

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2012.10.04</b>	(73) Titular(es): <b>MITRA RXDX INDIA PRIVATE LIMITED</b> <b>V-18, VASWANI ASHTOONWOODS</b> <b>KARIYAMMANA AGRAHARA OUTER RING</b> <b>ROAD BANGALORE, 560037</b>	<b>IN</b>
(30) Prioridade(s): <b>2011.10.04 IN CH33102011</b>		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2014.08.13</b>		
(45) Data e BPI da concessão: <b>2017.11.22</b> <b>042/2018</b>	(72) Inventor(es): <b>MALLIKARJUN SUNDARAM</b> <b>BISWANATH MAJUMDER</b> <b>MISTI JAIN</b> <b>SARAVANAN THIAGARAJAN</b> <b>DENCY PINTO</b>	<b>IN</b> <b>IN</b> <b>IN</b> <b>IN</b> <b>IN</b>
	(74) Mandatário: <b>MARIA TERESA DELGADO</b> <b>AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA</b>	<b>PT</b>

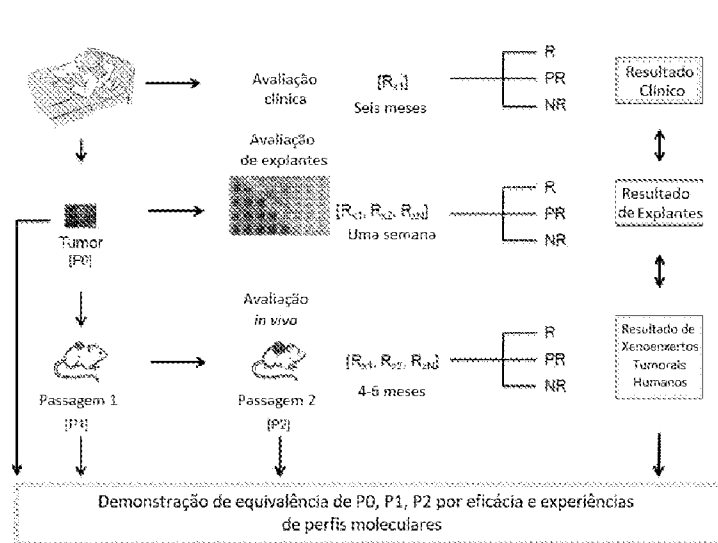
(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO DE ECM, PLATAFORMA DE MICROAMBIENTE TUMORAL E SEUS MÉTODOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE DIVULGAÇÃO RELACIONA-SE COM UMA COMPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR ESPECÍFICA DO TIPO DE CANCRO E UMA PLATAFORMA DE MICROAMBIENTE TUMORAL PARA CULTURA A LONGO PRAZO DE TECIDO TUMORAL, EM QUE A REFERIDA CULTURA PROPORCIONA LIGANTES E MICROAMBIENTE DE TECIDOS TUMORAIS HUMANOS PARA MIMETIZAR SISTEMAS DE SINALIZAÇÃO FISIOLÓGICAMENTE RELEVANTES. A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONASE ADICIONALMENTE COM O DESENVOLVIMENTO DE UM PREDITOR DA RESPOSTA CLÍNICA E SUA APLICAÇÃO NA ÁREA DE PROGNÓSTICO (SELEÇÃO DE OPÇÃO DE TRATAMENTO PARA O PACIENTE) E ÁREA DA BIOLOGIA TRANSLACIONAL (DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS). A DIVULGAÇÃO RELACIONA-SE ADICIONALMENTE COM UM MÉTODO DE PREVISÃO DA RESPOSTA CLÍNICA DE UM PACIENTE COM TUMOR AO(S) FÁRMACO(S). A DIVULGAÇÃO RELACIONA-SE ADICIONALMENTE COM UM MÉTODO PARA RASTREIO DE CÉLULAS TUMORAIS QUANTO À PRESENÇA DE MARCADORES ESPECÍFICOS PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DAS REFERIDAS CÉLULAS PARA INDICAÇÃO DO ESTADO TUMORAL.

