MINISTÉRIO DA SAÚDE

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MODELO MURINO DE XENOENXERTO DERIVADO DE PACIENTE (PDX) DE TUMOR MALIGNO DE BAINHA DE NERVO PERIFÉRICO

Rafael de Castro e Silva Pinheiro

Rio de Janeiro
2021

MINISTÉRIO DA SAÚDE

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO MODELO MURINO DE XENOENXERTO DERIVADO DE PACIENTE (PDX) DE TUMOR MALIGNO DE BAINHA DE NERVO PERIFÉRICO

Rafael de Castro e Silva Pinheiro

Defesa de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profª. Drª Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa

Rio de Janeiro

Agosto

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

P654e Pinheiro, Rafael de Castro e Silva.
Estabelecimento e caracterização do modelo murino de xenoenxerto derivado de paciente (pdx) de tumor maligno de bainha de nervo periférico / Rafael de Castro e Silva Pinheiro. — 2021.
94f.

Orientadora: Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa.
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2021.

1. Tumor Maligno de Bainha de Nervo Periférico. 2. Sarcoma. 3. Xenoenxerto derivado de paciente (PDX). 4. Neurofibromatose tipo 1. 5. Ortopedia. I. Costa, Annelise Fortuna de Azevedo Freire da, orient. II. Título.

NLM WE 258

MINISTÉRIO DA SAÚDE

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOMODELO MURINO DE XENOENXERTO DERIVADO DE PACIENTE (PDX) COM TUMOR MALIGNO DE BAINHA DE NERVO PERIFÉRICO

Rafael de Castro e Silva Pinheiro

Banca examinadora:

Drª Karin Soares Gonçalves Cunha (UFF)

Drª Patricia Abrão Possik (INCA)

Drª Ana Carolina Leal de Oliveira (CASM -INTO)

Drª Jamila Alessandra Perini (CASM – INTO – revisora e suplente)

Drª Amanda dos Santos Cavalcanti (CASM – INTO – suplente)

Rio de Janeiro

Agosto

2021

AGRADECIMENTOS

A minha família, por sempre apoiar meus novos caminhos. Pai, mãe e Ju, obrigado por fazerem dos meus sonhos e conquistas as de vocês. Sofia, que veio para renovar as esperanças de um mundo melhor e trazer muita alegria e luz, nesses tempos cinzentos.

A equipe do Centro de Oncologia Ortopédica do INTO, pela confiança e parceria. Em especial ao Walter Meohas, Ana Cristina de Sá, Giuliano Caruso, Rodrigo Cardoso e Camila Bedeschi pelos ensinamentos da especialidade e da vida. A Anabela pelas discussões de patologia. A Andrea, Isabella, Marcia, Ana Maria e tantas outras que me ensinaram o valor de uma equipe multidisciplinar. Aos meus residentes e amigos, por alimentarem a vontade de ensinar e aprender.

A minha orientadora, Anneliese, pela paciência e parceria. A equipe de pesquisa do INTO. Em especial à Caroline e aos alunos de iniciação científica, João Pedro, Lucas, Isabela, Jade e Íris, pelo suporte na parte experimental.

Ao Instituto Nacional de Ortopedia e Traumatologia (INTO), minha segunda casa, instituição a qual tenho o orgulho em ter realizado toda minha formação e seguir contribuindo para a ortopedia de excelência e de ponta na rede pública de saúde do Brasil.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir

RESUMO

DE CASTRO E SILVA PINHEIRO, Rafael. Estabelecimento e caracterização do biomodelo murino de xenoenxerto derivado de paciente (PDX) de Tumor Maligno de Bainha de Nervo Periférico. Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2021.

O Tumor Maligno de Bainha de Nervo Periférico (TMBNP), ainda que raro, é o sexto sarcoma de partes moles mais comum. Aproximadamente 50% dos casos são espontâneos e os outros 50% são observados em pacientes com Neurofibromatose tipo 1 (NF1). Surge, principalmente, na bainha de nervos sensitivos de grandes raízes nervosas e apresenta-se clinicamente como massa dolorosa de crescimento progressivo. A base do tratamento é a ressecção cirúrgica com margens livres, já que não há terapia sistêmica eficaz. Modelos pré-clínicos robustos são ferramentas essenciais para o desenvolvimento de novas terapias antineoplásicas. Nesse cenário, o modelo de xenoenxerto derivado de paciente (PDX, *patient-derived xenograft*) tem ganhado notoriedade por preservar a heterogeneidade, a complexidade gênica e as características histológicas do tumor do paciente, bem como mimetizar a resposta terapêutica. Contudo, poucos estudos caracterizaram detalhadamente o modelo PDX de TMBNP. O objetivo deste estudo foi estabelecer e caracterizar o modelo PDX de TMBNP em camundongos imunodeficientes. Onze amostras de TMBNP foram coletadas de pacientes atendidos no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad e enxertadas no subcutâneo de camundongos imunodeficientes *nude*. A média de idade dos pacientes foi de 28 anos (16-51). O sexo feminino, a cor de pele preta, a presença de NF1 e a localização anatômica em membro inferior predominaram entre os participantes do estudo. A maioria dos tumores foi classificada como grau histológico 3 e estadiamento patológico IIIB. A taxa de sucesso de enxertia foi de 50% na passagem 0 (P0) e de 100% em P1 e P2. O padrão de crescimento variou entre as amostras de cada paciente, sendo a mediana do tempo total de crescimento dos tumores de 106,5 dias (48-140), 80,5 (48-87) e 50 (43-59) dias em P0, P1 e P2, respectivamente. A mediana do tempo de latência (tempo até o início do crescimento) diminuiu ao longo das passagens: 67 (25-104), 46,5 (29-51) e 24,5 (21-34) dias em P0, P1 e P2, respectivamente. As avaliações histológicas dos tumores PDX das gerações P0, P1 e P2 evidenciaram notáveis similaridades com seu respectivo tumor parental. A alteração mais marcante, presente em todos os casos, foi a redução do componente estromal dos tumores ao longo das passagens e o consequente aumento da celularidade dos tumores PDX. A origem humana dos tumores gerados nos camundongos foi confirmada mediante imunomarcação com anticorpo com afinidade específica para a proteína nuclear lâmina A/C humana. Contudo, foram observadas algumas células não marcadas para lâmina A/C, indicando a infiltração de células estromais murinas nos tumores PDX. Ademais, o padrão de expressão dos biomarcadores CD56 e S100 nos tumores PDX foi semelhante ao do seu respectivo tumor parental. Em conjunto, os resultados obtidos indicam que o modelo PDX de TMBNP estabelecido neste estudo reproduziu as características histológicas do tumor do paciente, figurando, então, como um modelo adequado para estudos pré-clínicos de TMBNP.

Palavras-chave: Tumor Maligno de Bainha de Nervo Periférico; Sarcoma; Xenoenxerto derivado de paciente (PDX); Neurofibromatose tipo 1.

ABSTRACT

DE CASTRO E SILVA PINHEIRO, Rafael. Establishment and characterization of the murine model of patient derived xenograft (PDX) of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. Rio de Janeiro, 2021. Master Thesis. (Master's Degree in Applied Sciences to the Musculoskeletal System) - National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2021.

Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor (MPNST), although rare, is the sixth most common soft tissue sarcoma. Approximately 50% of cases are spontaneous and the other 50% are seen in patients with Neurofibromatosis type 1 (NF1). It mainly appears in the sheath of sensory nerves at large nerve roots and is clinically presented as a painful mass of progressive growth. The main treatment is surgical resection with negative margins, since there is there is no sistemic therapy. Robust preclinical models are essential tools for the development of new antineoplastic therapies. In this context, the patient-derived xenograft (PDX) model has gained notoriety for preserving the heterogeneity, gene complexity and histological characteristics of the patient's tumor, as well as mimicking the therapeutic response. However, few studies have characterized the PDX model of MPNST in detail. The aim of this study was to establish and characterize the PDX model of MPNST in immunodeficient mice. Eleven MPNST samples were collected from patients of the National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad and grafted to the subcutaneous tissue of nude immunodeficient mice. The mean age of the patients was 28 years (16-51). Female gender, black skin color, the presence of NF1 and the anatomical location in the lower limb predominated among the study participants. Most tumors were classified as histological grade 3 and pathological stage IIIB. The success rate of grafting was 50% in passage 0 (P0) and 100% in P1 and P2. The growth pattern varied between the samples of each patient, with the median total growth time of the tumors being 106.5 days (48-140), 80.5 (48-87) and 50 (43-59) days in P0, P1 and P2, respectively. The median latency time (time until the beginning of growth) decreased along the passages: 67 (25-104), 46.5 (29-51) and 24.5 (21-34) days at P0, P1 and P2, respectively. Histological evaluations of PDX tumors of the P0, P1 and P2 generations showed remarkable similarities with their respective parental tumor. The most remarkable change, present in all cases, was the reduction of the stromal component of the tumors along the passages and the consequent increase in the cellularity of PDX tumors. The human origin of the tumors generated in the mice was confirmed by immunostaining with antibody with specific affinity for the human nuclear protein A/C. However, some cells did not stain for A/C protein, indicating the infiltration of murine stromal cells in PDX tumors. In addition, the expression pattern of the CD56 and S100 biomarkers in PDX tumors was similar to their respective parental tumor. Therefore, the results obtained indicate that the PDX model of TMBNP established in this study reproduced the histological characteristics of the patient's tumor, figuring, then, as an adequate model for preclinical studies of MPNST.

Keywords: Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor; Sarcoma; Patient-derived xenograft (PDX); Neurofibromatosis type 1.

SUMÁRIO

RESUMO ..... **VII**

ABSTRACT ..... **VIII**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS ..... **XI**

LISTA DE FIGURAS ..... **XII**

LISTA DE QUADROS E TABELAS ..... **XIV**

1 INTRODUÇÃO **1**

1.1 Tumor maligno de bainha de nervo periférico **1**
1.1.1 Epidemiologia 1
1.1.2 Patogênese 2
1.1.3 Apresentação clínica 5
1.1.4 Diagnóstico 5
1.1.5 Análise anatomopatológica 9
1.1.6 Tratamento 14

1.2 Modelos pré-clínicos de tumor maligno de bainha de nervo periférico **16**
1.2.1 Linhagens celulares humanas 16
1.2.2 Modelo de xenoenxerto derivado de paciente (PDX) 17

2 JUSTIFICATIVA **21**

3 OBJETIVOS **22**

3.1 Objetivo Principal **22**

3.2 Objetivos Específicos **22**

4 METODOLOGIA **23**

4.1 Aspectos éticos **23**

4.2 Coleta de dados clínicos **23**

4.3 Coleta e processamento das amostras de TMBNP **24**

4.4 Obtenção e condições de manutenção dos camundongos **24**

4.5 Procedimento cirúrgico para enxertia das amostras tumorais nos camundongos **25**

4.6 Avaliação do crescimento tumoral e definição do critério de sucesso de enxertia 26

4.7 Eutánasia dos animias e coleta de tumores e órgãos 27

4.8 Processamento histológico das amostras 27

4.9 Avaliação da manutenção das características histológicas 28

4.10 Imunohistoquímica 28

4.11 Aquisição das imagens.....29

4.12 Análise estatística.....29

5 RESULTADOS 30

5.1 Composição da amostra do estudo.....30

5.2 Dinâmica de crescimento do TMBNP no modelo PDX. 33

5.3 Comparação das características histológicas entre tumores PDX e os parentais.35

5.4 Avaliação da origem humana dos tumores PDX e da presença de células estromais murinas nestes tumores. 47

5.5 Comparação da expressão de biomarcadores entre os tumores PDX e os parentais. 48

6 DISCUSSÃO 51

7 CONCLUSÃO.....62

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63

ANEXO A: PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA72

ANEXO B: TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 75

ANEXO C: PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS 90

ANEXO D. SISTEMA DE ESTADIAMENTO DE SARCOMAS DE PARTES MOLES DAS EXTREMIDADES OU TRONCO 91

APÊNDICE A. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PARTICIPANTES QUE TIVERAM AMOSTRAS COLETADAS PARA O ESTUDO 92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)

EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor* (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)

FDG-PET *Fluorodeoxyglucose- Positron Emission Tomography* (Tomografia por Emissão de Pósitrons com Flurorodesoxiglicose)

GAPs Proteínas ativadoras de GTPase

IGF1R *Insuline-like Growth Factor 1 Receptor* (Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1)

INTO Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad

MAPKs *Mitogen-activated Protein Kinase* (Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos)

NF1 Neurofibromatose tipo 1

P0 Passagem zero

PDX *Patient derived xenograft* (Xenoenxerto derivado de paciente)

PRC2 *Polycomb Repressive Complex 2* (Complexo Repressivo Polycomb 2)

PTEN *Phosphatase and tensin homologue* (Fosfatase e homólogo à tensina)

RECIST *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (Critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos)

SOX10 *SRY-box transcription factor 10*

SUVmax *Maximum Standart Uptake Value* (Valor padronizado de captação máximo)

TLE1 *Transducin-like enhancer protein 1* (Proteína potenciadora do tipo transducina 1)

TMBNP Tumor maligno de bainha do nervo periférico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patogênese do TMBNP.. 3
Figura 2. Ectoscopia do Tumor Maligno de Bainha de Nervo Periférico.. 5
Figura 3. Radiografia convencional de perna de paciente portador de TMBNP.. 6
Figura 4. Ressônancia magnética de coxa. 7
Figura 5. Ressonância magnética e imagem intraoperatória de TMBNP localizado na perna.. 8
Figura 6. Uso da Tomografia por emissão de pósitrons com fluorodesoxiglicose (FDG-PET) no TMBNP. 9
Figura 7. Características histopatológicas do tumor maligno da bainha de nervo periférico..... Erro! Indicador não definido.
Figura 8. Morfologia das células do tumor maligno da bainha de nervo periférico.. 12
Figura 9. Padrão de expressão da proteína S100 por imunohistoquímica.....13
Figura 10. Esquematização do processo de estabelecimento do modelo PDX e de expansão da amostra. 18
Figura 11. Fluxograma da composição da amostra do estudo. 30
Figura 12. Perfil de crescimento do TMBNP em modelo PDX na passagem 0.....34
Figura 13. Dinâmica de crescimento do TMBNP no modelo PDX ao longo de 3 passagens consecutivas.. 35
Figura 14. Comparação das características histológicas do tumor parental com seus respectivos tumores PDX das gerações P0, P1 e P2 da amostra 1.. 37
Figura 15. Expresão do antígeno de proliferação Ki-67 por imunohistoquímica na amostra 1 e em seus respectivos tumores PDX.. 38
Figura 16. Comparação das características histológicas do tumor parental com seus respectivos tumores PDX das gerações P0, P1 e P2 da amostra 2. 40
Figura 17. Expresão do antígeno de proliferação Ki-67 por imunohistoquímica na amostra 2 e em seus respectivos tumores PDX. 41
Figura 18. Comparação das características histológicas do tumor parental com seus respectivos tumores PDX das gerações P0, P1 e P2 da amostra 3. 43
Figura 19. Comparação das características histológicas do tumor parental com seus respectivos tumores PDX das gerações P0, P1 e P2 da amostra 5.. 45

Figura 20. Expresão do antígeno de proliferação Ki-67 por imunohistoquímica na amostra 5 e em seus respectivos tumores PDX. 46
Figura 21. Expressão da proteína lâmina A/C humana por imunohistoquímica nos tumores PDX na passagem 2. 47
Figura 22. Expressão da proteína CD56 por imunohistoquímica no tumor parental e em seu respectivo tumor PDX na passagem 2
. 49
Figura 23. Expressão da proteína S100 por imunohistoquímica no tumor parental e em seu respectivo tumor PDX na passagem 2.
.....50

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Características clínico-patológicas dos participantes do estudo.....32
Tabela 2. Número de camundongos com crescimento tumoral em relação ao número total de animais enxertados nas passagens 0, 1 e 2.....33
Tabela 3. Comparação das características histológicas dos tumores PDX com o tumor parental da amostra 1.....38
Tabela 4. Comparação das características histológicas dos tumores PDX com o tumor parental da amostra 2.....41
Tabela 5 - Comparação das características histológicas dos tumores PDX com o tumor parental da amostra 3.....44
Tabela 6. Comparação das características histológicas dos tumores PDX com o tumor parental da amostra 5.....46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumor maligno de bainha de nervo periférico

1.1.1 Epidemiologia

O tumor maligno de bainha de nervo periférico (TMBNP), anteriormente denominado neurofibrossarcoma e schawnnoma maligno, é o sexto sarcoma de partes moles mais comum, correspondendo a 5-10% de todos os sarcomas de partes moles. Apresenta incidência de 1:100000 na população e sobrevida geral em 5 anos de 20-60% (DURBIN et al., 2016; MARTINEZ; FRITCHIE, 2018). Aproximadamente metade dos casos se desenvolve espontaneamente e acomete, predominantemente, pacientes do sexo feminino entre os 30-50 anos. Os outros 50% são observados em pacientes com Neurofibromatose tipo 1 (NF1), sendo a maioria do sexo masculino na segunda década de vida (FARID et al., 2014). Outro fator de risco identificado para o desenvolvimento do TMBNP é a exposição local prévia à radioterapia (JAMES et al., 2016).

O risco ao longo da vida de um portador de NF1 desenvolver o TMBNP é de 8-13%, sendo esta a principal causa de morte nesses pacientes. A NF1, também conhecida como doença de Von Recklinghausen, é uma doença autossômica dominante com incidência mundial de 1:3500 indivíduos que afeta diversos órgãos e apresenta amplo e variável espectro de manifestações clínicas progressivas, ainda sem tratamento curativo. Apresenta como marcos característicos máculas de coloração café com leite (população densa de melanócitos com inativação bialélica do gene *nf1*) e o surgimento de neurofibromas (tumor benigno da bainha do nervo), que se localizam em íntimo contato com nervos espinhais, craniais e periféricos. Comparados à população sadia, os portadores de NF1 apresentam risco 50 vezes maior de desenvolverem

algum tumor de alto grau e, especificamente, 1000 vezes maior de desenvolverem tumor do tecido conectivo de alto grau, como o TMBNP (DURBIN et al., 2016; GUTMANN et al., 2017; MARTINEZ e FRITCHIE, 2018).

O TMBNP surge, principalmente, na bainha de nervos sensitivos de grandes raízes nervosas, sendo 33-46% nos membros, 34-41% no tronco e 17-25% na cabeça e pescoço. Em pacientes com NF1, surge comumente de um neurofibroma plexiforme pré-existente (DURBIN et al., 2016; JAMES et al., 2016; MARTINEZ e FRITCHIE, 2018).

1.1.2 Patogênese

Embora a patogênese do TMBNP seja pouco compreendida devido a sua histologia complexa, sabe-se que diferentes aberrações genéticas já identificadas levam à desregulação na sinalização das vias que modulam a proliferação, o crescimento e a apoptose celular. Contudo, ainda não foram identificados rearranjos gênicos específicos (UPADHYAYA, 2011).

Na NF1 há mutação no gene neurofibromina 1 (*nf1*), localizado no braço longo do cromossomo 17. Ele codifica a neurofibromina, uma proteína citoplasmática que apresenta região homóloga à família de proteínas que regulam negativamente os proto-oncogenes da família RAS, denominadas proteínas ativadoras de GTPase (GAPs). As GAPs inativam a RAS mediante a conversão de RAS-GTP (forma ativa) em RAS-GDP (forma inativa). Foi verificado que a neurofibromina age como uma GAP para a família RAS de proto-oncogenes. Portanto, a perda da função da neurofibromina, pela mutação no gene *nf1*, leva à hiperativação da via RAS, promovendo sinais mitogênicos em excesso. A ativação constitutiva da via de RAS estimula as via de RAF/MEK/ERK e de PI3K/AKT/mTOR resultando na exacerbação da proliferação e da sobrevivência celular, o que favorece o surgimento de lesões neoplásicas (**Figura 1**) (UPADHYAYA, 2011; PEMOV et al., 2020; PRUDNER et al., 2020).

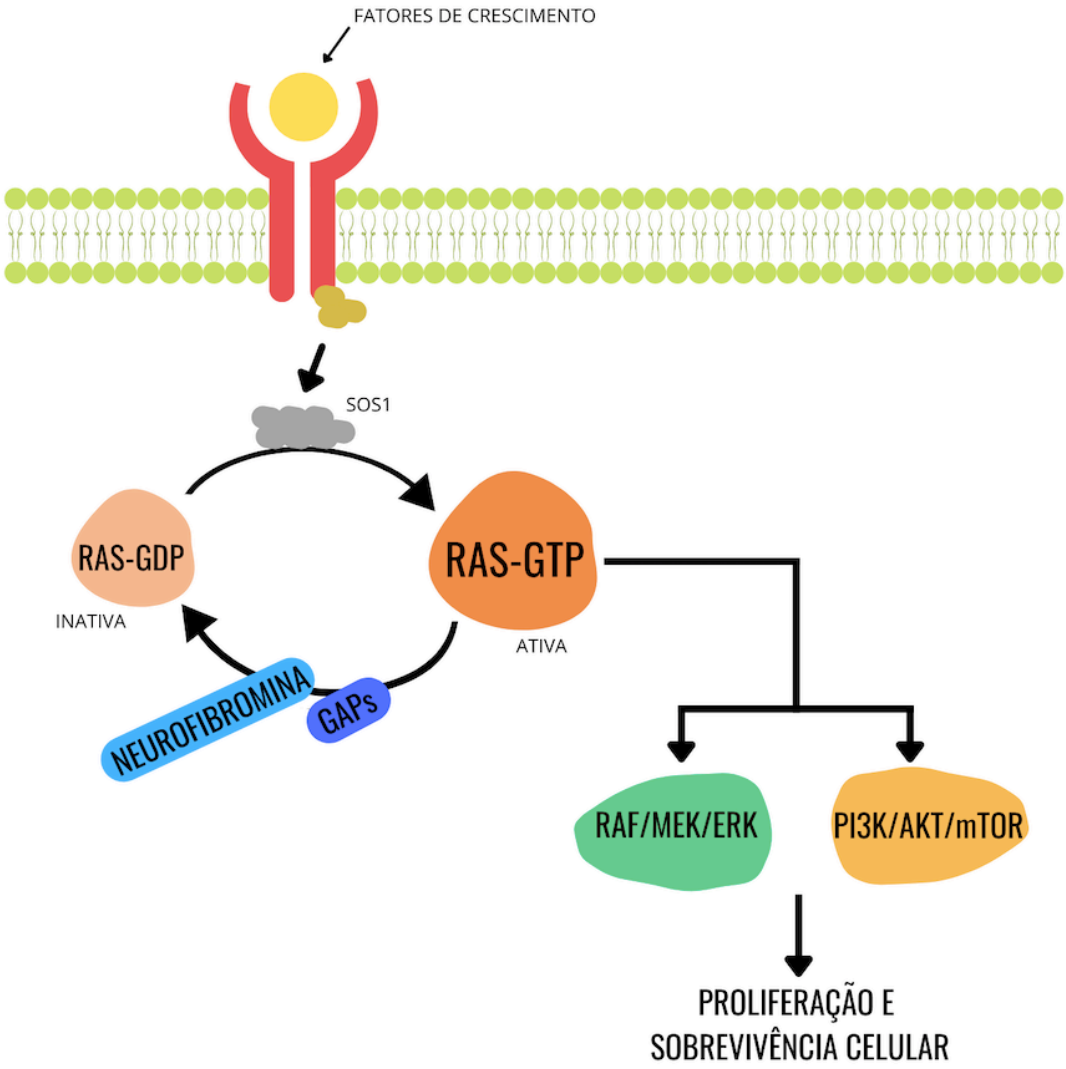


Figura 1. Patogênese do TMBNP. A perda da função da neurofibromina promove a hiperativação da via RAS, a qual hiperestimula as vias RAF/MEK/ERK e PI3K/AKTi/mTOR, levando a exarcebação da proliferação e sobrevivência celular, fundamentais para a tumorigênese. Adaptada de UPADHYAYA, 2011.

O TMBNP se desenvolve a partir da perda da heterozigosidade do *nf1* nas células de Schawnn, entretanto a base molecular da transformação do neurofibroma benigno em TMBNP ainda é pouco entendida. Enquanto a inativação do gene *nf1* e a consequente perda da expressão da neurofibromina caracterizam a maioria dos TMBNP, a perda bialélica do gene *nf1* é insuficiente para a transformação maligna. Mutações somáticas e alterações no número de cópias de genes como o *TP53*, *CDKN2A*, *EED* e *SUZ12* são reportadas como mutações

secundárias que facilitam essa transformação maligna (BOTTILLO et al., 2009; UPADHYAYA, 2011; SOHIER et al., 2017; PRIDGEON et al., 2017; KORFHAGE; LOMBARD, 2020; PEMOV et al., 2020).

Portanto, embora pouco compreendido, nem todos os TMBNP derivam de mutação no gene *nf1*. Estudos recentes exploraram a perda da trimetilação da histona H3K27 devido à inativação do Complexo Repressor Polycomb 2 (PRC2, do inglês *Polycomb repressive complex 2*) pela mutação nas subunidades EED e SUZ12, encontrada em 70-90% dos TMBNP. Por imunohistoquímica, verificou-se que cerca de 34-73% dos TMBNP apresentaram perda da trimetilação da histona H3K27, sendo esta perda mais frequente nos TMBNP esporádicos e radioinduzidos (KORFHAGE; LOMBARD, 2020; PEMOV et al., 2020; PRUDNER et al., 2020). Ainda, algumas proteínas estão implicadas na patogênese do TMBNP, como a fosfatase e homólogo à tensina (PTEN), o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (JAMES et al., 2016).

O supressor tumoral PTEN, um regulador central negativo da cascata de sinalização PI3K/AKT/mTOR que controla o crescimento, proliferação e sobrevivência celular, é o componente mais alterado dessa via no ciclo celular nos casos de transformação maligna nos seres humanos. Sua supressão ou deleção está associada à transformação maligna do neurofibroma em TMBNP (VOGEL et al., 1999). A expressão aumentada de *IGF1R* foi relacionada à redução na sobrevida livre de doença de pacientes com TMBNP e ao aumento do risco de progressão tumoral (CHOW e BAKER, 2006; GREGORIAN et al., 2009; KENG et al., 2012). O aumento da expressão do EGFR foi notado nas células de Schwann presentes nos TMBNP, comparado ao percentual encontrado nos neurofibromas benignos, o que indica que ocorrem alterações da via de EGFR no TMBNP (YANG et al., 2011).

