

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Larissa de Abreu Fernandes

ANÁLISE DO PERFIL HISTOPATOLÓGICO DE AMOSTRAS DE
PDX (*PATIENT-DERIVED XENOGRAFT*) DE SARCOMA
SINOVIAL PEDIÁTRICO E ESTABELECIMENTO DE CULTURA
DE ESFEROIDES (3D)

BOTUCATU – SP

2024

Larissa de Abreu Fernandes

ANÁLISE DO PERFIL HISTOPATOLÓGICO DE AMOSTRAS DE
PDX (*PATIENT-DERIVED XENOGRAFT*) DE SARCOMA
SINOVIAL PEDIÁTRICO E ESTABELECIMENTO DE CULTURA
DE ESFEROIDES (3D)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Orientadora: Dra. Larissa Akemi Kido de Barros

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Fernandes, Larissa de Abreu.

Análise do perfil histopatológico de amostras de PDX
(*Patient-Derived Xenograft*) de sarcoma sinovial pediátrico
e estabelecimento de cultura de esferoides (3D) / Larissa de
Abreu Fernandes. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Larissa Akemi Kido de Barros

Coorientador: Sérgio Luis Felisbino

Capes: 20601000

1. Câncer em crianças. 2. Xenoenxertos. 3. Medicina de
precisão. 4. Sarcoma sinovial.

Palavras-chave: PDX; Pediatric cancer; Precision medicine;
Synovial sarcoma.

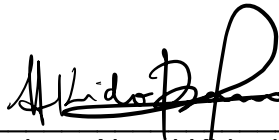
Larissa de Abreu Fernandes

**ANÁLISE DO PERFIL HISTOPATOLÓGICO DE AMOSTRAS DE PDX
(PATIENT-DERIVED XENOGRAFT) DE SARCOMA SINOVIAL
PEDIÁTRICO E ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE
ESFEROIDES (3D)**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biomédicas.

Campinas, 04 de dezembro de 2024.
(data da defesa)

BANCA EXAMINADORA



Prof. Larissa Akemi Kido de Barros
Centro Infantil Boldrini

Prof. Claudia Helena Pellizzon
Unesp

Prof. Luís Fernando Barbizan
Unesp

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa nº 2023/14392-0.

Ao Centro Infantil Boldrini e à orientadora Larissa Akemi Kido de Barros pelo auxílio durante o projeto.

Aos professores Claudia Helena Pellizzon e Luís Fernando Barbisan por comporem a banca do TCC.

RESUMO

O sarcoma sinovial é um dos tipos de tumores que mais afeta as populações entre 0 e 19 anos de idade e é considerado o sarcoma de partes moles não-rabdomiossarcoma mais comum nessa faixa etária. Nesse contexto, a medicina de precisão surge para auxiliar no desenvolvimento de tratamentos mais efetivos e menos tóxicos para os pacientes pediátricos, sendo baseadas nas particularidades de cada um dos pacientes. A confirmação da semelhança das características morfológicas dos tumores que crescem nos modelos xenoenxerto derivados de pacientes (PDX) e dos pacientes se torna indispensável. Para isso, analisamos os tumores de sete pacientes que cresceram em camundongos NSG provenientes do projeto PRONON “Medicina de Precisão Aplicada ao Câncer Infanto-Juvenil” (NUP: 25000.211368/2019-41), o qual encontra-se plenamente alinhado a todas as regulamentações da Ministério da Saúde e Comissão de Ética em Pesquisa (CEP). Os tumores coletados de duas gerações de camundongos NSG foram previamente emblocados em parafina. Os blocos foram cortados e a coloração com hematoxilina e eosina (H.E) realizada. As lâminas coradas foram fotografadas e analisadas, com o auxílio da médica patologista do Centro Infantil Boldrini, comparando características morfológicas com as lâminas de biópsia dos pacientes. Os resultados dessas análises demonstraram que as amostras xenoenxertadas recapitularam o padrão histomorfológico do tumor original, sendo todas classificadas como sarcoma sinovial. No entanto, também foi observado que nas amostras xenoenxertadas houve aumento da agressividade tumoral, fato indicado pela presença aumentada de figuras mitóticas típicas e atípicas e aquisição de um fenótipo mais indiferenciado quando comparadas às lâminas do paciente. Além disso, foram realizadas validações ortogonais do modelo de xenoenxerto, com FISH e RT-PCR, que confirmaram a estabilidade molecular do modelo. Além disso, o tratamento de esferoides derivados de amostras de PDX com drogas alvo-dirigidas e epigenéticas resultou na redução da viabilidade celular. Assim, pode-se concluir que o modelo de xenoenxerto apresenta estabilidade molecular e histopatológica em aproximadamente 86% dos casos, conforme descrito na literatura, sendo, portanto, uma ferramenta robusta e confiável para estudos. Adicionalmente, a cultura tridimensional a partir de células originadas do xenoenxerto demonstra um grande potencial para pesquisas futuras.

ABSTRACT

Synovial sarcoma is one of the types of tumors that most affects people between the ages of 0 and 19 and is considered the most common non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcoma in this age group. In this context, precision medicine has emerged to help develop more effective and less toxic treatments for pediatric patients, based on the particularities of each patient. Confirming the similarity of the morphological characteristics of tumors growing in patient-derived xenograft (PDX) models and those of patients is essential. To this end, we analyzed the tumors of seven patients that grew in NSG mice from the PRONON project “Precision Medicine Applied to Child and Adolescent Cancer” (NUP: 25000.211368/2019-41), which is fully in line with all the regulations of the Ministry of Health and the Research Ethics Committee (CEP). Tumors collected from two generations of NSG mice were previously embedded in paraffin. The blocks were cut and stained with hematoxylin and eosin (H.E). The stained slides were photographed and analyzed with the help of a pathologist from the Boldrini Children's Center, comparing morphological characteristics with the patients' biopsy slides. The results of these analyses showed that the xenografted samples recapitulated the histomorphological pattern of the original tumor and were all classified as synovial sarcoma. However, it was also observed that in the xenografted samples there was an increase in tumor aggressiveness, a fact indicated by the increased presence of typical and atypical mitotic figures and the acquisition of a more undifferentiated phenotype when compared to the patient slides. In addition, orthogonal validations of the xenograft model were carried out using FISH and RT-PCR, which confirmed the molecular stability of the model. Furthermore, treatment of spheroids derived from PDX samples with target-directed and epigenetic drugs resulted in reduced cell viability. Thus, it can be concluded that the xenograft model shows molecular and histopathological stability in approximately 86% of cases, as described in the literature, and is therefore a robust and reliable tool for studies. In addition, the three-dimensional culture of cells originating from the xenograft shows great potential for future research.

SUMÁRIO

1. Introdução	8
2. Metodologia	11
3. Resultados	15
4. Discussão	28
5. Conclusão	30
6. Referências Bibliográficas	31

1. INTRODUÇÃO

O câncer infantojuvenil é um conjunto de doenças que apresenta características próprias, em relação à histopatologia e ao comportamento clínico (Little, 1999), correspondendo entre 1% e 4% de todos os tumores malignos na maioria das populações entre 0 e 19 anos. (INCA, 2016). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) estimou, em 2021, que no mundo aproximadamente 215.000 novos casos de câncer ao ano são diagnosticados em crianças menores de 15 anos, e cerca de 85.000 em adolescentes entre 15 e 19 anos. (Silva, 2021). Em 2020, no Brasil, ocorreram 2.289 mortes por câncer infantojuvenil (38,20 por milhão) e para o triênio 2023 a 2025 foram estimados 7.930 novos casos (INCA, 2022).

Os tipos de câncer mais frequentes na infância e adolescência são as leucemias, tumores no sistema nervoso central e os linfomas. Também acometem crianças e adolescentes o neuroblastoma, tumor de Wilms, retinoblastoma, tumores germinativos, osteossarcoma e sarcomas. (Spironello et al., 2020). Os sarcomas de partes moles correspondem entre 4% e 8% de todos os cânceres na infância (de 0 a 14 anos). A taxa de incidência mundial desse grupo como um todo está ao redor de 11 casos por milhão. Enquanto no Brasil, a taxa média de incidência da população infantil (de 0 a 14 anos) foi de 2%, já para a população de crianças e adolescentes (de 0 a 19 anos) foi de 3%. (INCA, 2016).

O sarcoma sinovial é um tumor maligno, classificado pela Organização Mundial da Saúde como um tumor de partes moles do tipo NTRK (*neurotrophic tropomyosin kinase receptor*) - neoplasia de células fusiformes rearranjadas (Sbaraglia et al., 2020). Em crianças, o sarcoma sinovial é o sarcoma de partes moles não-rabdomiossarcoma mais comum, representando entre 26% - 36% desses cânceres. (Blay et al., 2023).

Em 1995, os pesquisadores Enzinger e Weiss classificaram os sarcomas sinoviais em quatro grupos com base na sua morfologia microscópica: bifásico, monofásico fusocelular, monofásico epitelial e pouco diferenciado. O sarcoma bifásico é facilmente reconhecido pela coexistência de componentes distintos de células epiteliais e fusiformes, com estruturas pseudo-glandulares. O tipo monofásico, porém, devido ao seu crescimento semelhante a outros sarcomas, pode representar maior dificuldade ao diagnóstico histopatológico (LIMA et al., 2005). Em relação ao perfil molecular, o sarcoma sinovial apresenta uma translocação característica entre o cromossomo 18 e o X, t(X;18) (p11; q11), presente em mais de 90% deles, o que pode auxiliar no diagnóstico em casos não característicos (Corrêa et al. , 2005).

Os sarcomas sinoviais são tumores agressivos, que apresentam uma taxa de recidiva em torno de 25% dos casos (Soole et al, 2014). Dados obtidos pelo banco de dados SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Result) apresentam uma taxa de sobrevida livre de metástases em 5 anos em torno de 85,3% (Blay et al., 2023). A detecção de metástase ocorre principalmente nos pulmões e linfonodos (Blay et al., 2023). Quando o tumor está localizado, o tratamento envolve a ressecção inicial, além de tratamentos auxiliares, incluindo combinação quimioterápica de doxorrubicina e ifosfamida, dependendo da estratificação de risco individual (Blay et al., 2023). Quanto à resposta à quimioterapia, apresentam índices mais altos do que o restante dos sarcomas em adultos e índices de sobrevida doença-específica em cinco anos de 57 a 63% (Corrêa et al., 2005). No entanto, em comparação com o rabdomiossarcoma, por exemplo, o sarcoma sinovial está associado a um mau prognóstico em crianças e adolescentes (Kerouanton et al., 2014).