**RESUMO****"COMPOSIÇÃO DE ECM, PLATAFORMA DE MICROAMBIENTE TUMORAL E SEUS MÉTODOS"**

A presente divulgação relaciona-se com uma composição de Matriz Extracelular específica do tipo de cancro e uma plataforma de microambiente tumoral para cultura a longo prazo de tecido tumoral, em que a referida cultura proporciona ligantes e microambiente de tecidos tumorais humanos para mimetizar sistemas de sinalização fisiologicamente relevantes. A presente invenção relaciona-se adicionalmente com o desenvolvimento de um Preditor da Resposta Clínica e sua aplicação na área de prognóstico (seleção de opção de tratamento para o paciente) e área da biologia translacional (desenvolvimento de fármacos anticancerígenos). A divulgação relaciona-se adicionalmente com um método de previsão da resposta clínica de um paciente com tumor ao(s) fármaco(s). A divulgação relaciona-se adicionalmente com um método para rastreio de células tumorais quanto à presença de marcadores específicos para determinação da viabilidade das referidas células para indicação do estado tumoral.



**Figura 1**

## DESCRIÇÃO

### **"COMPOSIÇÃO DE ECM, PLATAFORMA DE MICROAMBIENTE TUMORAL E SEUS MÉTODOS"**

#### ÁREA TÉCNICA

Este pedido relaciona-se com a área de cancro e o desenvolvimento de prognósticos e terapêuticos para o cancro. Mais especificamente, a invenção proporciona composição de Matriz Extracelular [ECM], plataforma de microambiente tumoral para cultura de tecido tumoral e seus métodos.

A presente divulgação relaciona-se com um "Preditor da resposta clínica" e sua aplicação em vários cancros para quimioterapia, fármacos biológicos, visados e agentes amplos que têm efeito antitumoral. A presente divulgação relaciona-se adicionalmente com um método para cultura a longo prazo de tecido tumoral, em que a referida cultura proporciona ligantes e microambiente de tecido tumoral humanos para mimetizarem sistemas de sinalização fisiologicamente relevantes. A divulgação relaciona-se adicionalmente com um método para rastreio de tecido tumoral quanto à presença de marcadores específicos para determinação da viabilidade das referidas células para indicação de estado tumoral. A divulgação relaciona-se também com método de previsão da resposta de um sujeito com tumor e método de rastreio ou desenvolvimento de agente anticancerígeno.

## ANTECEDENTES E TÉCNICA ANTERIOR DA DIVULGAÇÃO

Várias ferramentas de segregação de pacientes conhecidas na técnica são classificadas amplamente como em baixo:

### **Biomarcadores:**

Existem vários biomarcadores que são baseados na análise do tumor, tecido normal, soro, urina, saliva bem como outras partes do corpo &/ou material secretado/excretado do paciente. Por p.ex.: Her2 é um marcador baseado em proteína bem como gene que segrega os pacientes que sobre-expressam a proteína Her2 daqueles que a subexpressam. Tem sido levada a cabo investigação clínica detalhada por seu turno para mostrar que aqueles que têm níveis mais elevados da proteína Her2 respondem significativamente melhor ao anticorpo monoclonal Herceptina. Neste contexto, Her2 foi aprovado como um "Biomarcador" para prever o resultado de tratamento com Herceptina para o paciente sob consideração. Existem outros biomarcadores tais como EGFR, C-MET cuja presença ou ausência, ou o perfil de expressão, é usado para prever a eficácia dos fármacos visados sob consideração.

