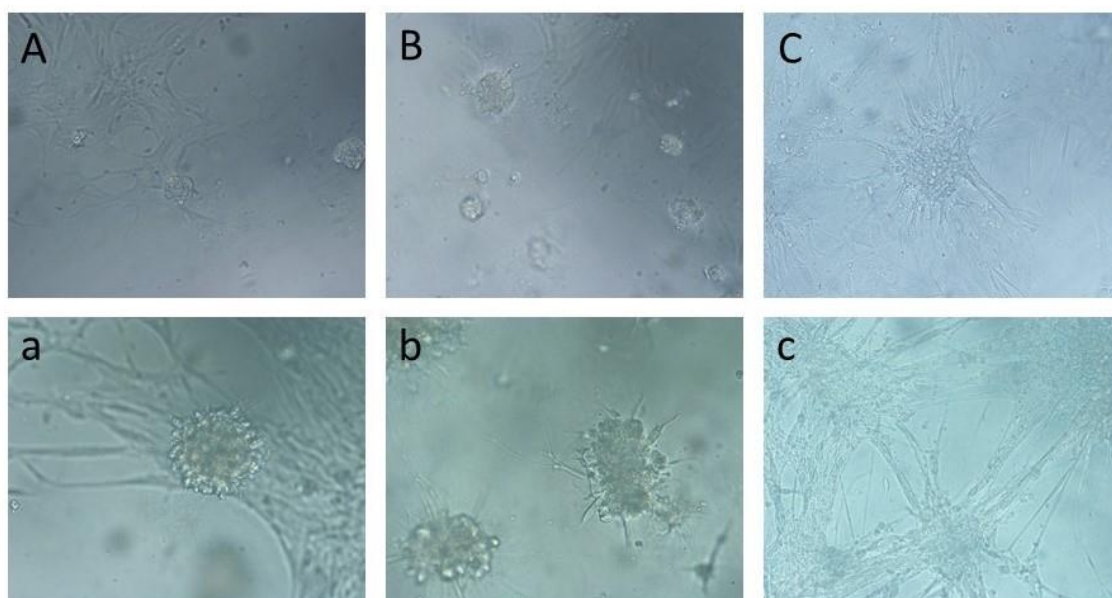


Figura 12 - Organoides provenientes de uma cultura celular primária em monocamada de um Sarcoma Fusocelular e Pleomórfico de Alto Grau. As células derivam de um tumor gerado em PDX. Condições experimentais: (A) 5.000 células/ poço; (B) 10.000 células por poço e (C) 45.000 células/poço. Em (a) 5.000 células/ poço + 20 ng/ml de FGF; (b) 45.000 células/poço + 20 ng/ml de FGF e (c) 45.000 células/poço + 20 ng/ml de FGF.

A suplementação com FGF nos três experimentos contribuiu significativamente para geração de organoides maiores, comparado a condição sem essa suplementação. Além disso, o número de células ideal variou de acordo com a célula (5.000 ou 10.000). Acreditamos que a técnica ainda precise de algumas adaptações para de fato concluirmos a metodologia mais adequada voltada para o desenvolvimento de organoides derivados de sarcomas. Diante da dificuldade encontrada para adaptar esse protocolo a tempo, decidimos seguir utilizando para tal as culturas primárias já estabelecidas anteriormente na instituição. Todas as culturas primárias foram derivadas de fragmentos de PDX e serviram para estabelecer condições para o estudo de citotoxicidade com quimioterápicos.

5.3 Imunofluorescência de organoides

Foi estabelecido o protocolo de imunofluorescência de organoides. Utilizamos inicialmente a marcação com as proteínas S100 e actina de músculo liso (SMA). As imagens foram obtidas por microscopia confocal (Figura 13). Curiosamente, obtivemos positividade para a marcação de S-100, que não havia sido detectado anteriormente (Figura 13) e também no material utilizado para emissão do laudo anátomo-patológico do paciente. Esse achado precisa ser verificado em novos ensaios.

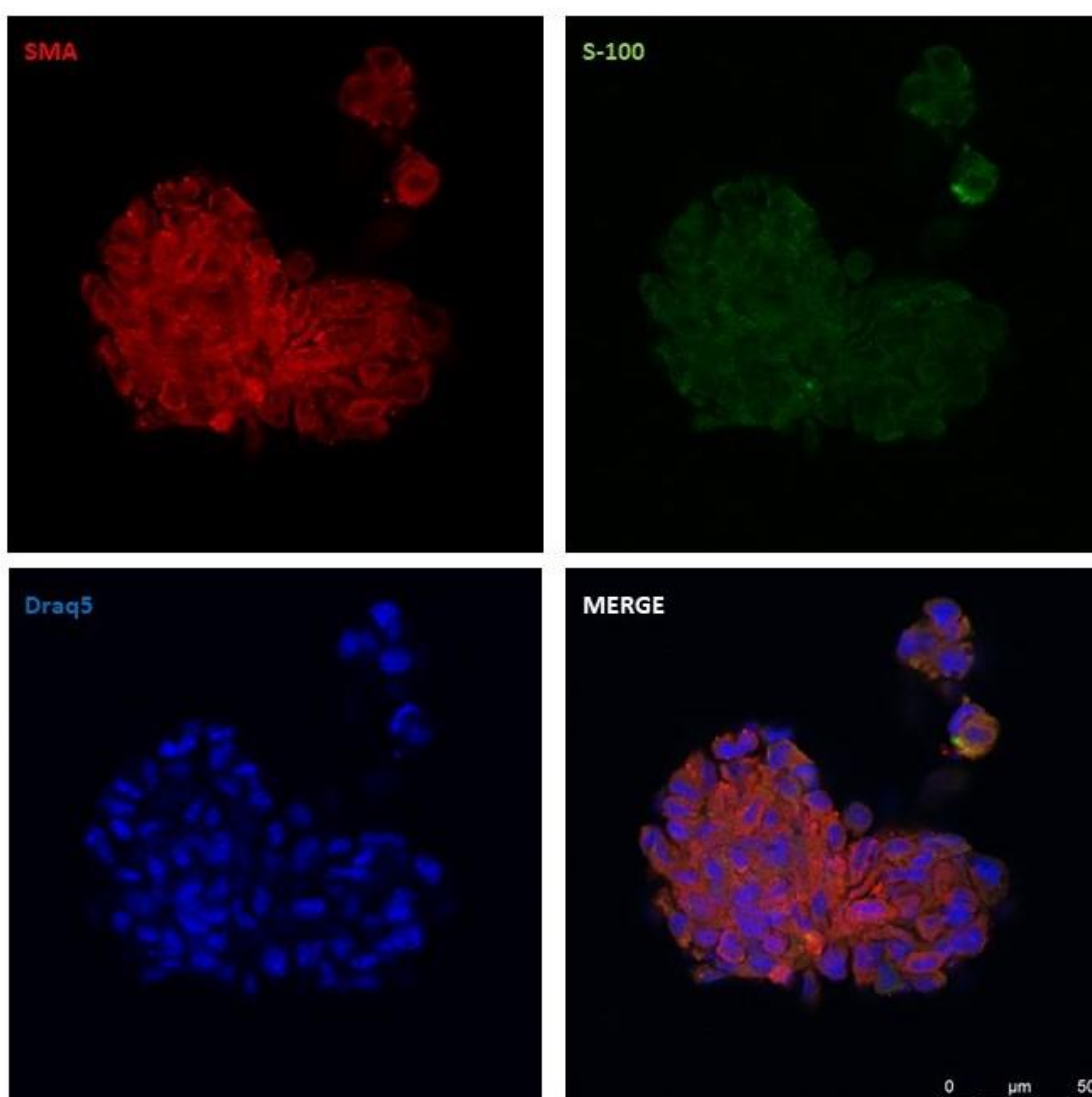


Figura 13 - Padronização do protocolo de imunofluorescência de organoides. SMA foi marcado em vermelho (488), S-100 em verde (546) e Draq5 em azul (622).

5.3 Padronização do teste de viabilidade e citotoxicidade

O kit *LIVE/DEAD Viability/Citotoxicity* é um meio de diferenciar e estimar visualmente células viáveis de células não viáveis. Este kit se baseia em corar as células viáveis em verde, por meio da marcação com calceína-AM, que indica atividade da enzima esterase no meio intracelular e cora em vermelho as células não-viáveis, por meio de homodímero de etídio-1, que indica perda de integridade da membrana celular.

A padronização do kit *LIVE/DEAD* foi realizado utilizando a cultura em monocamada de um sarcoma fusocelular, paciente K.J.H. (Figura 14).

Como controle positivo de morte, as células foram incubadas por 20 minutos a 60 °C minutos no Thermo Mixer a 60 rpm. O kit utilizado mostrou um resultado satisfatório e permitiu a correta marcação e distinção de células viáveis de não-viáveis. Entretanto, observou-se um sinal fluorescente muito forte, sendo necessária a repetição do protocolo visando o ajuste das quantidades dos componentes. A densidade celular de cada poço também dificultou a visualização, sendo necessário realizar a coloração com uma menor confluência por poço. Fatores como esses podem contribuir para obtenção de imagens de maior qualidade e facilitar a visualização da marcação diferencial nas células. As imagens da padronização estão colocadas abaixo.