O desenvolvimento de protocolos para o tratamento do sarcoma sinovial tem impacto direto na melhora e na sobrevida dos pacientes e isso se deve, sobretudo, ao desenvolvimento da estratificação de risco das terapias e às abordagens multimodais (Kieuhua, et al., 2020). Nesse contexto, a medicina de precisão se destaca como prática clínica cujo objetivo é encontrar terapias mais eficazes e menos tóxicas para o tratamento de crianças com câncer (Kieuhua, et al., 2020). O câncer pediátrico tem tido destaque como área de estudo para medicina de precisão e o desenvolvimento de técnicas mais eficientes de cuidado clínico (Mody et al., 2017). Embora os tumores pediátricos normalmente não apresentem alterações direcionáveis, como as que são encontradas em cânceres de adultos, eles parecem ser causados por fusões de genes direcionáveis (Mody et al., 2017). O uso de medicamentos inicialmente desenvolvidos para câncer de adultos no tratamento de câncer pediátrico que compartilha a mesma alteração molecular tem feito com que novos estudos clínicos voltados para a pediatria sejam realizados (Mody et al., 2017). Dentre eles, estão os estudos com modelos de xenoenxerto ou culturas tridimensionais estabelecidas a partir de tumores ressecados de pacientes que podem ser muito efetivos na medicina personalizada, pois refletem as propriedades reais do tumor primário e permitem testes bioquímicos *in vitro*. Esses testes podem realizar a triagem de múltiplos medicamentos eficazes em um curto espaço de tempo ou descobrir novas drogas para o tratamento (Shiihara & Furukawa et al., 2022).

Resultados iniciais de um estudo de medicina de precisão pediátrico desenvolvido na Europa, entre 2016 e 2017, pelo estudo clínico *Molecular Profiling for Pediatric and Young Adult Cancer Treatment Stratification* (MAPPYACTS) encontrou alterações genéticas que

favoreciam o uso de tratamentos específicos (Costa et al., 2023). Esse estudo utilizou o modelo PDX (*patient-derived xenograft*), que se baseia no xenoenxerto do tumor primário do paciente em camundongos imuno deficientes (Costa et al., 2023). Essa técnica preserva a estrutura do tumor e ajuda a recriar com mais precisão o microambiente tumoral (McNerney et al., 2021). Os camundongos reproduzem as características clínicas e patológicas do tumor de origem, como o crescimento tumoral e a diversidade de células (Gasparini et al., 2023).

Além dos modelos *in vivo*, o uso de cultura celular 3D também se destaca como uma ferramenta capaz de recapitular de forma aproximada o microambiente tumoral, permitindo o estudo *in vitro* de diversos tipos de câncer, incluído o pediátrico (McNerney et al., 2021). Quando comparado com a cultura 2D, os sistemas de cultura tridimensionais produzem informações mais completas sobre mecanismos biológicos pelos quais os diferentes tipos celulares interagem entre si, incluindo a sinalização com a matriz extracelular, além de se autorrenovar e poder se organizar para se assemelhar ao órgão original ou ao tumor em termos de estrutura e função (Gao et al., 2017; Shiihara & Furukawa, 2022). Devido à sua capacidade de rápido crescimento sob condições adequadas, o uso de esferoides é extremamente útil na pesquisa translacional, pois permite a triagem em larga escala de medicamentos candidatos identificados por análises multiômicas, como também na triagem de medicamentos direcionados utilizados na imunoterapia e radioterapia. (Shiihara & Furukawa, 2022).

O presente trabalho, portanto, tem como objetivo deste caracterizar e validar as amostras de PDX de sarcoma sinovial e estabelecer a cultura de esferoides a partir das amostras xenotransplantadas. Para isso, as amostras tumorais de sarcoma sinovial em PDX de primeira e segunda geração serão caracterizadas histologicamente e comparadas com as amostras primárias dos pacientes; avaliadas quanto aos padrões moleculares, se os achados na amostra do paciente se mantêm nos PDX. Além de estabelecer a cultura 3D das amostras xenotransplantadas que apresentarem maior semelhança com as amostras do respectivo paciente e avaliar a viabilidade *in vitro* destes esferoides após tratamento com drogas alvo-dirigidas.

2. METODOLOGIA

2.1. Amostras

Todas as amostras (Tabela 1) que foram utilizadas neste projeto são derivadas de xenoenxertos realizados em camundongos NSG provenientes do projeto PRONON “Medicina de Precisão Aplicada ao Câncer Infanto-Juvenil” (NUP: 25000.211368/2019-41), o qual encontra-se plenamente alinhado a todas as regulamentações da Ministério da Saúde e Comissão de Ética em Pesquisa (CEP). Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE): 44219021.6.0000.5376. Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA): 0017-2021.

Tabela 1. Informações das amostras de xenoenxerto de sarcoma sinovial.

Identificação	Geração	Diagnóstico	Duração do PDX (meses)
PDX1.SSPT_1	1ª	Sarcoma Sinovial SOE (M90403)	5.5
PDX1.SSPT_2	1ª	Sarcoma Sinovial Bifásico (M90433)	8.1
PDX1.SSPT_3	1ª	Sarcoma Sinovial SOE (M90403)	3.3
PDX1.SSPT_4	1ª	Sarcoma Sinovial de Células Epitelioides (M90423)	6.2
PDX1.SSPT_5	1ª	Sarcoma Sinovial Bifásico (M90433)	2.3
PDX1.SSPT_6	1ª	Sarcoma Sinovial Bifásico (M90433)	1.8
PDX1.SSPT_7	1ª	Sarcoma Sinovial SOE (M90403)	5.5
PDX2.SSPT_1	2ª	Sarcoma Sinovial SOE (M90403)	2.1
PDX2.SSPT_2	2ª	Sarcoma Sinovial Bifásico (M90433)	5.3
PDX2.SSPT_3	2ª	Sarcoma Sinovial SOE (M90403)	1.5
PDX2.SSPT_4	2ª	Sarcoma Sinovial de Células Epitelioides (M90423)	1.8
PDX2.SSPT_5	2ª	Sarcoma Sinovial Bifásico (M90433)	3.9
PDX2.SSPT_6	2ª	Sarcoma Sinovial Bifásico (M90433)	1.2
PDX2.SSPT_7	2ª	Sarcoma Sinovial SOE (M90403)	6.9

2.1.1. Rotina histológica e coloração hematoxilina-eosina

As amostras de PDX (Tabela 1) foram seccionadas no micrótomo CUT 5062 (Slee Medical GmbH, Alemanha) (4µm de espessura) e coletadas em lâminas para microscopia (silanizadas ou não). As secções histológicas foram coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). A análise histopatológica das amostras tanto do paciente, quanto dos PDXs foi realizada com o auxílio da patologista do Centro Infantil Boldrini, Dra. Izilda Aparecida Cardinalli. Os critérios avaliados foram (1) intensidade celular, (2) tipo celular, (3) número de mitoses e de mitoses atípicas, (4) necrose e hemorragia, (5) tecido infiltrado inflamatório, (6) vasos sanguíneos, (7) fibras colágenas e (8) presença de alguma particularidade do tumor.

2.2. Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH)

Fragmentos de tumor de PDX de primeira geração e de pacientes foram dissociados mecanicamente em meio de cultura. A amostra dissociada foi adicionada em um tubo com 5 mL de meio de cultura e homogeneizado. O tubo foi levado para centrifugar por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi homogeneizado com 5 mL KCl. A amostra foi incubada por 20 minutos em banho-maria a 37°C, lavada com fixador de Carnoy e centrifugada novamente. Depois do processo de lavagem, 4 µL de amostra foi pipetado sobre uma lâmina de microscopia. Sobre a amostra, foi adicionado 1 µL da sonda SS18 Break Apart FISH Probe. Depois de duas horas, a lâmina foi lavada e 2 µL de DAPI foram adicionados sobre a amostra, que foi analisada em microscópio.

2.3. RT-PCR

RNA foi extraído das amostras de tumor de PDX de segunda geração seguindo o protocolo Kit RNAeasy Mini Qiagen (Sigma-Aldrich). Foi realizada a síntese de cDNA, seguindo o protocolo GoScript Reverse Transcription System, padronizado no laboratório. O cDNA sintetizado foi diluído em água, adicionado a Cloreto de Magnésio, dNTP, GoTaq G2 e aos primers referentes às translocações SS18-SSX1, SS18-SSX2 e SS18-SSX4, indicados na Tabela 2, e levados ao termociclador durante o período padronizado pelo laboratório de análises clínicas do hospital.

Tabela 2. Sequências dos primers.

Nome	Sequência 5'-3'
SSX1R	ACACTCCCTTCGAATCATTTTCG
SSX2R	GCACTTCCTCCGAATCATTTTC
SSX4R	GCACTTCCTTCAAACCATTTTCT
SSXF	AGACCAACACAGCCTGGACCAC

2.4. Cultura Celular

2.4.1. Dissociação tumoral

As amostras provenientes dos xenoinxertos de 1ª geração (3 fragmentos / 4x4mm por animal) foram descongeladas em banho-maria a 37°C e imediatamente lavadas 3 vezes com 25 - 40 mL de PBS. Após a lavagem, os fragmentos foram medidos e, com o auxílio de um bisturi, cortados até a completa dissociação (ou o máximo possível). Então, o tecido dissociado foi ressuspenso em 2 mL da solução enzimática (já padronizado no laboratório) e incubado por 20 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO₂ homogeneizando a placa a cada 5 minutos. Para inativar a ação enzimática, foi adicionado volume de meio de cultura suplementado com

antibiótico/antimicótico e soro fetal bovino (SFB). O homogenato foi filtrado no *cell strainer* (100µm) e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos, o *pellet* ressuspendido em 5 mL da solução BSA 4%, e novamente centrifugado por 1200 rpm por 10 minutos. O *pellet* de células foi ressuspendido em 1 mL de meio DMEM/F-12 (Meio de Eagle modificado por Dulbecco/Mistura de nutrientes de Ham F-12) suplementado com 10% SFB + 1% penicilina/estreptomicina (Penicilina: 10.000 U.I./mL e Estreptomicina: 10 mg/mL). Após a completa dissolução do *pellet*, completar com o volume adequado de meio para realizar a contagem das células com a câmara de Neubauer.

2.4.2. Cultivo celular 3D

Após a dissociação, foi reservada a quantidade de células necessárias para realizar o plaqueamento dos esferoides com 2×10^4 células/poço em placa de 96 poços com superfície com baixa adesão celular com fundo em U (Nunc™ Sphera™ Microplates - 174927) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). As células foram ressuspendidas em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. Cada poço recebeu volume total de 150 µL + células. A placa foi armazenada em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e houve o acompanhamento da formação dos esferoides diariamente utilizando o microscópio invertido (MOTIC AE 2000, referência 1100103800029) para realizar a documentação fotográfica. A troca de meio de cultura foi realizada a cada 2 dias.

2.4.3. Teste de drogas

Depois de sete dias de plaqueamento, os esferoides foram tratados com quatro doses (0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM e 10 µM) das drogas quimioterápicas Selumetinib (Cayman Chemicals) e Trametinib (Cayman Chemicals). Foram feitos acompanhamento e documentação fotográfica durante 72 horas. Depois desse período, o teste de viabilidade foi realizado e calculado o IC₅₀ de cada droga. Com essa informação, novos esferoides foram tratados com Selumetinib (doses: 0,34 µM; 1,04 µM e 3,12 µM), Trametinib (doses: 0,016 µM; 0,04 µM; 0,01 µM e 0,1 µM) e Panobinostat (Sigma-Aldrich) (doses: 0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM e 10 µM).

2.4.4. Teste de viabilidade (ATP-Glo™ Bioluminometric Cell Viability Assay)

Após 72 horas do tratamento com as drogas, os esferoides foram transferidos para uma placa branca de 96 poços com 25 µL de meio de cultura. Em cada poço, foram adicionados 25 µL do reagente do kit ATP-Glo™ Bioluminometric Cell Viability Assay. A placa colocada em um agitador por 5 minutos a 800 rpm. Em seguida, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e a placa foi incubada por 25 minutos, protegida da luz, em agitação branda. Depois desse tempo,

a placa foi levada para o Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek®), onde foi realizada a leitura por luminescência de cada um dos poços. Os dados obtidos foram analisados pelo GraphPad Prism.