Para o uso de um biomarcador, ambos os eixos de um plano XY necessitam de ser definidos; *i.e.*, é necessário definir a quantidade ou qualidade do biomarcador num eixo, e a resposta clínica no outro eixo. Antes do uso do biomarcador é necessário desenvolver uma quantidade extensa de dados para a combinação fixa da qualidade &/ou quantidade do biomarcador bem como o resultado clínico. Logo que uma tal base de dados tenha sido desenvolvida, para um novo paciente para a mesma doença e o mesmo fármaco, a medição da qualidade ou quantidade do biomarcador pode ser usada

para estimar o resultado clínico se for administrado ao paciente esse fármaco particular. Assim, uma abordagem dirigida por biomarcadores está largamente restrita por muitos fatores de entrada tais como o fármaco usado, a doença na qual é usado, e o biomarcador que é usado.

#### **Quimiomarcadores:**

Existem testes que são usados para prever a eficácia de quimioterapêuticos tais como Cisplatina em diferentes cânceros. Estes testes medem a presença ou ausência, ou a extensão, de marcadores substituintes. Os quimiomarcadores sofrem das mesmas deficiências dos biomarcadores.

#### **Estado de doença corrente ou prévio do paciente:**

Os pacientes positivos quanto a HPV que têm também carcinoma das células escamosas da Cabeça & Pescoço respondem à quimioterapia melhor do que pacientes com carcinoma das células escamosas da Cabeça & Pescoço negativos quanto a HPV. Neste caso, o estado de HPV dos pacientes é usado como uma bitola para prevenir a sua resposta a fármacos para o carcinoma das células escamosas da Cabeça & Pescoço no caso de eles desenvolverem carcinoma das células escamosas da Cabeça & Pescoço. Existe uma quantidade limitada de informação sob esta categoria de prognóstico. Esta informação é largamente baseada em correlação e não necessariamente baseada em causalidade.

#### **Teste de quimiossensibilidade:**

Nesta categoria de testes, uma amostra tumoral do paciente é retirada, homogeneizada em células tumorais, e este sistema é tratado com vários quimioterapêuticos em sistemas

*in vitro*. Alternativamente, uma amostra tumoral do paciente é tratada com vários quimioterapêuticos em sistemas *in vitro* sem homogeneização. Estes testes *in vitro* têm diferentes nomes (p.ex., Teste em monocamada ou ensaio clonogénico da Oncotest GMBH, teste de quimiossensibilidade da Chemofx, teste Extreme Drug Resistance (EDR) da Oncotech).

A deficiência fundamental deste modelo é que o microambiente tumoral do paciente não é capturado nestes testes de quimiossensibilidade. Por exemplo, foi reivindicado em várias literaturas que sistemas baseados em células ou tecidos *in vitro* não são representativos do resultado clínico.

**Sistema de xenoenxertos *in vitro* e *in vivo* baseado em linhas de células.**

Em tempos recentes tem existido um número de literaturas publicadas sobre teste pré-clínico *in vitro* & *in vivo* do crescimento tumoral baseado em inibição do crescimento tumoral bem como para previsão da eficácia clínica. Todos os métodos da técnica anterior têm limitações inerentes de não serem capazes de mimetizar o microambiente local das amostras tumorais e consequentemente fraca correlação com resultado clínico que impedem o seu uso como ensaios confiáveis para previsão de resultados clínicos.

Somente 10% de todos os fármacos para cancro que entram nos ensaios clínicos de fase I entram com sucesso no mercado. Esta baixa taxa de sucesso é uma das principais razões pelas quais o custo de fármacos para oncologia é exorbitantemente elevado; a baixa taxa de sucesso pode ser