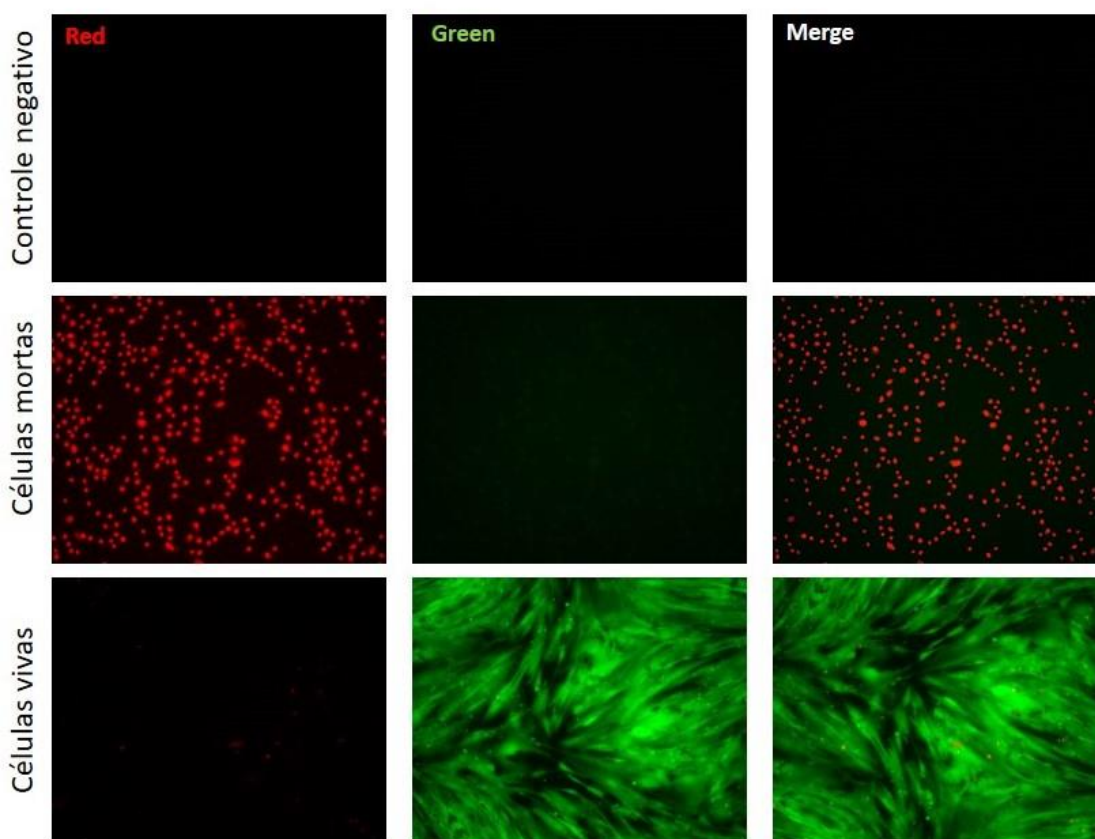


Figura 14 - Padronização do protocolo de viabilidade e citotoxicidade (Kit Live/Dead) em cultura primária em monocamada. O kit realiza a detecção de células morta por meio da marcação em vermelho e de células viáveis por meio da marcação em verde.

5.4 Teste de citotoxicidade e sensibilidade a quimioterápicos

Diante das dificuldades encontradas para estabelecer os PDO e para realizarmos as análises de sequenciamento no tempo adequado, decidimos seguir no estabelecimento de um protocolo de sensibilidade a quimioterápicos em culturas primárias e em organoides derivados de culturas primárias. O resultado que será mostrando adiante é preliminar, mas reflete a nossa capacidade de avaliar toxicidade frente a um quimioterápico utilizado como terapia sistêmica padrão em sarcomas (Figura 15).

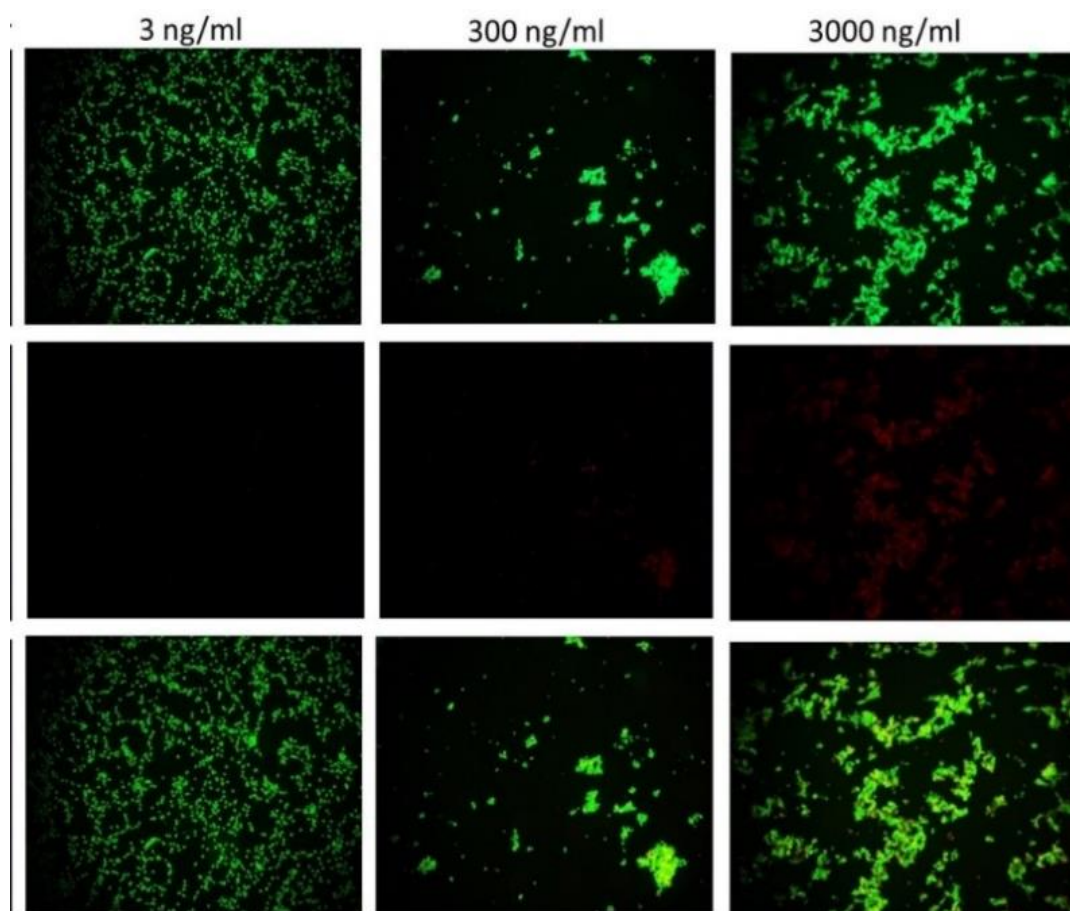


Figura 15 - Ensaio preliminar de sensibilidade a Doxorrubicina no caso de um sarcoma fusocelular indiferenciado de alto grau. Para o controle de morte celular, utilizou-se a mesma célula após inativação por exposição ao calor.

A Figura 16 e 17 mostram resultados semelhantes foram obtidos com culturas primárias de outros dois casos de sarcoma pleomórfico.

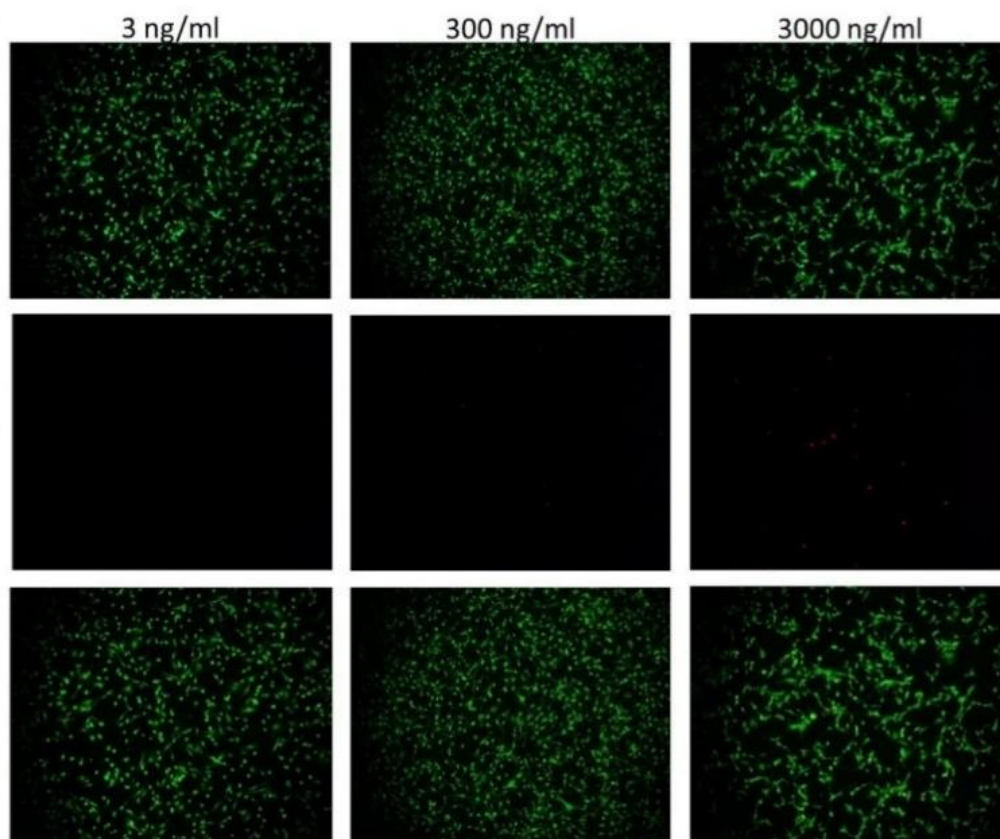


Figura 16 - Ensaio preliminar de sensibilidade à Doxorrubicina em um Sarcoma fusocelular e pleomórfico de alto grau - M.F.S. Para o controle de morte celular, utilizou-se a mesma célula após inativação por exposição ao calor.