3. RESULTADOS

3.1. Processamento Histológico

O processamento histológico de tumores de sarcoma sinovial que haviam sido previamente implantados em camundongos imunossuprimidos (NSG), coletados e armazenados em blocos de parafina foi realizado, bem como a comparação com as lâminas do diagnóstico dos pacientes.

O paciente SSPT_1 foi diagnosticado como um sarcoma sinovial pouco diferenciado metastático para linfonodo, o qual foi caracterizado pela presença predominantes de células pequenas de núcleo ovalado com nucléolo evidente, além de células fusiformes e presença de figuras mitóticas típicas e atípicas (18/mm²) (Figura 1a.). O PDX de primeira geração (PDX1.SSPT_1), por sua vez, reproduziu o mesmo padrão indiferenciado e hiper celular encontrado na amostra do paciente e destacou-se pelo aumento de figuras mitóticas (28/mm²) (Figura 1b). Os xenoinxertos de segunda geração mantiveram padrão morfológico semelhante aos de primeira geração, exceto pelo aumento da frequência de mitoses atípicas (Figura 1c).

No caso SSPT_3, diagnosticado como sarcoma sinovial bifásico metastático, é possível observar claramente o padrão morfológico epitelióide, remetendo a estruturas glandulares e ao redor estroma de padrão sarcomatoide (Figura 1d). A amostra do PDX de primeira geração apresentou-se completamente necrótica, fato que impossibilitou a análise histopatológica (Figura 1e). No entanto, nos xenoinxertos de segunda geração foi possível observar células pequenas, redondas e indiferenciadas e a presença de figuras mitóticas (40/mm²) (Figura 1f).

O paciente SSPT_6, diagnosticado como sarcoma sinovial bifásico metastático para o pulmão, apresenta células redondas de pequeno e médio tamanho organizadas de forma agrupada (Figura 1g). É possível identificar a presença de figuras mitóticas típicas (5/mm²) e atípicas. A amostra do PDX de primeira geração (Figura 1h) apresentou hiper celularidade, células fusiformes, maior presença de figuras mitóticas típicas (20/mm²) (Figura 1h1) e atípicas. Nos PDXs de segunda geração, foi possível observar hiper celularidade e a presença de células fusiformes. Houve um aumento no número de figuras mitóticas típicas (45/mm²).

No caso SSPT_4, diagnosticado como sarcoma sinovial monofásico, apresenta predomínio de células epitelióides de tamanho médio-grande e citoplasma escasso, com núcleo ovalado, nucléolos evidentes e extensas áreas de necrose tecidual. Foi possível identificar a presença de necrose e de figuras mitóticas típicas (11/mm²) e atípicas (Figuras 1j). Nesse caso, é importante ressaltar que o paciente recebeu quimioterapia pré-ressecção cirúrgica. No PDX de primeira geração é possível observar a presença de células grandes redondas e

indiferenciadas. Houve um aumento no número de mitoses típicas ($27/\text{mm}^2$) (Figura 1k). Nos xenoinxertos de segunda geração, observa-se células pequenas, redondas e indiferenciadas, com presença de figuras mitóticas típicas ($13/\text{mm}^2$) e atípicas (Figura 1l).

O paciente SSPT_5, observado na Figura 1m, diagnosticado como sarcoma sinovial bifásico, apresenta células pequenas, redondas e fusiformes com citoplasma acidófilo. Foi possível observar a presença de figuras mitóticas típicas ($11/\text{mm}^2$) e atípicas. O PDX de primeira geração apresentou as mesmas características histopatológicas do sarcoma sinovial bifásico que a amostra do paciente, tanto em hipercelularidade quanto no tipo celular, destacando o discreto aumento no número de mitoses típicas ($15/\text{mm}^2$) (Figura 1n). Já o PDX de segunda geração (Figura 1o), apesar de manter as características do tumor do paciente, apresentou um maior número de figuras mitóticas típicas ($36/\text{mm}^2$) e de mitoses atípicas ($16/\text{mm}^2$).

O paciente SSPT_7 foi diagnosticado com sarcoma sinovial monofásico metastático para pulmão, composto por células fusiformes de citoplasma acidófilo e núcleo de cromatina delicada. Foi possível observar a presença de figuras mitóticas típicas ($6/\text{mm}^2$) e atípicas (Figura 1p). O PDX de primeira geração (Figura 1q) apresenta células redondas e indiferenciadas, com aumento de figuras mitóticas típicas ($40/\text{mm}^2$) (Figura 1q1) e atípicas. O PDX de segunda geração apresentou células redondas e indiferenciadas, uma área necrótica maior e a presença de figuras mitóticas típicas ($39/\text{mm}^2$) e atípicas.

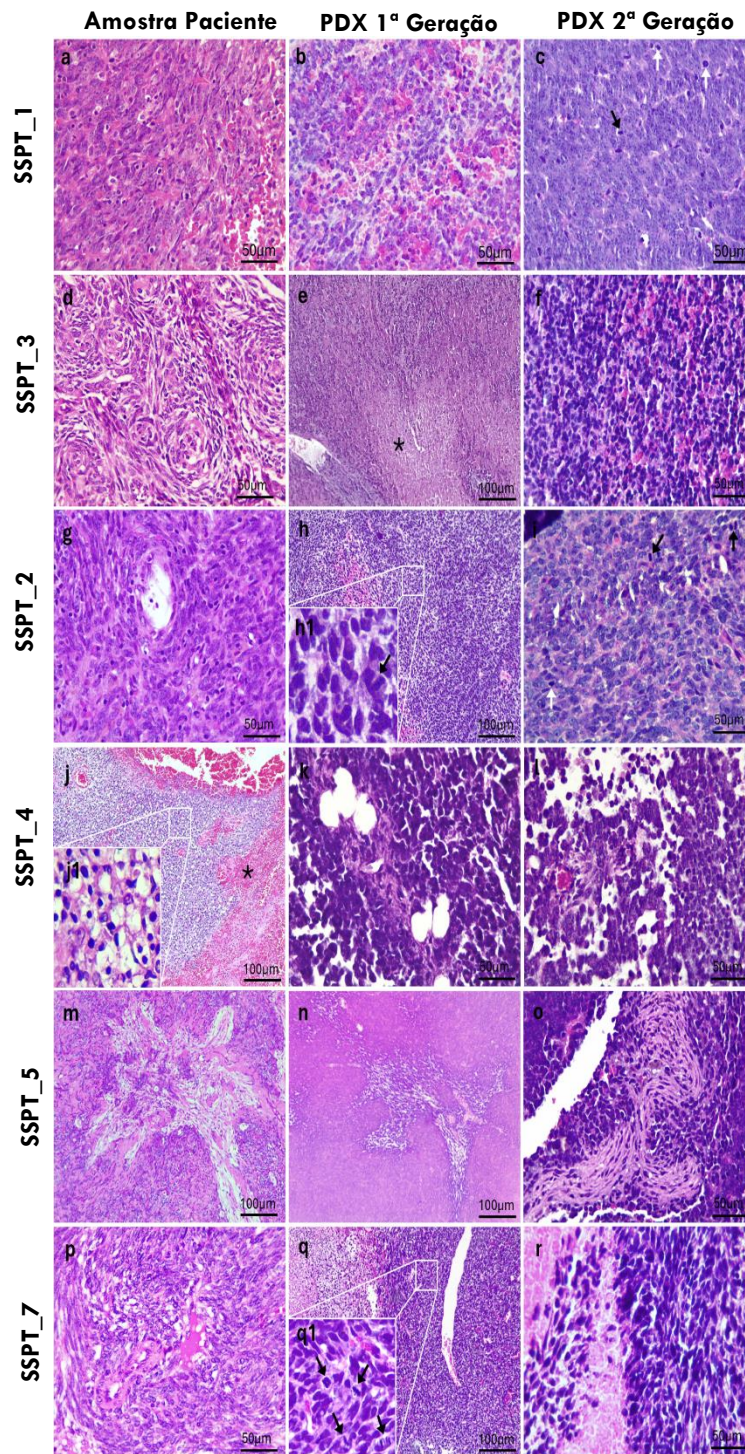


Figura 1. Fotomicrografias provenientes de amostras tumorais de sarcoma sinovial de pacientes pediátricos e seus respectivos xenoinxertos expandidos em camundongos NSG. As imagens dispostas nas linhas são compostas de secções histológicas do tumor do paciente seguida pelos tumores xenoinxertados de 1º e 2ª geração. Amostras tumorais humanas: (a,d,g,m) Sarcoma sinovial bifásico; (j) Sarcoma sinovial de células epitelióides; (p) Sarcoma sinovial monofásico. Amostras de xenoinxerto de 1ª geração (b,e,h,k,n). Amostras de xenoinxerto de 2ª geração (c,f,i,l,o,r). (h1, j1, q1: insets). Observa-se aumento da agressividade tumoral nas amostras xenoinxertadas representado pela perda do arranjo tecidual e instabilidade cromossômica indicadas pela presença de figuras mitóticas atípicas (seta branca). Setas pretas: figuras mitóticas; Setas brancas: figuras mitóticas atípicas; asterisco (*) áreas necróticas. Coloração: hematoxilina-eosina.

3.2.HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

A análise das amostras que passaram pela técnica FISH, apresentadas na Figura 3, indicam um dos cromossomos SS18 foi rearranjado com o cromossomo SSX do paciente, identificados pelos pontos verde e vermelho separados, e o outro cromossomo está íntegro, identificado pelos pontos verde e vermelho juntos. Os pacientes SSPT_1 e SSPT_5 apresentaram um gene íntegro e outro que sofreu o rearranjo tanto na amostra do paciente quanto à que foi expandida em camundongos imunodeficientes. As amostras referentes aos pacientes SSPT2 e SSPT_7, bem como as amostras xenoenxertadas, apresentaram um ganho de sinal do cromossomo SS18, indicado pela presença de mais pontos verdes na figura 3 (3e, 3f, 3j e 3k). No entanto, a amostra do PDX SSPT_3 (Figura 3d) não apresentou rearranjo.