atribuída ao baixo poder de previsão de testes *in vitro* e *in vivo* correntes na área de oncologia. Até recentemente, estudos convencionados baseados em monocamadas de células 2D têm demonstrado as suas limitações significativas na medida em que a arquitetura dos tecidos na rede tridimensional (3-D) de componentes da matriz extracelular, interações célula-com-célula e célula-com-matriz que governa a diferenciação, proliferação e função de célula *in vivo* é, de facto, perdida sob a condição de monocamadas em 2D simplificada. Na ausência de estrutura específica bem como perda de componentes estromais e outras células associadas a tumores, os ensaios funcionais para estudar a sinalização e vias tumorais associadas à manutenção, iniciação e progressão tumorais não podem ser precisamente estudados. No entanto, os modelos da técnica anterior têm falhas na medida em que não usam o microambiente tumoral intacto; isto leva a perda de função e também mudança nos sistemas de sinalização resultando da ausência de ligantes derivados de humanos nos meios de células usados. Mais recentemente, o sucesso limitado de inibidores de pequena molécula correntes em muitos cancros humanos epiteliais sublinha a necessidade de se desenvolverem técnicas melhores para prever mais precisamente a resposta à terapia, preferencialmente customizada ao cancro individual e as suas alterações genéticas e epigenéticas únicas. As interações tumor-estroma têm desde há muito sido reconhecidas como facetas importantes na patogénese e disseminação de malignidade. A evidência significativa apoiando o papel de tecidos peritumorais na manutenção tumoral inclui a presença de mutações genéticas no estroma de vários tipos de cancros e o papel desempenhado por células estromais na aquisição de resistência à terapia. Para que um tumor cultivado seja representativo do cancro

real é essencial que o tumor, à medida que prolifere *in vitro*, mantenha a sua organização e estrutura dos tecidos, as suas propriedades oncogénicas, as suas funções diferenciadas, e qualquer heterogeneidade celular que possa ter estado presente *in vivo*. Se os tumores humanos crescendo *in vivo* consigam satisfazer os critérios acima e, adicionalmente, possam ser cultivados a elevada frequência durante longos períodos de tempo em cultura, devem provar ser valiosos para estudos básicos na biologia de cancros bem como para teste clinicamente relevante.

Os estudos proporcionados nesta divulgação respondem à importante questão de se os tumores humanos podem de facto satisfazer os critérios acima *in vitro*. Estudos prévios que usam sistemas de cultura de células primárias padrão e xenoenxertos cutâneos ou ortotópicos baseados em linhas de células têm avançado o entendimento do comportamento tumoral; no entanto, estes métodos têm limitações inerentes na avaliação do papel do microambiente tumoral na modulação da carcinogénese e progressão tumoral pois os modelos baseados em linhas de células têm sido amplamente reconhecidos como modelos homogéneos e isto é uma das razões fundamentais porque não representam adequadamente uma doença heterogénea tal como cancro. Em contraste, a presente divulgação relaciona-se com o desenvolvimento de uma abordagem de biologia de sistemas para criar uma ferramenta de segregação de pacientes *in vitro* que mimetize o microambiente tumoral humano em placa e conseqüentemente resulte em potenciais aplicações em diferentes áreas do tratamento do cancro, tanto no prognóstico bem como biologia translacional. A presente divulgação confirma também a hipótese com vários exemplos para aplicações tanto de prognóstico bem como de biologia translacional.

Adicionalmente, o uso da ferramenta de segregação de pacientes da presente divulgação é também aplicável no desenvolvimento de aplicações de prognóstico, diagnóstico acompanhante, e biologia translacional para disfunções autoimunes e doenças inflamatórias.

O documento da técnica anterior da literatura não patentária CHRIS S. HUGHES *ET AL.*, "*Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture*", *PROTEOMICS*, (20100516), vol. 10, no. 9 e Informação de Apoio divulga que numerosos tipos de células requerem uma superfície para anexação para crescerem e proliferarem. Certas células, particularmente células primárias e estaminais, necessitam o uso de matrizes de crescimento especializadas em conjunto com condições de meios de cultura específicas para manter as células num estado não diferenciado. Uma mistura de proteínas gelatinosas derivada de células tumorais de camundongo e comercializada como Matrigel é comumente usada como uma matriz de membrana de base para células estaminais porque retém as células estaminais num estado não diferenciado. No entanto, a Matrigel não é uma matriz bem definida, e, portanto, pode produzir uma fonte de variabilidade em resultados experimentais. Neste estudo apresentam uma análise proteômica profunda de Matrigel usando um método de exclusão iterativo dinâmico acoplado com protocolos de fracionamento que envolvem precipitação com sulfato de amônio, cromatografia por exclusão de tamanhos, e SDS-PAGE unidimensional. A capacidade de se identificarem os componentes de baixa massa e abundância de Matrigel ilustra a utilidade deste método para a análise da matriz extracelular, bem como a complexidade da própria matriz.