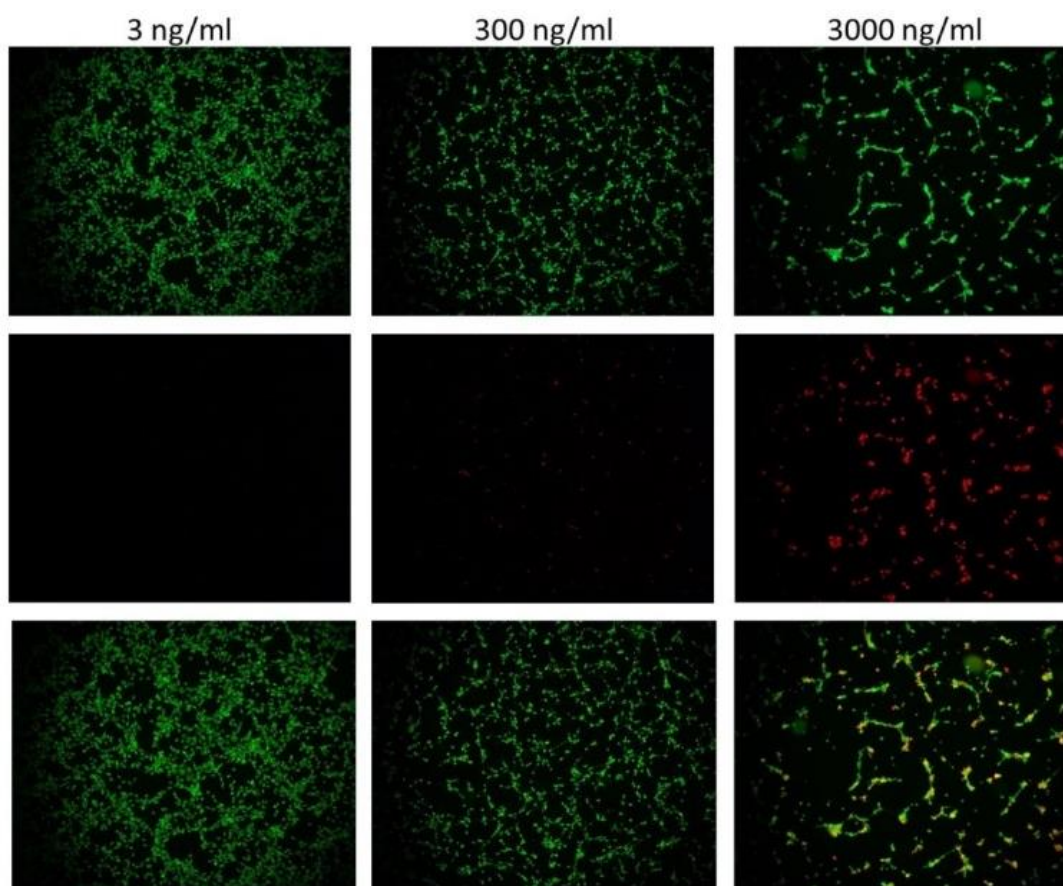


Figura 17 - Ensaio preliminar de sensibilidade à Doxorubicina em um Sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grau – W.S. Para o controle de morte celular, utilizou-se a mesma célula após inativação por exposição ao calor.

Com a observação de um perfil de marcação que é condizente com a toxicidade causada pela doxorubicina, concluímos que o ensaio de viabilidade foi devidamente estabelecido. Isso é fundamental para a continuidade desta linha de pesquisa, uma vez que este protocolo será utilizado para determinar a toxicidade de fármacos que serão escolhidos de acordo com as alterações moleculares identificadas em cada um dos casos que foram submetidos a análise de exoma.

5.5 Sequenciamento de exoma

Foi realizado o sequenciamento de um conjunto de oito amostras, sendo cinco delas representadas por um conjunto paciente/PDX/cultura celular e outros três por um conjunto de

paciente/PDX (Tabela 4). O motivo de não termos oito conjuntos completos foi devido as culturas primárias dos pacientes J.P.V., M.A.N.R e W.S. não prosperaram, impedindo assim a realização de novos cultivos a tempo de as amostras serem enviadas para o sequenciamento.

O primeiro nível de análise realizado envolveu a cobertura das amostras. Verificamos que em quatro amostras, JPV-T (amostra tumoral do paciente J.P.V), PELLET-PDX-JGLF, PELLET-PDX-KJH e PELLET-PDX-MFS tiveram coberturas muito baixas e, portanto, foram descartadas das análises posteriores.

Tabela 4 – Dados de cobertura das amostras enviadas para sequenciamento.

Amostras		% de bases mapeadas	% de bases com mais de 20 leituras
Tumor do paciente	ACV-T	99,26	95,5
	ERS-T	99,92	97,4
	JGLF-T	98,74	95,5
	JPV-T	92,8	20,9
	MANR-T	98,56	91,1
	MFS-T	98,97	96,1
	WS-T	99,32	95,3
	PDX-ACV-T	99,99	97,3
PDX	PDX-ERS-T	99,98	97,9
	PDX-JGLF-T	99,43	97,1
	PDX-JPV-T	96,81	90,2
	PDX-MANR-T	99,99	97,4
	PDX-MFS-T	99,99	96,9
	PDX-WS-T	99,99	97,1
	PELLET-PDX-ACV	99,99	97,3
	PELLET-PDX-ERS	99,99	96,5
Células	PELLET-PDX-JGLF	90,52	21
	PELLET-PDX-KJH	92,12	22,1
	PELLET-PDX-MFS	91,65	20,2

Um sumário da análise dos conjuntos de amostras dos pacientes (Figura 18), PDX (Figura 19) e culturas celulares (Figura 20) nos permite avaliar que a maioria das alterações encontradas é do tipo *missense*, seguida de *Splice site* e *frame shift* e o principal tipo de variante é SNP. Em relação ao tipo de substituição, as de T>C e C>T são as mais frequentes.

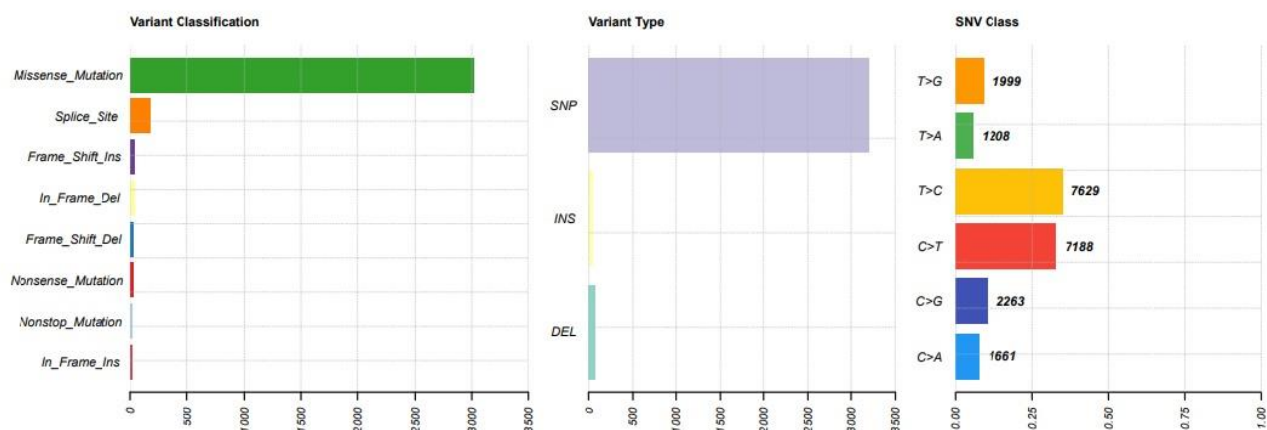


Figura 18 - Gráfico resultante do sequenciamento de exoma de todas as amostras do tumor derivado dos pacientes envolvidos no estudo. A maior parte das variações detectadas são SNPs (*Single Nuclotide Polimorphism*) e são classificadas como *missense*. A maior parte das alterações compreende a troca de nucleotídeo T – C (timina – citosina) ou C – T.