1.1.3 Apresentação clínica

O TMBNP apresenta-se clinicamente como uma massa dolorosa de crescimento progressivo e rápido e, eventualmente, cursa com sintomas neurológicos locais, como fraqueza e parestesia. Em pacientes com NF1, o início de dor, ou sua piora e persistência, em topografia de neurofibroma prévio, associado ao aumento de volume local progressivo, são sinais e sintomas que devem ser avaliados com atenção devido à possibilidade de malignização (desenvolvimento de um TMBNP) (**Figura 2**). Menos de 15% dos pacientes apresentam metástase ao diagnóstico, sendo os principais sítios metastáticos os pulmões, o esqueleto e o fígado (JAMES et al., 2016a).



Figura 2. Ectoscopia do Tumor Maligno de Bainha de Nervo Periférico. Tumoração localizada na coxa esquerda de paciente do sexo feminino com 16 anos, portadora de NF1. Fonte: arquivo pessoal.

1.1.4 Diagnóstico

A radiografia convencional é o primeiro exame a ser realizado no paciente com suspeita de tumor musculoesquelético, embora tenha baixa acurácia no diagnóstico do TMBNP (**Figura**

3). Após a suspeição clínica, a avaliação radiológica com ressonância magnética é o método de imagem mais útil para avaliar as características e a extensão do tumor, bem como para realizar o planejamento cirúrgico, embora isoladamente não confirme o diagnóstico (**Figura 4**) (FARID et al., 2014). Radiologicamente, o TMBNP apresenta-se como uma massa heterogênea, volumosa e fusiforme em posição longitudinal ao nervo do qual se desenvolve (**Figura 5**) (KAMRAN et al., 2012).



Figura 3. Radiografia convencional de perna de paciente portador de TMBNP. Nota-se aumento de volume e densidade de partes moles na região proximal e lateral da perna (setas). Fonte: arquivo INTO.

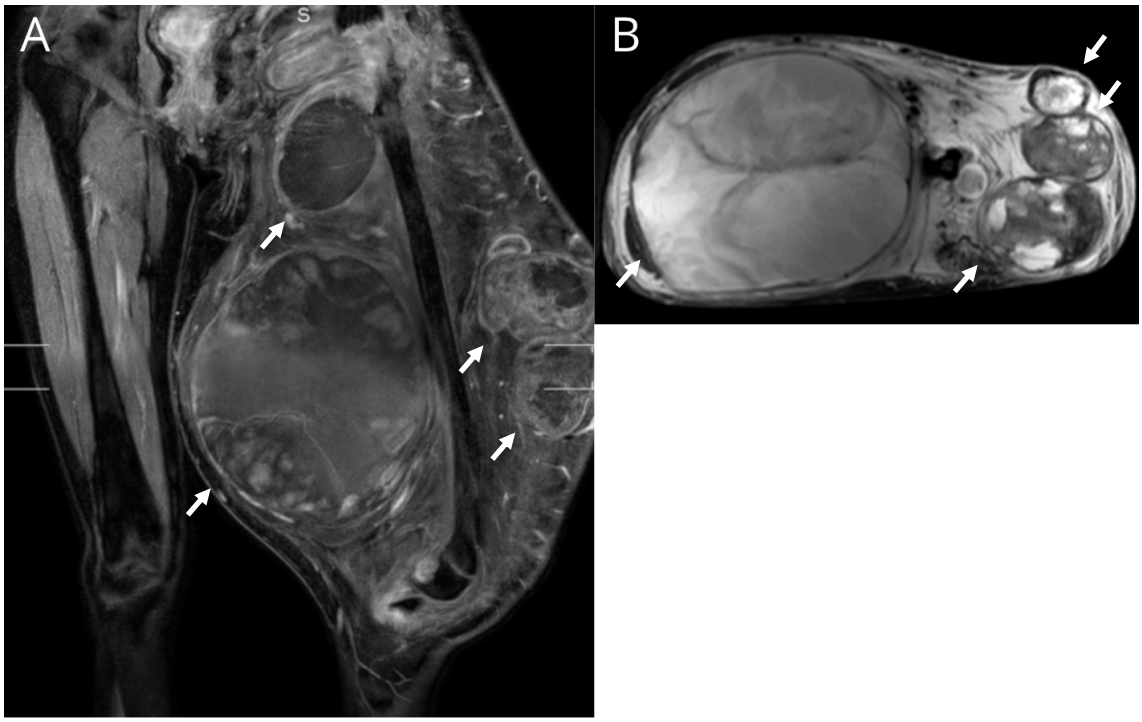


Figura 4. Ressônancia magnética de coxa. (A) Reconstrução coronal ponderada em *STIR* evidênciando múltiplos TMBNP (setas brancas) em coxa esquerda de paciente do sexo feminino com 16 anos e NF1. (B) Aquisição axial poderada em T2 da coxa da mesma paciente. Fonte: arquivo INTO.

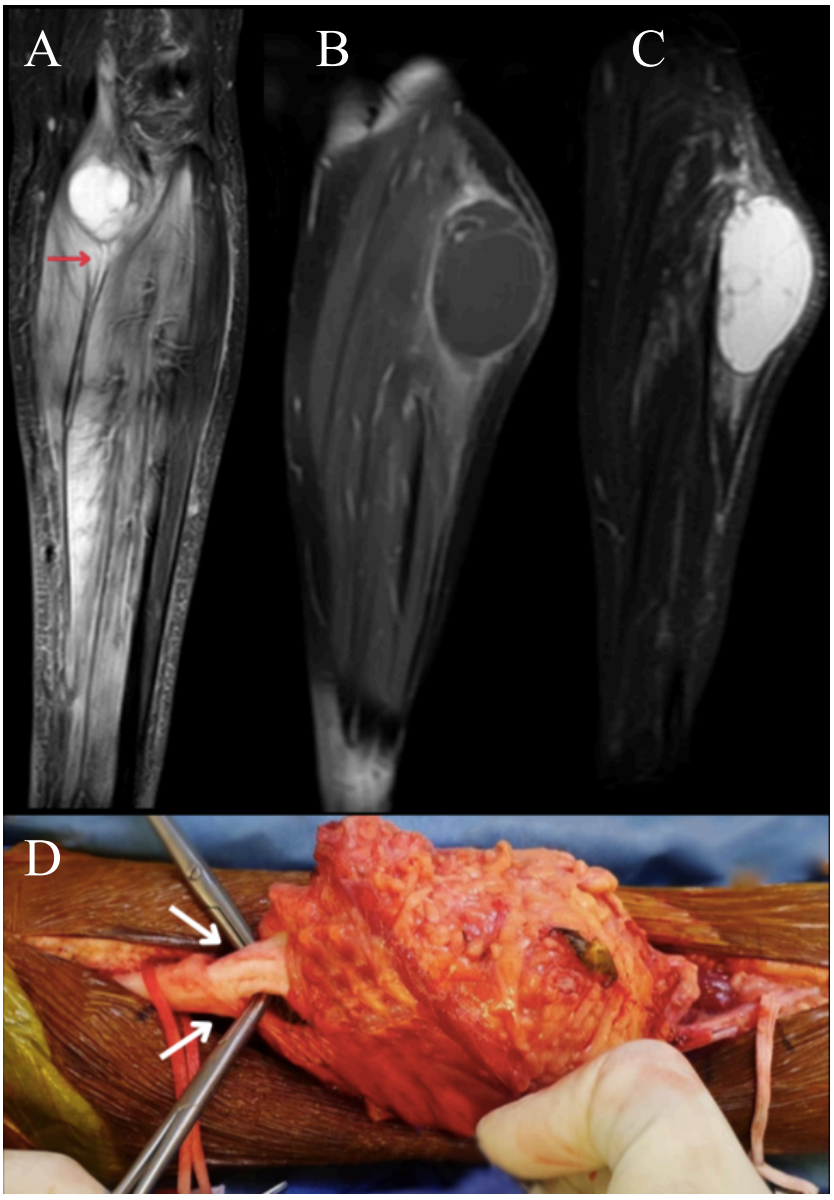


Figura 5. Ressonância magnética e imagem intraoperatória de TMBNP localizado na perna. (A) Reconstrução coronal ponderada em T2 da perna de paciente com TMBNP evidenciando sua posição longitudinal ao nervo acometido (seta vermelha). (B) Na reconstrução sagital ponderada em T1 nota-se o formato fusiforme da lesão. (C) Formato fusiforme do TMBNP em reconstrução sagital ponderada em T2. (D) Imagem intra-operatória evidenciando a posição logitudinal do TMBNP em relação ao nervo acometido (setas brancas). Fonte: Arquivo INTO (A, B e C) e arquivo pessoal (D).

A tomografia computadorizada por emissão de pósitron com fluorodesoxiglicose (*FDG-PET*) pode ser utilizada para diferenciar neurofibromas benignos do TMBNP, através da comparação do valor de captação padronizado (*Standardized Uptake Value – SUVmax*) (**Figura**

6). Os TMBNP apresentam esse valor significante maior que os tumores benignos (KAMRAN et al., 2012).

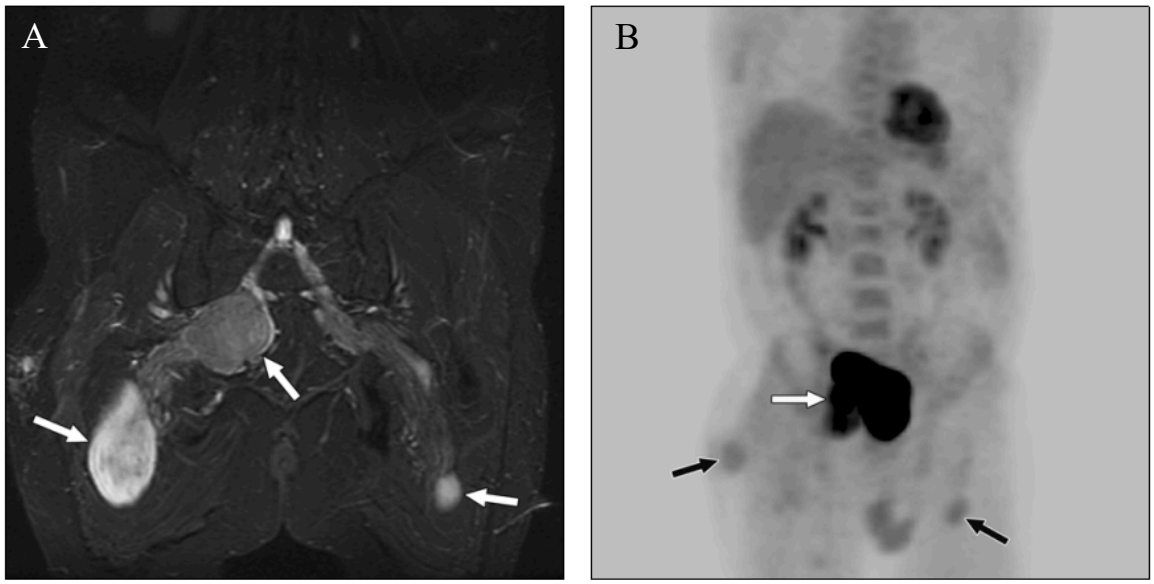


Figura 6. Uso da Tomografia por emissão de pósitrons com fluorodesoxiglicose (FDG-PET) no TMBNP. (A) Ressônancia magnética de portador de NF1 evidencia múltiplas tumores de partes moles na região da pelve e coxas (setas brancas). (B) No PET, o TMBNP apresenta maior captação (seta branca) que os neurofibromas benignos (setas pretas). Fonte: BREDELLA et al., 2007

Diante da suspeição clínica e radiológica, é essencial realizar a biópsia cirúrgica da lesão suspeita para posterior análise anatomopatológica para a confirmação do diagnóstico (DURBIN et al., 2016; MARTINEZ; FRITCHIE, 2018).

1.1.5 Análise anatomopatológica

O diagnóstico do TMBNP é complexo devido à ausência de critérios morfológicos, imunohistoquímicos e moleculares específicos. A análise requer correlação com a história clínica do paciente, incluindo a presença ou não de NF1, e a exclusão de tumores com morfologia similar por um painel de análise imunohistoquímica e/ou de genética molecular. (THWAY; FISHER, 2014; KORFHAGE; LOMBARD, 2020).

Macroscopicamente, apresenta-se com uma massa fusiforme ou globóide, sólida, brancacenta e firme, pseudoencapsulada, com áreas evidentes de necrose e hemorragia (**Figura 7A**). Histologicamente, o TMBNP caracteriza-se por lesão infiltrativa com padrão monótono de células fusiformes arranjadas em fascículos longos ou com padrão de espinha de peixe, semelhante ao fibrossarcoma, além de, em grande aumento, apresentar padrão 'marmorizado', alternando áreas hipercelulares e mixoides (**Figura 7B, 7C**). As células apresentam uma extremidade pontiaguda e outra contundente, típico de células de diferenciação da bainha nervosa, além de núcleo alongado, cônico ou ondulado, hipercromático ou vesicular, e escasso citoplasma anfofílico (**Figura 8**) (ANGHILERI et al., 2006; THWAY, FISHER, 2014; MARTINEZ, FRITCHIE, 2018). Apresenta ainda invasão vascular e de estruturas adjacentes, bem como áreas de necrose (JAMES et al., 2016; BROHL et al., 2017; MARTINEZ; FRITCHIE, 2018). A maioria dos TMBNP é de alto grau, porém aproximadamente 10-15% apresentam morfologia de baixo grau, com padrão semelhante a neurofibroma atípico, sarcoma fibromixoide de baixo grau, sarcoma epitelioide de baixo grau e hemangiopericitoma (THWAY e FISHER, 2014).

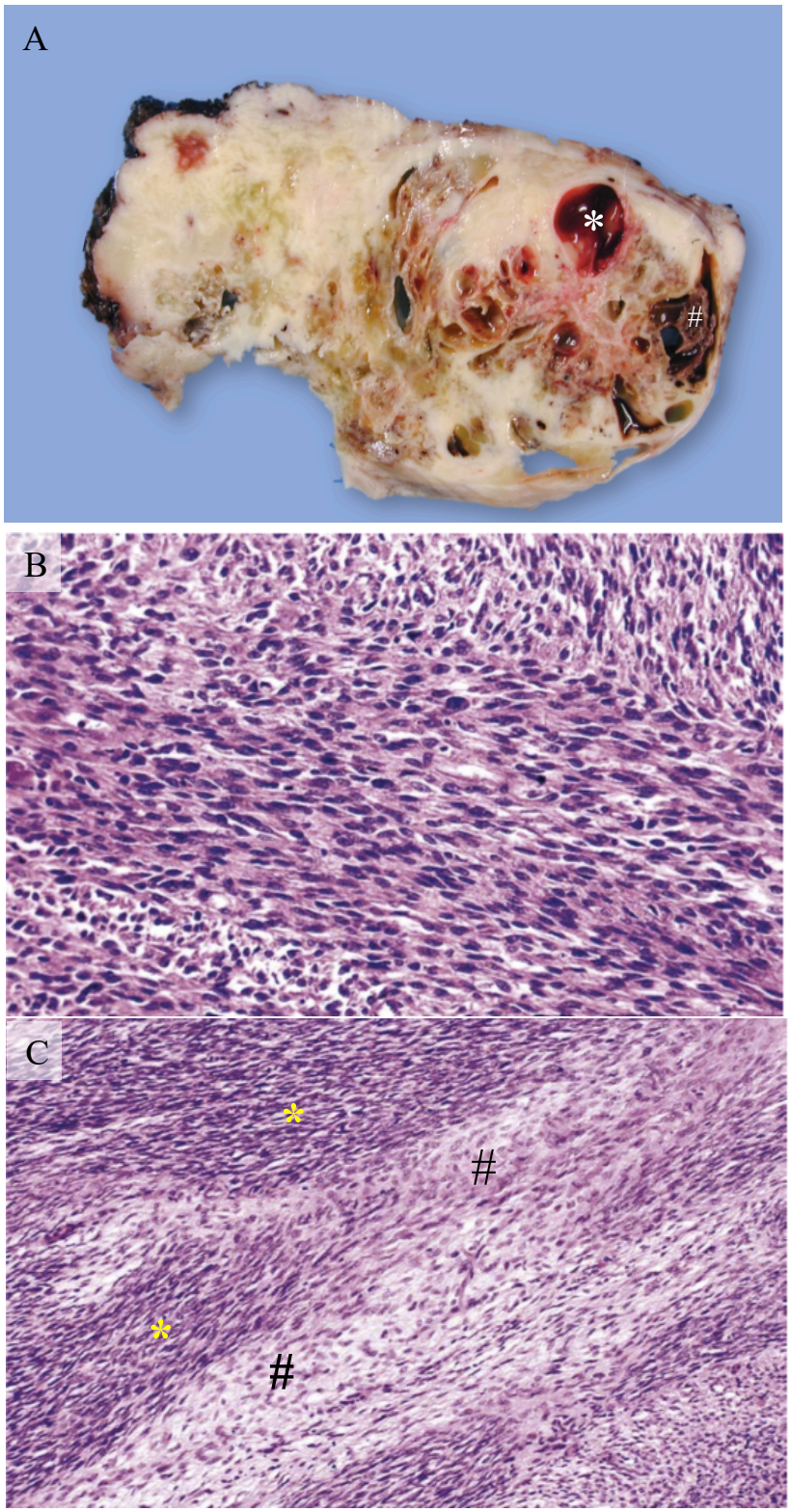


Figura 7. Características histopatológicas do tumor maligno da bainha de nervo periférico. (A) Macroscopia do TMONP : massa brancacenta firme com áreas de hemorragia (*) e necrose (#). (B) Organização em fascículos longos com aspecto de espinha de peixe (C) Aspecto marmorizado característico do TMBNP: alternância entre áreas hipercelulares (*) e hipocelulares (#). Coloração: hematoxilina e eosina. Fonte: GOLDBLUM; FOLPE; WEISS, 2020.

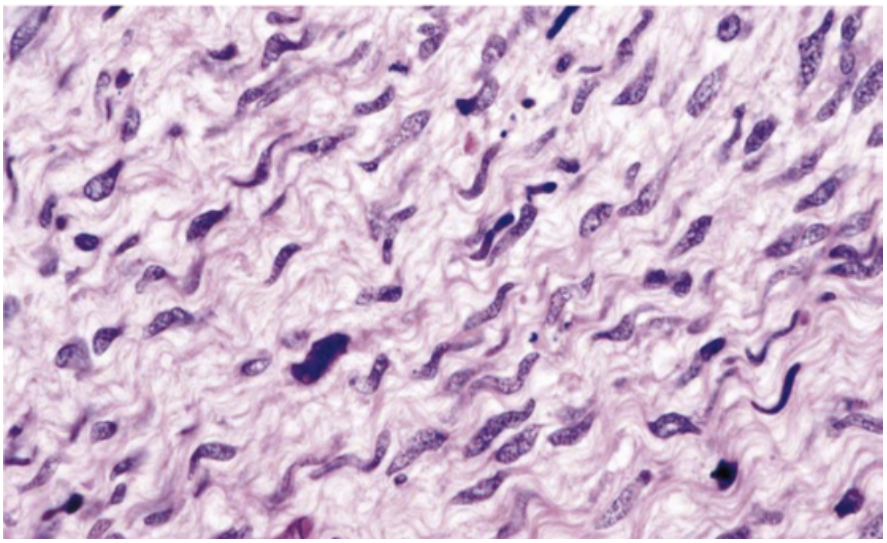


Figura 8. Morfologia das células do tumor maligno da bainha de nervo periférico. Células com núcleo alongado, típico de células de diferenciação da bainha nervosa. Fonte: GOLDBLUM; FOLPE; WEISS, 2020.

Os patologistas enfrentam dois dilemas histológicos: distinguir o TMBNP de baixo grau do neurofibroma e do neurofibroma atípico; e diferenciar o TMBNP de alto grau de outras lesões neoplásicas de alto grau. Comparado ao neurofibroma, o TMBNP apresenta maior celularidade, pleomorfismo e atividade mitótica. Ocasionalmente, nos pacientes com NF1, um espectro de alterações pode ser visto simultaneamente, variando de neurofibromas atípicos até TMBNP de alto grau. Os neurofibromas atípicos apresentam maior pleomorfismo do que os neurofibromas, porém não há atividade mitótica (THWAY et al., 2014; JAMES et al., 2016).

Na imunohistoquímica, como os marcadores apresentam sensibilidade e especificidade limitadas, não há painel diagnóstico específico. Entretanto, apresentam valor na exclusão de diagnósticos diferenciais, como: neurofibroma, sarcoma sinovial, angiossarcoma, melanoma e tumores mioepiteliais. A expressão da proteína S100 (**Figura 9**), um dos marcadores mais utilizados, quando presente (aproximadamente em 50-90% dos casos), tem como característica o padrão de imunocoloração focal. Sua expressão difusa, que pode surgir na variante epitelioide

e nos tumores de baixo grau oriundos de neurofibromas plexiformes, é mais consistente com schwannoma celular, sarcoma de células claras e melanoma desmoplásico, assim sendo usada para excluir o diagnóstico de TMBNP (THWAY e FISHER, 2014). Sua expressão não é específica para o TMBNP e está presente em percentual significante de sarcoma sinovial, leiomiossarcoma e rabdomiossarcoma (BROHL et al., 2017).

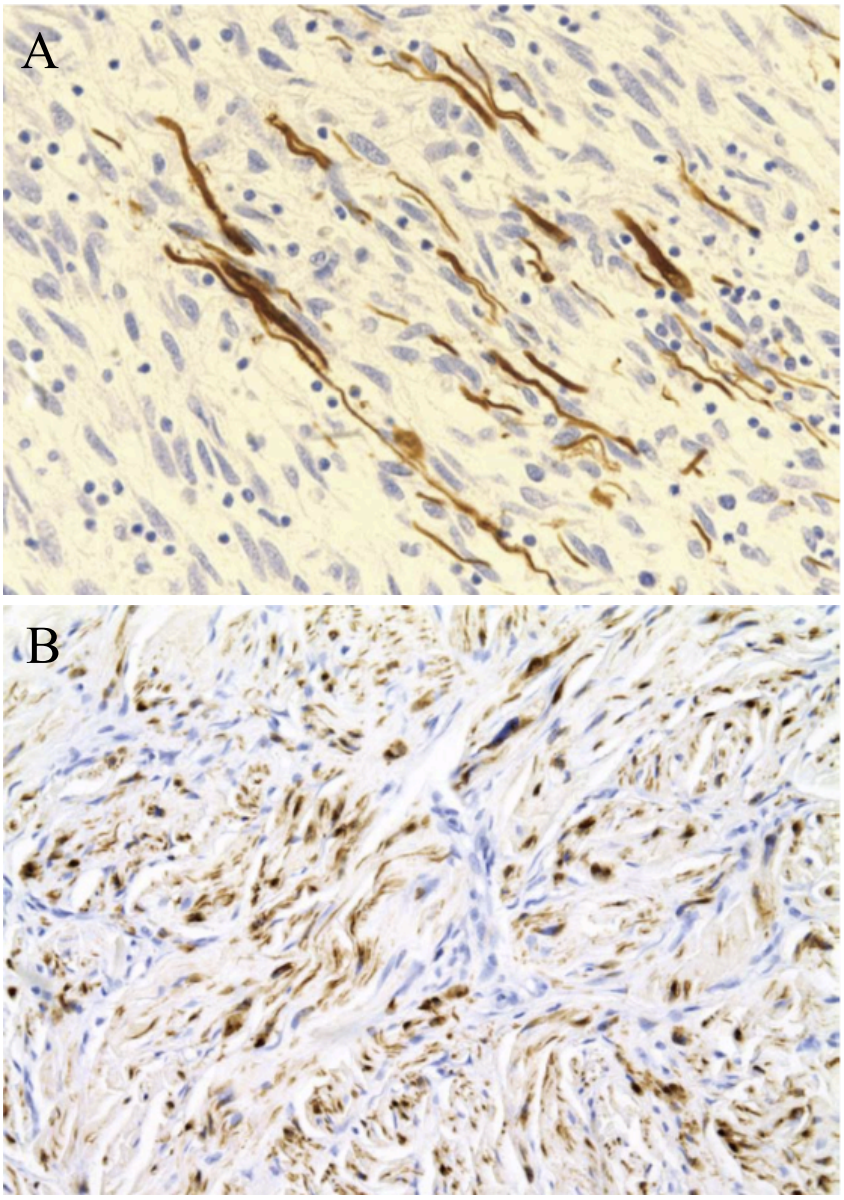


Figura 9. Padrão de expressão da proteína S100 por imunohistoquímica. (A) Marcação focal de S100 característica do TMBNP (B) Melanoma desmoplásico exemplificando marcação difusa de S100. Fonte: GOLDBLUM; FOLPE; WEISS, 2020.

A expressão de CD56, encontrada em células de origem neural, embora não seja específica para TMBNP, é considerada um marcador sensível para tumores de bainha de nervo periférico (GUO et al., 2012). A expressão nuclear de Sox10 (*SRY-box transcription factor 10*) parece mostrar maior especificidade e sensibilidade em relação a S100 no TMBNP e apresenta maior especificidade para tumores de origem na crista neural (GOLDBLUM et al., 2020). O TMBNP raramente expressa marcadores epiteliais, o que é útil na exclusão de diagnósticos diferenciais. Embora um subgrupo apresente marcação focal de pancitoqueratinas (mediante detecção pelo anticorpo AEI/AE3) e do antígeno de membrana epitelial, a maioria não expressa as citoqueratinas 7 e 19, o que auxilia a diferenciá-lo do sarcoma sinovial monofásico (CARLI et al., 2005). O TLE1 (*Transducin-like enhancer protein 1*) é encontrado, no geral, em tumores da bainha de nervo periférico, incluindo um terço dos neurofibromas, todos os schwannomas e 30-40% dos TMBNP, que apresentam marcação focal e fraca, ao contrário do sarcoma sinovial que apresenta padrão difuso (KIM et al., 2017; KORFHAGE; LOMBARD, 2019; GOLDBLUM; FOLPE; WEISS, 2020).