O documento da técnica anterior da literatura não patentária SANDRA Z HASLAM ET AL., "Tumour-stroma interactions: Reciprocal regulation of extracellular matrix proteins and ovarian steroid activity in the mammary gland", BREAST CANCER RESEARCH, (20010802), vol. 3, no. 6 é uma revisão focando-se nas interações entre proteínas da matriz extracelular (ECM) derivadas do estroma mamário, integrinas e a proliferação dependente de hormonas dos ovários em células mamárias normais e neoplásicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Os estudos *in vitro* mostram que a fibronectina é requerida para a proliferação induzida por progesterona de células epiteliais mamárias normais e que proteínas de ECM específicas regulam também as interações entre fatores de crescimento e hormonas dos ovários. Estudos com linhas de células do cancro da mama humano mostraram que a laminina inibe a proliferação induzida por estrogénio e a transcrição mediada por elementos de resposta ao estrogénio *in vitro* e inibe também a proliferação induzida por estrogénio *in vivo*. Reciprocamente, os esteroides dos ovários regulam a expressão de proteínas de ECM e seus recetores celulares, integrinas, durante o desenvolvimento das glândulas mamárias *in vivo*. A integrina específica da fibronectina,  $\alpha 5\beta 1$ , é regulada por esteroides de ovários e a sua expressão está positivamente correlacionada com as etapas de desenvolvimento da proliferação no pico. Estes estudos sugerem que a regulação coordenada da capacidade de resposta das hormonas dos ovários e expressão de ECM/integrina pode ser crítica para o desenvolvimento normal de glândulas mamárias e crescimento e progressão do cancro da mama.

O documento da técnica anterior da literatura não patentária N. E. CAMPBELL *ET AL.*, "*Extracellular Matrix Proteins and Tumor Angiogenesis*", *JOURNAL OF ONCOLOGY*, (20100101), vol. 72, no. 6, doi:10.1016/S0945-053X(02)00010-0, ISSN 1687-8450, páginas 787 - 13 é uma revisão focando-se no papel que a matriz extracelular e proteínas de ECM desempenham na regulação da angiogénese tumoral. Muita da massa de um tumor sólido é compreendida pelo estroma que está ricamente investido com a matriz extracelular. Dentro desta matriz está um conjunto de proteínas matricelulares que regulam a expressão e função de uma miríade de proteínas que regulam os processos tumorigénicos. Um dos processos que é vital ao crescimento e progressão tumorais é a angiogénese, ou a formação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente. Dentro da matriz extracelular estão proteínas estruturais, um conjunto de proteases e fatores pró- e anti-angiogénicos residentes que controlam a angiogénese tumoral de um modo estritamente regulado.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS ACOMPANHANTES**

De modo a que a divulgação possa ser prontamente entendida e posta em efeito prático será agora feita referência a formas de realização exemplificativas como ilustrado com referência às figuras acompanhantes. As figuras, em conjunto com uma descrição detalhada em baixo, são incorporadas na e formam parte da especificação, e servem para ilustrar as formas de realização e explicar vários princípios e vantagens, de acordo com a presente divulgação onde:

A **Figura 1** mostra diagrama esquemático ilustrando o desenvolvimento e validação da tecnologia “Preditor da Resposta Clínica”.

A **Figura 2** mostra a importância de fatores parácrinos no modelo de explante.

A **Figura 3A** mostra a importância da Matriz extracelular no modelo de explantes e **3B** mostra a importância do microambiente no modelo de explantes.

A **Figura 4A-G** mostra que os ligantes autólogos e a Matriz Extracelular retêm o microambiente e rede de sinalização de tumores de pacientes em cultura. Ampliação da imagem: 20X.