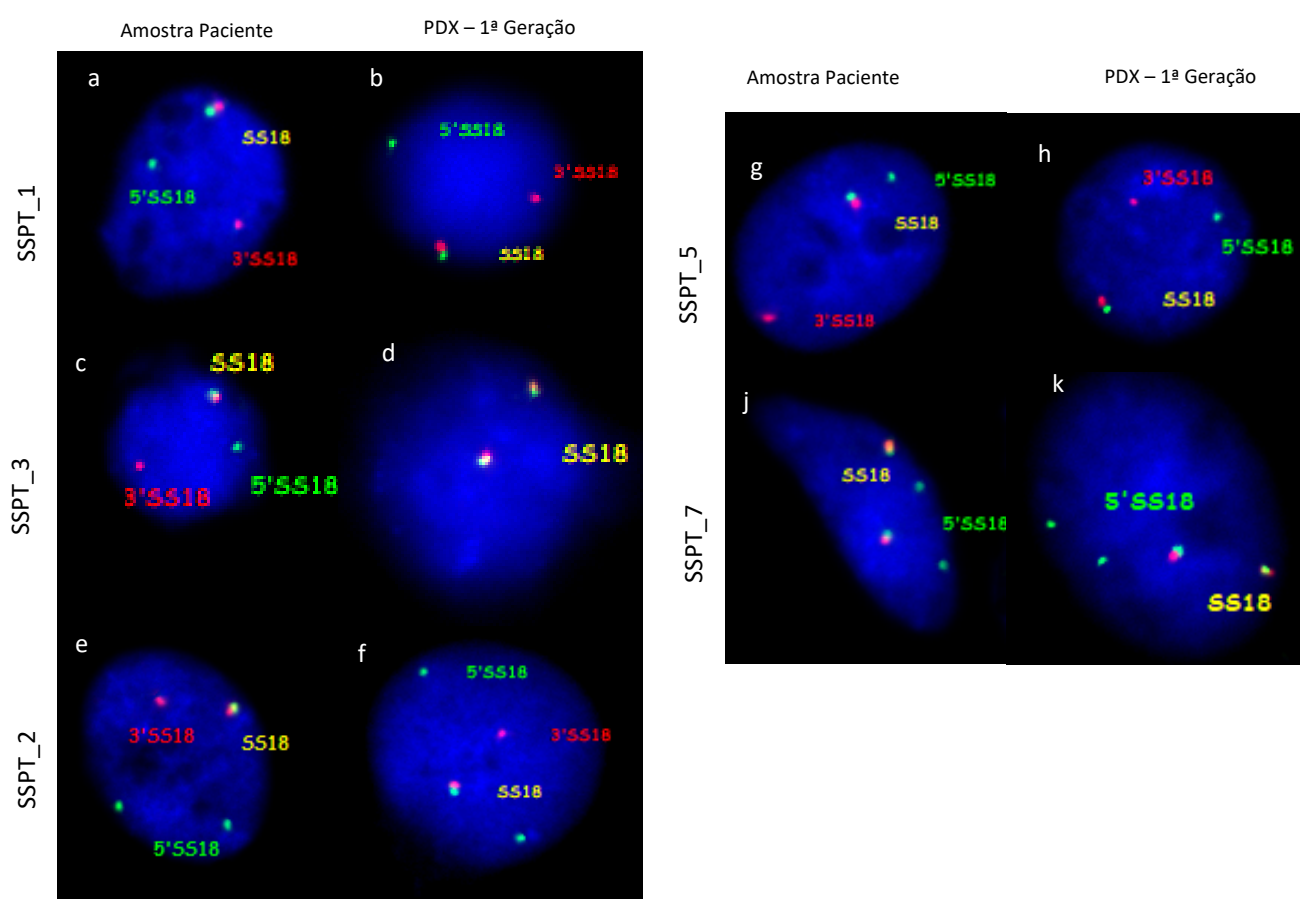
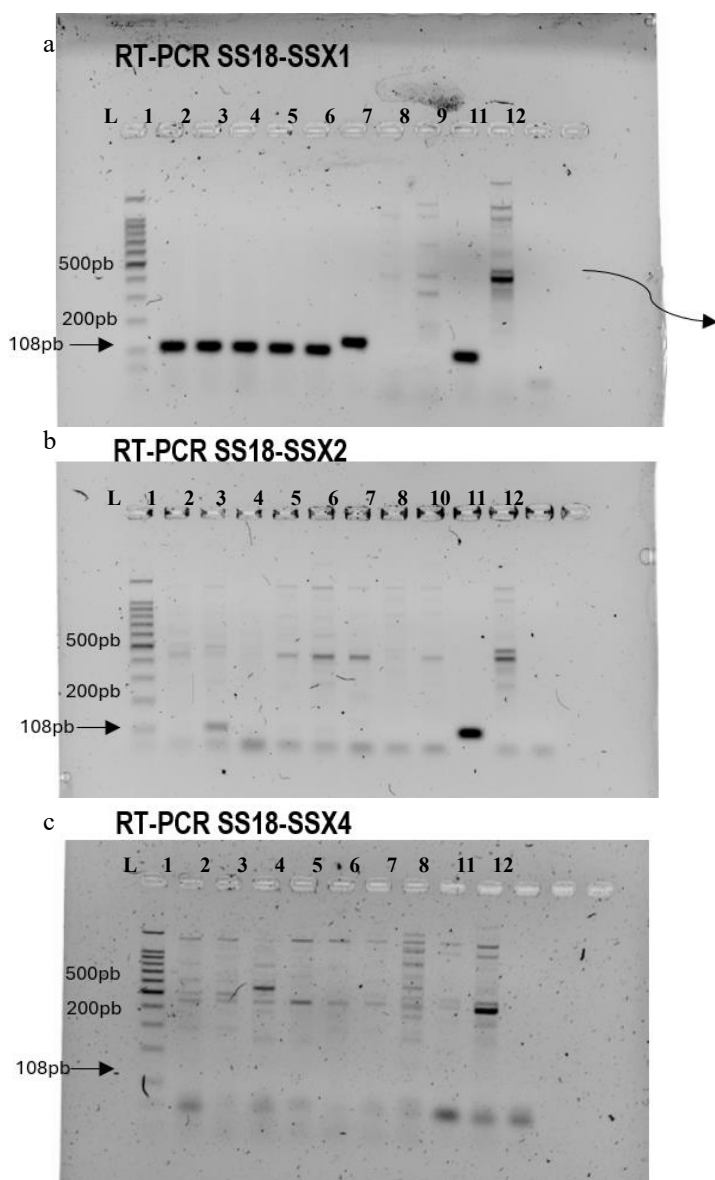


Figura 3. Imagem do FISH de pacientes (a, c, e, g e j) e de PDX de primeira geração (b, d, f, h e k). Todas as amostras de pacientes apresentaram rearranjo. As amostras de PDX b, f, h e k apresentaram o rearranjo, enquanto a amostra d não apresentou nenhum rearranjo. As amostras e, f, j e k apresentaram ganho de sinais.

3.3.RT-PCR

O tamanho da banda esperado aparecer no gel é o de 108 bp, indicado pela seta. É importante ressaltar que os dímeros estão abaixo de 100pb, o que é esperado. Na água, há presença da banda de dímero e ela se apresenta mais forte que as demais devido à ausência da amostra e consequentemente acúmulo de primers. Como o resultado observado no FISH, a maior parte dos PDX, apresentou a mesma translocação que o paciente, com exceção do PDX2c1.SSPT_3. Os PDX1a.SSPT_1; PDX1a.SSPT_7; PDX1a.SSPT_5; PDX1b.SSPT_2; PDX1b.SSPT_6; PDX1b.SSPT_8 apresentaram a banda de 108 bp na reação com o primer para SS18-SSX1, como indicado na Figura 4a. Nas reações SS18-SSX2 (Figura 4b) e SS18-SSX4 (Figura 4c) não houve a formação de bandas, indicando não haver nenhuma amostra portadora dessas translocações.



Legenda	Amostra
L	Ladder 100 bp
1	PDX1a.SSPT_1
2	PDX1a.SSPT_7
3	PDX1a.SSPT_5
4	PDX1b.SSPT_2
5	PDX1b.SSPT_6
6	PDX1b.SSPT_8
7	PDX1a.SSPT_4
8	PDX2c1.SSPT_3
9	Controle positivo SS18-SSX1
10	Controle positivo SS18-SSX2
11	Controle negativo
12	Água

Figura 4: Foto do gel de agarose 2%, **L** representa do ladder de 100 bp usado para indicar o tamanho de pares de base amplificado. Na imagem **a**, as amostras **1, 2, 3, 4, 5 e 6** apresentaram amplificação na região de 108 bp. As amostras **7 e 8** não apresentaram amplificação. A amostra **9** apresentou amplificação, por ser um controle positivo. A imagem **b** representa as amostras testadas com o primer para translocação SS18-SSX2. Apenas a amostra **10** apresentou a banda de 108 bp, por ser o controle positivo. A imagem **c** representa as amostras testadas com o primer para a translocação SS18-SSX4. Não havia um controle positivo e, portanto, nenhuma amostra apresentou a banda de 108 bp. A amostra **11** apresentou bandas inespecíficas, por ser o controle negativo, e a amostra **12** era composta apenas por água e primers, como controle negativo da reação.

3.4. CULTURA CELULAR 3D

Como parte do Projeto PRONON “Medicina de Precisão Aplicada ao Câncer Infanto-Juvenil”, amostras de tumores de pacientes do Centro Infantil Boldrini são analisadas através de exoma. Nas análises de pacientes com Sarcoma Sinovial, dois foram selecionados por possuírem mutação em MAP3K. Segundo a literatura, tumores com essa mutação respondem bem a tratamentos com Selumetinib e Trametinib, quimioterápicos inibidores da via MAP3K.

Nas imagens obtidas após 72 horas de tratamento foi possível observar, no esferoide do PDX2.SSPT_6, que houve a perda da compactação celular (Figura 5n), indicando a efetividade do tratamento com Selumetinib. As imagens referentes ao controle positivo (Figuras 5a, 5g e 5m) representam os esferoides tratados com 01% de DMSO e, por isso, não apresentaram a perda da compactação celular. As imagens do controle negativo (Figuras 5f, 5l e 5r) apresentam a perda da compactação celular desde o início do tratamento com 50% de DMSO. Na figura 9a, é possível observar que as doses 0,1 μ M, 1 μ M e 10 μ M de Selumetinib apresentaram dados estatisticamente significantes da redução da viabilidade celular. Na figura 6, as imagens representam os esferoides tratados com Trametinib. É possível observar que nas doses 0,1 μ M (Figuras 6c, 6i e 6o) e 1 μ M (Figuras 6d, 6j e 6p) houve perda da compactação das células que formavam os esferoides. No gráfico da figura 9b, as doses 0,1 μ M e 1 μ M apresentaram dados estatisticamente significantes da perda da viabilidade celular.

Os esferoides referentes ao PDX de segunda geração da amostra SSPT_1 apresentaram perda da compactação celular, exemplificado pela figura 7q. O tratamento com Selumetinib apresentou maior eficácia em todas as doses testadas, bem como o tratamento com Trametinib, indicados pelos gráficos 9c e 9d, respectivamente.