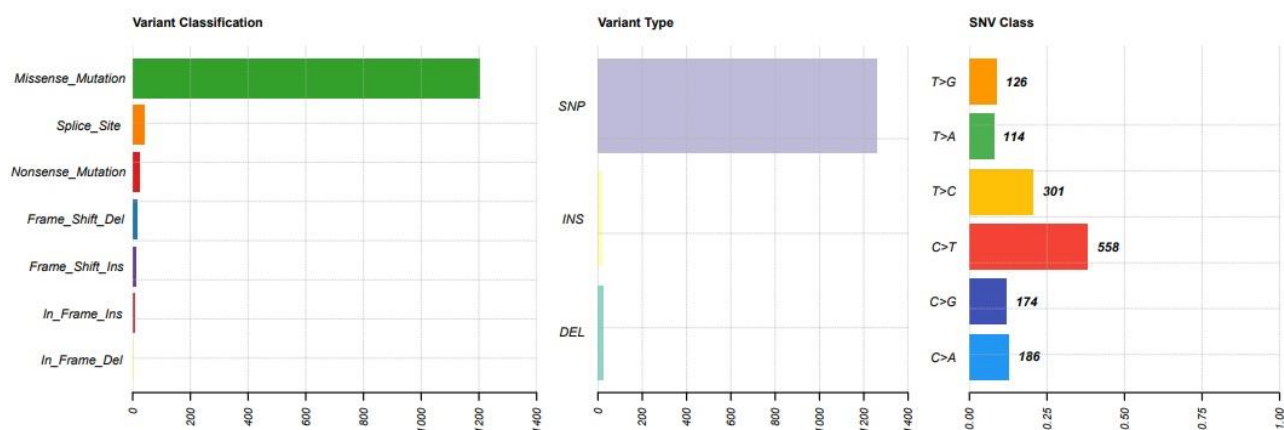


Figura 19 - Gráfico resultante do sequenciamento de exoma dos tumores derivados de PDX. A maioria das variantes, assim como nos tumores derivados de paciente, são *missense* do tipo SNP. As alterações são em sua maioria ocasionadas pela troca C – T (citosina – timina).

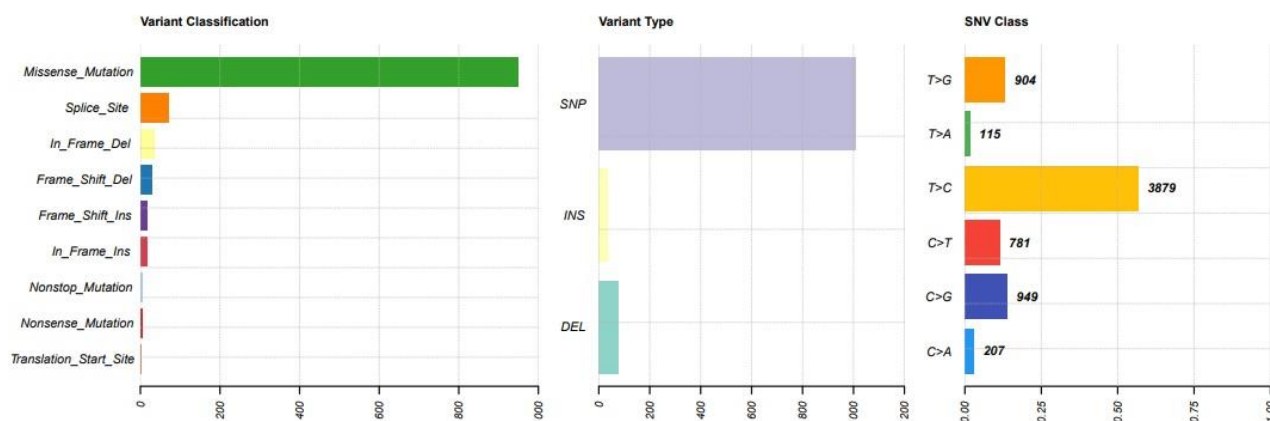


Figura 20 - Gráfico resultante do sequenciamento de exoma das culturas celulares derivadas do PDX. As variantes também são do tipo *missense*, assim como o observado nas amostras tumorais dos pacientes e nos PDXs gerados. As trocas T – C são os SNPs mais frequentes.

Utilizamos os dados de cobertura como parâmetro inicial de qualidade. Decidimos aprofundar as análises nas amostras que possuísem a maior porcentagem de bases com mais de 10 leituras tanto no tumor do paciente, quanto no PDX e na cultura primária derivada. Além disso, filtramos as variantes que apresentassem um número de leituras superior a 3, tanto na fita *forward* quando na fita *reverse*. Sendo assim, decidimos prosseguir com os pacientes A.C.V e E.R.S.

Após a aplicação dos filtros de qualidade no VarSeq™, decidimos restringir as análises apenas ao caso E.R.S. Ao analisarmos as variantes encontradas no caso A.C.V foi possível verificar que, apesar do índice de cobertura da amostra ser alto, ainda haviam variantes que apresentaram erros relacionados a etapa de amplificação, ainda durante a confecção de biblioteca. Além disso, maior parte das variantes do tumor do paciente não apresentaram correspondência em relação ao PDX e a linhagem primária. Sendo assim, optamos por excluir esse caso das análises finais. O sequenciamento deverá ser repetido futuramente.

Após a aplicação dos filtros de qualidade, as 230 variantes encontradas no conjunto de amostras representados pelo caso ERS foi reduzida a 99 e, então submetido a uma seleção por relevância das variantes codificantes que resultou em 58 variantes, sendo que 8 delas estão presentes tanto no tumor do paciente, no PDX e na cultura primária. Quatro delas são do tipo *missense* (FCRL3, MYO1G, SPAM 1 e HASPIN/ITGAE) e as outras quatro do tipo *loss-of-function* (NPHP4, NHLRC2, PAN2 e MAPK8IP3). Um resumo dessa análise está representada Na Figura 21.

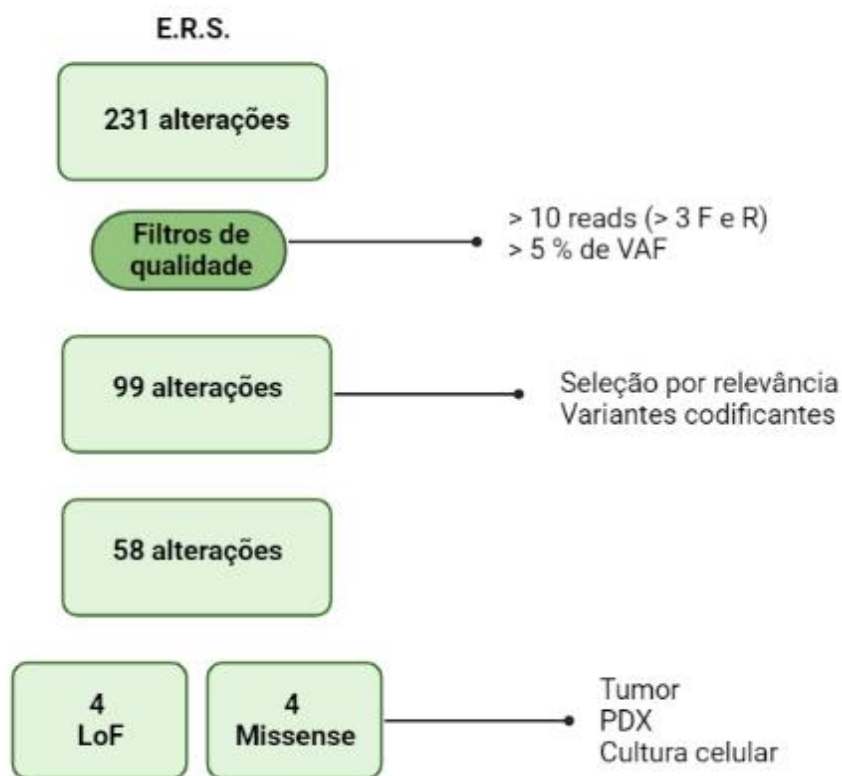


Figura 21 - Fluxograma com a sequência de filtros aplicados nas alterações pelo software VarSeq™. O tumor apresentou inicialmente 231 alterações. Ao final da filtragem, restaram 4 variantes do tipo LoF e 4 do tipo *missense* que estão presentes no tumor do paciente, PDX e na cultura celular primária.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Devido à baixa incidência de pacientes, a adoção de estudos pré-clínicos em tumores considerados raros é fundamental e contribui com o surgimento de novas terapias, já que permite o aprofundamento no estudo de novos genes-alvo e suas respectivas funções (Kondo 2020).

A abordagem pré-clínica envolve 3 categorias de estudo: *Patient-derived xenografts* (PDX), *Patient-derived organoids* (PDO) e células derivadas de paciente. Este trabalho se propôs a explorar e padronizar essas 3 categorias de estudos pré-clínicos a partir de pacientes diagnosticados com sarcoma pleomórfico indiferenciado e fusocelular, sendo esses dois subtipos os mais comuns entre os sarcomas de partes moles.