1.1.6 Tratamento

Atualmente, para pacientes com doença localizada, a ressecção cirúrgica com margens livres é o tratamento de escolha e mantém relação direta com a sobrevida livre de doença e global. Objetiva-se a ressecção com margens amplas livres, complementada com radioterapia e/ou quimioterapia adjuvantes de forma individualizada. Nas lesões de grande volume e localizadas na raiz dos membros (comum nos pacientes com NF1), embora a abordagem cirúrgica esteja associada a grande morbidade local e prejuízo funcional ao paciente, preconiza-se realizar margem oncológica ampla, uma vez que há impacto prognóstico direto da ressecção cirúrgica com margens comprometidas (MINNA et al., 2019).

A radioterapia adjuvante é indicada principalmente para sarcomas de partes moles maiores de 5cm, de alto grau e com margens cirúrgica R1 (margem microscópica comprometida) e R2 (margem macroscópica comprometida). Ela auxilia a reduzir as taxas de recorrência local, embora tenha pouco impacto na sobrevida global. Deve-se discutir exaustivamente com o paciente portador de NF1 a relação risco-benefício de submetê-lo à radioterapia, visto o alto risco de desenvolvimento de sarcoma radio-induzido (FARID et al., 2014; KAHN et al., 2014).

Os regimes padrões de quimioterapia para sarcomas de partes moles podem ser usados nos pacientes com TMBNP, como o protocolo único com doxorrubicina ou terapia combinada com doxorrubicina e ifosfamida. As taxas de resposta à quimioterapia combinada são em torno de 21%, segundo o Critério de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* – RECIST) (FERNER; GUTMANN, 2002; TORA et al., 2019). Entretanto, é escassa a literatura sobre os resultados do tratamento cirúrgico combinado com quimioterapia no prognóstico do paciente (KROEP et al., 2011; FARID et al., 2014). Não há opções terapêuticas eficazes para o paciente com doença recidivada, metastática e/ou inoperável (FERNER; GUTMANN, 2002; TORA et al., 2019).

Estudos mais atuais, incluindo ensaios clínicos de fase I e II, têm buscado uma terapia alvo-específica para o TMBNP baseada em fármacos que mostraram eficácia em outros sarcomas (WIDEMANN; ITALIANO, 2018). Um exemplo são os ensaios clínicos que visaram tratar o TMBNP com inibidores específicos da via da tirosina quinase, os quais não obtiveram sucesso (KIM et al., 2017; CARLI et al., 2019). Parte da limitação em alcançar tratamento específico e avaliar sua eficácia no TMBNP vem da dificuldade em realizar ensaios clínicos de uma doença rara. Assim, dispor de modelos pré-clínicos que reproduzam adequadamente a doença do paciente é fundamental para compreensão de seu comportamento biológico e, consequentemente, a busca por novas terapias.

1.2 Modelos pré-clínicos de tumor maligno de bainha de nervo periférico

1.2.1 Linhagens celulares humanas

Nas últimas décadas, a maioria das pesquisas translacionais sobre sarcoma de partes moles utilizou linhagens celulares humanas destas neoplasias, cultivadas *in vitro* e/ou implantadas em animais imunodeficientes, como modelo para ensaios pré-clínicos (WIDEMANN e ITALIANO, 2018). No caso do TMBNP, linhagens celulares humanas derivadas de pacientes com TMBNP esporádicos e de portadores de NF1 foram utilizadas, por exemplo, em estudos *in vitro* e *in vivo* para elucidar o mecanismo de ação da neurofibromina, de fatores de crescimento, da p53 e de hormônios sexuais na biologia do tumor, bem como avaliar os potenciais efeitos terapêuticos da quimioterapia e de terapias alvo-específicas (PERRIN et al., 2007; JOHANSSON et al., 2008; BANERJEE et al., 2010; LOPEZ et al., 2011; TURK et al., 2011; KAUR; CHIOCCA; CRIPE, 2014). Entretanto, tais linhagens apresentam importantes limitações no desenvolvimento de testes pré-clínicos (HIDALGO et al., 2014; LU et al., 2018; MATTAR et al., 2018).

Atualmente é amplamente reconhecido que as linhagens celulares, estabelecidas há muitos anos, se adaptaram às condições de cultivo *in vitro*, através da seleção darwiniana ocorrida após inúmeras passagens seriais (KIM et al., 2017). Isso as torna bastante distintas do cenário clínico, pois exibem ganhos e perdas gênicas irreversíveis, além de mudanças em suas propriedades biológicas, características essas que influenciam na evolução da doença e na resistência ao tratamento sistêmico. Justamente por não manterem a heterogeneidade intratumoral em função da pressão seletiva no cultivo *in vitro*, essas linhagens, geralmente, não são representativas do cenário clínico (HIDALGO et al., 2014). Ademais, poucas linhagens celulares de um mesmo subtipo tumoral conseguiram ser estabelecidas até o momento, o que não é representativo da

expressiva heterogeneidade intertumoral observada entre pacientes com um mesmo tipo histológico de neoplasia. Essas variáveis são importantes na análise da tumorigênese, do comportamento biológico e em testes terapêuticos (LU et al., 2018).

Nesse contexto, como as linhagens celulares não se mostram apropriadas para estudos pré-clínicos robustos, vem crescendo a busca por um modelo pré-clínico que transpasse essas limitações, como o biomodelo de PDX (HIDALGO et al., 2014; LU et al., 2018; MATTAR et al., 2018).

1.2.2 Modelo de xenoenxerto derivado de paciente - PDX

Os primeiros relatos de xenoenxertia de neoplasias humanas diretamente do paciente para animais imunodeficientes, denominado modelo PDX, foram publicados por volta de 1980, em estudos sobre câncer de pulmão e rabdomiossarcoma em crianças (HIDALGO et al., 2014). Desde então, alguns modelos de PDX foram desenvolvidos e utilizados, dentre outros fins, para a identificação de biomarcadores, análise da resistência à quimioterapia, desenvolvimento de fármacos e testes pré-clínicos (MARANGONI et al., 2007; KIM et al., 2009; MOESTUE et al., 2010; NÉMATI et al., 2010; HIDALGO et al., 2011; SIVANAND et al., 2012; HOFF et al., 2013; LI et al., 2013; SIOLAS et al., 2013 ZHANG et al., 2013).

O modelo PDX consiste na enxertia de um fragmento a fresco de tumor primário ou metastático oriundos de pacientes em animais imunodeficientes (majoritariamente camundongos), o que permite o desenvolvimento do tumor diretamente em um ambiente *in vivo*. Para tal, a amostra tumoral é obtida do material coletado na biópsia diagnóstica ou no procedimento cirúrgico de ressecção tumoral. A amostra é seccionada em pequenos fragmentos que são implantados no subcutâneo dos camundongos (enxertia heterotópica) ou na mesma localização anatômica do tumor parental (ortotópico). Apesar da enxertia ortotópica apresentar

vantagem translacional por se desenvolver no mesmo microambiente anatômico do tumor parental e permitir o desenvolvimento de metástase, sua execução é mais dispendiosa e tecnicamente mais complexa do que o modelo heterotópico. O sucesso da enxertia, que é o desenvolvimento do tumor do paciente no animal, permite a passagem do tumor para outros animais e, assim, expandir uma amostra que, inicialmente, é reduzida (**Figura 10**) (STEBBING et al., 2014; BLATTMANN et al., 2015; CORNILLIE et al., 2019).

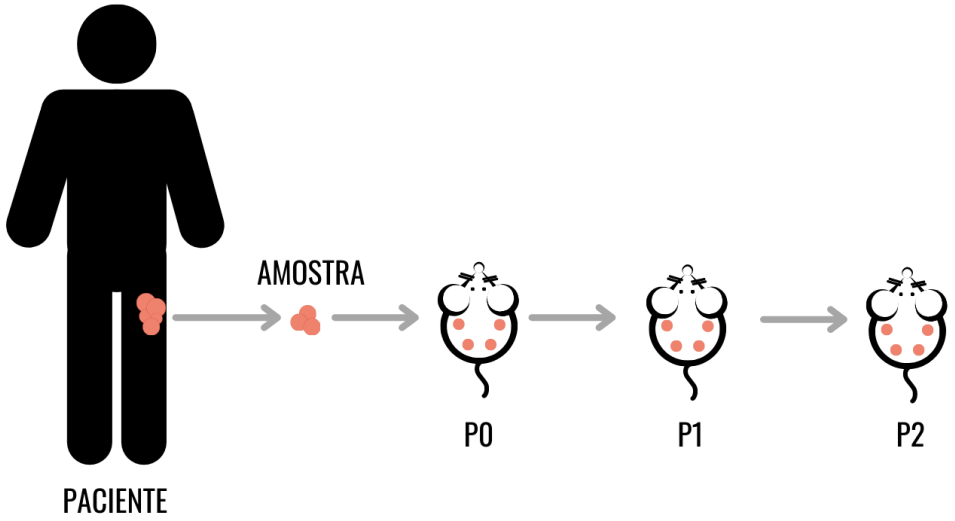


Figura 10. Esquematização do processo de estabelecimento do modelo PDX e de expansão da amostra. A amostra coletada do paciente é implantada no camundongo e, após estabelecido o tumor, o mesmo é ressecado, dissociado e passado para outros animais, permitindo a expansão da amostra. Fonte: Arquivo pessoal.

Diversos estudos vêm demonstrando que, diferentemente do modelo de linhagens celulares, o modelo PDX preserva a heterogeneidade e a complexidade gênica tumoral, bem como melhor simula o microambiente tumoral. Além disso, ele é preditivo do desfecho clínico, já que a resposta terapêutica no PDX se correlaciona com a encontrada na prática clínica (BERTOTTI; MIGLIARDI; GALIMI, 2011; MIGLIARDI et al., 2012; KEYSAR et al., 2013; IZUMCHENKO et al., 2017). Ainda, em estudos de larga escala, sua utilização facilita a busca por potenciais biomarcadores relacionados à resposta terapêutica, tanto para avaliar eficácia

quanto resistência à terapia (HIDALGO et al., 2014). Diferentes estudos têm demonstrado a semelhança histopatológica e genética entre o tumor parental e o tumor gerado no modelo PDX com base em avaliações por imunohistoquímica, citometria de fluxo, cariotipagem e sequenciamento completo do genoma e mRNA (MEEHAN et al., 2017). Entretanto, outros estudos já reportaram certo grau de discordância entre os aspectos histológicos e genéticos (MOESTUE et al., 2011, 2013; BARDELLI; CORSO; BERTOTTI, 2013). Assim, é crucial analisar a manutenção das características do tumor parental antes de utilizar o PDX para análises pré-clínicas.

Dada a dificuldade de estabelecimento do modelo, há poucos trabalhos que estabeleceram PDX de sarcomas musculoesqueléticos em comparação à heterogeneidade de cada tipo, restringindo a aplicação extensa do PDX em pesquisas básicas e pré-clínicas (LU et al., 2018).

Em estudo com 107 amostras de sarcomas de partes moles, coletadas no período de 1 ano, não houve sucesso no estabelecimento de modelo com TMBNP, que representava apenas 1 amostra enxertada ortotopicamente (RUSSELL et al., 2017). Em outro estudo, com 188 amostras de diversos sarcomas de partes moles, 6 eram de TMBNP e apenas houve sucesso no estabelecimento de 2 amostras (CORNILLIE et al., 2019). Entretanto, esses estudos não discutem individualmente as características dos pacientes incluídos e nem as correlacionam com o sucesso da enxertia. Ainda, outro estudo estabeleceu 4 PDX a partir de amostras de TMBNP provenientes de 3 pacientes, sendo 2 modelos oriundos de um mesmo paciente com NF1 e os outros 2 de casos esporádicos, e verificou semelhança histológica, imunohistoquímica e genética (CASTELLSAGUÉ et al., 2015).

Há limitação para realizar ensaios clínicos com TMBNP, devido a sua baixa incidência. Dispor de modelo pré-clínico que simule de forma satisfatória a doença do paciente é essencial

para analisar seu comportamento biológico e, assim, expandir o campo da pesquisa em TMBNP, inclusive na busca por novas terapias.

2 JUSTIFICATIVA

O TMBNP é uma neoplasia maligna de partes moles rara e que carece de tratamento sistêmico eficaz até o presente momento. Sua baixa incidência limita não só a realização de estudos clínicos prospectivos representativos, mas também a obtenção de amostras para o estabelecimento de um modelo pré-clínico adequado. O INTO, por ser um hospital de alta complexidade e ter em sua estrutura um serviço especializado em oncologia ortopédica, apresenta-se como pilar essencial no referenciamento nacional de pacientes com tumores musculoesqueléticos e, portanto, uma importante matriz para a realização de estudos com doenças raras.

Conforme descrito no referencial teórico, é notória a importância crescente do modelo PDX no cenário pré-clínico da pesquisa mundial. O PDX vem se consolidando como base para o entendimento de diversas neoplasias e como modelo pré-clínico para o aprimoramento terapêutico, na busca de maior compreensão do mecanismo de resposta e/ou resistência medicamentosa e de biomarcadores relacionados a tal.

Embora já tenha sido estabelecido o modelo murino de PDX de TMBNP, esse tópico ainda é escasso literatura, principalmente no tocante a validação de sua semelhança histopatológica e genética com o tumor parental. Diante disto, há relevante e indispensável potencial em caracterizar o modelo, visando o aprimoramento da análise diagnóstica e permitir a realização de testes terapêuticos em biomedelo adequado, na busca por tratamento farmacológico mais eficaz e com efeitos adversos toleráveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Estabelecer e caracterizar o modelo murino de xenoenxerto derivado de paciente (PDX) de tumor maligno de bainha de nervo periférico.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Descrever as características clínico-patológicas dos participantes do estudo;
- ✓ Avaliar a taxa de sucesso de enxertia dos tumores nos camundongos ao longo de 3 gerações consecutivas;
- ✓ Analisar a dinâmica de crescimento dos tumores nos camundongos ao longo de 3 gerações consecutivas;
- ✓ Comparar a similaridade histológica entre os tumores gerados nos camundongos e seu respectivo tumor parental;
- ✓ Confirmar a origem humana dos tumores gerados nos camundongos e avaliar a presença de células estromais de origem murina;
- ✓ Comparar, por imunohistoquímica, o perfil de expressão de biomarcadores entre os tumores gerados nos camundongos e seu respectivo tumor parental.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO) (CAAE: 69859417.2.0000.5273) (ANEXO A). Os participantes e/ou seus responsáveis legais manifestaram sua concordância em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B), redigido de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Os experimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do INTO (Protocolo 005/2017) (ANEXO C).

4.2 Coleta de dados clínicos

As informações dos pacientes como sexo, idade, local do tumor, presença de metástase ao diagnóstico, tipo de tratamento (cirúrgico e sistêmico), procedimento cirúrgico realizado, recidiva da doença e sobrevida dos pacientes foram obtidas mediante busca em prontuário. Os aspectos anatomopatológicos das amostras das lesões parentais foram avaliados e caracterizados pela equipe da Unidade de Anatomia Patológica do INTO. A classificação do estadiamento da doença, baseada na oitava edição do estadiamento pela *American Joint Committee on Cancer* foi retirada dos laudos fornecidos pela Unidade de Anatomia Patológica do INTO (ANEXO D).

4.3 Coleta e processamento das amostras de TMBNP

Entre agosto de 2017 e dezembro de 2020, amostras frescas de tumor de pacientes foram obtidas de cirurgias para biópsia diagnóstica, ressecção tumoral ou amputação de membro. As amostras foram coletadas em ambiente estéril pela equipe de cirurgiões do Centro de Oncologia Ortopédica do INTO ou pela equipe de patologistas da Unidade de Anatomia Patológica do INTO. A coleta foi feita em áreas sólidas com aspecto macroscópico de tecido tumoral, evitando-se áreas de necrose ou hemorragia. As amostras foram armazenadas em frascos estéreis e transportadas imediatamente até a Unidade de Pesquisa Experimental em Ortopedia do INTO. Em cabine de fluxo laminar, foi adicionado meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Meio Eagle Modificado por Dulbecco, LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) à amostra, que foi acondicionada a 4ºC até o início do processamento. As amostras foram transferidas para placas de Petri contendo meio DMEM, e seccionadas com bisturi estéril em fragmentos de aproximadamente 5-9 mm^3 para enxertia nos camundongos. O processamento e a enxertia das amostras foram feitos dentro de 1-2h após a coleta do material.

4.4 Obtenção e condições de manutenção dos camundongos

Camundongos imunodeficientes *nude* com background C57/Black-6 (B6.Cg-*Foxn1*^{nu}) de ambos os sexos e entre 6-8 semanas de idade foram obtidos do biotério de criação do INTO. Os animais foram mantidos em mini-isoladores para camundongos (Série Ventlife – Alesco, Monte Mor,SP, Brasil) em biotério com ambiente de barreira física contendo estantes ventiladas equipadas com filtros de alta eficiência na separação de partículas (*HEPA - high efficiency particulate arrestance)* durante todo o período de experimentação. Os camundongos foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12h cada, em condições de 40 – 60% de umidade relativa

do ar e 20 – 25ºC de temperatura ambiente. O acesso à alimentação com ração irradiada para roedores (Nuvilab® - Quimtia, Colombo, PR, Brasil) e água autoclavada foi *ad libitum*. Três dias após o procedimento cirúrgico, os animais do mesmo sexo enxertados com a mesma amostra foram mantidos em um único mini-isolador, respeitando o limite máximo de 5 animais por mini-isolador. Caso os animais apresentassem alterações de comportamento, perda ponderal ou aspecto de dor, os mesmos foram avaliados pela veterinária responsável pelo biotério que decidiu pela necessidade de eutanásia.

4.5 Procedimento cirúrgico para enxertia das amostras tumorais nos camundongos

Os camundongos foram anestesiados por via inalatória com isoflurano (Biochimico, Itatiaia,RJ, Brasil) em vaporizador calibrado (Insight Equipamentos Ltda., Ribeirão Preto,SP, Brasil) na taxa de 5% vol/L de oxigênio para indução (em câmara de indução) e 2,5% vol/L de oxigênio para manutenção por meio de máscara facial adaptada. Após a indução anestésica, foi realizada, por via subcutânea, analgesia intra-operatória com cetoprofeno 5mg/kg (Artrinid® - União Química, São Paulo, SP, Brasil) e tramadol 5 mg/kg (cloridrato de tramadol, Laboratório Teuto, Anápolis, GO, Brasil). Os camundongos foram posicionados em decúbito ventral e, na altura das vértebras lombares, foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm de extensão na pele. Em seguida, com uma tesoura de ponta curva, foi feita a divulsão e levantamento da pele, e os fragmentos tumorais foram inseridos na região subcutânea do dorso do animal. Com intuito de reduzir o número de camundongos utilizados no estudo, um mesmo animal recebeu 4 fragmentos de tumor proveniente de um mesmo paciente. Dois fragmentos foram posicionados no lado esquerdo e 2 no lado direito do animal, de modo que houvesse uma boa separação entre os 4 fragmentos e, assim, os mesmos não se juntassem em caso de crescimento simultâneo dos fragmentos. A incisão foi fechada por sutura simples com fio de nylon 5-0. Durante todo o

procedimento, os camundongos foram mantidos em colchão térmico (Prevtech Equipamentos Veterinários, São Paulo,SP, Brasil) previamente ajustado na temperatura de 37ºC.

Quando os tumores atingiram o volume máximo de crescimento tumoral, os animais foram submetidos à eutanásia e os tumores foram ressecados, fragmentados e enxertados em outro camundongo, seguindo a mesma metodologia apresentada anteriormente, até que se completassem 3 gerações consecutivas de tumores PDX de cada caso. A primeira geração foi denominada P0 (passagem 0), a segunda P1 e a última P2.

4.6 Avaliação do crescimento tumoral e definição do critério de sucesso de enxertia

As dimensões tumorais foram acompanhadas semanalmente por palpação local e medidas com paquímetro digital. Para o cálculo volumétrico do tumor, foi utilizada a fórmula: volume total = [(dimensão maior) x (dimensão menor)^2]/2.

O volume de 200mm^3 foi definido como início do crescimento tumoral enquanto o volume entre 1400-1600 mm^3 foi definido como limite máximo de crescimento tumoral, e consequente eutanásia dos animais, com base em dados prévios do nosso grupo para evitar a necrose na região central do tumor (FORTUNA-COSTA et al., 2020).

O tempo de latência e o tempo de crescimento foram definidos, respectivamente, como o intervalo de tempo, em dias, entre a enxertia da amostra e o início do crescimento tumoral (200 mm^3) e entre o início do crescimento (200mm^3) e o fim do crescimento (1400-1600 mm^3) tumoral. O tempo total de crescimento foi definido como o intervalo de tempo entre a enxertia e o fim do crescimento, quando os tumores atingiram o limite máximo.

Quando um mesmo animal apresentou mais de um enxerto com crescimento, os dados do tumor que atingiu primeiramente o limite de crescimento foram usados no cálculo do tempo de latência e de crescimento. Nos casos em que mais de um animal foi enxertado com amostra de

uma mesma paciente, o tempo de latência e de crescimento representou a média dos dados do tumor com crescimento mais rápido em cada camundongo.

Os animais foram acompanhados semanalmente por pelo menos 8 meses e, quando não apresentaram volume mínimo de 200 mm^3 após esse período, foram considerados como insucesso de enxertia e submetidos à eutanásia.

4.7 Eutánasia dos animias e coleta de tumores e órgãos

Para a realização da eutanásia, primeiramente os camundongos receberam injeção intraperitoneal de cetamina (100mg/kg) e xilasina (5mg/kg). Após a indução anestésica, os animais foram colocados em câmara de CO_2 por pelo menos 5 minutos. Uma vez confirmada ausência de movimentos respiratórios, foi realizado o deslocamento cervical.

Após a eutanásia, os animais que apresentavam crescimento tumoral tiveram o(s) tumor (es) removidos, em cabine de fluxo laminar, e processados como descrito no item 4.3. Os pulmões, baço, fígado e os rins de todos os animais foram coletados para avalição de metástase por macroscopia e microscopia.

4.8 Processamento histológico das amostras

Secções dos tumores em seu maior eixo (pacientes e xenoenxertos) foram posicionados em cassetes histológicos e fixadas em solução de paraformaldeído (Êxodo Científica, Sumaré, SP, Brasil) a 4% em tampão fosfato-salino por pelo menos 24h. As amostras foram processadas na Unidade de Anatomia Patológica do INTO. Resumidamente, foi realizada a etapa de desidratação do material mediante imersão em solução de etanol/água em concentrações crescentes (70%, 95%, 100%). A seguir, foi feita a etapa de diafanização por meio de 3 banhos

consecutivos em xilol e a inclusão do material em parafina. Foram realizados cortes de 4 μm de espessura no micrótomo e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

Os pulmões, fígado, baço e rins dos camundongos foram coletados e fixados em solução de formaldeído a 10% em água. Após um período mínimo de 7 dias de fixação, os órgãos foram seccionados, posicionados em cassetes histológicos e processados como descrito acima.

4.9 Avaliação da manutenção das características histológicas

A avaliação da manutenção das características histológicas dos tumores PDX nas gerações P0, P1 e P2 em relação ao tumor parental foi feita por uma médica patologista da Unidade de Anatomia Patológica do INTO com ampla experiência em sarcomas. A avaliação foi feita de forma encoberta em relação às passagens dos tumores PDX. Foram comparadas a arquitetura tecidual, a composição do estroma, o pleomorfismo nuclear, a celularidade, a proliferação celular (por meio da expressão de Ki-67) e a necrose tecidual. As avaliações da proliferação celular foram feitas nas áreas de maior expressão de Ki-67 ("*hot spot*") em campos com aumento de 10X. O percentual de expressão de Ki-67 foi determinado mediante a relação de células marcadas com Ki-67 com as células totais no campo avaliado, seguindo a metodologia usada nos laudos histopatológicos da Unidade.

4.10 Imunohistoquímica

As análises imunohistoquímicas foram realizadas no Laboratório de Apoio em Patologia (APC Laboratório, São Paulo, SP, Brasil). Foram utilizados os anticorpos prontos para uso anti-CD56 (clone 123C3), anti-Ki-67 (clone MIB-1), anti-S100 (policlonal), anti-vimentina (clone V9), todos da DAKO Agilent (Santa Clara, CA, EUA). A imunohistoquímica foi realizada com

o kit EnVision™ FLEX – High Ph Link (DAKO, Glostrup, Denmark) de acordo com as instruções do fabricante. A incubação das amostras com os anticorpos primários foi feita por 45 minutos à temperatura e com o polímero por 25 minutos, também à temperatura ambiente. A incubação com o reagente DAB (diaminobenzidina) foi feita por 5 minutos e a contracoloração com hematoxilina de Harris por 10 segundos.

4.11 Aquisição das imagens

As micrografias foram obtidas no *scanner* digital de lâminas Aperio CS2 (Leica Biosystems, Wetzlar,HE, Alemanha), pertencente ao Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense, ou no microscópio óptico EVOS M5000 (Invitrogen, Bothell, WA, EUA).

4.12 Análise estatística

As variáveis categóricas foram expressas por meio de frequências absolutas e relativas (percentual). As variáveis quantitativas foram apresentadas por meio de medidas de tendência central (média e mediana) e por medidas de variabilidade (desvio-padrão, valores mínimos e máximos). O tempo de latência e o tempo de crescimento foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com o teste não paramétrico de Friedman, seguido por pós-teste de Dunn. Para todas as análises foram consideradas estatisticamente significativas aquelas que apresentaram um grau de confiabilidade de 95% ($p<0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 8 para Windows (GraphPad Software, San Diego California EUA, www.graphpad.com).

5 RESULTADOS

5.1 Composição da amostra do estudo

Entre agosto de 2017 e dezembro de 2020, foram realizadas no INTO 19 cirurgias em 7 pacientes com TMBNP, sendo 9 biópsias, 4 ressecções e 6 amputações de membro. Dentre as 13 amostras tumorais coletadas, 11 foram enxertadas em camundongos imunodeficientes e 2, devido à falta de animais para experimentação, foram criopreservadas para enxertia futura. Três das 11 amostras enxertadas foram excluídas das avaliações, duas por não serem representativas do tumor do paciente e 1 em função da eutanásia precoce do camundongo por problemas de saúde. Das 8 amostras de TMBNP avaliadas, obtidas de 6 pacientes, metade teve sucesso de crescimento no modelo PDX (**Figura 11**).