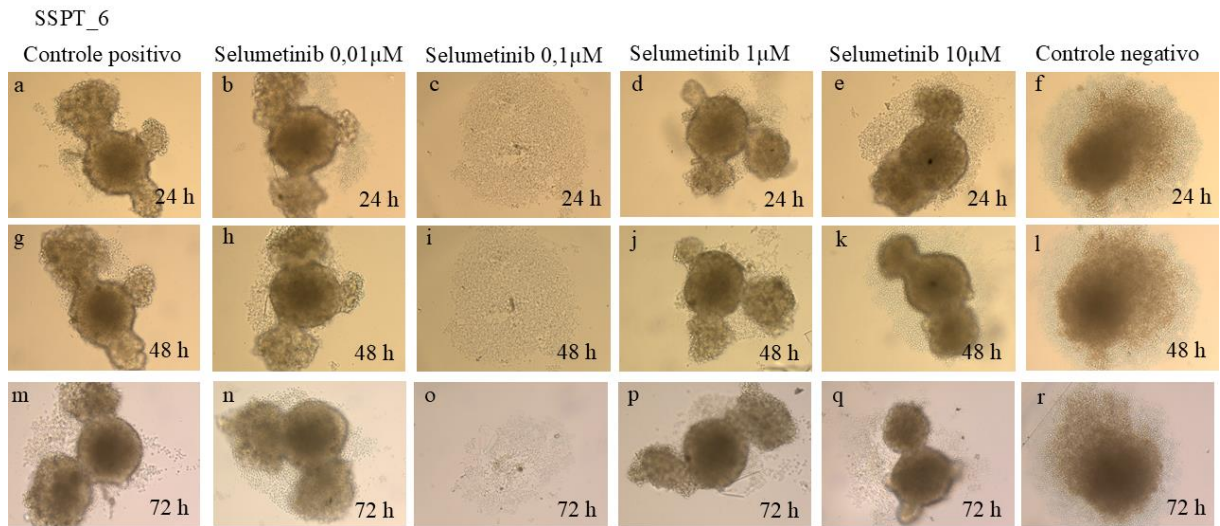


Figura 5: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_6 após 24 (a, b, c, d, e, f), 48 (g, h, i, j, k, l) e 72 (m, n, o, p, q, r) horas da adição das quatro doses de Selumetinib. As fotos a, g, m indicam os esferoides tratados com 0,1% de DMSO e as fotos f, l, r indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos b, h, n indicam os esferoides tratados com a dose 0,01 µM de Selumetinib. As fotos c, i e o indicam os esferoides tratados com a dose 0,1 µM de Selumetinib, porém eles foram perdidos durante a troca de meio. As fotos d, j, p indicam os esferoides tratados com a dose 1 µM de Selumetinib e as fotos e, k, q indicam esferoides que foram tratados com a dose 10 µM de Selumetinib.

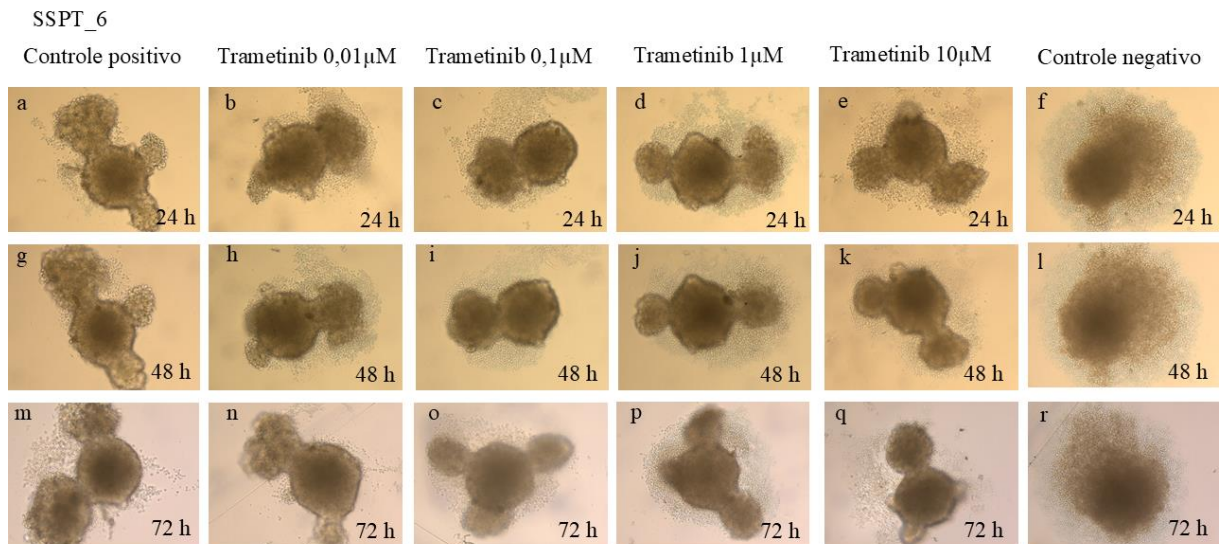


Figura 6: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_6 após 24 (a, b, c, d, e, f), 48 (g, h, i, j, k, l) e 72 (m, n, o, p, q, r) horas da adição das quatro doses de Trametinib. As fotos a, g, m indicam os esferoides tratados com 0,1% de DMSO e as fotos f, l, r indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos b, h, n indicam os esferoides tratados com a dose 0,01 µM de Trametinib. As fotos c, i e o indicam os esferoides tratados com a dose 0,1 µM de Trametinib. As fotos d, j, p indicam os esferoides tratados com a dose 1 µM de Trametinib e as fotos e, k, q indicam esferoides que foram tratados com a dose 10 µM de Trametinib.

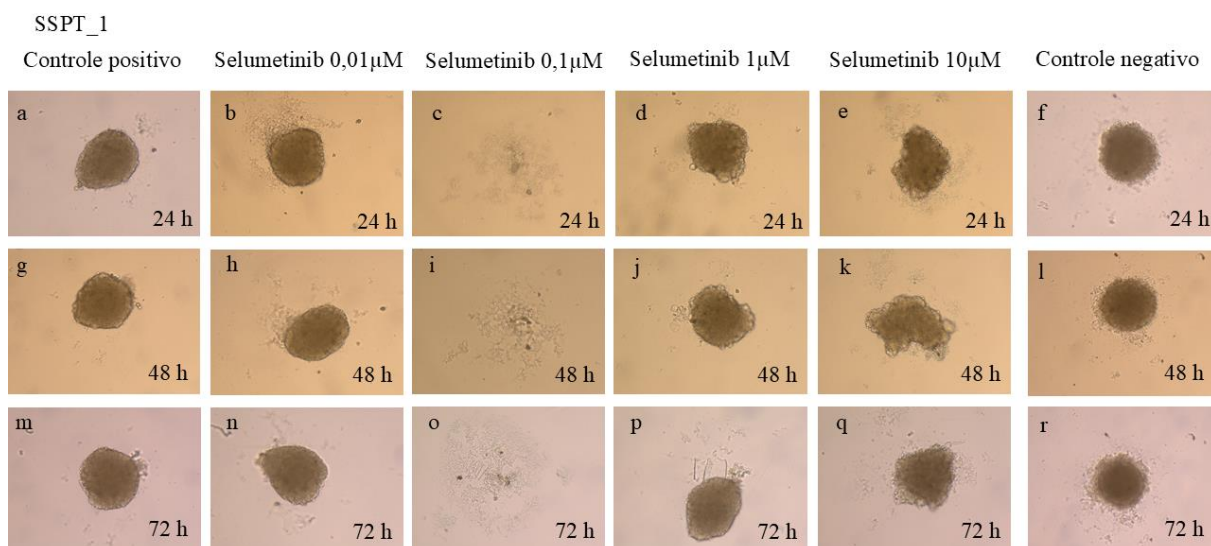


Figura 7: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_1 após 24 (a, b, c, d, e, f), 48 (g, h, i, j, k, l) e 72 (m, n, o, p, q, r) horas da adição das quatro doses de Selumetinib. As fotos a, g, m indicam os esferoides tratados com 0,1% de DMSO e as fotos f, l, r indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos b, h, n indicam os esferoides tratados com a dose 0,01 μ M de Selumetinib. As fotos c, i e o indicam os esferoides tratados com a dose 0,1 μ M de Selumetinib, porém eles foram perdidos durante a troca de meio. As fotos d, j, p indicam os esferoides tratados com a dose 1 μ M de Selumetinib e as fotos e, k, q indicam esferoides que foram tratados com a dose 10 μ M de Selumetinib.

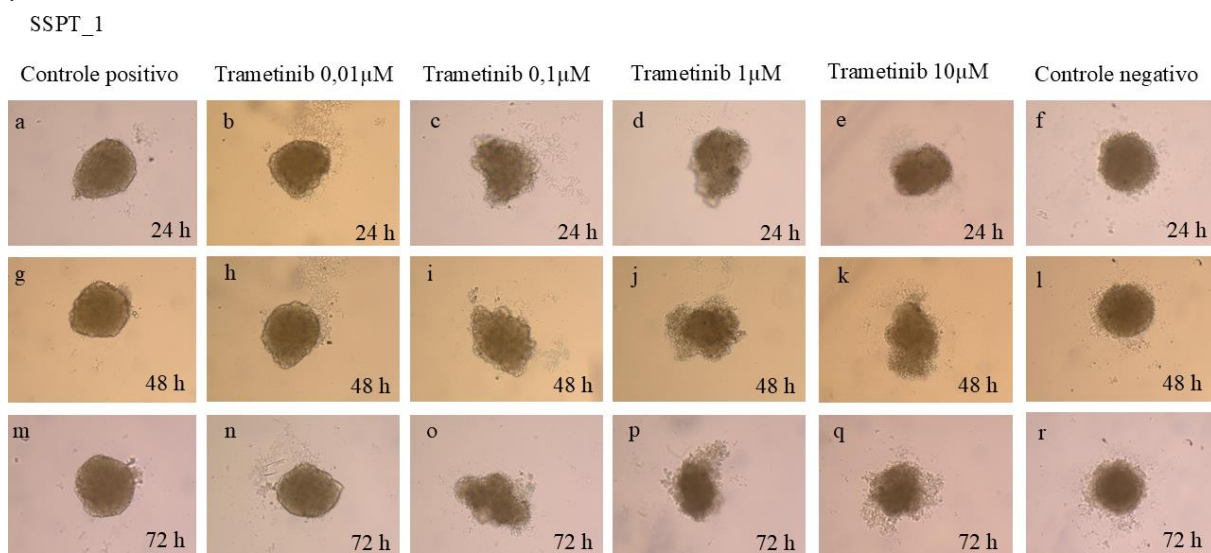


Figura 8: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_1 após 24 (a, b, c, d, e, f), 48 (g, h, i, j, k, l) e 72 (m, n, o, p, q, r) horas da adição das quatro doses de Trametinib. As fotos a, g, m indicam os esferoides tratados com 0,1% de DMSO e as fotos f, l, r indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos b, h, n indicam os esferoides tratados com a dose 0,01 μ M de Trametinib. As fotos c, i e o indicam os esferoides tratados com a dose 0,1 μ M de Trametinib. As fotos d, j, p indicam os esferoides tratados com a dose 1 μ M de Trametinib e as fotos e, k, q indicam esferoides que foram tratados com a dose 10 μ M de Trametinib.