Obtivemos com sucesso a geração de nove PDXs derivados de material cirúrgico de pacientes com sarcoma pleomórfico indiferenciado e fusocelulares atendidos por A. C. Camargo Cancer Center, destes oito foram escolhidos para análise de exoma e identificação de alterações que possam ser alvejadas com drogas-alvo. Foi também possível obter a cultura primária de 5 desses casos. Todos os casos enviados foram sequenciados.

Quanto a geração de organoides, ainda não obtivemos êxito na padronização de um protocolo que seja eficiente para todos os fragmentos. Entretanto, foi possível verificar que a técnica de cultura 3D é facilmente aplicada em células em monocamada. Alguns outros protocolos foram padronizados com sucesso neste trabalho como a imunofluorescência de organoides e também o teste de sensibilidade a quimioterápicos com utilização de kit para verificação da viabilidade células em culturas primárias.

O surgimento de novos modelos pré-clínicos capazes de reter as características tumorais exibidas nos pacientes é de extrema importância no cenário da medicina personalizada. Esses modelos contribuem para o surgimento de novos alvos terapêuticos e são essenciais para o desenvolvimento de novas drogas (Okada et al. 2019).

A obtenção do modelo PDX é capaz de preservar componentes do microambiente e arquitetura tumoral e baseia-se na inserção de um fragmento tumoral proveniente do paciente em um animal imunocomprometido (Okada et al. 2019).

A descoberta de animais atímicos imunocomprometidos (camundongos do tipo nude) em 1962 revolucionou e propiciou uma nova área de estudo na oncologia. Com seu primeiro uso ainda em 1969, o modelo de PDX se mostrou promissor ao permitir a geração de tumores com as mesmas características encontradas no paciente. Desde então, o sucesso da técnica levou ao surgimento de novos camundongos imunodeficientes, proporcionando um maior desenvolvimento desse modelo murino na pesquisa oncológica (Surdez et al. 2021).

O uso de animais com imunodeficiência é um dos motivos que permite a alta taxa de sucesso desse modelo. Neste trabalho, optamos por utilizar camundongos NOD/SCID gamma (NSG). O cruzamento entre animais NOD (*non-obese diabetic mice*) e SCID (*severe combined immunodeficient mice*) deu origem a camundongos com ausência de linfócitos T e B e alterações severas no sistema imune adaptativo (NOD/SCID). O cruzamento de camundongos do tipo NOD/SCID com animais que apresentam deficiência no receptor IL-2 γ por sua vez deu origem a linhagem NSG, cujo a principal característica é também a ausência completa de células do tipo NK (Okada et al. 2019).

Os camundongos NSG, que apresentam severas alterações no sistema imune, como a ausência total de células T, B e NK, contribuem para que a taxa de sucesso seja muito maior, se comparada ao uso de animais nudes, por exemplo (Yoshida 2020).

A taxa de sucesso pode variar de acordo com algumas características do tumor primário e geralmente tumores com comportamentos típicos de agressividade, tem a maior chance de sucesso na geração desse modelo (Okada et al. 2019).

A taxa obtida nesse trabalho é maior do que é relatado na literatura e foi igual a 81,8% (de 11 fragmentos, 9 geraram PDX com sucesso). O trabalho descrito por Cornillie e colaboradores (2019) aponta um sucesso de 32% da técnica (61 de 188 casos). Desses 188 casos, apenas 3 derivados de sarcomas pleomórficos indiferenciados obtiveram sucesso (Cornillie et al. 2019). Outro trabalho relata a revisão de diversos artigos e descreve uma taxa de sucesso de 50% (2/4) para a geração de PDX derivados de sarcomas fusocelulares e 60% (6/10) para sarcomas pleomórficos indiferenciados. No geral, a taxa de sucesso é de 70,9% para sarcoma de partes moles (LU et al., 2018). Ainda assim, deve-se levar em consideração a porcentagem com o número total de PDXs gerados, já que o número amostral ainda é baixo. Quanto ao tempo de geração, obtivemos casos de PDXs que levaram de 2 a 12 meses, um pouco maior do que encontrado na literatura, que foi de 4 – 8 meses (Yoshida 2020).

Assim como qualquer modelo pré-clínico, o uso de PDX apresenta vantagens e desvantagens. O modelo é capaz de preservar as características do tumor do paciente, como arquitetura celular, a biologia tumoral e a resposta a quimioterápicos. Além disso, o uso de PDX em sarcomas mostrou que o perfil genético do tumor primário é mantido, preservando também a histopatologia e a heterogeneidade tumoral (Lu et al. 2018; Yoshida 2020).

Por utilizar animais imunocomprometidos (como os camundongos NSG), torna-se um modelo com custo elevado, já que os animais necessitam de alojamento do tipo *SPF* (Okada et al. 2019).

Além disso, o tempo para desenvolvimento dos tumores é algo variável, o que faz com que os testes para avaliação de sensibilidade a drogas seja algo demorado. Ainda assim, o crescimento dos fragmentos nos animais torna-se mais rápido com as passagens subsequentes. Outras desvantagens são a impossibilidade de realização de testes que envolvem uso de imunoterapia e a substituição de células do estroma tumoral por células de origem murina (Shi et al. 2020).

Outro modelo pré-clínico explorado neste estudo foi o organoide derivado de paciente. No nosso caso, optamos por utilizar amostras tumorais oriundas dos PDX, pelo fato de que

esses tumores apresentam capacidade de crescimento tumoral *in vivo*. Na medida que a técnica for estabelecida, serão utilizadas amostras obtidas diretamente dos pacientes. Os organoides são caracterizados como um tipo de cultura 3D que derivam de células primárias e são capazes de manter similaridade tanto arquitetural, quando funcional com os órgãos dos quais se originaram. Além disso, tal modelo ainda permite a conservação das características genéticas presentes nos tumores originários (Rae et al. 2021).

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, tudo isso em um tempo menor quando comparado a utilização do modelo PDX (Maier et al. 2021; Rae et al. 2021).

Todas as culturas primárias utilizadas neste trabalho (tanto para o ensaio de citotoxicidade, quanto para o estabelecimento da metodologia de geração de PDOs) foram derivadas de PDX. Tais culturas possibilitam a realização de testes de sensibilidade a droga, já que mantém as características do tumor do paciente. A utilização de culturas celulares também contribui para diminuir os custos e o tempo gasto em relação ao uso do modelo PDX (Invrea et al. 2020).

Esses organoides foram então submetidos a imunohistoquímica e apresentaram positividade para desmina, assim como o tumor primário do paciente, demonstrando que a cultura primária derivada do PDX do sarcoma de pênis foi capaz de manter a mesma característica do tumor original, no que diz aos marcadores diagnósticos (Figura 4).

Apresentamos dificuldade ao estabelecer PDOs derivados do tumor primário do paciente. São poucos os artigos disponíveis na literatura que demonstram a aplicação da metodologia em sarcomas de partes moles. Ainda não temos meios de cultura específicos que contemplem as culturas derivadas de sarcomas de partes moles. Um estudo com colangiocarcinoma não obteve sucesso na geração de organoides devido ao meio utilizado para cultivar as células. No caso os autores utilizaram um meio já estabelecido para organoides de tumores gástricos e a cultura não chegou até a segunda passagem. Entretanto, a suplementação com outros fatores como inibidor de ROH quinase, Selenita, Forskolina e Transferrina permitiu que a cultura se estabelecesse por um longo período (Maier et al. 2021).

A ausência de suplementação do meio utilizado pode ter sido um dos motivos que explicaria a falha do protocolo. Outros suplementos como R-Spondina-1, fator de crescimento epidérmico (EGF), Noggina, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), inibidores de p28 (SB202190) e da via TGF (A83-01) são comumente utilizados. Ainda são necessários mais

estudos que visem entender quais suplementos são essenciais na cultura de células provenientes de sarcomas, já que tais suplementos podem variar de acordo com o tumor utilizado (Rae et al. 2021).

Visto isso, decidimos seguir o trabalho utilizando linhagens celulares em monocamada que foram anteriormente imortalizadas a partir de material extraído do PDX. Decidimos escolher 3 linhagens (K.J.H, M.F.S. e WS) que estavam armazenadas sob congelamento para testarmos quais seriam as condições ideais para a geração de PDOs. Em todos os casos a obtenção dos organoides foi excelente. A célula W.S. foi a única em que a cultura foi mantida por 15 dias, já que seu desenvolvimento estava lento. A utilização de suplementação com FGF mostrou ser benéfica em todos os casos, contribuindo para a obtenção de organoides bem desenvolvidos. No caso dessas células, o número ideal por poço foi de 10.000 a 25.000 células por poço (Figura 9, 10 e 11).

Também padronizamos a técnica de imunofluorescência em organoides. Escolhemos usar organoides originados da célula M.F.S, que está presente em nossa casuística. Optamos por utilizar 2 marcações com base no laudo diagnóstico do paciente, SMA (positiva no tumor) e S-100 (negativa no tumor). O protocolo de imunofluorescência foi eficiente e permitiu a marcação específica dos organoides. No entanto, foi possível verificar a marcação positiva para S-100, diferente do tumor do paciente (Figura 12).