A **Figura 5A-C** mostra a composição de ECM e seus efeitos na viabilidade e proliferação.

A **Figura 6** mostra comparação dos efeitos de diferentes TPM na proliferação e ativação de proteínas de sinalização de cancro.

A **Figura 7A-C** mostra que passagens iniciais de xenoenxertos de tumores humanos retêm as características moleculares de tumores originais dos pacientes.

A **Figura 8A-C** mostra que o tumor do paciente e o xenoenxerto derivado do mesmo exibem resultado de resposta idêntico a terapia anticancerígena quando testados num modelo de cultura de explante tumoral.

A **Figura 9A-H** mostra que os efeitos antitumorais de TPF e Cetuximab na cultura de explantes tumorais dos pacientes são similares à resposta de xenoenxertos tumorais humanos como testado por experiências de eficácia *in vivo*.

A **Figura 10** mostra correlação da plataforma de resposta a fármacos guiada por “Preditor da Resposta Clínica” com eficácia *in vivo*.

A **Figura 11** mostra um diagrama esquemático ilustrando o desenvolvimento e validação da tecnologia "Preditor da Resposta Clínica".

A **Figura 12** mostra a validação clínica dos dados da análise "preditor da resposta clínica" em Cancro da Cabeça e Pescoço. A pontuação M é calculada usando "preditor da resposta clínica" e o resultado previsto é correlacionado com o resultado clínico do paciente. É obtida pontuação M maior do que 60 para 30 tumores dos pacientes e é previsto que estes pacientes tenham resposta completa e mais do que 90% destes pacientes tenham de facto resultado clínico correspondendo à análise "preditor da resposta clínica". Similarmente é previsto que cerca de 20 pacientes com pontuação M menor do que 25 sejam não respondedores e 100% dos pacientes mostraram não resposta pós-tratamento.

A **Figura 13A-S** mostra os dados de eficácia obtidos por Análise "Preditor da Resposta Clínica" para pacientes com cancro tratados com fármacos ou combinações de fármacos.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA DIVULGAÇÃO**

A presente divulgação relaciona-se com uma composição de Matriz Extracelular [ECM] compreendendo os componentes colagénio 1, colagénio 3, colagénio 4, colagénio 6, Fibronectina, Vitronectina, Caderina, Filamina A, Vimentina, Laminina, Decorina, Tenascina C, Osteopontina.

A presente divulgação relaciona-se também com tal composição, compreendendo adicionalmente um ou mais componentes selecionados do grupo consistindo em Proteínas da membrana de base, Proteínas citoesqueléticas e Proteínas da matriz.

A presente divulgação relaciona-se também com um método para se obter composição de Matriz Extracelular [ECM] como mencionado acima, compreendendo o referido método:

combinação dos componentes da ECM colagénio 1, colagénio 3, colagénio 4, colagénio 6, Fibronectina, Vitronectina, Caderina, Filamina A, Vimentina, Laminina, Decorina, Tenascina C, Osteopontina. A presente divulgação relaciona-se também com tal método, em que os componentes compreendem adicionalmente de um ou mais componentes selecionados do grupo consistindo em Proteínas da membrana de base, Proteínas citoesqueléticas e Proteínas da matriz para se obter a composição de ECM.

A presente divulgação relaciona-se também com uma plataforma de microambiente tumoral para cultura de tecido tumoral, compreendendo o referido microambiente composição de ECM como mencionado acima, meio de cultura opcionalmente em conjunto com soro, plasma ou PBMCs autólogas e fármaco.

A presente divulgação relaciona-se também com um método para obtenção de plataforma de microambiente tumoral para cultura de tecido tumoral, compreendendo o referido método o ato de revestimento da plataforma com composição de ECM como mencionado acima e adição de meio de cultura opcionalmente em conjunto com soro, plasma ou PBMCs autólogas e fármaco à plataforma para se obter a plataforma de microambiente tumoral.