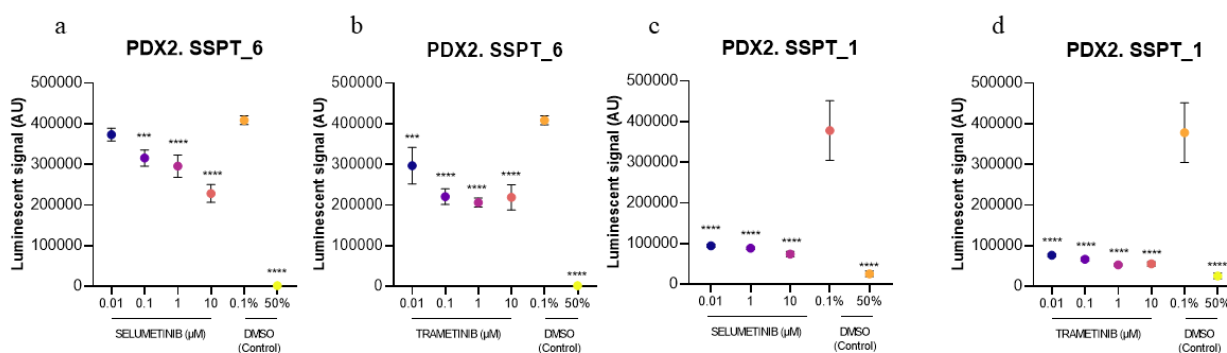


Figura 9: Gráficos do sinal de luminescência indicando a viabilidade celular dos esferoides em cada dose das drogas Selumetinib e Trametinib, comparando com os controles positivos e negativos dos PDX2.SSPT_6 (a e b) e PDX2.SSPT_1 (c e d). Os asteriscos (*) indicam dados estatisticamente significantes quando comparados com o controle tratado com 0,1% de DMSO.

Com os dados obtidos no primeiro teste, novas doses foram selecionadas para tratar esferoides dos mesmos pacientes. Além disso, houve um teste realizado com Panobinostat, uma droga inibidora de HDAC.

Para a amostra PDX2.SSPT_6, as doses de Selumetinib selecionadas foram 0,34 μ M, 1,04 μ M e 3,12 μ M. Houve pouca perda da viabilidade celular em todas as doses, conforme indicado na figura 13a. Para o tratamento com Trametinib, as doses selecionadas foram 0,016 μ M, 0,04 μ M, 0,01 μ M e 0,1 μ M. A perda da viabilidade celular foi estatisticamente significativa nas doses 0,01 μ M e 0,1 μ M quando comparadas com o controle tratado com 0,1% de DMSO (Figura 13b). No tratamento com Panobinostat, houve uma redução significativa da viabilidade celular em todas as doses de tratamento (Figura 12) quando comparadas com o controle tratado com 0,1% de DMSO, indicando a susceptibilidade desse tipo tumoral a tratamentos com drogas epigenéticas (Figura 13c).

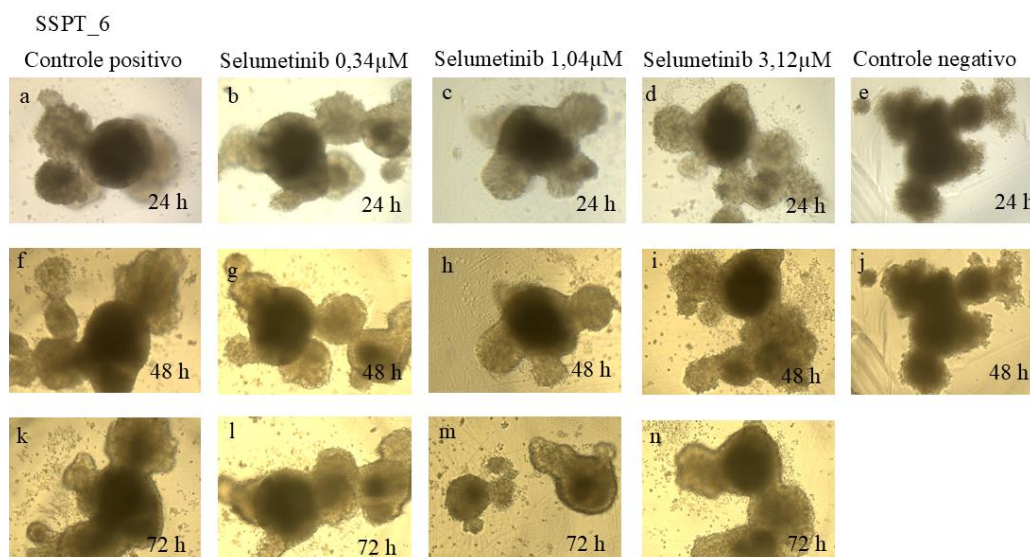


Figura 10: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_6 após 24 (a, b, c, d, e), 48 (f, g, h, i, j) e 72 (k, l, m, n) horas da adição das três doses de Selumetinib. As fotos a, f, k indicam os esferoides tratados com 0,1% de DMSO e as fotos e, j indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos b, g, l indicam os esferoides tratados com a dose 0,34 μM de Selumetinib. As fotos c, h e m indicam os esferoides tratados com a dose 1,04 μM de Selumetinib. As fotos d, i, n indicam os esferoides tratados com a dose 3,12 μM de Selumetinib.

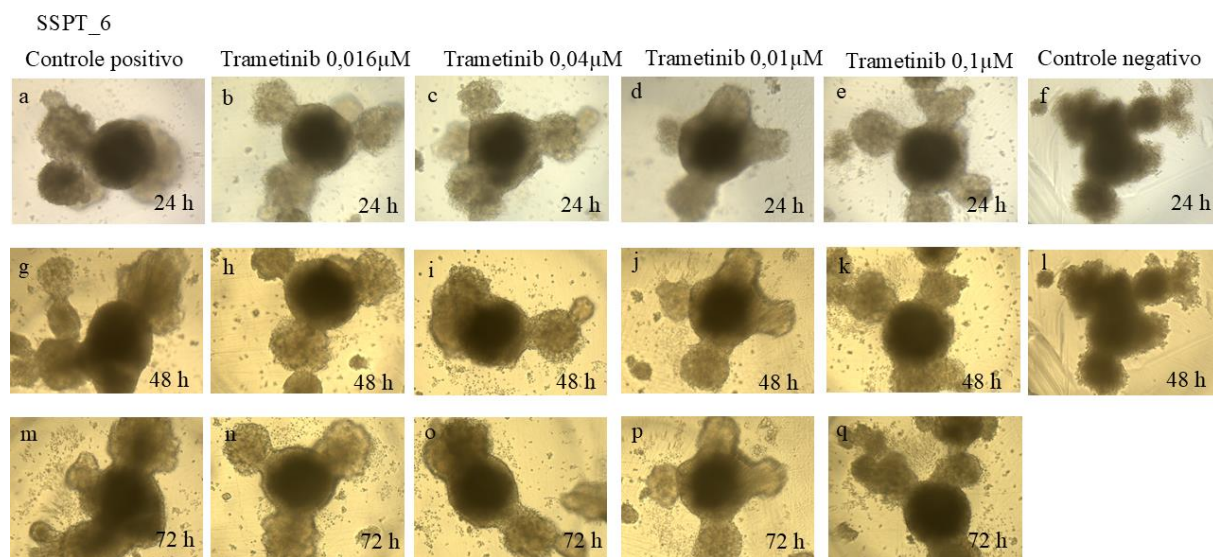


Figura 11: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_6 após 24 (a, b, c, d, e, f), 48 (g, h, i, j, k, l) e 72 (m, n, o, p, q) horas da adição das quatro doses de Trametinib. As fotos a, g, m indicam os esferoides tratados com 0,1% de DMSO e as fotos f, l, r indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos b, h, n indicam os esferoides tratados com a dose 0,016 μM de Trametinib. As fotos c, i e o indicam os esferoides tratados com a dose 0,04 μM de Trametinib. As fotos d, j, p indicam os esferoides tratados com a dose 0,01 μM de Trametinib e as fotos e, k, q indicam esferoides que foram tratados com a dose 0,1 μM de Trametinib.

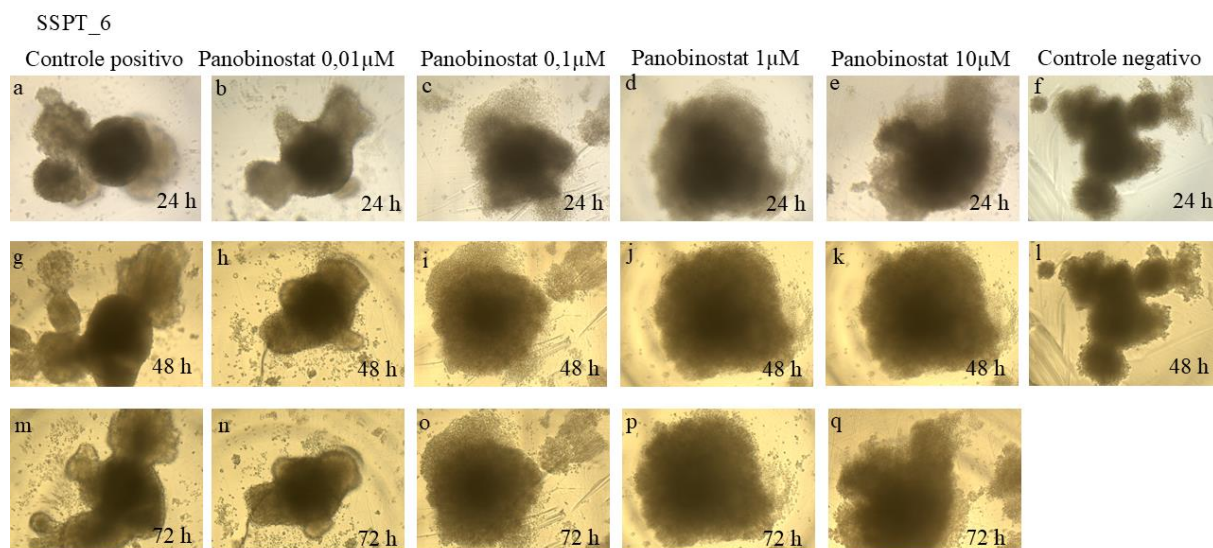


Figura 12: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_6 após 24 (a, b, c, d, e, f), 48 (g, h, i, j, k, l) e 72 (m, n, o, p, q) horas da adição das quatro doses de Panobinostat. As fotos a, g, m indicam os esferoides tratados com 0,1% de DMSO e as fotos f, l, r indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos b, h, n indicam os esferoides tratados com a dose 0,01 μM de Panobinostat. As fotos c, i, o indicam os esferoides tratados com a dose 0,1 μM de Panobinostat. As fotos d, j, p indicam os esferoides tratados com a dose 1 μM de Panobinostat e as fotos e, k, q indicam esferoides que foram tratados com a dose 10 μM de Panobinostat.

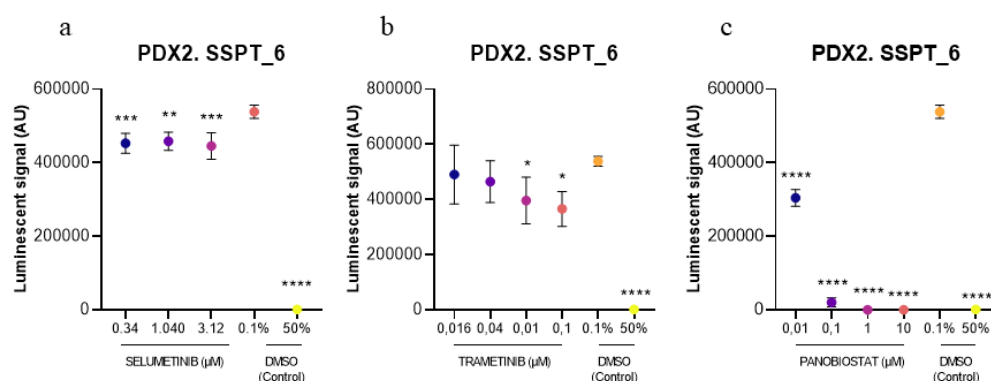


Figura 13: Gráficos do sinal de luminescência indicando a viabilidade celular dos esferoides do PDX2.SSPT_6 em cada dose das drogas Selumetinib (a), Trametinib (b) e Panobinostat (c), comparando com os controles positivos e negativos. Os asteriscos (*) indicam dados estatisticamente significantes quando comparados com o controle tratado com 0,1% de DMSO.