Um estudo envolvendo organoides de carcinoma neuroendócrino demonstrou a perda de marcadores importante (sinaptofisina, cromogranina e CD56) nesse tipo tumoral, levando a exclusão de 2 conjuntos de organoides por discordância com o tumor primário. A seleção de células com características não-neuroendócrinas ou a perda desse marcador na cultura são apontados pelos autores como fatores que levaram a ausência de sinaptofisina nos organoides (Dijkstra et al. 2021).

A heterogeneidade intratumoral é uma das características-chaves encontradas em tumores e faz parte das “*Hallmarks*” descritas por Hannahan e Weinberg (Hannahan and Weinberg 2011). Um único tumor é capaz de abrigar diversas populações celulares que diferem entre si, apresentando características e perfis genéticos distintos. A heterogeneidade intrínseca dos tumores é um dos motivos que leva à geração de PDXs que diferem do tumor primário, uma vez que a utilização do modelo murino causa uma pressão seletiva, levando à progressão de algumas populações celulares específicas (Shi et al., 2020).

A pressão seletiva também leva à substituição de parte das células tumorais estromais, alterando o microambiente tumoral ao longo das passagens. Além disso, as condições do tecido que será implantado devem ser levadas em conta, uma vez que a porção retirada pode não ser

totalmente representativa do tumor. Um estudo em adenocarcinoma pulmonar demonstrou amplificação em HER2 e manutenção de amplificação em MET e inibidores dependentes de kinase A (Shi et al., 2020).

O fato de as células utilizadas neste ensaio serem derivadas de PDX pode ter ocasionado a expressão de S-100 no ensaio de imunofluorescência. Ainda são necessários mais estudos focados em técnicas que permitam o melhor entendimento dessas variações, visando contribuir ainda mais com o desenvolvimento da validação dessa técnica. A adoção de um meio de cultura com as necessidades específicas para células mesenquimais poderia contribuir para um maior sucesso no desenvolvimento de PDOs.

Outro teste realizado foi utilizando o kit de viabilidade células LIVE/DEAD. Testamos esse kit utilizando a cultura convencional do sarcoma de pênis (K.J.H). Tratou-se de um ensaio rápido e simples que permite a obtenção de resultados em 30 minutos. O kit apresentou bons resultados em células em monocamada e pode ser promissor também quando empregado em organoides para avaliação de sensibilidade a drogas.

Com o protocolo já estabelecido, decidimos iniciar um teste piloto para sensibilidade a drogas, utilizando primeiramente células em monocamada derivadas de PDX. Utilizamos as mesmas células M.F.S, K.J.H, e W.S para verificar o efeito de 3 concentrações diferentes de doxorubicina.

A doxorubicina isolada ou em conjunto com ifosfamida, é um dos quimioterápicos de escolha de primeira linha para tratamento de sarcomas (Meyer and Seetharam 2019). De acordo com a bula (Fauldoxo – Cloridrato de Doxorubicina - Libbs®), seu mecanismo de ação é baseado na inibição da síntese de DNA por meio da ligação da doxorubicina, além de interação com a membrana celular e com a topoisomerase II, apresentando ação citotóxica e antineoplásica.

Todas as células utilizadas apresentaram um aumento de dano progressivo de acordo com a dose utilizada de doxorubicina. Ainda assim, observamos que o perfil de resposta variou entre as células utilizadas. A célula M.F.S. aparentemente apresentou maior resistência em comparação a K.J.H. e W.S, já que visualmente o número de células comprometidas é menor. Coincidentemente, a paciente em questão foi refratária ao uso de doxorubicina em combinação com ifosfamida.

A célula W.S. em contrapartida, teve um maior efeito da doxorubicina, apresentando maior quantidade de células inviáveis em 3000 ng/ml quando comparada com as outras. O efeito foi consideravelmente maior na dose de 3000 ng/ml, com a maior parte das células

inviáveis e em processo de morte (apresentando dupla marcação). Já a célula K.J.H apresentou uma resposta intermediária frente a doxorubicina.

A utilização de células em estudos *in vitro* ainda é algo amplamente aplicado na oncologia. Apesar do surgimento de novos modelos pré-clínicos, como PDX e organoides, o uso de cultura celular ainda é necessário e permite ampliar o conhecimento acerca de mecanismos funcionais de genes biomarcadores e sua interação com novos fármacos. Por ser um tumor raro, são poucas as linhagens disponíveis. A utilização de células derivadas de fragmentos tumorais pode ser uma alternativa para estudos pré-clínicos, já que podem reter as características do tumor de origem (Hattori et al. 2019; Tsuchiya et al. 2022).

A análise de sequenciamento de exoma do caso E.R.S revelou alterações relevantes nos genes *FCRL3*, *MYO1G*, *SPAM1*, *HASPIN*, *NPHP4*, *NHLRC2*, *PAN2* e *MAPK8IP3*.

O gene *FCRL3* é responsável por codificar um dos receptores de imunoglobulina do tipo Fc. Esse gene tem um importante papel na regulação do sistema imune. Alterações nesse gene estão relacionadas a doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e doença autoimune da tireoide, por exemplo (<https://genome.ucsc.edu/>).

Ainda não há nenhum estudo que relacione alterações no gene *FCRL3* em sarcomas. Entretanto, existe correlação de que alguns SNVs levem ao aumento de risco para tumores de cabeça e pescoço (Zhang and Sun 2021). Outro estudo fez o levantamento de 14 genes relacionados a resposta imune em câncer de ovário. A expressão de *FCRL3* é maior em tecidos derivados de câncer de ovário do que em tecidos normais. A alta expressão também está relacionada a recorrência nesse tipo tumoral (Quan et al. 2021). O sequenciamento de exoma do caso E.R.S revelou a presença de uma mutação em *FCRL3* devido a troca nucleotídica (G/A), ocasionando a perda de função da proteína codificada. Tal alteração está presente tanto no tumor do paciente, quanto no PDX gerado a partir desse caso.

Encontramos também alterações relacionadas ao gene *MYO1G*. Esse gene é responsável por codificar uma das miosinas não convencionais de classe 1. A principal função dessa classe de miosinas é controlar a tensão da membrana celular, contribuindo para a migração celular. O gene *MYOG1* está superexpresso em diversos tipos tumorais como em tumores de células escamosas de cabeça e pescoço, em tumores cervicais; indicando um pior prognóstico e em carcinoma de células escamosas de esôfago (Diaz-Valencia et al. 2022).

O gene *MYOG1* está superexpresso também em pacientes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda, apresentando valor diagnóstico, com diminuição da expressão em pacientes onde houve remissão tumoral. O aumento do nível de expressão de *MYOG1* está relacionado também com pior prognóstico em pacientes diagnosticados com câncer renal (Estrada-Abreo et

al. 2021). Encontramos alteração em MYO1G no tumor do paciente, PDX e nas células enviadas para sequenciamento. Houve perda de função da proteína codificada devido a troca de nucleotídeo C/A. Não há dados na literatura atualmente que identifiquem essa alteração em sarcomas de partes moles.

Identificamos uma alteração no gene SPAM1. Esse gene está relacionado a funções de adesão entre óvulo e espermatozoide, por meio da síntese de hialuronidase (<https://genome.ucsc.edu/index.html>). Existem poucos artigos que relacionam alterações em SPAM1 com desenvolvimento tumoral. Um único artigo de 2011 relata a expressão de SPAM1 em tumores de mama e relaciona a expressão com um pior prognóstico (Veiseh and Turley 2011). A expressão de SPAM1 foi encontrada no tumor do paciente e também no PDX.

Encontramos alterações no gene HASPIN/ITGAE. Com descrição ainda em 2001, refere-se a uma serina/treonina quinase atípica codificada pelo gene GSG2. O gene está localizado na região intrônica de outro gene que codifica a integrina αE (ITGAE) (Higgins 2001; Tokuhiro et al. 2007). Haspin está associado a diversas funções na célula. Encontrado primeiramente em espermátides de camundongos, sua expressão não está restrita apenas as células germinativas (Kestav et al. 2017).

Sabe-se que essa quinase também está presente em menor concentração em células somáticas, atuando em funções relacionadas a mitose e progressão do ciclo celular normal. A inativação de HASPIN leva a geração de um ciclo celular anormal, já que leva ao mal alinhamento cromossômico, separação prematura das cromátides irmãs e formação de fuso cromossômico disfuncional. Já a superexpressão leva a um atraso durante a fase de intérfase da mitose (Wang et al. 2020; Soupsana et al. 2021).

Sabe-se que a superexpressão de HASPIN está relacionada com um pior prognóstico em tumores de bexiga. O efeito dessa superexpressão pode levar a progressão tumoral, inibição de apoptose e migração celular (Chen et al. 2020). Algo semelhante foi descrito em tumores de ovário, indicando que a superexpressão está correlacionada com um pior prognóstico, sendo um potencial alvo terapêutico (Huang et al. 2021). Um estudo envolvendo câncer de próstata também identificou efeitos da expressão disfuncional de HASPIN, indicando sua superexpressão. Resultados mostram que o knockout de GSG2 leva a apoptose, inibe a proliferação e interfere na formação de colônias (Yu et al. 2020). Identificamos alteração do tipo LoF em HASPIN/ITGAE devido a mutação do tipo *frameshift* no tumor do paciente e também na cultura celular primária. Não há dados na literatura sobre o efeito dessa variante em sarcoma de partes moles.