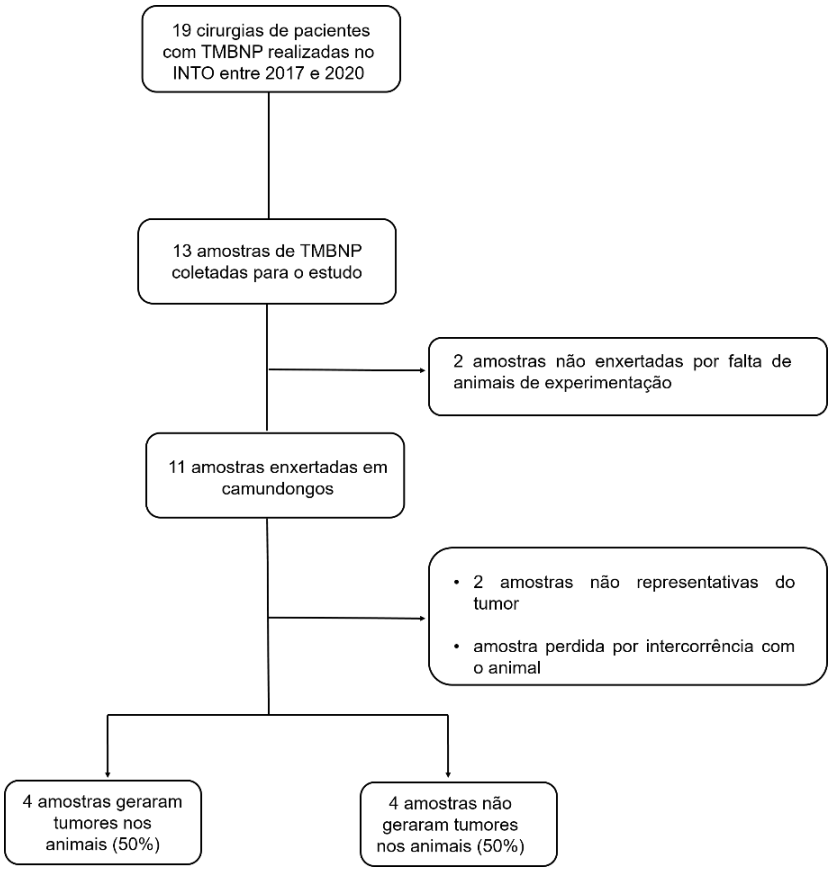


Figura 11. Fluxograma da composição da amostra do estudo.

A média de idade dos pacientes, no momento da coleta da amostra, foi de 28 anos (16-51). O sexo feminino (6/8), a cor de pele preta (7/8), a presença de NF1 (6/8) e a localização anatômica em membro inferior (7/8) predominaram entre os participantes do estudo. Nenhum participante realizou quimioterapia ou radioterapia antes da coleta da amostra. A maioria dos tumores foi classificada como grau histológico 3 (5/8) e estadiamento patológico IIIB (5/8) e 5 amostras foram coletadas de cirurgias amplas (ressecção ou amputação). Dois pacientes apresentavam metástase pulmonar ao diagnóstico e tiveram tempo médio de sobrevida de 12,5 meses. Quatro amostras foram coletadas de pacientes que apresentaram recidiva local da doença. As características clínico-patológicas dos participantes são apresentadas na **tabela 1**, sendo pormenorizadas em relação ao sucesso ou insucesso de crescimento da amostra de TMBNP no modelo PDX.

Tabela 1. Características clínico-patológicas dos participantes do estudo.

Variável	Global (n=8)	Crescimento do enxerto tumoral	
		Sim (n=4)	Não (n=4)
Idade			
Mediana (min-máx)	28 (16-51)	28,5 (27-51)	23 (16-47)
		n (%)	
Gênero			
Feminino	6 (75)	3 (75)	3 (75)
Masculino	2 (25)	1 (25)	1 (25)
Cor da pele			
Preta	7 (87,5)	4(100)	3 (75)
Branca	1 (12,5)	0 (0)	1 (25)
Neurofibromatose 1			
Sim	6 (75)	3 (75)	3 (75)
Não	2 (25)	1 (25)	1 (25)
Localização do tumor			
Perna	4 (50)	3 (75)	1 (25)
Coxa	2 (25)	0 (0)	2 (50)
Antebraço	1 (12,5)	1 (25)	0 (0)
Tornozelo	1 (12,5)	0	1 (25)
QT/ RT prévia			
Não	8 (100)	4 (100)	4 (100)
Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Origem da amostra			
Biópsia	3 (37,5)	2 (50)	1 (25)
Ressecção/amputação	5 (62,5)	2 (50)	3 (75)
Grau			
G2	3 (37,5)	0 (0)	3 (75)
G3	5 (62,5)	4 (100)	1 (25)
Estadiamento patológico			
IIIB	5 (62,5)	2 (50)	3 (75)
IV	2 (25)	2 (25)	0 (0)
N.D.	1 (12,5)	0 (0)	1 (25)
Metástase ao diagnóstico			
Não	6 (75)	2 (50)	4 (100)
Sim	2 (25)	2 (50)	0 (0)
Recidiva local			
Não	2 (25)	0 (0)	2 (50)
Sim	4 (50)	2 (50)	2 (50)
N.A.*	2 (25)	2 (50)	0 (0)
Falecimento			
Não	6 (75)	2 (50)	4 (100)
Sim	2 (25)	2 (50)	0 (0)

QT- quimioterapia; RT- radioterapia; N.A.* - não aplicável (pacientes apresentavam metástase pulmonar ao diagnóstico); N.D. – não disponível.

5.2 Dinâmica de crescimento do TMBNP no modelo PDX.

Foi observado que as amostras 1, 2, 3 e 5 apresentaram crescimento em todos os camundongos enxertados nas passagens 0,1 e 2 (**Tabela 2**).

Tabela 2. Número de camundongos com crescimento tumoral em relação ao número total de animais enxertados nas passagens 0, 1 e 2.

Número da amostra		**1**	**2**	**3**	**5**	**7**	**8**	**10**	**12**
Número de animais com crescimento/ número de animais enxertados	P0	2/2	3/3	1/1	1/1	0/2	0/4	0/3	0/1
	P1	6/6	5/5	1/1	1/1	-	-	-	-
	P2	5/5	2/2	1/1	1/1	-	-	-	-

O perfil de crescimento, na passagem 0, das 4 amostras que tiveram sucesso de enxertia é apresentado no gráfico da **figura 12.** Foi observado que os padrões de crescimento diferiram entre as amostras, sendo a mediana do tempo total de crescimento dos tumores de 106,5 dias (48-140). Curiosamente, as amostras 3 e 5, cujos perfis de crescimento foram mais semelhantes, são de uma mesma paciente e foram obtidas nas cirurgias de biópsia e de ressecção, respectivamente. Todas as amostras foram repassadas com êxito para P1 e P2 e apresentaram mediana do tempo total de crescimento de 80,5 (48-87) e 50 (43-59) dias, respectivamente. Apesar da redução da mediana do tempo total de crescimento, não houve diferença estatística entre os grupos.

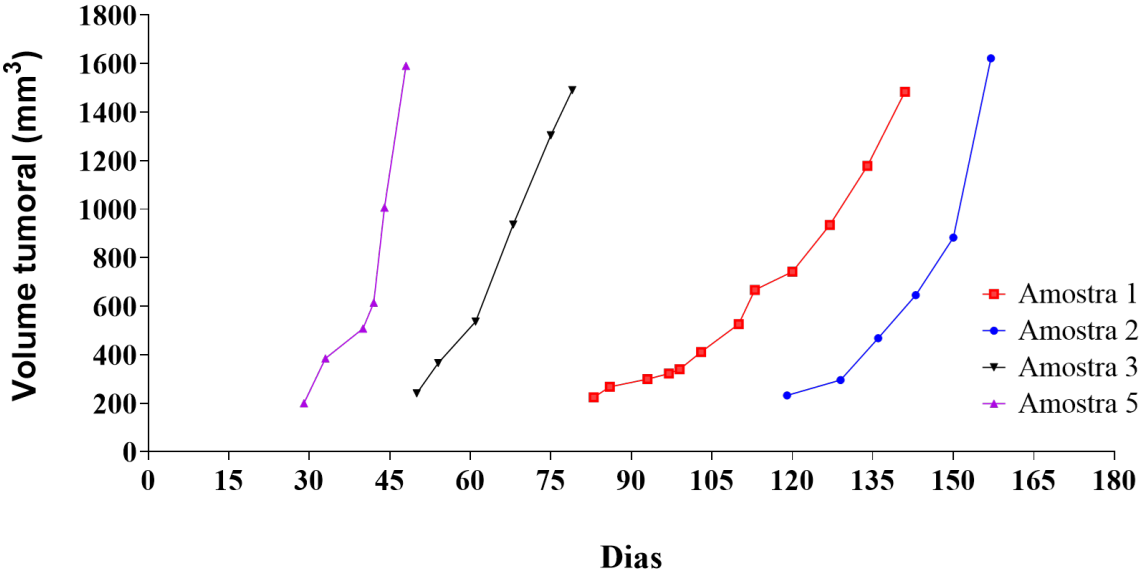


Figura 12. Perfil de crescimento do TMBNP em modelo PDX na passagem 0. O crescimento tumoral foi acompanhado semanalmente. A curva de cada caso é representativa do enxerto que apresentou crescimento mais rápido no camundongo. As amostras 3 e 5 são de uma mesma paciente, e foram obtidas na biópsia e na ressecção, respectivamente.

Com o intuito de destrinchar a dinâmica de crescimento dos tumores, foram comparados o tempo de latência (tempo até início do crescimento) e o tempo de crescimento (intervalo entre o início e o final do crescimento) ao longo das 3 passagens consecutivas. A mediana do tempo de latência diminuiu ao longo das passagens: 67 (25-104) dias em P0, 46,5 (29-51) dias em P1 e 24,5 (21-34) dias em P2 (p=0,0741) (**Figura 13A**). Uma maior variação do tempo de latência entre as amostras foi vista em P0 (**Figura 13A**). O tempo de crescimento foi semelhante entre as passagens, sendo as medianas em P0, P1 e P2, respectivamente, 33,5 (23-48), 34 (19-50) e 25 (22-26) (**Figura 13B**). Em P2, observou-se mais uniformidade do tempo de crescimento entre as amostras do que em P1 e P0 (**Figura 13B**).

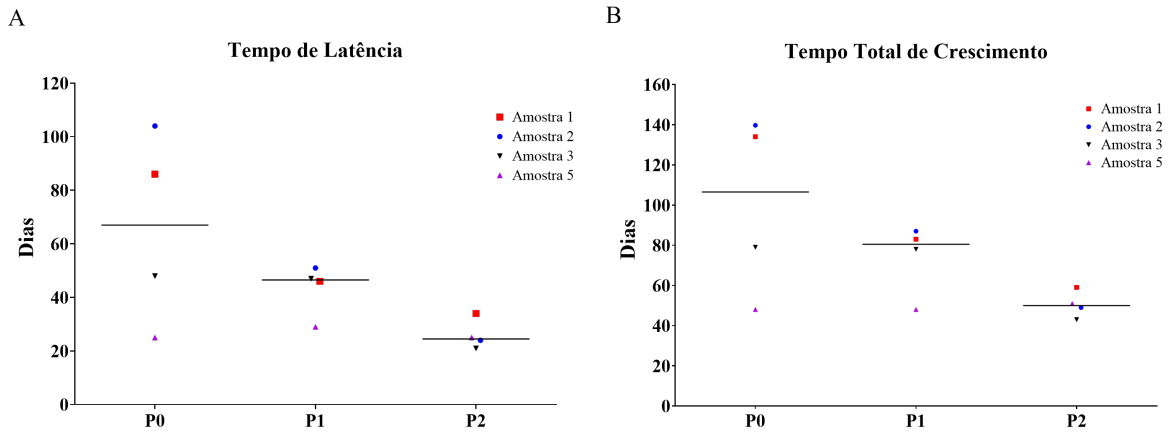


Figura 13. Dinâmica de crescimento do TMBNP no modelo PDX ao longo de 3 passagens consecutivas. (A) Tempo de latência: tempo (em dias) até que os tumores PDX de cada amostra atingissem o limiar de 200 mm³ nas gerações P0, P1 e P2. (B) Tempo de crescimento: intervalo de tempo (dias) entre o início do crescimento (200 mm³) e o final do crescimento (1400-1600mm^3) nas gerações P0, P1 e P2. n =4, teste de Friedman e pós-teste de Dunn, *p*-valor = 0,0741 (tempo de latência) e 0,5278 (tempo de crescimento).

5.3 Comparação das características histológicas entre tumores PDX e os parentais.

Verificou-se que nos 4 casos que tiveram sucesso de crescimento no modelo PDX, os tumores das gerações P0, P1 e P2 apresentaram notáveis similaridades histológicas com seu respectivo tumor parental. Características particulares de cada tumor também foram reproduzidas fidedignamente nos tumores PDX. Os casos são apresentados separadamente a seguir.

Na amostra 1, o tumor parental apresentou arranjos em feixes, áreas com diferenciação heteróloga (condroblástica e osteossarcomatosa) e organização semelhante a de um neurofibroma plexiforme (“ninhos”). Foram observadas áreas extensas de estroma com componente mixoide e outras áreas com menos estroma (maior densidade celular) (**Figura 14A, B e C**). O pleomorfismo nuclear foi classificado como moderado, a celularidade como moderada para acentuada e foi observada aproximadamente 70% de marcação para Ki-67 e 20% de necrose tecidual (**Tabela 3 e figura 15**).

As principais alterações encontradas nos tumores PDX em relação ao tumor parental foram: a redução do componente mixoide do estroma, mais acentuada na passagem 2, o aumento da celularidade ao longo das passagens e a redução das áreas de necrose. As comparações são apresentadas detalhadamente na **tabela 3** e os cortes histológicos dos tumores (parental e PDX) na **figura 14**.

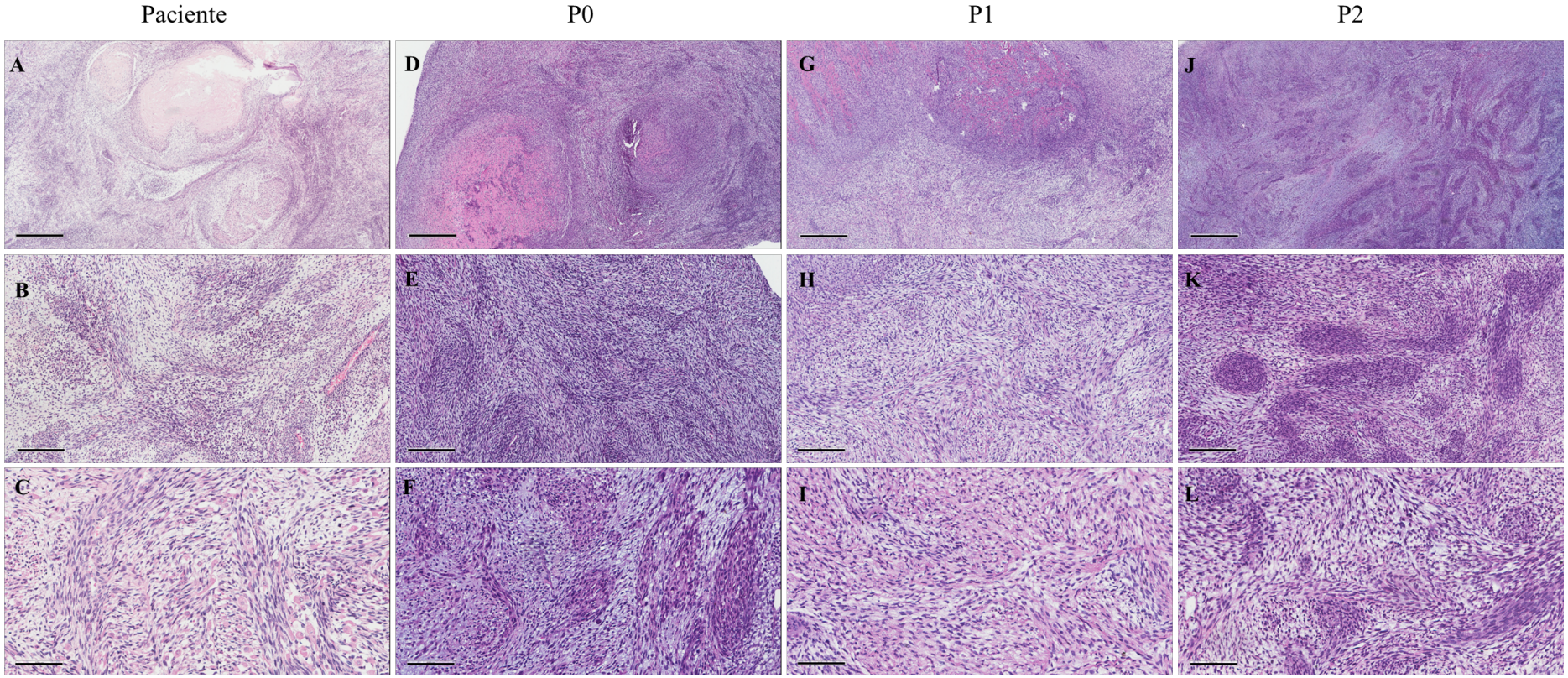


Figura 14. Comparação das características histológicas do tumor parental com seus respectivos tumores PDX das gerações P0, P1 e P2 da amostra 1. São apresentados cortes histológicos representativos de cada amostra: paciente (A-C), P0 (D-F), P1(G-I) e P2 (J-L). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra de escala: 600µm (1ª fileira); 200µm (2ª fileira) e 100 µm (3ª fileira).

Tabela 3. Comparação das características histológicas dos tumores PDX com o tumor parental da amostra 1.

	PACIENTE	PDX		
	Amostra 1	PO	P1	P2
Arquitetura tecidual	Arranjo em feixes; estrutura de neurofibroma plexiforme (ninhos)	Semelhante	Semelhante	Semelhante (feixes mais longos)
Composição do estroma	Áreas mixoides e áreas densas	Semelhante	Redução da área mixoide	Quase sem área mixoide
Pleomorfismo nuclear	Moderado	Semelhante	Aumento (sutil)	Semelhante
Celularidade	Moderada/ Acentuada		Semelhante / Aumento	Aumento
Necrose tecidual	20%		Ausente / Focal (<5%)	Ausente
Marcação Ki-67	70%		30-40% / 40%	40%

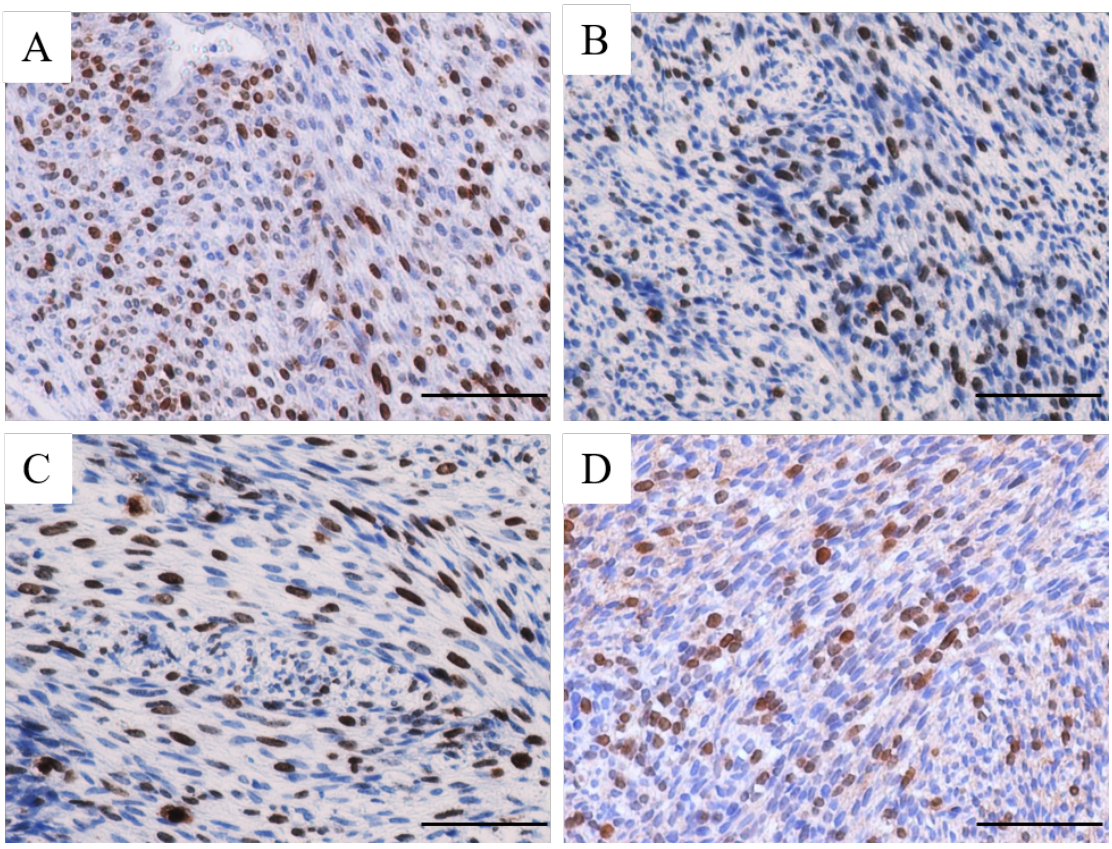


Figura 15. Expresão do antígeno de proliferação Ki-67 por imunohistoquímica na amostra 1 e em seus respectivos tumores PDX. (A) tumor do paciente, (B) passagem 0, (C) passagem 1 e (D) passagem 2. Barra de escala: 75µM.

Na amostra 2, o tumor parental apresentou em sua organização feixes curtos e enovelados, áreas de estroma mixoide (baixa densidade celular), intercaladas com áreas de maior densidade celular (aspecto marmorizado). O pleomorfismo nuclear foi classificado como moderado e a celularidade tecidual acentuada (**Figura 16A, B e C**). Foi observada, aproximadamente, 40% de células marcadas para Ki-67 e 20% de área de necrose **(Tabela 4 e Figura 17)**.

As principais alterações encontradas nos tumores PDX em relação ao tumor parental foram a redução do componente mixoide do estroma, praticamente não identificado na passagem 2, e a redução da necrose. Ainda, houve o aumento da celularidade na passagem 2. As comparações são apresentadas detalhadamente na **tabela 4** e os cortes histológicos dos tumores (parental e PDX) na **figura 16**.

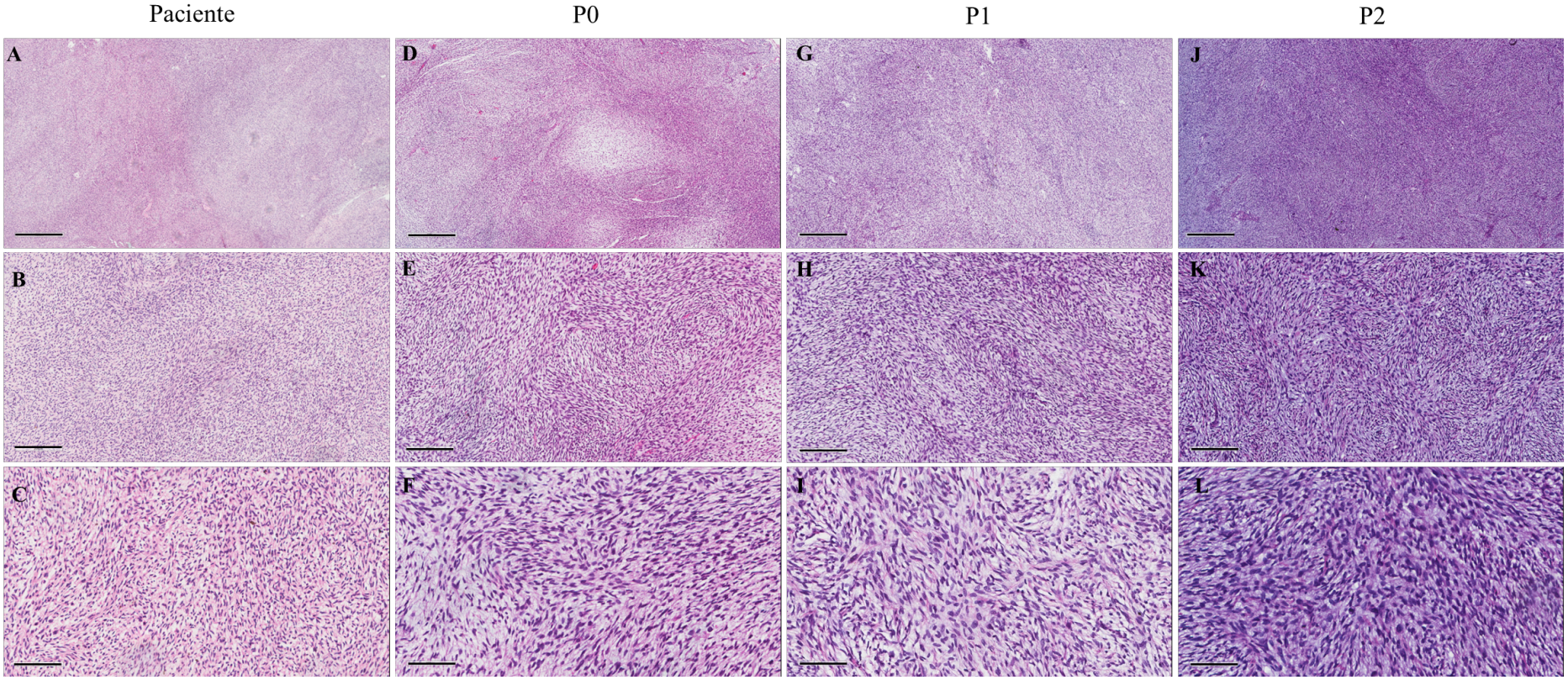


Figura 16. Comparação das características histológicas do tumor parental com seus respectivos tumores PDX das gerações P0, P1 e P2 da amostra 2. São apresentados cortes histológicos representativos de cada amostra: paciente (A-C), P0 (D-F), P1(G-I) e P2 (J-L). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra de escala: 600µm (1ª fileira) ; 200µm (2ª fileira) e 100 µm (3ª fileira).