A amostra SSPT_1, quando tratada com Selumetinib apresentou redução da viabilidade apenas na dose 0,34 μ M quando comparada com o controle positivo (Figura 17a). Esse resultado pode ser observado pela perda da compactação do esferoide (Figura 14l). Com Trametinib, entretanto, não houve nenhuma perda significativa da viabilidade (Figura 17b). Nas imagens da figura 15 é possível perceber que os esferoides mantiveram a compactação celular. No entanto, com Panobinostat, houve uma redução significativa da viabilidade nas doses 0,1 μ M, 1 μ M e 10 μ M (Figura 17c). A perda da compactação dos esferoides nesse caso, pode ser observada com 24h pós-tratamento (Figura 16c, 16d e 16e).

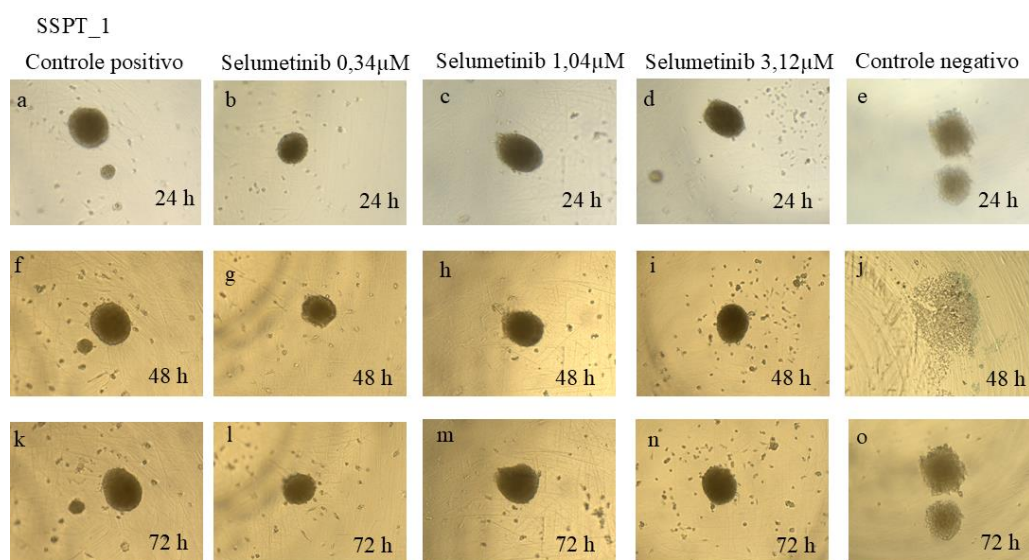


Figura 14: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_1 após 24 (a, b, c, d, e), 48 (f, g, h, i, j) e 72 (k, l, m, n, o) horas da adição das três doses de Selumetinib. As fotos a, f, k indicam os esferoides tratados com 0,1%

de DMSO e as fotos **e, j, o** indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos **b, g, l** indicam os esferoides tratados com a dose 0,34 μM de Selumetinib. As fotos **c, h e m** indicam os esferoides tratados com a dose 1,04 μM de Selumetinib. As fotos **d, i, n** indicam os esferoides tratados com a dose 3,12 μM de Selumetinib

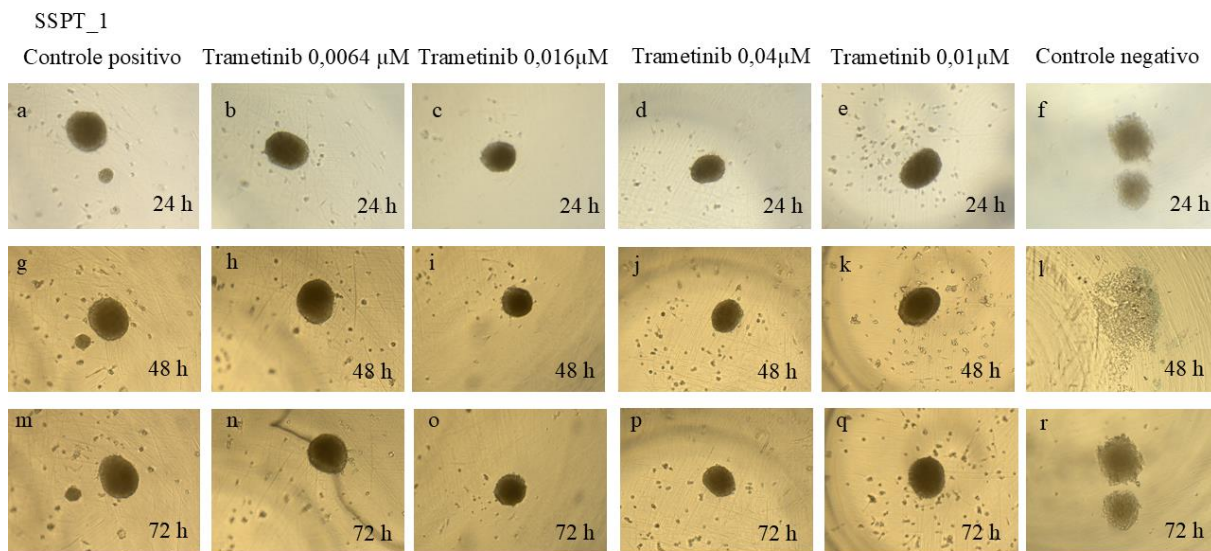


Figura 15: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_1 após 24 (**a, b, c, d, e, f**), 48 (**g, h, i, j, k, l**) e 72 (**m, n, o, p, q, r**) horas da adição das quatro doses de Trametinib. As fotos **a, g, m** indicam os esferoides tratados com 0,1% de DMSO e as fotos **f, l, r** indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos **b, h, n** indicam os esferoides tratados com a dose 0,0064 μM de Trametinib. As fotos **c, i, o** indicam os esferoides tratados com a dose 0,016 μM de Trametinib. As fotos **d, j, p** indicam os esferoides tratados com a dose 0,04 μM de Trametinib e as fotos **e, k, q** indicam esferoides que foram tratados com a dose 0,01 μM de Trametinib.

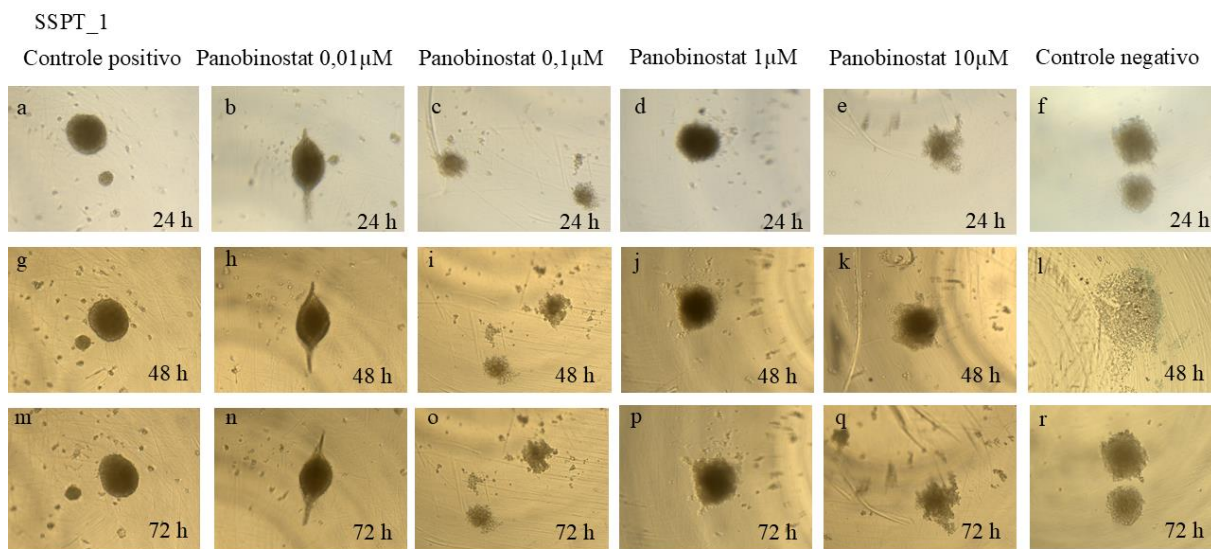


Figura 16: Fotos dos esferoides provenientes do PDX2.SSPT_1 após 24 (**a, b, c, d, e, f**), 48 (**g, h, i, j, k, l**) e 72 (**m, n, o, p, q, r**) horas da adição das quatro doses de Panobinostat. As fotos **a, g, m** indicam os esferoides tratados com 0,1% de DMSO e as fotos **f, l, r** indicam os esferoides tratados com 50% de DMSO. As fotos **b, h, n** indicam os esferoides tratados com a dose 0,01 μM de Panobinostat. As fotos **c, i, o** indicam os esferoides tratados com a dose 0,1 μM de Panobinostat. As fotos **d, j, p** indicam os esferoides tratados com a dose 1 μM de Panobinostat e as fotos **e, k, q** indicam esferoides que foram tratados com a dose 10 μM de Panobinostat.

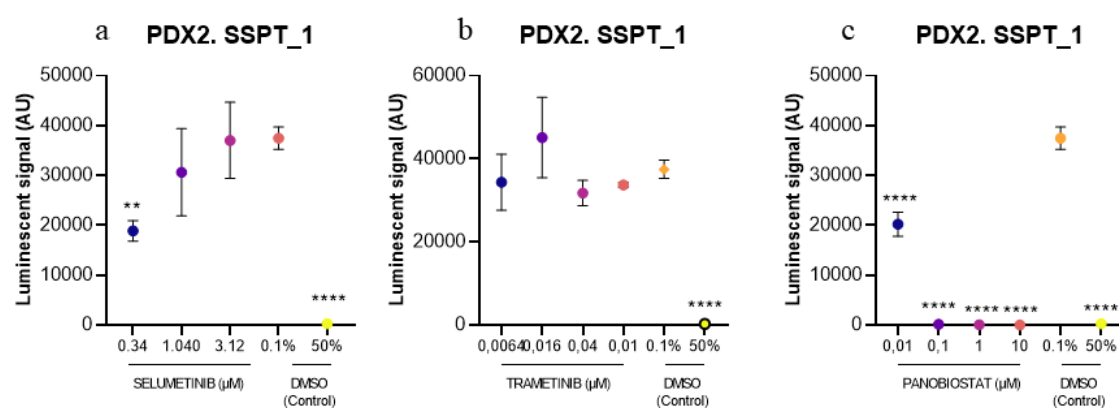


Figura 17: Gráficos do sinal de luminescência indicando a viabilidade celular dos esferoides do PDX2.SSPT_6 em cada dose das drogas Selumetinib (a), Trametinib (b) e Panobinostat (c), comparando com os controles positivos e negativos. Os asteriscos (*) indicam dados estatisticamente significantes quando comparados com o controle tratado com 0,1% de DMSO.