Outra alteração encontrada envolveu o gene NPHP4 por meio da troca G/T, gerando uma variante *missense*. Esse gene está relacionado ao desenvolvimento e funcionamento dos túbulos renais (<https://genome.ucsc.edu/index.html>). Atualmente, são poucos os artigos que citam a relação desse gene com tumores. Mas sabe-se que esse gene está relacionado a ativação da via *Hippo* e apresenta um padrão diferencial de metilação em tumores renais, sendo um regulador negativo dessa via de proliferação celular (Habbig et al. 2012; Slater et al. 2013). Não há relações sobre alterações em NPHP4 em sarcomas de partes moles. Nosso trabalho identificou essa alteração no tumor do paciente, PDX e também na cultura celular utilizada.

Alterações em NHRLC2 do tipo *missense* foram reportadas pelo sequenciamento realizado. Neste trabalho, o gene sofreu alterações por meio da troca de nucleotídeos T/C, tanto no tumor do paciente, quanto no PDX derivado. Este gene está relacionado a síndrome rara FINCA (fibrose, neurodegeneração e angiomas cerebrais). A função do gene NHRLC2 ainda não está totalmente definida, entretanto, sabe-se que está presente no cérebro e é responsável por funções de organização celular (Badura-Stronka et al. 2022). Um estudo realizou o perfil transcricional em adenocarcinoma de pulmão e revelou que a expressão de NHRLC2 foi relacionada com um tempo de sobrevivência maior (Ye et al. 2019). Não há artigos que descrevam alterações nesse gene em outros tumores.

Outra alteração do tipo *missense* foi encontrada no gene PAN2. Esse gene codifica a deadenilase. Trata-se de uma subunidade do complexo responsável por degradar RNA mensageiro no citoplasma. A degradação da cauda poli-A do RNA mensageiro e consequente inibição do processo de transcrição, é de suma importância e contribui para regulação gênica (Tang et al. 2019). Não há dados na literatura que relacionem esse gene a sarcoma de partes moles e outros subtipos tumorais. Neste trabalho a alteração foi encontrada no tumor do paciente, PDX e também na cultura celular utilizada.

Por fim, encontramos alterações *missense* em MAPK8IP3. O gene codifica JIP3, que participa da via MAPK e serve como proteína adaptadora para a via JNK. Estudos relacionam alterações em JIP3 a condições neurodegenerativas em diversas espécies. A função de MAPK8IP3 ainda não está muito estabelecida para humanos. Sabe-se que JIP3 participa do complexo de kinesina, que tem como função o transporte axonal (Iwasawa et al. 2019). Ainda é necessário abordar as funções de MAPK8IP3 no desenvolvimento tumoral, especialmente em sarcomas de partes moles.

A raridade e heterogeneidade dos sarcomas de partes moles ressalta a necessidade do desenvolvimento de novos modelos pré-clínicos para impulsionar estudos que envolvam entender a biologia tumoral, assim como contribuir com o surgimento de novos tratamentos.

7 CONCLUSÕES

- A plataforma de estudos baseados em PDX de sarcomas pleomórficos foi estabelecida com sucesso através da obtenção de oito casos, os quais foram molecularmente caracterizados parcialmente.
- A metodologia para geração de PDO foi estabelecida a partir de culturas de células em monocamada. Ainda há a necessidade de estabelecer os PDO a partir de tecidos frescos e criopreservados.
- Padronizamos o protocolo de imunofluorescências de organoides.
- O sequenciamento de exoma foi realizado e identificou diversas alterações comuns aos conjuntos paciente/PDX/cultura primária.
- Padronizamos o ensaio inicial de citotoxicidade por imunofluorescência em cultura primária exposta ao quimioterápico doxorubicina. Os próximos passos incluem realizar o mesmo teste utilizando organoides ao invés de culturas em monocamada.

8 REFERÊNCIAS

- Badura-Stronka M, Śmigiel R, Rutkowska K, Szymańska K, Hirschfeld AS, Monkiewicz M, et al. FINCA syndrome-Defining neurobehavioral phenotype in survivors into late childhood. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 2022 Apr 1;
- Becker M, Graf C, Tonak M, Radsak MP, Bopp T, Bals R, et al. Xenograft models for undifferentiated pleomorphic sarcoma not otherwise specified are essential for preclinical testing of therapeutic agents. *Oncology Letters*. 2016;12:1257–64.
- Byrne AT, Alférez DG, Amant F, Annibali D, Arribas J, Biankin A v., et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2017;17(4):254–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.140>
- Carvalho SD, Pissaloux D, Crombé A, Coindre JM, le Loarer F. Pleomorphic Sarcomas: The State of the Art. *Surgical Pathology Clinics* [Internet]. 2019;12(1):63–105. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.path.2018.10.004>
- Chen Y, Fu D, Zhao H, Cheng W, Xu F. GSG2 (Haspin) promotes development and progression of bladder cancer through targeting KIF15 (Kinase-12). *Aging* [Internet]. 2020;12(10):8858–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32439830>
- Choi JH, Ro JY. The 2020 WHO Classification of Tumors of Soft Tissue: Selected Changes and New Entities. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2021 Jan;28(1):44–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32960834>
- Colella G, Fazioli F, Gallo M, de Chiara A, Apice G, Ruosi C, et al. Sarcoma Spheroids and Organoids-Promising Tools in the Era of Personalized Medicine. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018;19(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29466296>
- Day CP, Merlino G, van Dyke T. Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges. *Cell* [Internet]. 2015;163(1):39–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.068>
- Demicco EG, Ding L, Ladanyi M, Lazar AJ, Singer S. Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell*. 2017;171(4):950–965.e28.
- Diaz-Valencia JD, Estrada-Abreo LA, Rodríguez-Cruz L, Salgado-Aguayo AR, Patiño-López G. Class I Myosins, molecular motors involved in cell migration and cancer. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2022;16(1):1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34974807>

- Dijkstra KK, van den Berg JG, Weeber F, van de Haar J, Velds A, Kaing S, et al. Patient-Derived Organoid Models of Human Neuroendocrine Carcinoma. *Frontiers in Endocrinology*. 2021 Mar 11;12.
- Estrada-Abreo LA, Rodríguez-Cruz L, Garfias-Gómez Y, Araujo-Cardenas JE, Antonio-Andrés G, Salgado-Aguayo AR, et al. High expression of Myosin 1g in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* [Internet]. 2021 Sep 14;12(19):1937–45. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.28055>
- Ezuddin NS, Pretell-Mazzini J, Yechieli RL, Kerr DA, Wilky BA, Subhawong TK. Local recurrence of soft-tissue sarcoma: issues in imaging surveillance strategy. *Skeletal Radiology*. 2018;47(12):1595–606.
- Ferrari A, Dirksen U, Bielack S. Sarcomas of Soft Tissue and Bone. *Progress in Tumor Research*. 2016;43:128–41.
- Gaebler M, Silvestri A, Haybaeck J, Reichardt P, Lowery CD, Stancato LF, et al. Three-Dimensional Patient-Derived In Vitro Sarcoma Models: Promising Tools for Improving Clinical Tumor Management. *Frontiers in Oncology*. 2017;7(September):1–14.
- Galuschka C, Proynova R, Roth B, Augustin HG, Muller-Decker K. Models in translational oncology: A public resource database for preclinical cancer research. *Cancer Research*. 2017;77(10):2557–63.
- Haas RL, van de Sande MAJ. Considering sarcoma staging systems and their implications to personalized care. *Chinese Clinical Oncology*. 2019;8:103–103.
- Habbig S, Bartram MP, Sägmüller JG, Griessmann A, Franke M, Müller RU, et al. The ciliopathy disease protein NPHP9 promotes nuclear delivery and activation of the oncogenic transcriptional regulator TAZ. *Human Molecular Genetics*. 2012 Dec;21(26):5528–38.
- Hamacher R, Bauer S. Preclinical models for translational sarcoma research. *Current Opinion in Oncology*. 2017;29(4):275–85.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74
- Hattori E, Oyama R, Kondo T. Systematic Review of the Current Status of Human Sarcoma Cell Lines. *Cells*. 2019 Feb 13;8(2):157.
- Hernandez MC, Bergquist JR, Leiting JL, Ivanics T, Yang L, Smoot RL, et al. Patient-Derived Xenografts Can Be Reliably Generated from Patient Clinical Biopsy Specimens. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2019;
- Higgins JM. The Haspin gene: location in an intron of the integrin alphaE gene, associated transcription of an integrin alphaE-derived RNA and expression in diploid as well as haploid