Tabela 4. Comparação das características histológicas dos tumores PDX com o tumor parental da amostra 2.

	PACIENTE	PDX		
	Amostra 2	PO	P1	P2
Arquitetura tecidual	Feixes curtos (enovelados)	Semelhante	Semelhante	Semelhante
Composição do estroma	Poucas áreas mixoides	Redução das áreas mixoides	Semelhante	Ausência de áreas mixoides
Pleomorfismo nuclear	Moderado	Semelhante	Semelhante	Semelhante
Celularidade	Acentuada	Semelhante	Semelhante	Aumento
Necrose tecidual	20%	Ausente	Ausente	Ausente
Marcação Ki-67	40%	70%	40-50%	*

* Marcação de imunohistoquímica com qualidade ruim para avaliação.

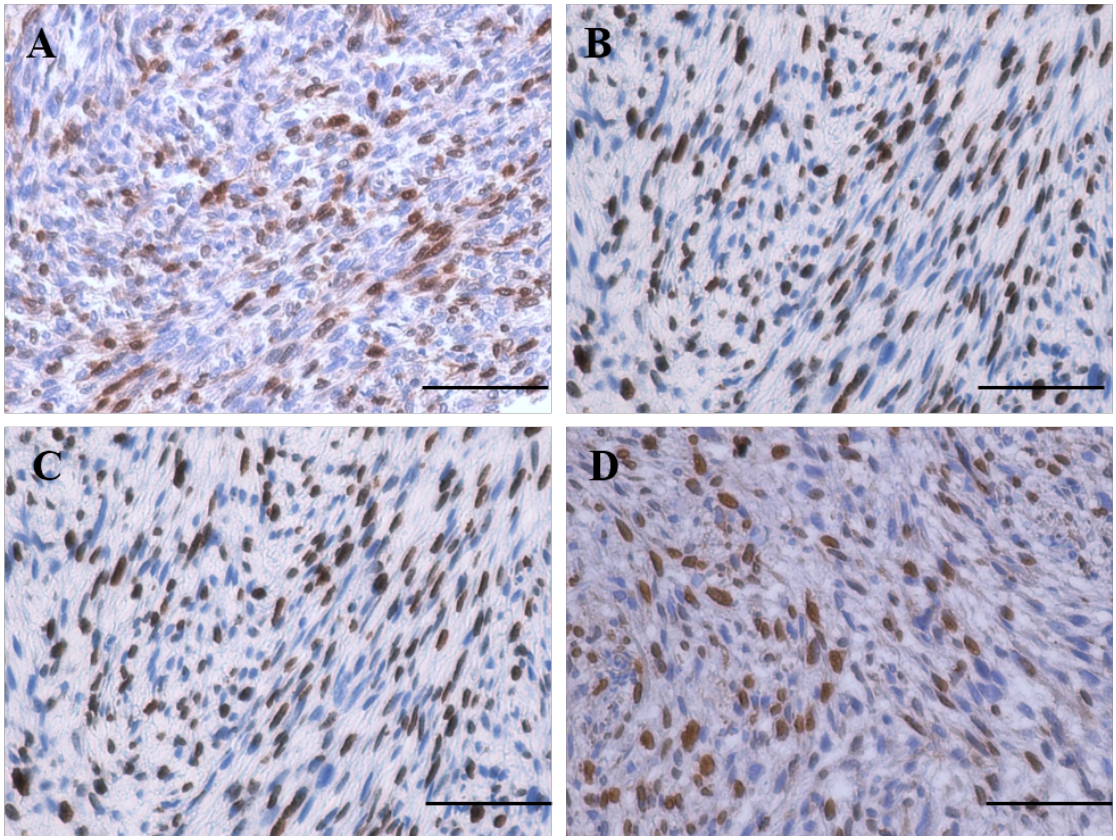


Figura 17. Expresão do antígeno de proliferação Ki-67 por imunohistoquímica na amostra 2 e em seus respectivos tumores PDX. (A) tumor do paciente, (B) passagem 0, (C) passagem 1 e (D) passagem 2. Barra de escala: 75µM.

Na amostra 3, verificou-se que a arquitetura do tumor parental é composta por feixes curtos e desorganizados e que há a presença de estroma mixoide. O pleomorfismo nuclear e a celularidade foram classificados como moderados e foi observada aproximandamente 60% de área de necrose e extensas áreas de hemorragia **(Figura 18A, B e C)**.

Os tumores PDX, principalmente das passagens 2 e 3, apresentaram redução do estroma mixoide e o aumento do pleomorfismo nuclear e da celularidade. As áreas de hemorragia não foram verificadas nos tumores PDX. As comparações são apresentadas detalhadamente na **tabela 5**.

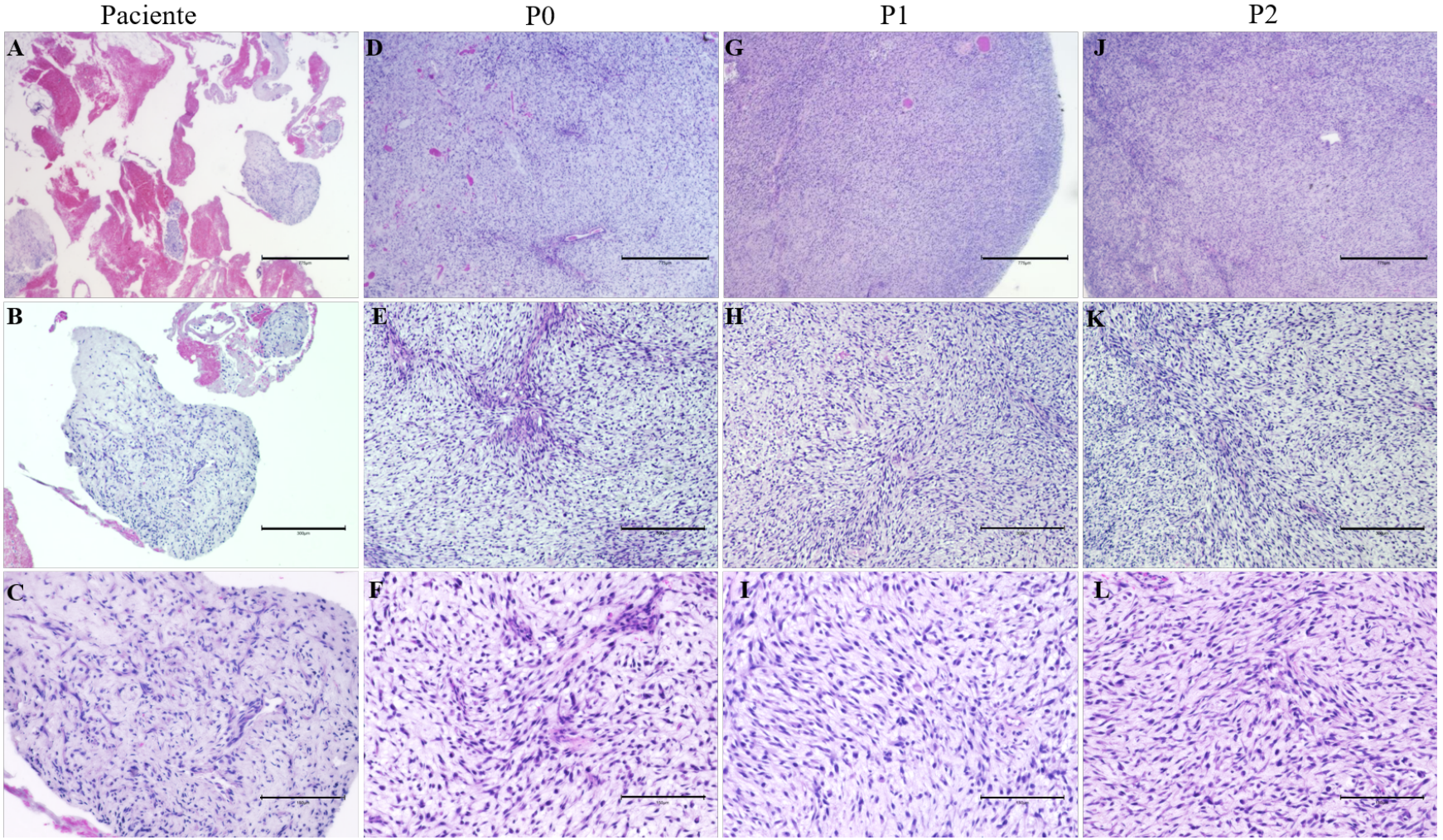


Figura 18. Comparação das características histológicas do tumor parental com seus respectivos tumores PDX das gerações P0, P1 e P2 da amostra 3. São apresentados cortes histológicos representativos de cada amostra: paciente (A-C), P0 (D-F), P1(G-I) e P2 (J-L). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra de escala: 775µm (1ª fileira) ; 300µm (2ª fileira) e 150 µm (3ª fileira).

Tabela 5 - Comparação das características histológicas dos tumores PDX com o tumor parental da amostra 3.

	PACIENTE	PDX		
	Amostra 3	**PO**	**P1**	**P2**
Arquitetura tecidual	Feixes curtos e dispostos em diversas direções	Semelhante	Semelhante	Semelhante
Composição do estroma	Predomínio de estroma mixoide	Semelhante	Redução das áreas mixoides	Redução das áreas mixoides
Pleomorfismo nuclear	Moderado	Semelhante	Aumentou	Aumentou
Celularidade	Moderada	Semelhante	Aumento (acentuada)	Aumento (acentuada)
Necrose tecidual	60%	Ausente	Focal ~10%	Ausente

Na amostra 5, verificou-se que a arquitetura do tumor parental é composta por feixes curtos e desorganizados e que há a presença de estroma mixoide e hialino. O pleomorfismo nuclear e a celularidade foram classificados como moderados (**Figura 19 A, B e C)** e foi observada aproximadamente 5% de área de necrose e 30% de marcação para Ki-67.

Diferentemente do tumor parental, os tumores PDX não apresentaram áreas de necrose. Os tumores PDX apresentaram menor marcação para Ki-67 e, na passagem 1, foi obervado um ligeiro aumento da área de estroma mixoide. As comparações são apresentadas detalhadamente na **tabela 6** e na **figura 20**.

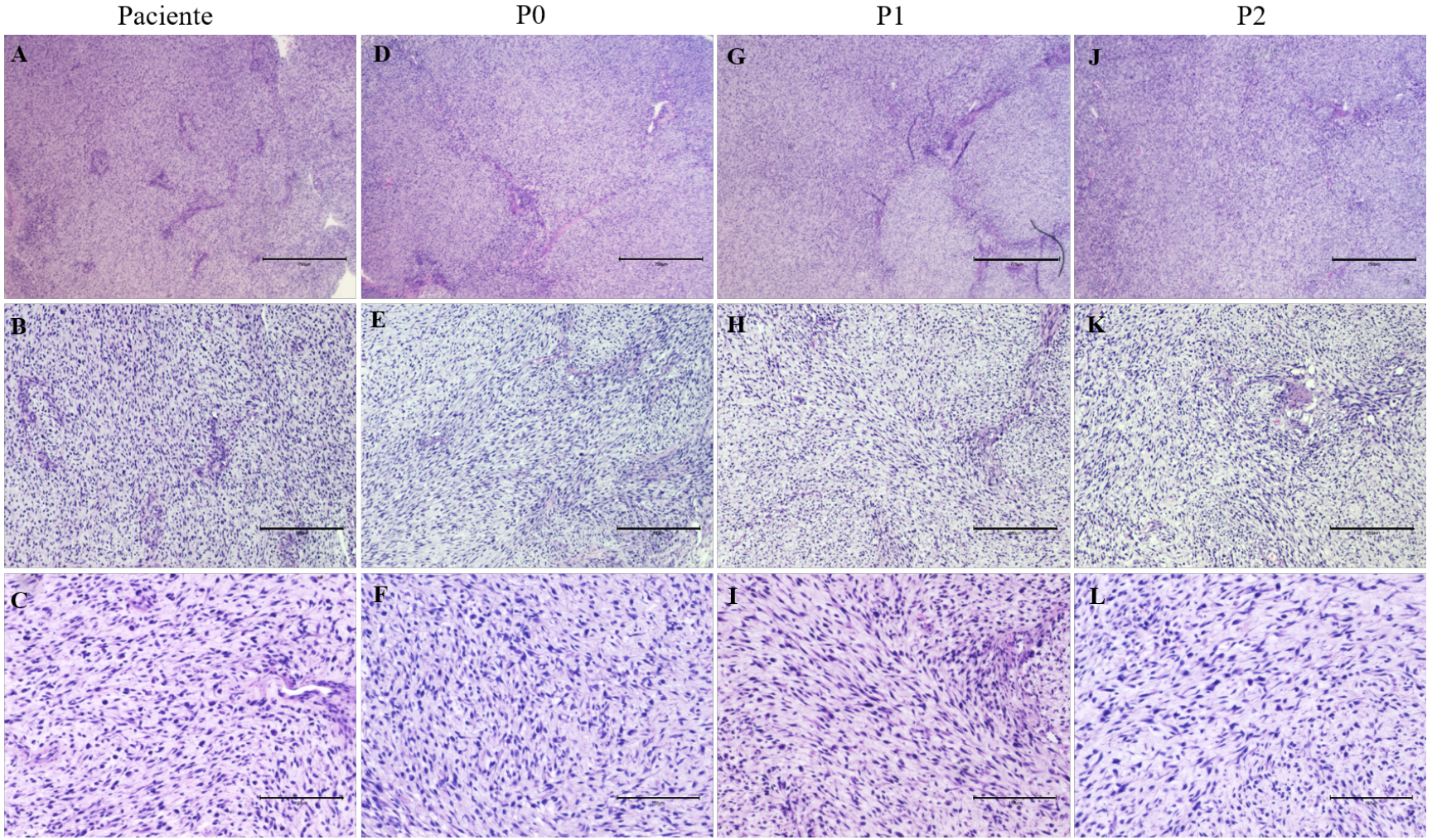


Figura 19. Comparação das características histológicas do tumor parental com seus respectivos tumores PDX das gerações P0, P1 e P2 da amostra 5. São apresentados cortes histológicos representativos de cada amostra: paciente (A-C), P0 (D-F), P1(G-I) e P2 (J-L). Coloração: hematoxilina e eosina. Barra de escala: 775µm (1ª fileira) ; 300µm (2ª fileira) e 150 µm (3ª fileira).

Tabela 6. Comparação das características histológicas dos tumores PDX com o tumor parental da amostra 5.

	PACIENTE	PDX		
	Amostra 5	PO	P1	P2
Arquitetura tecidual	Feixes curtos e dispostos em diversas direções	Semelhante	Semelhante	Semelhante
Composição do estroma	Poucas áreas mixoides, estroma hialino	Semelhante	Aumento das áreas mixoides	Semelhante
Pleomorfismo nuclear	Moderado	Semelhante	Semelhante	Semelhante
Celularidade	Moderada	Semelhante	Semelhante	Semelhante
Necrose tecidual	10%	Ausente	Ausente	Ausente
Marcação Ki-67	30%	15-20%	15-20%	15%

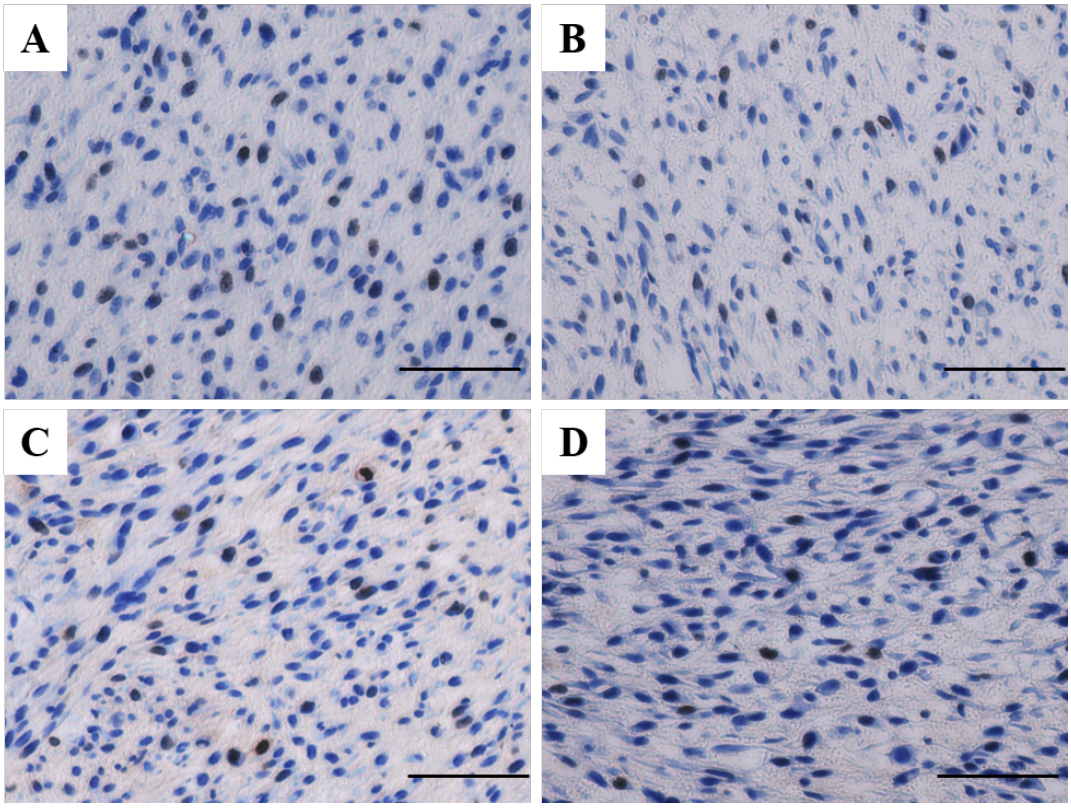


Figura 20. Expresão do antígeno de proliferação Ki-67 por imunohistoquímica na amostra 5 e em seus respectivos tumores PDX. (A) tumor do paciente, (B) passagem 0, (C) passagem 1 e (D) passagem 2. Barra de escala: 75µM

5.4 Avaliação da origem humana dos tumores PDX e da presença de células estromais murinas nestes tumores.

Para confirmar a origem humana dos tumores gerados nos camundongos, foi realizada imunohistoquímica com anticorpo com afinidade específica para a proteína nuclear lâmina A/C de origem humana. Observou-se que nas amostras P2 das amostras 1 e 2, os tumores foram quase em sua totalidade positivos quanto à expressão de lâmina A/C (**Figura 21**). Contudo, foram observadas algumas células presentes nos tumores não marcadas para lâmina A/C, o que indica que houve a infiltração de células estromais murinas nos tumores PDX (**Figura 21B e D)**.

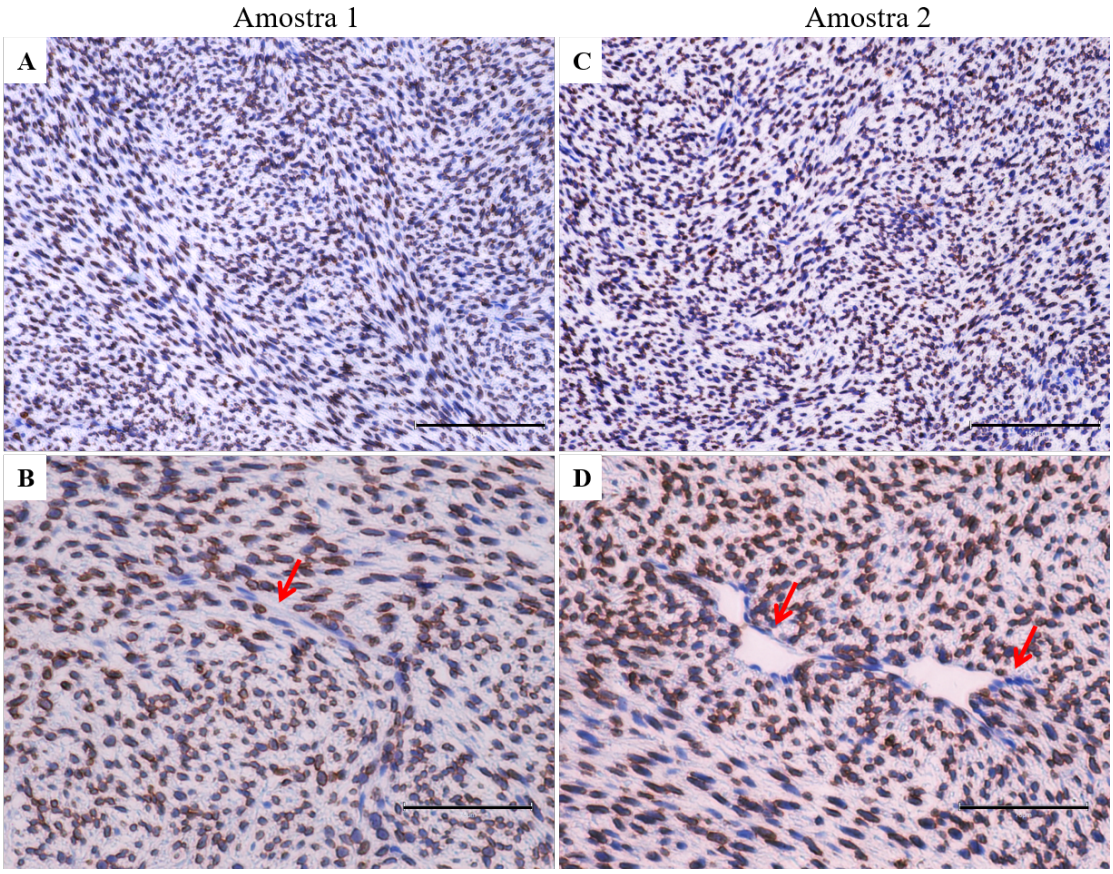


Figura 21. Expressão da proteína lâmina A/C humana por imunohistoquímica nos tumores PDX na passagem 2. A expressão da proteína lâmina A/C humana pelas células tumorais confirmou a origem humana dos tumores. Nos cortes histológicos das imagens B e D são obersavadas algumas células não marcadas (núcleos azulados - setas vermelhas) para lâmina A/C humana que representam a infiltração de células estromais murinas nos tumores. Barras de escala: 150 µm (1ª linha), 75 µm (2ª linha).

5.5 Comparação da expressão de biomarcadores entre os tumores PDX e os parentais.

Com o intuito de ampliar a avaliação da similaridade entre os tumores PDX e seus respectivos tumores parentais, foram comparadas qualitativamente em relação a expressão das proteínas CD56 e S100 nas amostras 1, 2 e 5. O padrão de expressão de CD56 dos tumores PDX nas amostras 1 e 5 foi semelhante ao padrão de seu respectivo tumor parental (**Figura 22 A-D e I-L**). Na amostra 2 não foi observada expressão de CD56 no tumor parental, e o mesmo foi observado nos tumores PDX (**Figura 22 E-H**). Em relação à expressão de S100, na amostra 1 foram observadas áreas com ampla expressão da proteína no tumor parental, e o mesmo padrão foi observado nos tumores PDX (**Figura 23 A-D**). Na amostra 2, raras células foram positivas para S100 no tumor parental e nos tumores PDX (**Figura 23 E-H**). Na amostra 5, não foi observada expressão de S100 no tumor parental e nos tumores PDX (**Figura 23 I-L)**.

Não foi observada, por avaliação macroscópica e microscópica, a disseminação de células tumorais para os pulmões, fígado, rins e baço em nenhum dos animais do estudo, inclusive nos que não desenvolveram tumores no subcutâneo.

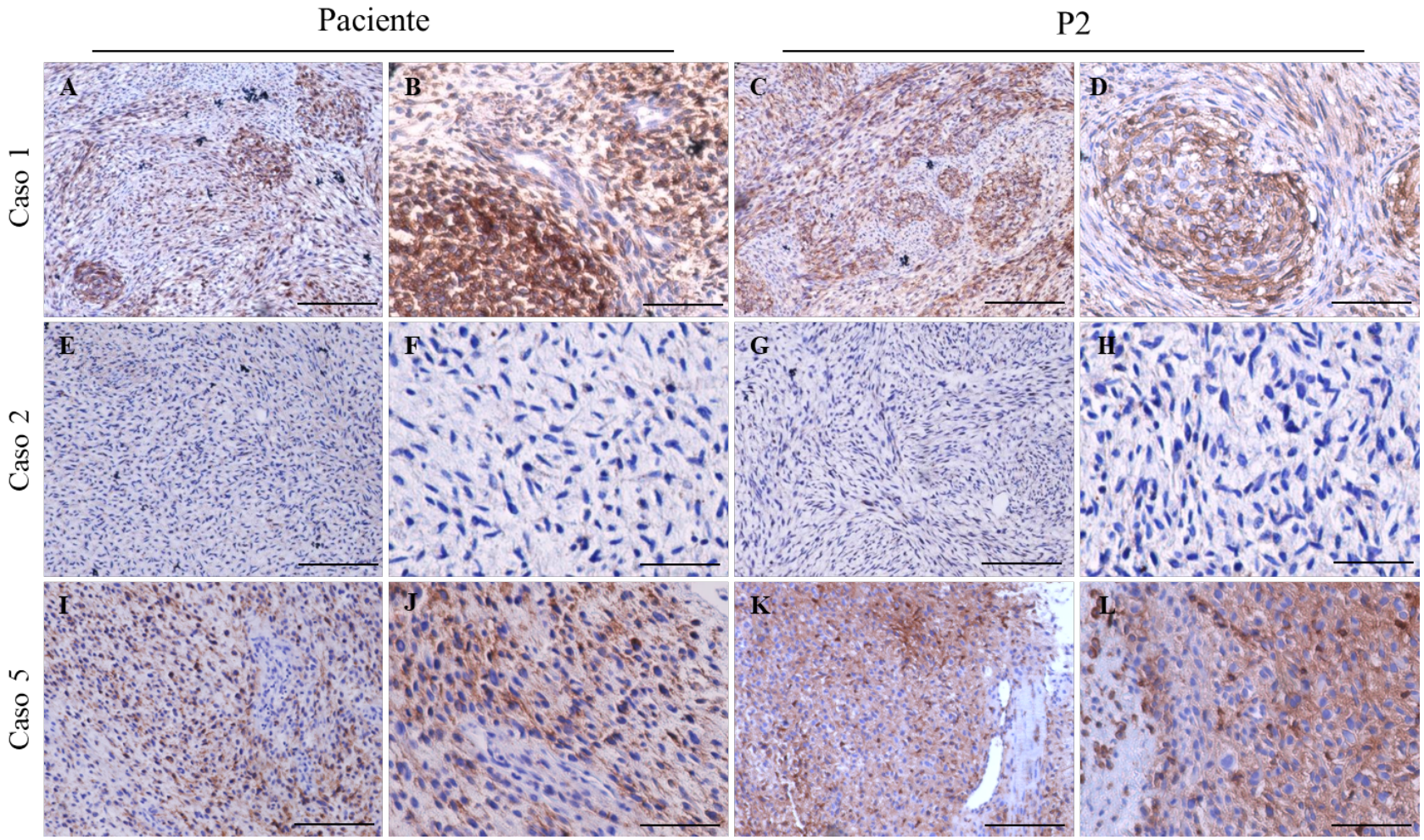


Figura 22. Expressão da proteína CD56 por imunohistoquímica no tumor parental e em seu respectivo tumor PDX na passagem 2. O padrão de expressão de S100 do tumor parental foi reproduzido nos tumores PDX na passagem 2 nos 3 casos avaliados. Barra de escala: 150 µm (1ª e 3ª colunas), 75 µm (2ª e 4 colunas).