4. DISCUSSÃO

O presente projeto teve como finalidade validar as amostras de PDX que foram expandidas em camundongos imunodeficientes de forma histológica e molecular. As análises realizadas em amostras de tumor de sarcoma sinovial provenientes de PDX foram comparadas com amostras dos pacientes, demonstrando uma semelhança. Essas mesmas amostras foram analisadas através de técnicas moleculares, como FISH e PCR e apresentaram semelhança. Além disso, as amostras provenientes de PDX foram cultivadas em cultura tridimensional e tratadas com drogas quimioterápicas não usadas no tratamento convencional de pacientes com sarcoma sinovial, apresentando responsividade ao tratamento.

Os xenoenxertos representam o modelo *in vivo* que recapitula mais características importantes dos tumores dos pacientes (Gasparini et al, 2022). Essa técnica é frequentemente realizada em camundongos NSG (NOD/SCID/gamma), que não apresentam células B, T ou NK maduras para mediar a rejeição imunológica, produzindo maiores taxas de sucesso nos enxertos (McNerney et al., 2021). Os modelos de PDX têm sido amplamente utilizados em estudos translacionais, pois podem manter a estabilidade genômica até 10 gerações, além de demonstrar capacidade de manter a heterogeneidade intratumoral, características estruturais do tecido, detalhes microscópicos e comportamentos biológicos do tumor (Liu et al., 2023; Stewart et al., 2017; Julien et al., 2012).

Com isso, a análise das amostras histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina dos PDX apresentou características histopatológicas semelhantes às lâminas dos pacientes ao diagnóstico. Essa semelhança também foi observada por testes realizados com Sarcoma de Ewing, Osteossarcoma e Rabdomiossarcoma (Castillo-Ecija et al., 2021). Os trabalhos com outros tipos de sarcomas identificaram que não houve mudança significativa no padrão histológico das amostras de PDX quando comparadas com as amostras de seus respectivos pacientes. No entanto, as lâminas de PDX apresentaram sinais de maior agressividade, representados pela maior presença de figuras mitóticas típicas e atípicas, e indiferenciação celular do que as lâminas dos pacientes, fatos também observados por Cornillie e colegas (2019).

O modelo PDX, caracterizado pela estabilidade das características moleculares e histológicas precisa ser validado por métodos ortogonais. Por isso, além da análise histológica, estudos moleculares são importantes. Cornillie e colegas (2019) confirmaram a estabilidade molecular dos PDX através de sequenciamento de RNA, provando que os modelos PDX

mantém as características moleculares da amostra do paciente. Essa manutenção da estabilidade molecular também foi encontrada nas amostras analisadas pelo estudo.

Estudos demonstraram que a translocação t(X;18)(p11.2;q11.2) é a alteração molecular encontrada em 90% dos casos de Sarcoma Sinovial (Tvrdík et al., 2005). Essa informação foi confirmada em nossos experimentos: os tumores de xenoenxerto mantiveram as alterações moleculares encontradas nos tumores dos pacientes analisados por FISH, com a sonda break-apart SS18. Além disso, como uma forma de validação ortogonal do modelo PDX, a PCR convencional foi realizada. Esta técnica confirmou o que foi observado no FISH, demonstrando que cerca de 80% dos casos apresentam a translocação SS18-SSX1, assim como a literatura indica (Amary et al. 2007).

O tratamento quimioterápico convencional de sarcomas sinoviais é realizado com doxorrubicina e ifosfamida (Blay et al., 2023), que apresenta efeitos colaterais e toxicidade. No contexto da Medicina de precisão, testes com drogas alvo-dirigidas são realizados para analisar a resposta tumoral ao tratamento. O uso da cultura celular é uma ferramenta que permite o estudo *in vitro* desses medicamentos (McNerney et al., 2021). Nosso estudo utilizou drogas alvo-dirigidas para a mutação na via MAP3K encontrada em dois dos pacientes. As amostras que foram expandidas em PDX foram dissociadas e tratadas com doses crescentes das drogas quimioterápicas Selumetinib e Trametinib (XUE et al, 2018). Assim como no estudo de Xue et al, conseguimos observar uma diminuição no número de células vivas do esferóide, indicando que o tratamento apresentou uma ação efetiva contra o crescimento tumoral.

Diante dos resultados obtidos, resolvemos utilizar uma droga inibidora de HDAC (desacetilação de histonas), que possui papel importante na regulação gênica. Esses quimioterápicos possuem o papel de estimular os processos de morte celular, como a apoptose, nas células de linhagem de sarcoma sinovial (LAPORTE et al, 2017). Para comparar, utilizamos esferóides de PDX de segunda geração de sarcoma sinovial e tratamos com quatro doses de Panobinostat, uma droga inibidora da HDAC. Como resultado, observamos uma maior morte das células tumorais mesmo na menor dose. Isso demonstra que esse tipo de tratamento também estimula as vias de morte celular na cultura primária.

5. CONCLUSÃO

Os modelos de PDX de sarcoma sinovial estabelecidos reproduzem com fidelidade as características histológicas e moleculares do tumor do paciente, assegurando uma correspondência precisa para o uso seguro desse modelo em novos estudos. Além disso, o tratamento alvo-dirigido mostrou-se eficaz ao induzir a morte celular. No entanto, a droga epigenética apresentou uma eficácia ainda maior, destacando o potencial desses medicamentos para o tratamento do Sarcoma Sinovial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARY, M. F. C., et al. Detection of SS18-SSX fusion transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded neoplasms: analysis of conventional RT-PCR, qRT-PCR and dual color FISH as diagnostic tools for synovial sarcoma. **Mod Pathol**, v. 20, n. 4, p. 482–496, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800761>>.

BHIMANI, J., et al. Patient-derived xenograft models: the future of personalized cancer treatment. **Br J Cancer**, v. 122, p. 601-602, jan. 2020.

BLAY, J. et al. Synovial Sarcoma: Characteristics, Challenges, and Evolving Therapeutic Strategies. **ESMO Open**, v. 8, n. 5, p. 1-14, ago. 2023.

CASTILLO-ECIJA, H., et al. Prognostic value of patient-derived xenograft engraftment in pediatric sarcomas. **J Pathol Clin Res**, v. 7, p. 338-349, jul. 2021.

CORNILLIE, J., *et al.* Establishment and characterization of histologically and molecularly stable soft-tissue sarcoma xenograft models for biological studies and preclinical drug testing. **Mol Cancer Ther**, vol. 18, no. 6, p. 1168–1178, 2019.

CORRÊA, D. S. et al. Sarcoma Sinovial de Extremidades com Doença Localizada ao Diagnóstico: Tratamento e Padrões de Recidiva em 57 Casos. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 32, n. 6, p. 304-309, dez. 2005

COSTA, M. E. M., et al. Pediatric Patient-Derived Xenograft Development in MAPPYACTS - International Pediatric Cancer Precision Medicine Trial in Relapsed and Refractory Tumors. **Nature Portfolio**, PREPRINT (Versão 1). Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2542996/v1>

DEROSE, Y. S. et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1514–1520, jan 2013.

FERRARI, A. et al. Surgery Alone Is Sufficient Therapy For Children And Adolescents With Low-risk Synovial Sarcoma: A Joint Analysis From the European Paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group and the Children's Oncology Group. **Eur J Cancer**, v. 78, p. 1-6, jun. 2017.

GAO, S., et al. Three-dimensional (3D) culture in sarcoma research and the clinical significance. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, set. 2017

- GASPARINI, P., et al. Establishment of 6 Pediatric Rhabdomyosarcoma Patient's Derived Xenograft Models Closely Recapitulating Patient's Tumor Characteristics. **Tumori Journal**, v. 109, n. 3, p. 314-323, jun. 2023.
- GAZENDAM, A. M. et al. Synovial Sarcoma: A Clinical Review. **Curr. Oncol.** v. 28, n. 3, p. 1909-1920, jun. 2021.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2022
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade. Rio de Janeiro, 2016.
- JULIEN, S. et al. Characterization of a Large Panel of Patient-Derived Tumor Xenografts Representing the Clinical Heterogeneity of Human Colorectal Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 19, p. 5314–5328, set 2012.
- KERUANTON, A., et al. Synovial Sarcoma in Children and Adolescents. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 36, n. 4, mai. 2014.
- KIEUHOA, T. V. et al. Precision Medicine in Pediatric Oncology. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 29, n. 1, p. 63-72, jan. 2021.
- LAPORTE, A. N., *et al.* Death by HDAC inhibition in synovial sarcoma cells. **Mol Cancer Ther**, vol. 16, no. 12, p. 2656–2667, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0397>>.
- LIMA, F. D. O. et al. Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas no sarcoma sinovial. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v.41, n. 5, p. 347-352, dez. 2005.
- LIU, Y., et al. Patient-derived xenograft models in cancer therapy: technologies and applications. **Sig Transduct Target Ther**, v. 8, p. 1-24, abr. 2023.
- McNERNEY, K. O., TEACHEY, D. T. Xenograft Models for Pediatric Cancer Therapies. **Faculty Reviews**, v. 10, n. 11. Disponível em: <https://doi.org/10.12703/r/10-11>
- MODY, R. J. et al. Precision Medicine in Pediatric Oncology: Lessons Learned and Next Steps. **Pediatr Blood Cancer**, v. 64, n. 3, p. 1-26, mar. 2017.

- ROKITA, J. L., et al. Genomic Profiling of Childhood Tumor Patient-Derived Xenograft Models to Enable Rational Clinical Trial Design. **Cell Reports**, v. 29, n. 6, p. 1675-1689, nov. 2019.
- SHIIHARA, M., FURUKAWA, T. Application of patient-derived cancer organoids to personalized medicine. **J Pers Med**, v. 12, n. 5, p. 789, mai. 2022
- SILVA, D. B. Epidemiologia e Diagnóstico Precoce do Câncer Infantojuvenil. Santa Catarina [s. n.], 2021 5p. Disponível em: <http://www.scp.org.br/wp-content/uploads/2021/09/dc-epidemio-e-diag-precoce-ca-infantojuvenil.pdf>.
- SOOLE, F. et al. Synovial Sarcoma Relapses in Children and Adolescents: Prognostic Factors, Treatment and Outcome. **Pediatr Blood Cancer**, v. 61, n. 8, p. 1387-1393, jan. 2014.
- SPIRONELLO, R. A. et al. Mortalidade infantil por câncer no Brasil. **Saúde e Pesquisa**, v. 13, n. 1, p. 115–122, 2 mar. 2020.
- STEWART, E., et al. Orthotopic patient-derived xenografts of paediatric solid tumours. **Nature**, v. 549, p. 96-100, set. 2017.
- TVRDÍK, D., et al. Molecular diagnosis of synovial sarcoma: RT-PCR detection of SYT-SSX1/2 fusion transcripts in paraffin-embedded tissue. **Med Sci Monit**, v. 11, n. 3, p. MT1-7, 2005.
- XUE, Z., et al. MAP3K1 and MAP2K4 mutations are associated with sensitivity to MEK inhibitors in multiple cancer models. **Cell research**, v. 28, n. 7, p. 719–729, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41422-018-0044-4>>.
- ZANONI, M., et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Sci Rep**, v. 6, jan. 2016.