- cells. *Gene* [Internet]. 2001 Apr 4;267(1):55–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311556>
- Huang Y, Liu Y, Zhu K, Ma X, Lu R, Zhang M. Gsg2 promotes development and predicts poor prognosis of ovarian cancer. *Cancer Management and Research*. 2021;13:499–508.
- Igarashi K, Li S, Han Q, Tan Y, Kawaguchi K, Murakami T, et al. Growth of doxorubicin-resistant undifferentiated spindle-cell sarcoma PDOX is arrested by metabolic targeting with recombinant methioninase. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;119(4):3537–44.
- Invrea F, Rovito R, Torchiano E, Petti C, Isella C, Medico E. Patient-derived xenografts (PDXs) as model systems for human cancer. Vol. 63, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 151–6.
- Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2016 Oct 6;99(4):877–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27666373>
- Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Science*. 2017;108(3):283–9.
- Jung J, Seol HS, Chang S. The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research. *Cancer Research and Treatment*. 2018;50(1):1–10.
- Karamboulas C, Ailles L. Patient-derived xenografts: a promising resource for preclinical cancer research. *Molecular and Cellular Oncology* [Internet]. 2019;6(1):1–3. Available from: <https://doi.org/10.1080/23723556.2018.1558684>
- Kasper B. The challenge of finding new therapeutic avenues in soft tissue sarcomas. *Clinical Sarcoma Research* [Internet]. 2019;9(1):5. Available from: <https://clinicalsarcomaresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13569-019-0115-4>
- Kelleher FC, O’Sullivan H. FOXM1 in sarcoma: role in cell cycle, pluripotency genes and stem cell pathways. *Oncotarget*. 2016;7(27).
- Kestav K, Uri A, Lavogina D. Structure, Roles and Inhibitors of a Mitotic Protein Kinase Haspin. *Current Medicinal Chemistry*. 2017 May 3;24(21).
- Kluin RJC, Kemper K, Kuilman T, de Ruiter JR, Iyer V, Forment J v., et al. XenofilteR: Computational deconvolution of mouse and human reads in tumor xenograft sequence data. *BMC Bioinformatics*. 2018;19(1):1–15.
- Kondo T. Current status and perspectives of patient-derived rare cancer models. *Human Cell*. 2020 Oct 1;33(4):919–29.

- Lewin J, Garg S, Lau BY, Dickson BC, Traub F, Gokgoz N, et al. Identifying actionable variants using next generation sequencing in patients with a historical diagnosis of undifferentiated pleomorphic sarcoma. *International Journal of Cancer*. 2018;142(1):57–65.
- Liu W, Jiang Q, Zhou Y. Advances of systemic treatment for adult soft-tissue sarcoma. *Chinese Clinical Oncology*. 2018;7(4):42–42.
- Lu W, Chao T, Ruiqi C, Juan S, Zhihong L. Patient-derived xenograft models in musculoskeletal malignancies. Vol. 16, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2018.
- Maier CF, Zhu L, Nanduri LK, Kühn D, Kochall S, Thepkaysone ML, et al. Patient-derived organoids of cholangiocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Aug 2;22(16).
- Matushansky I, Charytonowics E, Mills J, Siddiqi S, Hricik T, Cordon-Cardo C. MFH classification: differentiating undifferentiated pleomorphic sarcoma in the 21st century. *Exoert Rev Anticancer Ther*. 2009;9(8):1135–44.
- Meyer M, Seetharam M. First-Line Therapy for Metastatic Soft Tissue Sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* [Internet]. 2019 Jan 24;20(1):6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30675651>
- Oda Y, Yamamoto H, Kohashi K, Yamada Y, Iura K, Ishii T, et al. Soft tissue sarcomas: From a morphological to a molecular biological approach. *Pathology International*. 2017;67(9):435–46.
- Okada, Vaeteewoottacharn, Kariya. Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. *Cells*. 2019 Aug 13;8(8):889.
- Pasquali S, Bonvalot S, Tzanis D, Casali PG, Trama A, Gronchi A, et al. Treatment challenges in and outside a network setting: Soft tissue sarcomas. *European Journal of Surgical Oncology*. 2019;45(1):31–9.
- Quan Q, Xiong X, Wu S, Yu M. Identification of Immune-Related Key Genes in Ovarian Cancer Based on WGCNA. *Frontiers in Genetics*. 2021 Nov 15;12.
- Rae C, Amato F, Braconi C. Patient-derived organoids as a model for cancer drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Apr 1;22(7).
- Sbaraglia M, Dei Tos AP. The pathology of soft tissue sarcomas. *Radiologia Medica* [Internet]. 2018;(0123456789):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11547-018-0882-7>
- Shah SB, Singh A. Cellular self-assembly and biomaterials-based organoid models of development and diseases. *Acta Biomaterialia* [Internet]. 2017;53:29–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.075>

- Shi J, Li Y, Jia R, Fan X. The fidelity of cancer cells in PDX models: Characteristics, mechanism and clinical significance. *International Journal of Cancer*. 2020 Apr 15;146(8):2078–88.
- Slater AA, Alokail M, Gentle D, Yao M, Kovacs G, Maher ER, et al. DNA methylation profiling distinguishes histological subtypes of renal cell carcinoma. *Epigenetics*. 2013;8(3):252–67.
- Soupsana K, Karanika E, Kiosse F, Christogianni A, Sfikas Y, Topalis P, et al. Distinct roles of haspin in stem cell division and male gametogenesis. *Scientific Reports*. 2021a Dec 1;11(1).
- Surdez D, Landuzzi L, Scotlandi K, Manara MC. Ewing Sarcoma PDX Models. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2021;2226:223–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33326106>
- Tanaka K, Ozaki T. New TNM classification (AJCC eighth edition) of bone and soft tissue sarcomas: JCOG Bone and Soft Tissue Tumor Study Group. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2019;49(2):103–7.
- Tang TTL, Stowell JAW, Hill CH, Passmore LA. The intrinsic structure of poly(A) RNA determines the specificity of Pan2 and Caf1 deadenylases. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2019 Jun 1;26(6):433–42.
- Thway K, Jones RL, Noujaim J, Zaidi S, Miah AB, Fisher C. Dedifferentiated Liposarcoma : Updates on Morphology , Genetics , and Therapeutic Strategies. *Advances in Anatomic Pathology*. 2016;23(1):30–40.
- Tokuhiro K, Miyagawa Y, Yamada S, Hirose M, Ohta H, Nishimune Y, et al. The 193-base pair Gsg2 (Haspin) promoter region regulates germ cell-specific expression bidirectionally and synchronously. *Biology of Reproduction*. 2007 Mar;76(3):407–14.
- Tsuchiya R, Yoshimatsu Y, Noguchi R, Sin Y, Ono T, Akiyama T, et al. Establishment and characterization of NCC-UPS3-C1: a novel patient-derived cell line of undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Human Cell*. 2022 Jan 1;35(1):384–91.
- Veiseh M, Turley EA. Hyaluronan metabolism in remodeling extracellular matrix: probes for imaging and therapy of breast cancer. *Integr Biol (Camb)* [Internet]. 2011 Apr;3(4):304–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264398>
- Villacis RAR, Silveira SM, Barros-Filho MC, Marchi FA, Domingues MAC, Scapulatempo-Neto C, et al. Gene expression profiling in leiomyosarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcomas: SRC as a new diagnostic marker. *PLoS ONE*. 2014;9(7).
- Wang P, Hua X, Bryner YH, Liu S, Gitter CB, Dai J. Haspin inhibition delays cell cycle progression through interphase in cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2020 May 1;235(5):4508–19.

- Ye J, Liu H, Xu ZL, Zheng L, Liu RY. Identification of a multidimensional transcriptome prognostic signature for lung adenocarcinoma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019 Nov 1;33(9).
- Yen CC, Chen TWW. Next frontiers in systemic therapy for soft tissue sarcoma. *Chinese Clinical Oncology*. 2018;7(4):43–43.
- Yoshida GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *Journal of Hematology and Oncology*. 2020 Jan 7;13(1).
- Yu F, Lin Y, Xu X, Liu W, Tang D, Zhou X, et al. Knockdown of GSG2 inhibits prostate cancer progression in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*. 2020 Jul 1;57(1):139–50.
- Zhang Y, Sun D. Genetic polymorphisms of fcrl3, nlrp3 and il2 are associated with the risk of head and neck cancer in a chinese population. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2021;14:1047–53.
- Zheng B, Qu Y, Wang J, Shi Y, Yan W. Pathogenic and Targetable Genetic Alterations in Resected Recurrent Undifferentiated Pleomorphic Sarcomas Identified by Targeted Next-generation Sequencing. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019;16(3):221–8.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

São Paulo, 11 de setembro de 2019.

Ao

Dr. Tiago Góss dos Santos.

Aluna: Ingrid Martinez Nakamuta (Mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2498/18B

"Identificação e caracterização funcional de alterações genéticas em sarcomas pleomórficos indiferenciados e fusocelulares."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **03/09/2019**, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado: "Papel do Receptor Lgr5 no Prognóstico e na Biologia de Sarcomas de Partes Moles.", registrado neste CEP sob nº. 2498/18. O projeto afiliado em referência será Mestrado da aluna *Ingrid Martinez Nakamuta*, sob orientação do *Dr. Tiago Góss dos Santos*.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Cairés Serrano
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1