.

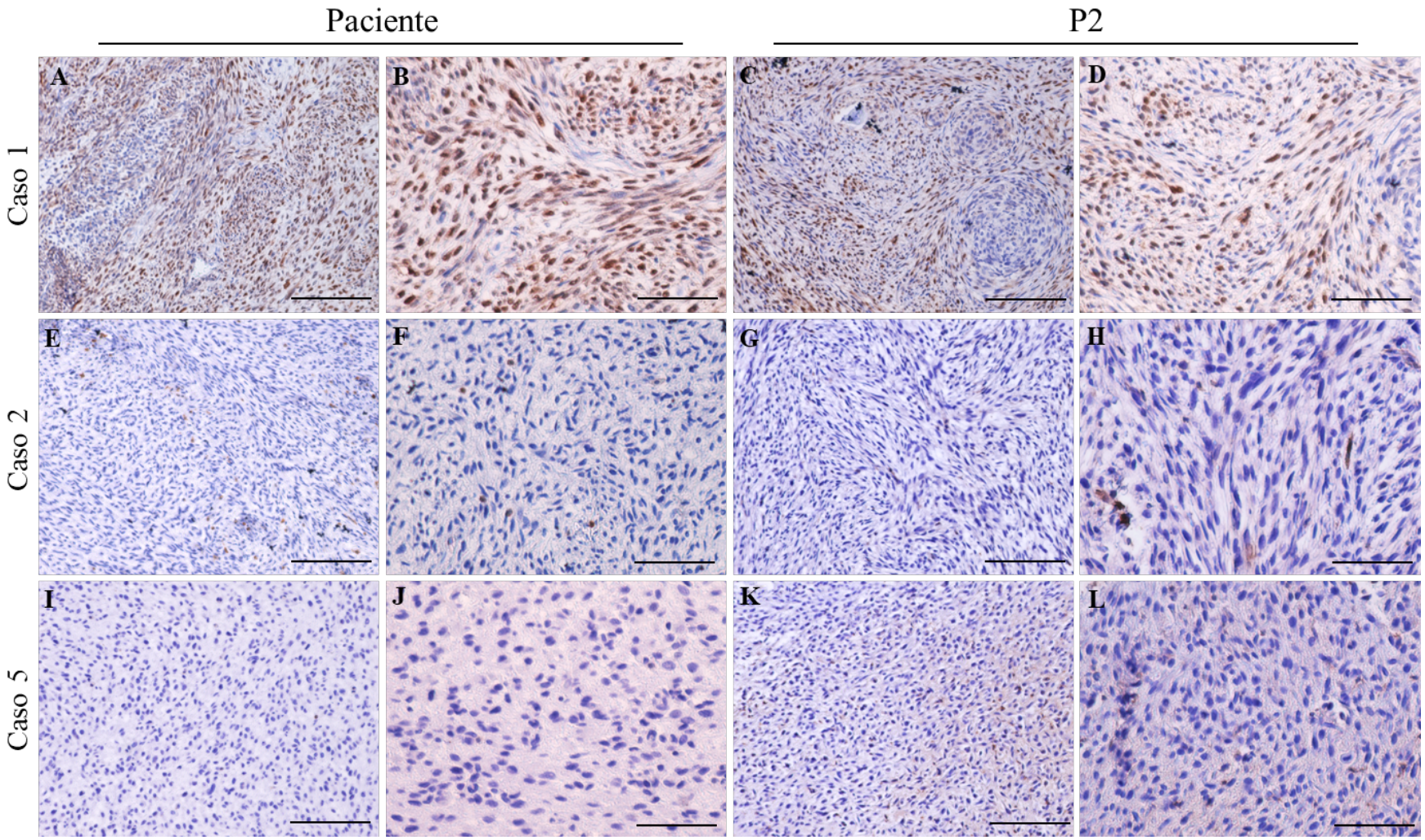


Figura 23. Expressão da proteína S100 por imunohistoquímica no tumor parental e em seu respectivo tumor PDX na passagem 2. O padrão de expressão de S100 do tumor parental foi reproduzido nos tumores PDX na passagem 2 nos 3 casos avaliados. Barra de escala: 150 µm (1ª e 3ª colunas), 75 µm (2ª e 4 colunas).

.

6 DISCUSSÃO

O TMBNP é um sarcoma de partes moles agressivo com prognóstico ruim, por apresentar taxa de sobrevida em 5 anos de 30-40%. Seu tratamento consiste na ressecção cirúrgica complementada por radioterapia e/ou quimioterapia. O TMBNP, até este momento, carece de tratamento farmacológico eficaz e tampouco se compreende integralmente sua patogênese e seu comportamento biológico. O impacto da terapia sistêmica na sobrevida do paciente, visto em outros tumores malignos, fomenta a busca por abordagens mais eficazes (ZHOU et al., 2003; ANGHILERI et al., 2006; DURBIN et al., 2016). A raridade do TMBNP configura como uma limitação para a realização de ensaios clínicos para a busca e comparação de tratamentos eficazes. Assim, estabelecer um modelo acurado para estudos pré-clínicos é um estágio importante para permitir testes terapêuticos e diagnósticos mais acurados, especialmente em doenças com baixíssima incidência, como é o caso do TMBNP (BYERNE, 2017; IZUMCHENKO et al., 2017).

Nos últimos anos, o modelo PDX vem se consolidando como o modelo mais adequado para estudos pré-clínicos em oncologia (IZUMCHENKO et al., 2017; FORTUNA-COSTA et al., 2020). Apesar de já haver extensa literatura de modelos PDX de carcinomas, para os sarcomas os trabalhos ainda são escassos. Em especial, há uma carência de estudos que avaliem minuciosamente a capacidade do modelo de reproduzir fidedignamente o tumor do paciente (LU et al., 2018). É desafiador realizar estudos pré-clínicos com amostras de pacientes portadores de doenças raras. O INTO, por ser um centro de referência nacional para o tratamento de tumores musculoesqueléticos, que canaliza o direcionamento de pacientes com TMBNP, apresenta-se como base fundamental para esse tipo de estudo.

Em nosso estudo 75% dos pacientes eram portadores de NF1, diferentemente de estudos que relatam que aproximadamente 50% dos pacientes com TMBNP tem NF1. Além disso, o

percentual de pacientes com metástase ao diagnóstico também foi maior em nosso estudo do que o descrito na literatura (DECLUE et al., 2000; GUTMANN et al., 2017; LY e BLAKELEY, 2019; TORA et al., 2020). Em consonância com a literatura, a maioria dos pacientes do estudo era do sexo feminino (JAMES et al., 2016). Curiosamente, 87,5% dos pacientes tinham cor de pele preta. Contudo, não foram encontrados na literatura estudos relacionando a incidência de TMBNP com a cor de pele, sendo uma característica que deve ser investigada em estudos epidemiológicos futuros.

Outra limitação do estudo é o número reduzido de pacientes incluídos, podendo influenciar nas características epidemiológicas e clínicas descritas. Se aumentássemos o número de pacientes, possivelmente as características epidemiológicas seriam mais equiparáveis às descritas na literatura. E, pelo INTO ser um centro de referência e de alta complexidade do Sistema Único de Saúde, pode haver viés de seleção do perfil dos pacientes.

Dentre as 19 cirurgias realizadas em pacientes com TMBNP no período do estudo, 6 amostras não foram coletadas, sendo 3 por falha na comunicação entre a equipe de pesquisadores e de cirurgiões. É importante expor que esse modelo de estudo requer total integração da equipe de cirurgiões, patologistas e pesquisadores para seu pleno funcionamento (BYERNE, 2017; MATTAR et al., 2018). Tal falha, como apresentada, implicou na perda de amostra de um tumor raro, reduzindo assim a oportunidade de enxertia e estabelecimento do modelo PDX. Embora essa perda tenha ocorrido em nosso estudo, é válido ressaltar que foi obtida pelo menos uma amostra de todos os pacientes com TMBNP atendidos no INTO no período do estudo.

Duas amostras não foram coletadas, pois a suspeita do diagnóstico não era TMBNP. Em um dos casos, o paciente foi atendido por outro centro de atenção especializada do INTO. Há dificuldade no diagnóstico preciso do TMBNP apenas por análise clínica e por imagens

radiológicas (CARLI et al., 2019; DURBIN et al., 2016; JAMES et al., 2016). Para minimizar a perda de amostras, ainda mais pela raridade de certos tumores, estudos estabelecem a rotina de coleta e criopreservação de amostras (STEBBING et al., 2014; PEARSON et al., 2016; YU et al., 2017). Assim, após análise histológica e imunohistoquímica, opta-se pela enxertia ou não, baseado no interesse do estudo em questão, o que, inclusive, permite a criação de um banco de amostras para futuras análises. Porém, tal prática implica em maior custo e necessidade de espaço e equipamentos adequados para o estoque do material criopreservado. Além disso, em função da dificuldade no diagnóstico preciso do TMBNP, as chances de não se coletar amostra da lesão aumentam quando o paciente é abordado por equipe não especializada (MATTAR et al., 2018).

Uma amostra não foi coletada, pois a paciente apresentava processo infeccioso extenso no local da lesão tumoral. Alguns protocolos de estabelecimento de PDX preconizam que as amostras sejam coletadas em solução com antibiótico de forma profilática, uma vez que os camundongos são imunodeficientes (VARNA et al., 2014). Contudo, no caso supracitado, julgamos que o tratamento com antibióticos seria ineficiente e que, possivelmente, a enxertia da amostra desencadearia um quadro infeccioso no animal, o que inviabilizaria a continuidade do experimento.

Em nosso estudo, 11 amostras de TMBNP foram enxertadas em camundongos *nude*. Contudo, a análise histológica de 2 amostras evidenciou que as mesmas não eram representativas do tumor parental. Como consequência, os animais enxertados com estas amostras foram submetidos à eutanásia. É necessário, portanto, que parte de todas as amostras coletadas para o estudo seja separada para análise histológica para conferência da qualidade do material. Além disso, visando minimizar o uso desnecessário de animais de experimentação, pode-se estabelecer como protocolo de rotina a criopreservação da amostra para posterior

enxertia nos animais mediante confirmação do diagnóstico e/ou qualidade da amostra (RUSSELL et al., 2017; MATTAR et al., 2018). Um animal do estudo, após 3 meses em experimentação, teve que ser submetido à eutanásia porque apresentava-se debilitado. Após necropsia do mesmo, foi afastada a possibilidade de óbito por disseminação sistêmica do tumor, porém não foi realizada investigação a fundo da *causa mortis*. Em vista da imunodeficiência do animal e seu acompanhamento por um longo período, acredita-se que seu adoecimento tenha decorrido da quebra de barreira na manipulação que propiciou a infecção por algum patógeno.

Alguns trabalhos verificaram menor taxa de sucesso de enxertia de amostras coletadas durante biópsia. De fato, existe uma maior dificuldade em acessar e atingir a área mais representativa do tumor, bem como evitar áreas de necrose e hemorragia, em amostras obtidas de biópsias comparada àquelas coletadas após ressecção tumoral ou amputação/desarticulação (YU et al., 2017; IZUMCHENKO et al., 2017; ZOU et al., 2018). Em nosso estudo, metade das amostras que tiveram sucesso na enxertia era proveniente de biópsia. Dentre as amostras que não tiveram sucesso de crescimento, apenas uma era de biópsia. Apesar do pequeno tamanho amostral, nossos dados indicam que, para o TMBNP, a origem da amostra não parece influenciar no sucesso da enxertia. Cabe ressaltar que a experiência da equipe de cirurgiões e patologistas envolvidos interfere na qualidade do material coletado e, consequentemente, no sucesso da enxertia (BYERNE, 2017; MATTAR et al., 2018).

Todos as amostras que apresentaram crescimento nos camundongos (1, 2, 3 e 5) foram graduadas histologicamente como de alto grau (G3). Houve apenas 1 amostra (7) graduada como de alto grau que não apresentou crescimento tumoral no modelo murino, sendo inclusive o único caso de TMBNP de alto grau do estudo com evolução clínica favorável, uma vez que a paciente não apresentou metástase ao diagnóstico e nem recorrência local do tumor após 22 meses de seguimento. Já as demais amostras que não tiverem sucesso no crescimento tumoral

(8, 10 e 12) foram classificadas, pela Unidade de Patologia do INTO, como de grau intermediário (G2). Os dados sugerem que as lesões de alto grau apresentam maior sucesso no estabelecimento do modelo PDX de TMBNP. Em consonância, outros estudos verificaram que lesões de alto grau têm maior probabilidade de gerar tumores no modelo PDX (STEBBING et al., 2014; YU et al., 2017; FORTUNA-COSTA et al., 2020). Vale destacar que tal fato pode ser interpretado como uma limitação para estudos terapêuticos, já que tumores menos agressivos tendem a não estabelecer tumores no modelo PDX (VARNA et al., 2014; YU et al., 2017; ZOU et al., 2018). Todavia, o uso de camundongos mais imunodeficientes, como o NSG, poderia favorecer o estabelecimento dos tumores PDX. Desta forma, a taxa de sucesso de enxertia do nosso estudo poderia ser maior se tivéssemos utilizado como modelo uma linhagem de camundongos mais imunodeficiente (MATTAR., 2018).

A extensão da doença também parece manter relação com o sucesso no estabelecimento do modelo PDX (VARNA et al., 2014; YU et al., 2017; ZOU et al., 2018). Diversos estudos já validaram que o sucesso do estabelecimento do PDX está diretamente relacionado ao pior prognóstico e desfecho clínico no paciente (VARNA et al., 2014; YU et al., 2017; ZOU et al., 2018; FORTUNA-COSTA et al., 2020). Em nosso estudo, as amostras dos 2 pacientes com metástase ao diagnóstico desenvolveram tumores no modelo PDX. Por outro lado, amostras de pacientes sem metástase ao diagnóstico e sem recidiva local e a distância após a ressecção não geraram tumores. As outras duas amostras que tiveram sucesso na enxertia foram obtidas de paciente que, embora não apresentassem metástase ao diagnóstico, apresentaram recidiva local no segmento. Portanto, estes dados do nosso estudo corroboram os resultados verificados em estudos anteriores.

Foram observados padrões de crescimento distintos entre as amostras, o que parece estar reproduzindo a heterogeneidade dos tumores dos pacientes. Ilustra essa hipótese o fato das

amostras 3 e 5 apresentarem padrão de crescimento semelhante, já que derivam do mesmo paciente. Houve redução no tempo total de crescimento ao longo das passagens, embora não tenha sido estatisticamente significativo. Sabe-se que ao longo das passagens, o estroma humano é substituído por estroma murino, o que pode levar a alterações na sinalização do crescimento tumoral (HIDALGO et al., 2014; APARICIO; HIDALGO; KUNG, 2015; BYERNE, 2017).

O tempo total de crescimento reduziu ao longo das passagens, principalmente às custas da redução no tempo de latência, já que o tempo de crescimento se manteve similar entre as passagens. Estudo recente demonstrou que o tempo de latência encurta ao longo das passagens devido a seleção de células mais adaptadas a crescerem no microambiente do modelo animal (ZOU et al., 2018). Já em relação ao tempo de crescimento, os dados encontrados indicam que a velocidade de crescimento tumoral não se alterou ao longo das passagens no modelo murino. A quantificação do antígeno de proliferação Ki-67 avaliada em cada passagem corrobora essa suposição, já que ela se manteve percentualmente similar ao longo das passagens nas 3 amostras analisadas, conforme já explicitado por outros estudos (CASTELLSAGUÉ et al., 2015; DE VRIES et al., 2020).

Embora ocorra adaptação do tumor enxertado ao microambiente tumoral murino, diversos estudos demonstraram que os tumores gerados no modelos PDX mantém as características histológicas e genéticas do tumor parental (HIDALGO et al., 2014; VARNA et al., 2014; CHOI et al., 2016; ZOU et al., 2018; CHENG et al., 2019). De modo semelhante, em nosso estudo, os tumores PDX de todas as gerações apresentaram notáveis similaridades histológicas com seu respectivo tumor parental. Ressalta-se que certas características específicas de cada tumor foram reproduzidas fielmente nos tumores PDX. Uma alteração marcante nos tumores PDX foi a redução do estroma mixoide e o consequente aumento da

celularidade. Também foi verificado o aumento do pleomorfismo ao longo das passagens em alguns casos. É postulado que alterações histológicas que ocorrem ao longo das passagens representem a evolução natural dos tumores, semelhante ao que ocorreria no paciente (MORELLI, 2012; IZUMCHENKO et al., 2017a).

O mesmo padrão de alteração foi verificado em alguns tumores PDX de osteossarcoma de um estudo prévio do nosso grupo (FORTUNA-COSTA et al., 2020). Também foi percebido menor percentual de necrose tecidual ao longo das passagens em todos os casos. Contudo, o fato de limitarmos o crescimento do tumoral até um volume específico, é um viés para a avaliação da necrose dos tumores PDX.

O estudo dos biomarcadores CD56 E S100 reiterou a similaridade entre os tumores PDX e seus respectivos tumores parentais, ao manterem o padrão de expressão ao longo das passagens. Embora os tumores tenham sido comparados por análise histológica e imunohistoquímica, uma perspectiva do estudo é ampliar as comparações mediante análises genéticas. Ainda que tenham sido avaliadas apenas três passagens no modelo PDX nesse estudo, foi possível realizar a expansão da amostra de uma doença rara em quantidade suficiente para realização de ensaios pré-clínicos. Uma perspectiva deste estudo é avaliar até qual passagem do modelo PDX o TMBNP mantém suas características originais.

O uso do modelo PDX vem emergindo nos últimos 15 anos e os estudos apresentam metodologias diferentes para gerá-lo, o que dificulta avaliar a superioridade ou inferioridade de cada método e reproduzí-lo (HIDALGO et al., 2014; IZUMCHENKO et al., 2017; LAI et al., 2017; MEEHAN et al., 2017; LU et al., 2018; FUJII; KATO; SUZUKI, 2020; GOTO, 2020). Recentemente, foram sintetizadas e publicadas as informações básicas necessárias para o estabelecimento do modelo PDX, o que representa uma excelente ferramenta para promover sua reprodutibilidade em estudos relacionados. São explicitadas as informações mínimas para

descrever as características clínicas do tumor do paciente, o processo de implantação e de passagem do tumor e os métodos de garantia de qualidade do processo (MEEHAN et al., 2017).

O modelo PDX apresenta como uma das limitações a variação de sucesso de enxertia e, no âmbito da medicina personalizada, um longo período entre a enxertia e a expansão da amostra para testes pré-clínicos e sua aplicação clínica (CASTELLSAGUÉ et al., 2015). Como a maioria dos tumores precisa de alguns meses para se desenvolverem no animal e, depois, mais alguns outros para expandir a amostra, esse tempo prolongado limita sua utilização para o planejamento de tratamento sistêmico de primeira linha, por atrasar seu início. Assim, fica reservado para a busca por terapia de resgate numa eventual recidiva da doença (CASTELLSAGUÉ et al., 2015).

Utilizar camundongos imunodeficientes evita a rejeição do enxerto parental, porém esta característica crucial limita o estudo de terapias imunomediadas (BANKERT et al., 2001). Embora tecnicamente seja uma vantagem e aumente a taxa de sucesso de enxertia, essa particularidade retira a importante influência do sistema imune no microambiente tumoral, altera o comportamento do tumor e sua resposta a fármacos, além de desqualificar o modelo para estudos clínicos com terapias imunomediadas (APARICIO et al., 2015; BYERNE, 2017). Para contornar essa limitação, vem crescendo o uso de uma nova geração de PDX, denominado PDX humanizado, no qual é feita a ablação de medula do camundongo e posterior transplante de progenitores hematopoiético humanos, o que permite o desenvolvimento de células do sistema imunológico de origem humana (YAO et al., 2019).

Outra limitação desse biomodelo é que após três a cinco passagens murino-para-murino o enxerto apresenta rápida substituição do estroma humano pelo estroma murino, como já mencionado. A perda da interação tumor-estroma reflete em vias de sinalização alteradas, que

podem afetar a resposta à fármacos (HIDALGO et al., 2014; LAI et al., 2017; FUJII; KATO; SUZUKI, 2020; GOTO, 2020).

O estudo mais relevante encontrado na literatura que estabeleceu biomodelo de PDX de TMBNP realizou enxertia ortotópica de 4 amostras frescas oriundas de 3 pacientes distintos, sendo 1 portador de NF1. O estudo também realizou 1 enxertia com a linhagem celular de TMBNP S4262, proveniente de paciente com NF1. Embora o trabalho relate similaridade no padrão histológico e imunohistoquímico nas passagens 1 e 4, ele não traz dados sobre a comparação com o tumor parental, o que é essencial para a caracterização do modelo. A taxa de proliferação celular, mensurada através da marcação Ki-67, se manteve percentualmente similar ao longo das passagens, assim como o percentual que encontramos nas passagens das 3 amostras analisadas, o que indica que a velocidade de crescimento se mantém relativamente estável ao longo das passagens murino-para-murino . O artigo avalia a natureza do estroma do PDX gerado através de análise imunohistoquímica e genética e conclui que há perda do estroma humano na passagem 1 do caso proveniente do portador de NF1 e salienta a importância em proceder tal análise nos modelos gerados a partir de casos esporádicos. Essa alteração também foi encontrada pelo presente estudo, só que na passagem 2, nas 2 amostras analisada, o que aponta a substituição do estroma humano ao longo das passagens. Prosseguiram com análise genômica de apenas 1 caso, comparando somente as passagens 1 e 4 com o tumor parental, sendo constatado que houve alto grau de similaridade. É uma limitação desse estudo (e perspectiva de futura análise) não estreitar o grau de semelhança entre os biomodelo gerados e seu respectivo tumor parental através da análise genética. Embora o estudo citado apresente em sua metodologia o procedimento de enxertia, não há menção de como foi realizada a verificação da permanência ortotópica da amostra até o tumor atingir o volume estabelecido para o camundongo ser eutanasiado. Como não há protocolo estabelecido para aferir a

manutenção ortotópica e não era objetivo do presente estudo avaliar a capacidade e percentual de metástase no biomodelo, e também por exigir execução tecnicamente menos complexa, foi optado pelo uso heterotópico do xenoenxerto. Mencionam ainda a implantação de cada tumor parental em pelo menos 3 camundongos e a realização de 7 a 10 passagens murino-para-murino para cada enxerto ortotópico. Entretanto, esses dados não são apresentados detalhadamente ao longo do texto e não há citação ou quantificação dos casos sem sucesso de enxertia, como apresentamos no apêndice A e tópico 5.1. A análise dessas informações é fundamental para calcular a taxa de sucesso de enxertia, que não é exposta no estudo e se apresenta como dado desejável em estudos com modelo PDX (CASTELLSAGUÉ et al., 2015; MEEHAN et al., 2017).

A implantação ortotópica simula mais fielmente o microambiente tumoral e é o modelo essencial para aqueles que se propõem analisar aspectos relacionados às metástases (BYERNE, 2017). Nenhum animal do presente estudo apresentou metástase para pulmões, fígado, rins e baço. Quando utilizado de forma heterotópica, o modelo de PDX é incapaz de produzir metástase, independente do grau da lesão parental. Portanto, caso o objetivo do estudo não envolva tal análise, como em nosso estudo, a implantação heterotópica da amostra é tecnicamente mais viável e reprodutível, além de não requerer verificação do posicionamento da mesma (BYERNE, 2017).

No presente estudo foi possível estabelecer quatro modelos de PDX de TMBNP e validar sua semelhança com o tumor parental em todas as três passagens com análise histopatológica e avaliação da manutenção do padrão de expressão dos biomarcadores (S100 e CD56). Entretanto, é fundamental prosseguir com caracterização genética e analisar até qual passagem o PDX mantém semelhança com o tumor parental.

O modelo PDX, embora apresente limitações, é uma excelente plataforma para a realização de ensaios pré-clínicos em oncologia, sabida a similaridade entre o modelo gerado e seu respectivo tumor parental. É um excelente modelo para a identificação de biomarcadores e para a realização de testes pré-clínicos na busca por novas terapias para neoplasias raras, já que permite a expansão da amostra. Ainda, é protótipo relevante na observação e investigação do comportamento biológico dos tumores. Dada sua importância, é fundamental dispor de investimento apropriado e de rede integrada e especializada de cirurgiões, patologistas e pesquisadores para viabilizar o correto estabelecimento de modelos de PDX adequados.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo foi verificada 50% de taxa de sucesso de enxertia de amostras de TMBNP em camundongos imunodeficientes *nude* na passagem 0 e 100% nas 2 passagens consecutivas. O padrão de crescimento dos tumores diferiu entre as amostras avaliadas. Apesar do tempo de latência ter reduzido ao longo das passagens, não houve alteração do tempo de crescimento dos tumores. Em 3 passagens consecutivas os tumores PDX reproduziram as principais características histológicas dos tumores parentais, bem como o padrão de expressão dos biomarcadores CD56 e S100. A origem humana dos tumores gerados no modelo PDX foi confirmada, bem como foi identificada a infiltração de células estromais murinas nos tumores. Em conjunto, os dados sugerem que o modelo estabelecido é adequado para estudos pré-clínicos de TMBNP.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGHILERI, M.; MICELI, R.; FIORE, M.; MARIANI, L.; FERRARI, A.; MUSSI, C.; LOZZA, L.; COLLINI, P.; OLMI, P.; CASALI, P. G.; PILOTTI, S.; GRONCHI, A. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. **Cancer**, v. 107, n. 5, p. 1065–1074, 2006.

APARICIO, S.; HIDALGO, M.; KUNG, A. L. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 5, p. 311–316, 2015.

BANKERT, R. B.; EGILMEZ, N. K.; HESS, S. D. Human – SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. **Immunology**, v. 22, n. 7, p. 386–393, 2001.

BARDELLI, A.; CORSO, S.; BERTOTTI, A. Amplification of the MET Receptor Drives Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer Amplifi cation of the MET Receptor Drives Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer. **Cancer Discovery**, v. 3, p. 658–673, 2013.

BERTOTTI, A.; MIGLIARDI, G.; GALIMI, F. A Molecularly Annotated Platform of Patient-Derived Xenografts (' "Xenopatients"') Identifies HER2 as an Effective Therapeutic Target in Cetuximab-Resistant Colorectal Cancer. **Cancer Discovery**, v. 1, p. 508–523, 2011.

BLATTMANN, C.; THIEMANN, M.; STENZINGER, A.; ROTH, E. K.; DITTMAR, A.; WITT, H.; LEHNER, B.; RENKER, E.; JUGOLD, M.; EICHWALD, V.; WEICHERT, W.; HUBER, P. E.; KULOZIK, A. E. Establishment of a patient-derived orthotopic osteosarcoma mouse model. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2015.

BOTTILLO, I.; AHLQUIST, T.; BREKKE, H.; DANIELSEN, S. A.; BERG, E. Van Den; MERTENS, F.; LOTHE, R. A.; DALLAPICCOLA, B. Germline and somatic NF1 mutations in sporadic and NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumours. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 693–701, 2009.

BROHL, A. S.; KAHEN, E.; YODER, S. J.; TEER, J. K.; REED, D. R. The genomic landscape of malignant peripheral nerve sheath tumors: Diverse drivers of Ras pathway activation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–5, 2017.

BYERNE, A. T. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts . **Nature reviews Cancer**, n. March, p. 254–268, 2017.

CARLI, M.; FERRARI, A.; MATTKE, A.; ZANETTI, I.; CASANOVA, M.; BISOGNO, G.; CECCHETTO, G.; ALAGGIO, R.; DE SIO, L.; KOSCIELNIAK, E.; SOTTI, G.; TREUNER, J. Pediatric malignant peripheral nerve sheath tumor: The Italian and German Soft Tissue Sarcoma Cooperative Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 33, p. 8422–8430, 2005.

CASTELLSAGUÉ, J.; GEL, B.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, J.; LLATJÓS, R.; BLANCO, I.; BENAVENTE, Y.; PÉREZ-SIDELNIKOVA, D.; MURO, J. G.; VIÑALS, J. M.; VIDAL, A.; VALDÉS-MAS, R.; TERRIBAS, E.; LÓPEZ-DORIGA, A.; PUJANA, M. A.; CAPELLÁ, G.; PUENTE, X. S.; SERRA, E.; VILLANUEVA, A. Comprehensive establishment and

characterization of orthoxenograft mouse models of malignant peripheral nerve sheath tumors for personalized medicine. **Molecular Medicine**, v. 7, n. 5, p. 608–627, 2015.

CATES, J. M. M. The AJCC 8th edition staging system for soft tissue sarcoma of the extremities or trunk: A Cohort study of the SEER database. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 16, n. 2, p. 144–152, 2018.

CHENG, L.; PANDYA, P. H.; LIU, E.; CHANDRA, P.; WANG, L.; MURRAY, M. E.; CARTER, J.; FERGUSON, M.; SAADATZADEH, M. R.; BIJANGI-VISHESHSARAEI, K.; MARSHALL, M.; LI, L.; POLLOK, K. E.; RENBARGER, J. L. Integration of Genomic Copy Number Variations and Chemotherapy-Response Biomarkers in Pediatric Sarcoma. **BMC medical genomics**, v. 12, n. Suppl 1, p. 23, jan. 2019.

CHOI, Y. Y.; LEE, J. E.; KIM, H.; SIM, M. H.; KIM, K. K.; LEE, G.; KIM, H. Il; AN, J. Y.; HYUNG, W. J.; KIM, C. B.; NOH, S. H.; KIM, S.; CHEONG, J. H. Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as paraclinical models for gastric cancer. **Scientific Reports**, v. 6, n. September 2015, p. 1–12, 2016.

CHOW, L. M. L.; BAKER, S. J. PTEN function in normal and neoplastic growth. **Cancer Letters**, v. 241, p. 184–196, 2006.

CORNILLIE, J.; WOZNIAK, A.; LI, H.; WANG, Y.; BOECKX, B.; GEBREYOHANNES, Y. K.; WELLENS, J.; VANLEEUW, U.; HOMPES, D.; STAS, M.; SINNAEVE, F.; WAFA, H.; LAMBRECHTS, D.; DEBIEC-RYCHTER, M.; SCIOT, R.; SCHÔFFSKI, P. Establishment and Characterization of Histologically and Molecularly Stable Soft-tissue Sarcoma Xenograft Models for Biological Studies and Preclinical Drug Testing. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 6, p. 1168–1178, 2019.

DE VRIES, G.; ROSAS-PLAZA, X.; MEERSMA, G. J.; LEEUWENBURGH, V. C.; KOK, K.; SUURMEIJER, A. J. H.; VAN VUGT, M. A. T. M.; GIETEMA, J. A.; DE JONG, S. Establishment and characterisation of testicular cancer patient-derived xenograft models for preclinical evaluation of novel therapeutic strategies. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 18938, 1 dez. 2020.

DE WEVER, O.; MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 429–447, 2003.

DECLUE, J. E.; HEFFELFINGER, S.; BENVENUTO, G.; LING, B.; LI, S.; RUI, W.; VASS, W. C.; VISKOCHIL, D.; RATNER, N. Epidermal growth factor receptor expression in neurofibromatosis type 1- related tumors and NF1 animal models. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 9, p. 1233–1241, 2000.

DONG, X.; GUAN, J.; ENGLISH, J. C.; FLINT, J.; YEE, J.; EVANS, K.; MURRAY, N.; MACAULAY, C.; NG, R. T.; GOUT, P. W.; LAM, W. L.; LASKIN, J.; LING, V.; LAM, S.; WANG, Y. Patient-derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: Promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 5, p. 1442–1451, 2010.

DURBIN, A. D.; KI, D. H.; HE, S.; LOOK, A. T. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors.

In: **Cancer and Zebrafish, Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]p. 495–530.

FARID, M.; DEMICCO, E. G.; GARCIA, R.; AHN, L.; MEROLA, P. R.; CIOFFI, A.; MAKI, R. G. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. **The Oncologist**, v. 19, p. 193–201, 2014.

FERNER, R. E.; GUTMANN, D. H. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis. **Cancer Research**, v. 62, n. 5, p. 1573–1577, 2002.

FICHTNER, I.; ROLFF, J.; SOONG, R.; HOFFMANN, J.; HAMMER, S.; SOMMER, A.; BECKER, M.; MERK, J. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 20, p. 6456–6468, 2008.

FIEBIG, H. H.; NEUMANN, H. A.; HENS, H.; KOCH, H.; KAISER, D.; ARNOLD, H. Development of Three Human Small Cell Lung Cancer Models in Nude Mice. **Recent Results in Cancer Research**, v. 97, p. 77–86, 1985.

FORTUNA-COSTA, A.; GRANATO, R. A.; MEOHAS, W.; DE SÁ LOPES, A. C.; CARUSO, A. C.; SILVA PINHEIRO, R. C. E.; DA GAMA D'EÇA, P.; DIAS, R. B.; PERINI, J. A.; FERNANDES BARBOSA, A. P.; MOREIRA DE SÁ, R. A.; MATHEUS GUIMARÃES, J. A.; MURRAY, S. S.; LEITE DUARTE, M. E. An association between successful engraftment of osteosarcoma patient-derived xenografts and clinicopathological findings. **Histology and Histopathology**, v. 35, n. 11, p. 1295–1307, 2020.

FUJII, E.; KATO, A.; SUZUKI, M. Patient-derived xenograft (PDX) models: Characteristics and points to consider for the process of establishment. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 3, p. 153–160, 2020.

GOLDBLUM, J. R.; FOLPE, A. L.; WEISS, S. W. **Enzinger & Weiss's Soft Tissue Tumors**.
GOTO, T. Patient-derived tumor xenograft models: Toward the establishment of precision cancer medicine. **Journal of Personalized Medicine**, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2020.

GREGORIAN, C.; NAKASHIMA, J.; DRY, S. M.; NGHIEMPHU, P. L.; BARZAN, K.; AO, Y.; DANG, J.; LAWSON, G.; MELLINGHOFF, I. K.; MISCHEL, P. S.; PHELPS, M.; PARADA, L. F.; LIU, X.; SOFRONIEW, M. V; EILBER, F. C.; WU, H. PTEN dosage is essential for neurofibroma development and malignant transformation. **Proceeding of the National Academy of Science of United States of Amerina**, v. 106, n. 46, p. 19479–19484, 2009.

GUO, A.; LIU, A.; WEI, L.; SONG, X. Malignant peripheral nerve sheath tumors: Differentiation Patterns and Immunohistochemical Features - A Mini-Review and Our New Findings. **Journal of Cancer**, v. 3, n. 1, p. 303–309, 2012.

GUTMANN, D. H.; FERNER, R. E.; LISTERNICK, R. H.; KORF, B. R.; WOLTERS, P. L.; JOHNSON, K. J. Neurofibromatosis type 1. **Nature reviews**, v. 3, n. 170004, p. 1–18, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.4>.
HIDALGO, M.; AMANT, F.; BIANKIN, A. V; BUDINSKÁ, E.; BYRNE, A. T.; CALDAS,

C.; CLARKE, R. B.; DE JONG, S.; JONKERS, J.; MÆLANDSMO, G. M.; ROMAN-ROMAN, S.; SEOANE, J.; TRUSOLINO, L.; VILLANUEVA, A. Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 9, p. 998–1013, 2014.

HIDALGO, M.; BRUCKHEIMER, E.; RAJESHKUMAR, N. V; GARRIDO-LAGUNA, I.; DE OLIVEIRA, E.; RUBIO-VIQUEIRA, B.; STRAWN, S.; WICK, M. J.; MARTELL, J.; SIDRANSKY, D. A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 8, p. 1311–1316, 2011.

HOUGHTON, J. A.; HOUGHTON, P. J.; GREEN, A. A. Chemotherapy of childhood rhabdomyosarcomas growing as xenografts in immune-deprived mice. **Cancer Research**, v. 42, n. 2, p. 535–539, 1982.

IZUMCHENKO, E.; PAZ, K.; CIZNADIJA, D.; SLOMA, I.; KATZ, A.; STEBBING, J.; PASS, H.; PELED, N.; DAVIES, A.; MORRIS, R.; HIDALGO, M.; SIDRANSKY, D. Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors. **Annals of Oncology**, v. 28, n. August, p. 2595–2605, 2017.

JAMES, A. W.; SHURELL, E.; DRY, S. M.; EILBER, F. C. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 789–802, 2016.

JUNTTILA, M. R.; DE SAUVAGE, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 346–354, 2013.

KAHN, J.; GILLESPIE, A.; TSOKOS, M.; ONDOS, J.; DOMBI, E.; CAMPHAUSEN, K.; WIDEMANN, B. C.; KAUSHAL, A. Radiation therapy in management of sporadic and neurofibromatosis type 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. 324, p. 1–7, 2014.

KAMRAN, S. C.; SHINAGARE, A. B.; HOWARD, S. A.; HORNICK, J. L.; RAMAIYA, N. H. A-Z of malignant peripheral nerve sheath tumors. **Cancer Imaging**, v. 12, p. 475–483, 2012.

KENG, V. W.; RAHRMANN, E. P.; WATSON, A. L.; TSCHIDA, B. R.; MOERTEL, C. L.; JESSEN, W. J.; RIZVI, T. A.; COLLINS, M. H.; RATNER, N. PTEN and NF1 Inactivation in Schwann Cells Produces a Severe Phenotype in the Peripheral Nervous System That Promotes the Development and Malignant Progression of Peripheral Nerve Sheath Tumors. **American Association for Cancer Research**, v. 72, n. 13, p. 3405–3414, 2012.

KEYSAR, S. B.; ASTLING, D. P.; ANDERSON, R. T.; VOGLER, B. W.; BOWLES, D. W.; MORTON, J. J.; PAYLOR, J. J.; GLOGOWSKA, M. J.; LE, P. N.; EAGLES-SOUKUP, J. R.; KAKO, S. L.; TAKIMOTO, S. M.; SEHRT, D. B.; UMPIERREZ, A.; PITTMAN, M. A.; MACFADDEN, S. M.; HELBER, R. M.; PETERSON, S.; HAUSMAN, D. F.; SAID, S.; LEEM, T. H.; GODDARD, J. A.; ARCAROLI, J. J.; MESSERSMITH, W. A.; ROBINSON, W. A.; HIRSCH, F. R.; VARELLA-GARCIA, M.; RABEN, D.; WANG, X. J.; SONG, J. I.; TAN, A. C.; JIMENO, A. A patient tumor transplant model of squamous cell cancer identifies PI3K inhibitors as candidate therapeutics in defined molecular bins. **Molecular Oncology**, v.

7, n. 4, p. 776–790, 2013.

KIM, A.; STEWART, D. R.; REILLY, K. M.; VISKOCHIL, D.; MIETTINEN, M. M.; WIDEMANN, B. C. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors State of the Science: Leveraging Clinical and Biological Insights into Effective Therapies. **Sarcoma**, v. 2017, n. Table 1, 2017.

KIM, M. P.; EVANS, D. B.; WANG, H.; ABBRUZZESE, J. L.; FLEMING, J. B.; GALLICK, G. E. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. **Nature Protocols**, v. 4, n. 11, p. 1670–1680, 2009.

KORFHAGE, J.; LOMBARD, D. B. Malignant Peripheral Nerve Sheat Tumors: From Epigenome to Bedside. **American Association for Cancer Research**, 2019.

KORFHAGE, J.; LOMBARD, D. B. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors: From Epigenome to Bedside. **Molecular Cancer Research**, v. 17, n. 7, p. 1417–1428, 2020.

KROEP, J. R.; OUALI, M.; GELDERBLOM, H.; CESNE, A. Le; DEKKER, T. J. A.; GLABBEKE, M. Van; HOGENDOORN, P. C. W.; HOHENBERGER, P. First-line chemotherapy for malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) versus other histological soft tissue sarcoma subtypes and as a prognostic factor for MPNST : an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group study. **Annals of Oncology**, v. 22, p. 207–214, 2011.

LAI, Y.; WEI, X.; LIN, S.; QIN, L.; CHENG, L.; LI, P. Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 10, n. 106, p. 1–14, 2017.

LI, S.; SHEN, D.; SHAO, J.; CROWDER, R.; LIU, W.; PRAT, A.; HE, X.; LIU, S.; HOOG, J.; LU, C.; DING, L.; GRIFFITH, O. L.; MILLER, C.; LARSON, D.; FULTON, R. S.; HARRISON, M.; MOONEY, T.; MCMICHAEL, J. F.; LUO, J.; TAO, Y.; GONCALVES, R.; SCHLOSBERG, C.; HIKEN, J. F.; SAIED, L.; SANCHEZ, C.; GIUNTOLI, T.; BUMB, C.; COOPER, C.; KITCHENS, R. T.; LIN, A.; PHOMMALY, C.; DAVIES, S. R.; ZHANG, J.; KAVURI, M. S.; MCEACHERN, D.; DONG, Y. Y.; MA, C.; PLUARD, T.; NAUGHTON, M.; BOSE, R.; SURESH, R.; MCDOWELL, R.; MICHEL, L.; AFT, R.; GILLANDERS, W.; DESCHRYVER, K.; WILSON, R. K.; WANG, S.; MILLS, G. B.; GONZALEZ-ANGULO, A.; EDWARDS, J. R.; MAHER, C.; PEROU, C. M.; MARDIS, E. R.; ELLIS, M. J. Endocrine-Therapy-Resistant ESR1 Variants Revealed by Genomic Characterization of Breast-Cancer-Derived Xenografts. **Cell Reports**, v. 4, n. 6, p. 1116–1130, 2013.

LU, W.; CHAO, T.; RUIQI, C.; JUAN, S.; ZHIHONG, L. Patient - derived xenograft models in musculoskeletal malignancies. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 107, p. 1–16, 2018.

LY, K. I.; BLAKELEY, J. O. **The Diagnosis and Management of Neurofibromatosis Type 1Medical Clinics of North America**W.B. Saunders, , 1 nov. 2019.

MARANGONI, E.; VINCENT-SALOMON, A.; AUGER, N.; DEGEORGES, A.; ASSAYAG, F.; DE CREMOUX, P.; DE PLATER, L.; GUYADER, C.; DE PINIEUX, G.; JUDDE, J. G.;

REBUCCI, M.; TRAN-PERENNOU, C.; SASTRE-GARAU, X.; SIGAL-ZAFRANI, B.; DELATTRE, O.; DIÉRAS, V.; POUPON, M. F. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 13, p. 3989–3998, 2007.

MARTINEZ, A. P.; FRITCHIE, K. J. Update on Nerve Sheath Tumors. **Surgical Pathology**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2018.

MATTAR, M.; MCCARTHY, C. R.; KULICK, A. R.; QERIQI, B.; GUZMAN, S.; DE STANCHINA, E. Establishing and maintaining an extensive library of patient-derived xenograft models. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 19, p. 1–18, 2018.

MEEHAN, T. F.; CONTE, N.; GOLDSTEIN, T.; INGHIRAMI, G.; MURAKAMI, M. A.; BRABETZ, S.; GU, Z.; WISER, J. A.; DUNN, P.; BEGLEY, D. A.; KRUPKE, D. M.; BERTOTTI, A.; BRUNA, A.; BRUSH, M. H.; BYRNE, A. T.; CALDAS, C.; CHRISTIE, A. L.; CLARK, D. A.; DOWST, H.; DRY, J. R.; DOROSHOW, J. H.; DUCHAMP, O.; EVRARD, Y. A.; FERRETTI, S.; FRESE, K. K.; GOODWIN, N. C.; GREENAWALT, D.; HAENDEL, M. A.; HERMANS, E.; HOUGHTON, P. J.; JONKERS, J.; KEMPER, K.; KHOR, T. O.; LEWIS, M. T.; LLOYD, K. C. K.; MASON, J.; MEDICO, E.; NEUHAUSER, S. B.; OLSON, J. M.; PEEPER, D. S.; RUEDA, O. M.; SEONG, J. K.; TRUSOLINO, L.; VINOLO, E.; WECHSLER-REYA, R. J.; WEINSTOCK, D. M.; WELM, A.; WEROHA, S. J.; AMANT, F.; PFISTER, S. M.; KOOL, M.; PARKINSON, H.; BUTTE, A. J.; BULT, C. J. PDX-MI: Minimal information for patient-derived tumor xenograft models. **Cancer Research**, v. 77, n. 21, p. e62–e66, 2017.

MIGLIARDI, G.; SASSI, F.; TORTI, D.; GALIMI, F.; ZANELLA, E. R.; BUSCARINO, M.; RIBERO, D.; MURATORE, A.; MASSUCCO, P.; PISACANE, A.; RISIO, M.; CAPUSSOTTI, L.; MARSONI, S.; DI NICOLANTONIO, F.; BARDELLI, A.; COMOGLIO, P. M.; TRUSOLINO, L.; BERTOTTI, A. Inhibition of MEK and PI3K/mTOR suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in patient-derived xenografts of RAS-mutant colorectal carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 9, p. 2515–2525, 2012.

MINNA, P.; UUSITALO, E.; RANTANEN, M.; KALLIONP, R. A. Distinctive Cancer Associations in Patients With Neurofibromatosis Type 1. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 17, p. 1978–1986, 2019.

MOESTUE, S. A.; BORGAN, E.; HUUSE, E. M.; LINDHOLM, E. M.; SITTER, B.; BØRRESEN-DALE, A. L.; ENGEBRAATEN, O.; MÆLANDSMO, G. M.; GRIBBESTAD, I. S. Distinct choline metabolic profiles are associated with differences in gene expression for basal-like and luminal-like breast cancer xenograft models. **BMC Cancer**, v. 10, n. 433, p. 1–12, 2010.

MOESTUE, S. A.; HUUSE, E. M.; LINDHOLM, E. M.; BOFIN, A.; ENGEBRAATEN, O.; MÆLANDSMO, G. M.; AKSLEN, L. A.; GRIBBESTAD, I. S. Low-molecular contrast agent dynamic contrast-enhanced (DCE)-MRI and diffusion-weighted (DW)-MRI in early assessment of bevacizumab treatment in breast cancer xenografts. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 38, n. 5, p. 1043–1053, 2013.

MOESTUE, S.; SITTER, B.; BATHEN, T. F.; TESSEM, M.-B.; IGRIBBESTAD, I. S. HR MAS MR spectroscopy in metabolic characterization of cancer. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 2–26, 2011.
MORELLI, M. P. Prioritizing Phase I Treatment Options Through Preclinical Testing on. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 4, p. 45–48, 2012.

NÉMATI, F.; SASTRE-GARAU, X.; LAURENT, C.; COUTURIER, J.; MARIANI, P.; DESJARDINS, L.; PIPERNO-NEUMANN, S.; LANTZ, O.; ASSELAIN, B.; PLANCHER, C.; ROBERT, D.; PÉGUILLET, I.; DONNADIEU, M. H.; DAHMANI, A.; BESSARD, M. A.; GENTIEN, D.; REYES, C.; SAULE, S.; BARILLOT, E.; ROMAN-ROMAN, S.; DECAUDIN, D. Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 8, p. 2352–2362, 2010.

PEARSON, A. T.; FINKEL, K. A.; WARNER, K. A.; NÖR, F.; MARTINS, M. D.; JACKSON, T. L.; NÖR, J. E. Patient-derived xenograft (PDX) tumors increase growth rate with time. **Oncotarget**, v. 7, n. 7, p. 7993–8005, 2016.

PEMOV, A.; LI, H.; PRESLEY, W.; WALLACE, M. R.; MILLER, D. T.; HEALTH, F. Genetics of humam malignant peripheral nerve sheat tumors. **Neuro-oncology Advances**, v. 2, n. S1, p. 50–61, 2019.

PRIDGEON, M. G.; GROHAR, P. J.; STEENSMA, M. R.; WILLIAMS, B. O. Wnt Signaling in Ewing Sarcoma , Osteosarcoma , and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. **Current Osoteoporosis Report**, v. 15, n. 4, p. 239–246, 2017.

PRUDNER, B. C.; BALL, T.; RATHORE, R.; HIRBE, A. C. Diagnosis and management of malignant peripheral nerve sheath tumors: Current practice and future perspectives. **Neuro-Oncology Advances**, v. 2, n. Supplement_1, p. i40–i49, 2020.

RUSSELL, T. A.; ECKARDT, M. A.; MURAKAMI, T.; IRMINA, A. E.; KAWAGUCHI, K.; DRY, S. M. Clinical Factors That Affect the Establishment of Soft Tissue Sarcoma Patient-Derived Orthotopic Xenografts : A University of California, Los Angeles, Sarcoma Program Prospective Clinical Trial. **Journal of Precision Oncology**, v. 1, p. 1–13, 2017.

SIOLAS, D.; HANNON, G. J. Patient-derived tumor xenografts: Transforming clinical samples into mouse models. **Cancer Research**, v. 73, n. 17, p. 5315–5319, 2013.

SIVANAND, S.; PEÑA-LLOPIS, S.; ZHAO, H.; KUCEJOVA, B.; SPENCE, P.; PAVIA-JIMENEZ, A.; YAMASAKI, T.; MCBRIDE, D. J.; GILLEN, J.; WOLFF, N. C.; MORLOCK, L.; LOTAN, Y.; RAJ, G. V; SAGALOWSKY, A.; MARGULIS, V.; CADEDDU, J. A.; ROSS, M. T.; BENTLEY, D. R.; KABBANI, W.; XIE, X. J.; KAPUR, P.; WILLIAMS, N. S.; BRUGAROLAS, J. A validated tumorgraft model reveals activity of dovitinib against renal cell carcinoma. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 137, p. 1–17, 2012.

STEBBING, J.; PAZ, K.; SCHWARTZ, G. K.; WEXLER, L. H.; MAKI, R.; POLLOCK, R. E.; MORRIS, R.; COHEN, R.; SHANKAR, A.; BLACKMAN, G.; HARDING, V.; VASQUEZ, D.; KRELL, J.; CIZNADIJA, D.; KATZ, A.; SIDRANSKY, D. Patient-derived

xenografts for individualized care in advanced sarcoma. **Cancer**, v. 120, n. 13, p. 2006–2015, 2014.

SURESH, K.; KLIOT, T.; PIUNTI, A.; KLIOT, M. Epigenetic mechanisms drive the progression of neurofibromas to malignant peripheral nerve sheath tumors. **Surginal Neurology International**, v. 7, n. 33, p. 797–800, 2016.

THWAY, K.; FISHER, C. Annals of Diagnostic Pathology Malignant peripheral nerve sheath tumor : pathology and genetics ☆. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 18, n. 2, p. 109–116, 2014.

TORA, M. S.; XENOS, D.; TEXAKALIDIS, P.; BOULIS, N. M. Treatment of neurofibromatosis 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors: a systematic review. **Neurosurgical Review**, v. 43, n. 4, p. 1039–1046, 2020.

UPADHYAYA, M. Genetic basis of tumorigenesis in NF1 malignant peripheral nerve sheath tumors. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 3, p. 937–951, 2011.

VARNA, M.; BOUSQUET, G.; FERREIRA, I.; GOULARD, M.; EL-BOUCHTAOUI, M. Stability of preclinical models of aggressive renal cell carcinomas. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 6, p. 2950–2962, 2014.

VIDAL, A.; MUÑOZ, C.; GUILLÉN, M. J.; MORETÓ, J.; PUERTAS, S.; MARTÍNEZ-INIESTA, M.; FIGUERAS, A.; PADULLÉS, L.; GARCÍA-RODRIGUEZ, F. J.; BERDIEL-ACER, M.; PUJANA, M. A.; SALAZAR, R.; GIL-MARTIN, M.; MARTÍ, L.; PONCE, J.; MOLLEVÍ, D. G.; CAPELLA, G.; CONDOM, E.; VIÑALS, F.; HUERTAS, D.; CUEVAS, C.; ESTELLER, M.; AVILÉS, P.; VILLANUEVA, A. Lurbinectedin (PM01183), a new DNA minor groove binder, Inhibits growth of orthotopic primary graft of cisplatin-resistant epithelial ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 19, p. 5399–5411, 2012.

VOGEL, K. S.; KLESSE, L. J.; VELASCO-MIGUEL, S.; MEYERS, K.; RUSHING, E. J.; PARADA, L. F. Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. **Science**, v. 286, n. 5447, p. 2176–2179, 1999.

VON HOFF, D. D.; ERVIN, T.; ARENA, F. P.; CHIOREAN, E. G.; INFANTE, J.; MOORE, M.; SEAY, T.; TJULANDIN, S. A.; MA, W. W.; SALEH, M. N.; HARRIS, M.; RENI, M.; DOWDEN, S.; LAHERU, D.; BAHARY, N.; RAMANATHAN, R. K.; TABERNERO, J.; HIDALGO, M.; GOLDSTEIN, D.; VAN CUTSEM, E.; WEI, X.; IGLESIAS, J.; RENSCHLER, M. F. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 18, p. 1691–1703, 2013.

WANG, X.; FU, X.; HOFFMAN, R. M. A new patient-like metastatic model of human lung cancer constructed orthotopically with intact tissue via thoracotomy in immunodeficient mice. **International Journal of Cancer**, v. 51, n. 6, p. 992–995, 1992.

WIDEMANN, B. C.; ITALIANO, A. Biology and Management of Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma , Myxo fi brosarcoma , and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors : State of the Art and Perspectives. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 2, p. 160–168, 2018.

YANG, J.; YLIPÄÄ, A.; SUN, Y.; ZHENG, H.; CHEN, K.; NYKTER, M.; TRENT, J.; RATNER, N.; LEV, D. C.; ZHANG, W. Genomic and molecular characterization of malignant peripheral nerve sheath tumor identifies the IGF1R pathway as a primary target for treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 24, p. 7563–7573, 2011.

YAO, L. C.; ARYEE, K. E.; CHENG, M.; KAUR, P.; KECK, J. G.; BREHM, M. A. Creation of PDX-Bearing Humanized Mice to Study Immuno-oncology. In: **Methods in Molecular Biology**. Humana Press Inc., p. 241–252, 2019.

YU, J.; QIN, B.; MOYER, A. M.; SINNWELL, J. P.; THOMPSON, K. J.; III, J. A. C.; MARLOW, L. A.; MILLER, J. L.; YIN, P.; GAO, B.; MINTER-DYKHOUSE, K.; TANG, X.; MCLAUGHLIN, S. A.; MORENO-ASPITIA, A.; SCHWEITZER, A.; LU, Y.; HUBBARD, J.; NORTHFELT, D. W.; GRAY, R. J.; HUNT, K.; CONNERS, A. L.; SUMAN, V. J.; KALARI, K. R.; INGLE, J. N.; LOU, Z.; VISSCHER, D. W.; WEINSHILBOUM, R.; BOUGHEY, J. C.; GOETZ, M. P.; WANG, L. Establishing and characterizing patient-derived xenografts using pre-chemotherapy percutaneous biopsy and post-chemotherapy surgical samples from a prospective neoadjuvant breast cancer study. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 130, p. 1–13, 2017.

ZHANG, X.; CLAERHOUT, S.; PRAT, A.; DOBROLECKI, L. E.; PETROVIC, I.; LAI, Q.; LANDIS, M. D.; WIECHMANN, L.; SCHIFF, R.; GIULIANO, M.; WONG, H.; FUQUA, S. W.; CONTRERAS, A.; GUTIERREZ, C.; HUANG, J.; MAO, S.; PAVLICK, A. C.; FROEHLICH, A. M.; WU, M. F.; TSIMELZON, A.; HILSENBECK, S. G.; CHEN, E. S.; ZULOAGA, P.; SHAW, C. A.; RIMAWI, M. F.; PEROU, C. M.; MILLS, G. B.; CHANG, J. C.; LEWIS, M. T. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. **Cancer Research**, v. 73, n. 15, p. 4885–4897, 2013.

ZHOU, H.; COFFIN, C. M.; PERKINS, S. L.; TRIPP, S. R.; LIEW, M.; VISKOCHIL, D. H. Malignant peripheral nerve sheath tumor: A comparison of grade, immunophenotype, and cell cycle/growth activation marker expression in sporadic and neurofibromatosis 1-related lesions. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 27, n. 10, p. 1337–1345, 2003.

ZOU, J.; LIU, Y.; WANG, J.; LIU, Z.; LU, Z.; CHEN, Z.; LI, Z.; DONG, B.; HUANG, W.; LI, Y.; GAO, J.; SHEN, L. Establishment and genomic characterizations of patient-derived esophageal squamous cell carcinoma xenograft models using biopsies for treatment optimization. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2018.

ANEXO A: PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das características fenotípicas e biológicas dos sarcomas ósseos utilizando modelo murino de xenoenxerto tumoral.

Pesquisador: Maria Eugênia Leite Duarte

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 69859417.2.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Tráumato - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA SAUDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.216.625

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto está adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão definidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há risco adiconal para os pacientes submetidos ao projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e serve para melhor entendimento dos tumores osseos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os temos de apresentação obrigatória estão anexados.

Recomendações:

Publicação dos dados assim que houver resultados.

Explicitar no texto se existe conflito de interesses entre os participantes do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O trabalho é relevante do ponto de vista institucional.

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão **CEP:** 20.940-070
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br

Considerações Finais a critério do CEP:

Senhor pesquisador, de acordo com o constante da Resolução CNS nº 466 de 2012, faz-se necessário apresentar ao CEP/INTO, através da Plataforma Brasil, a cada 06 (seis) meses o relatório de acompanhamento de sua pesquisa. Além disso, após a conclusão da pesquisa, deverá ser submetido na Plataforma Brasil, através da Notificação, o Relatório Final e a pesquisa concluída para apreciação do CEP/INTO.

Informamos que qualquer alteração realizada no protocolo de pesquisa aprovado deverá ser submetida à apreciação do CEP/INTO através do envio de uma emenda utilizando a Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_942112.pdf	15/06/2017 15:56:39		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	DOUTORADO_RAG.pdf	15/06/2017 15:55:58	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE5.docx	15/06/2017 15:52:36	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE4.docx	15/06/2017 15:52:22	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE3.docx	15/06/2017 15:52:03	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.docx	15/06/2017 15:51:49	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1.docx	15/06/2017 15:51:11	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	15/06/2017 15:39:00	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão **CEP:** 20.940-070
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br

Declaração do Patrocinador	patrocinador.pdf	15/06/2017 15:38:05	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
Declaração de Pesquisadores	pesquisador.pdf	15/06/2017 15:37:32	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraestrutura.pdf	15/06/2017 15:36:42	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	15/06/2017 15:34:48	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	15/06/2017 15:34:18	Maria Eugênia Leite Duarte	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIO DE JANEIRO, 14 de Agosto de 2017

Assinado por:
Marisa Peter Silva
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil, nº 500
Bairro: São Cristóvão **CEP:** 20.940-070
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br

ANEXO B: TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Biópsia)
De acordo com as normas das Resoluções nº466 de 12/12/12 e nº 441 de 12/05/2011 do Conselho Nacional de Saúde

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "*Avaliação das características fenotípicas e biológicas dos sarcomas ósseos utilizando modelo murino de xenoenxerto tumoral*". A palavra murino está relacionada à utilização de camundongos nesta pesquisa. Xenoenxerto é o transplante de um indivíduo de uma espécie para outra, por exemplo, colocar um pedacinho da sua lesão em um camundongo. Você foi selecionado porque de acordo com os resultados de alguns exames que foram realizados, você tem uma lesão que pode ser um sarcoma. Esta participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. A sua recusa não trará nenhum prejuízo para você na relação com o médico que o trata ou com este hospital. O tratamento para a doença que você é portador será o mesmo participando ou não deste estudo.

O objetivo desta pesquisa é avaliar as características das células que fazem parte da lesão que você pode ser portador (sarcoma). A importância de estudar essas células é porque elas podem se comportar de diversas formas em resposta ao tratamento.

A confirmação do diagnóstico de sarcoma é feita por biópsia no local da lesão. A biópsia consiste na retirada de pequenas amostras da lesão, que são encaminhadas para análise no laboratório.

A sua participação consistirá em permitir que um pequeno pedaço da amostra que vai ser retirada na hora da biópsia seja utilizado para fazer estudos em animais de laboratório (camundongos). Este estudo não vai interferir no resultado da biópsia, no tratamento ou na forma como a doença vai evoluir. Todas as etapas do tratamento serão as mesmas com ou sem

a realização das experiências com os animais. Os riscos relacionados com a sua participação são os riscos relacionados com a realização da biópsia da lesão. Sua participação neste estudo não vai trazer risco adicional para você e nem vai alterar em nada o curso da sua doença.

Você não terá qualquer tipo custo/despesa por participar dessa pesquisa, como também não terá ressarcimento financeiro. Os benefícios relacionados com a sua participação são que os resultados deste estudo poderão ajudar a melhorar no futuro o tratamento dos sarcomas em geral. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a identificá-lo(a) como participante do estudo. Os resultados quando forem divulgados serão identificados com siglas que não permitirão conhecer a sua identidade.

A amostra coletada será utilizada apenas para este projeto de pesquisa e todas as informações ficarão sob a responsabilidade do pesquisador responsável.

Este Termo foi redigido em três vias, sendo uma para você, outra para o pesquisador e uma para ser anexada ao prontuário, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Rio de Janeiro, de de 201 .

Pesquisadora Responsável: Maria Eugenia Leite Duarte
Tel: 2134-5498/email: meugenia.into@gmail.com

_____
Assinatura e carimbo do responsável pela aplicação do termo

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

_____
Assinatura participante da pesquisa

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Biópsia)

De acordo com as normas das Resoluções nº 466 de 12/12/12 e nº 441 de 12/05/2011 do Conselho Nacional de Saúde

O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado para participar da pesquisa "*Avaliação das características fenotípicas e biológicas dos sarcomas ósseos utilizando modelo murino de xenoenxerto tumoral*". A palavra murino está relacionada à utilização de camundongos nesta pesquisa. Xenoenxerto é o transplante de um indivíduo de uma espécie para outra, por exemplo, colocar um pedacinho da lesão em um camundongo. Ele foi selecionado porque, de acordo com os resultados de alguns exames que foram realizados, ele tem uma lesão que pode ser um sarcoma. Esta participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir da autorização para ele participar e retirar seu consentimento. A sua recusa não trará nenhum prejuízo para o menor que você representa na relação com o médico que o trata ou com este hospital. O tratamento para a doença que ele é portador será o mesmo ele participando ou não deste estudo.

O objetivo desta pesquisa é avaliar as características das células que fazem parte da lesão que o menor sob sua responsabilidade pode ser portador (sarcoma). A importância de estudar essas células é porque elas podem se comportar de diversas formas em resposta ao tratamento.

A confirmação do diagnóstico de sarcoma é feita por biópsia do osso no local da lesão. A biópsia consiste na retirada de pequenas amostras da lesão, que são encaminhadas para análise no laboratório. A participação do menor sob seus cuidados, caso você autorize, consistirá em permitir que um pequeno pedaço da amostra que vai ser retirada na hora da biópsia seja utilizado para fazer estudos em animais de laboratório (camundongos). Este estudo não vai interferir no resultado da biópsia, no tratamento ou na forma como a doença vai evoluir. Todas as etapas do tratamento serão as mesmas com ou sem a realização das experiências com os animais. Os riscos relacionados com a participação do menor sob seus cuidados, caso você autorize, são os riscos relacionados com a realização da biópsia. A participação neste estudo não vai trazer risco adicional para ele ou ela e nem vai alterar em nada o curso da doença.

O menor que você representa não terá qualquer tipo custo/despesa por participar desta pesquisa, como também não terá qualquer ressarcimento financeiro.

Os benefícios relacionados com a participação do menor sob sua responsabilidade são que os resultados deste estudo poderão ajudar a melhorar no futuro o tratamento dos sarcomas. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a participação do menor sob sua responsabilidade. Os dados não serão divulgados de forma a identificá-lo como participante do estudo. Os resultados quando forem divulgados serão identificados com siglas que não permitirão conhecer a identidade dele ou dela.

A amostra coletada será utilizada apenas para este projeto de pesquisa e todas as informações ficarão sob a responsabilidade do pesquisador responsável.

Este Termo foi redigido em três vias, sendo uma para você, outra para o pesquisador e uma para ser anexada ao prontuário do participante, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e a participação do menor que você representa, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Rio de Janeiro, de de 201 .

Pesquisadora Responsável: Maria Eugenia Leite Duarte
Tel: 2134-5498/email: meugenia.into@gmail.com

_____
Assinatura e carimbo do responsável pela aplicação do termo

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Declaro que entendi os objetivos e condições da pesquisa e concordo com a participação do menor sob minha responsabilidade.

_____
Assinatura do responsável legal pelo participante da pesquisa
Documento de Identidade:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Peça cirúrgica)
De acordo com as normas das Resoluções nº466 de 12/12/12 e nº 441 de 12/05/2011 do Conselho Nacional de Saúde

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "*Avaliação das características fenotípicas e biológicas dos sarcomas ósseos utilizando modelo murino de xenoenxerto tumoral*". A palavra murino está relacionada à utilização de camundongos nesta pesquisa. Xenoenxerto é o transplante de um indivíduo de uma espécie para outra, por exemplo, colocar um pedacinho da sua lesão em um camundongo. Você foi selecionado porque, de acordo com os resultados da biópsia, você tem uma lesão denominada sarcoma. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. A sua recusa não trará nenhum prejuízo para você na relação com o médico que o trata ou com este hospital. O tratamento para a doença que você é portador será o mesmo participando ou não deste estudo.

O objetivo desta pesquisa é avaliar as características das células que fazem parte da lesão que você é portador (sarcoma). A importância de estudar essas células é porque elas podem se comportar de forma diferente em resposta ao tratamento.

O tratamento dos sarcomas pode ser feito através de quimioterapia e retirada por cirurgia da lesão. A cirurgia consiste na retirada da lesão que é encaminhada para análise no laboratório. A sua participação consistirá em permitir que depois que a lesão seja retirada do seu corpo e antes que a peça resultante da ressecção cirúrgica seja enviada para análise, seja retirado um pequeno pedaço da lesão para fazer estudos em animais de laboratório (camundongos). Este estudo não vai interferir no resultado da análise da peça cirúrgica, no

tratamento ou na forma como a doença vai evoluir. Todas as etapas do tratamento serão as mesmas com ou sem a realização das experiências com os animais. Os riscos relacionados com a sua participação são os riscos relacionados com a realização da cirurgia para a retirada da lesão. Sua participação neste estudo não vai trazer risco adicional para você e nem vai alterar em nada o curso da sua doença.

Os benefícios relacionados com a sua participação são que os resultados deste estudo poderão ajudar a melhorar no futuro o tratamento dos sarcomas. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a identificá-lo como participante do estudo. Os resultados quando forem divulgados serão identificados com siglas que não permitirão conhecer a sua identidade.

A amostra coletada será utilizada apenas para este projeto de pesquisa e todas as informações ficarão sob a responsabilidade do pesquisador responsável.

Este Termo foi redigido em três vias, sendo uma para você, outra para o pesquisador e uma para ser anexada ao prontuário, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Rio de Janeiro , de de 201 .

Pesquisadora Responsável: Maria Eugenia Leite Duarte
Tel: 2134-5498/email: meugenia.into@gmail.com

_____
Assinatura e carimbo do responsável pela aplicação do termo

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

_____
Assinatura participante da pesquisa

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Peça cirúrgica)

De acordo com as normas das Resoluções nº 466 de 12/12/12) e nº 441 de 12/05/2011 do Conselho Nacional de Saúde

O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado para participar da pesquisa "*Avaliação das características fenotípicas e biológicas dos sarcomas ósseos utilizando modelo murino de xenoenxerto tumoral*". A palavra murino está relacionada à utilização de camundongos nesta pesquisa. Xenoenxerto é o transplante de um indivíduo de uma espécie para outra, por exemplo, colocar um pedacinho da lesão em um camundongo. Ele foi selecionado porque, de acordo com os resultados da biópsia, ele tem uma lesão denominada sarcoma. Esta participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir da autorização para ele ou ela participar e retirar seu consentimento. A sua recusa não trará nenhum prejuízo para o menor que você representa na relação com o médico que o trata ou com este hospital. O tratamento para a doença que ele é portador será o mesmo ele participando ou não deste estudo.

O objetivo desta pesquisa é avaliar as características das células que fazem parte da lesão que o menor sob sua responsabilidade é portador (sarcoma) e como elas se comportam depois do tratamento. A importância de estudar essas células é porque elas podem se comportar de forma diferente em resposta ao tratamento.

O tratamento dos sarcomas pode ser feito através de quimioterapia e pela retirada por cirurgia da lesão. A cirurgia consiste na retirada da lesão que é encaminhada para análise no laboratório. A participação do menor sob seus cuidados, caso você autorize, consistirá em permitir que depois que a lesão seja retirada do local do corpo e antes que a peça resultante desta ressecção cirúrgica seja enviada para análise, seja retirado um pequeno pedaço da lesão para fazer estudos em animais de laboratório (camundongos). Este estudo não vai interferir no resultado da análise da peça cirúrgica, no tratamento ou na forma como a doença vai evoluir. Todas as etapas do tratamento serão as mesmas com ou sem a realização das experiências com os animais. Os riscos relacionados com a participação do menor sob os seus cuidados são os riscos relacionados com a realização da cirurgia para a retirada da lesão. A participação neste

estudo não vai trazer risco adicional para ele ou ela e nem vai alterar em nada o curso da doença.

O menor que você representa não terá qualquer tipo custo/despesa por participar desta pesquisa, como também não terá qualquer ressarcimento financeiro.

Os benefícios relacionados com a participação do menor sob sua responsabilidade são que os resultados deste estudo poderão ajudar a melhorar no futuro o tratamento dos sarcomas. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a participação do menor sob sua responsabilidade. Os dados não serão divulgados de forma a identificá-lo como participante do estudo. Os resultados quando forem divulgados serão identificados com siglas que não permitirão conhecer a identidade dele ou dela.

A amostra coletada será utilizada apenas para este projeto de pesquisa e todas as informações ficarão sob a responsabilidade do pesquisador responsável.

Este Termo foi redigido em três vias, sendo uma para você, outra para o pesquisador e uma para ser anexada ao prontuário do participante, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e a participação do menor que você representa, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Rio de Janeiro, de de 201 .

Pesquisadora Responsável: Maria Eugenia Leite Duarte
Tel: 2134-5498/email: meugenia.into@gmail.com

_____
Assinatura e carimbo do responsável pela aplicação do termo

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Declaro que entendi os objetivos e condições da pesquisa e concordo com a participação do menor sob minha responsabilidade.

_____
Assinatura do responsável legal pelo participante da pesquisa
Documento de Identidade:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Termo de Assentimento

De acordo com as normas das Resoluções nº466 de 12/12/12 e nº 441 de 12/05/2011 do Conselho Nacional de Saúde

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "*Avaliação das características fenotípicas e biológicas dos sarcomas ósseos utilizando modelo murino de xenoenxerto tumoral*". A palavra murino está relacionada à utilização de camundongos nesta pesquisa. Xenoenxerto é o transplante de uma pessoa para um animal de laboratório, por exemplo, colocar um pedacinho da sua lesão em um camundongo. Seus pais permitiram que você participe. Neste estudo vamos querer saber um pouco mais sobre as células que estão causando sua doença para poder melhorar o tratamento de outras crianças que tenham a mesma doença que você. As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de cinco a dezoito anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita no INTO onde as crianças são tratadas das doenças dos ossos. Para isso, será usado um pouco das células da sua doença para fazer um estudo no laboratório. O uso de uma pequena quantidade de células doentes retiradas do seu osso é seguro e não vai mudar a forma com seu médico vai te tratar. Caso você tenha alguma dúvida ou queira conversar sobre a pesquisa, você pode telefonar para Claudia no telefone 2134-5055 ou Eugênia no telefone 2134-5498.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar você e as outras crianças que vão participar da

pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa os resultados serão escritos em uma revista científica.

Este Termo foi redigido em três vias, sendo uma para você, outra para o pesquisador e outra que vai ficar no seu prontuário, onde está escrito o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa do INTO, também chamado de CEP. Você poderá esclarecer suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento através dos números dos telefones ou endereço de e-mail disponível neste Termo.

Eu, _____, aceito participar da pesquisa "*Avaliação das características fenotípicas e biológicas dos sarcomas ósseos utilizando modelo murino de xenoenxerto tumoral*", que tem o objetivo de entender um pouco mais sobre as células que estão causando minha doença para poder melhorar o tratamento de outras crianças que também fiquem doentes com a mesma doença que eu tenho. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e confirmo que concordo em participar da pesquisa.

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO/MS.

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ CEP: 20940-070 Tel.: (21) 2134-5000/(21) 2134-5061 e-mail: cep.into@into.saude.gov.br

Rio de Janeiro, de de 201 .

Pesquisadora Responsável: Maria Eugenia Leite Duarte
Tel: 2134-5498/email: meugenia.into@gmail.com

_____
Assinatura e carimbo do responsável pela aplicação do termo

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

_____
Assinatura do menor - Participante da pesquisa

ANEXO C: PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA DO INTO

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação das características fenotípicas e biológicas dos sarcomas ósseos utilizando modelo murino de xenoenxerto tumoral" protocolado sob o número 005/2017, utilizando 150 (cento e cinquenta) camundongos imunodeficientes, sob a responsabilidade da pesquisadora Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia e foi aprovado na reunião da Comissão em 22 de junho de 2017.

(We certify that the research "Evaluation of phenotypic and biological characteristics of bone sarcomas using murine tumor xenograft model", protocol number 005/2017, utilizing 150 (one hundred and fifty) immunodeficient mice, under the responsibility of the researcher Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa, agree with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Ethic Commission on Animal Use of the National Institute of Traumatology and Orthopedics, and was approved at the first meeting of the Commission on June 22, 2017).

Rio de Janeiro, 22 de junho de 2017.

Assinatura: _____

Diego Pinheiro Aguiar
Coordenador da Comissão

ANEXO D. SISTEMA DE ESTADIAMENTO DE SARCOMAS DE PARTES MOLES DAS EXTREMIDADES OU TRONCO

Sistema de estadiamento de sarcoma de partes moles das extremidades ou do tronco.

SISTEMA TNM	DESCRIÇÃO
T1	Tumor ≤ 5cm em sua maior dimensão
T2	Tumor > 5cm e ≤10cm em sua maior dimensão
T4	Tumor > 15cm em sua maior dimensão
N0	Ausência de metástase linfonodal regional ou status linfonodal desconhecido
N1	Metástase lifonodal regional
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

ESTÁGIO	DESCRIÇÃO
IA	T1; N0; M0; G1
IB	T2, T3, T4; N0; M0; G1
II	T1; N0; M0; G2/3
IIIA	T2; N0; M0; G2/3
IIIB	T3, T4; N0; M0; G2/3
IV	T1, T2, T3, T4; N1; M0; G1/2/3 T1, T2, T3, T4; N0, N1; M1; G1/2/

Adaptado de CATES, 2018.

APÊNDICE A. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PARTICIPANTES QUE TIVERAM AMOSTRAS COLETADAS PARA O ESTUDO

Caso	Sexo	Idade	NF1	Cor da pele	Sítio anatômico	Procedimento Cirúrgico	QT Prévia	RT Prévia	M.P.D.	Recidiva local	Morte	Grau	Estadiamento patológico	Crescimento PDX
1	F	51	Não	Preta	Perna	Biópsia	Não	Não	Sim	N.A.	Sim	G3	IV	Sim
2	M	29	Sim	Preta	Antebraço	Amputação	Não	Não	Sim	N.A.	Sim	G3	IV	Sim
3	F	27	Sim	Preta	Perna	Biópsia	Não	Não	Não	Sim	Não	G3	IIIB	Sim
4*	F	16	Sim	Preta	Coxa	Biópsia	Não	Não	Não	Sim	Não	G2	IIIB	N.A.
5	F	28	Sim	Preta	Perna	Ressecção	Não	Não	Não	Sim	Não	G3	IIIB	Sim
6*	F	16	Sim	Preta	Coxa	Biópsia	Não	Não	Não	Sim	Não	G2	IIIB	N.A.
7	F	28	Sim	Branca	Perna	Amputação	Não	Não	Não	Não	Não	G3	IIIB	Não
8	F	16	Sim	Preta	Coxa	Ressecção	Não	Não	Não	Sim	Não	G2	IIIB	Não
9$	F	28	Sim	Preta	Perna	Biópsia	Não	Não	Não	Sim	Não	G2	IIIB	N.A.
10	M	47	Não	Branca	Pé	Amputação	Não	Não	Não	Não	Não	G2	N.D.	Não
11#	F	16	Sim	Preta	Tornozelo	Ressecção	Não	Não	Não	Não	Não	G2	IIIA	N.A.
12	F	17	Sim	Preta	Coxa	Biópsia	Não	Não	Não	Sim	Não	G2	IIIB	Não
13#	F	18	Sim	Preta	Coxa	Desarticulação	Não	Não	Não	Sim	Não	G2	IIIB	N.A.

M.D.P. - metástase pulmonar ao diagnóstico; N.A. - não aplicável; N.D. – não disponível; N.F. 1 – neurofibromatose 1; QT - quimioterapia; RT - radioterapia.
* Material enxertado no camundongo não era representativo do tumor da paciente.
$ Camundongo ficou doente e teve que ser submetido à eutanásia humanitária precocemente.
Amostras coletadas e criopreservadas por falta de camundongos para enxertia.
Casos que representam o mesmo paciente: 3, 5 e 9; 4,6, 8,12 e 13.