A presente divulgação relaciona-se também com um método de cultura organotípica de tecido tumoral, compreendendo o referido método o ato de cultura do tecido tumoral na

plataforma de microambiente tumoral como mencionado acima para se obter a cultura organotípica.

A presente divulgação relaciona-se também com um método de previsão da resposta de um sujeito tumoral ao(s) fármaco(s), compreendendo o referido método os atos de:

- a. cultura do tecido tumoral do sujeito na plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 3, para se obter tecido tumoral cultivado;
- b. tratamento do tecido tumoral cultivado com o(s) fármaco(s) e condução de ensaio;
- c. conversão da leitura do ensaio em métrica numérica para se obter o índice de sensibilidade e, deste modo, previsão da resposta do sujeito ao(s) fármaco(s); e
- d. opcionalmente, correlação do índice de sensibilidade com a resposta clínica do sujeito ao(s) fármaco(s).

A presente divulgação relaciona-se também com um método de previsão da resposta de um sujeito tumoral ao(s) fármaco(s), compreendendo o referido método os atos de

- a. cultura do tecido tumoral do sujeito na plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 3, para se obter tecido tumoral cultivado;
- b. tratamento do tecido tumoral cultivado com o(s) fármaco(s);
- c. avaliação da resposta tumoral ao fármaco por pluralidade de ensaios para se obter pontuação de avaliação para cada um da pluralidade de ensaios;
- d. atribuição de uma pontuação ponderada para cada um da pluralidade de ensaios;

- e. multiplicação da pontuação de avaliação de cada um da pluralidade de ensaios com a pontuação ponderada do ensaio correspondente da pluralidade de ensaios para se obter a pontuação de ensaio independente para cada um da pluralidade de ensaios;
- f. combinação da pontuação de ensaio independente de cada um da pluralidade de ensaios para se obter o índice de sensibilidade e deste modo previsão da resposta do sujeito ao(s) fármaco(s); e
- g. opcionalmente, correlação do índice de sensibilidade com a resposta clínica do sujeito ao(s) fármaco(s)

A presente divulgação relaciona-se também com um método de rastreio ou desenvolvimento de agente anticancerígeno, compreendendo o referido método os atos de:

- a. cultura do tecido tumoral do sujeito na plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 3, para se obter tecido tumoral cultivado;
- b. tratamento do tecido tumoral cultivado com o agente, avaliação da resposta tumoral ao agente por ensaio para se determinar o efeito do referido agente na célula tumoral.

A presente divulgação relaciona-se também com um método para rastreio de células tumorais quanto a marcadores específicos, compreendendo o referido método os atos de:

- a. cultura do tecido tumoral do sujeito na plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 3, para se obter tecido tumoral cultivado;
- b. tratamento do tecido tumoral cultivado com fármaco(s) e avaliação da resposta tumoral ao fármaco por ensaio; e

c. condução de análise de *microarray* e Ácido Nucleico para rastrear quanto aos biomarcadores.

Em outra forma de realização da composição de ECM acima, a composição é específica do tumor; e em que o colagénio 1 está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL ou cerca de 50 µg/mL; o colagénio 3 está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, preferencialmente a cerca de 0,1 µg/mL ou cerca de 1 µg/mL ou cerca de 100 µg/mL; o colagénio 4 está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL ou cerca de 250 µg/mL; o colagénio 6 está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 0,1 µg/mL ou cerca de 1 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL; a Fibronectina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 750 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL ou cerca de 500 µg/mL; a Vitronectina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 95 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL; a Caderina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 1 µg/mL e cerca de 5 µg/mL; a Filamina A está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL; a Vimentina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, preferencialmente a cerca de 1 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL; a Laminina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL; a Decorina está à concentração

variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, preferencialmente a cerca de 10 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL; a Tenascina C está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 10 µg/mL ou cerca de 25 µg/mL; e a Osteopontina está à concentração variando de cerca de 001 µg/mL a cerca de 150 µg/mL, preferencialmente a cerca de 1 µg/mL ou cerca de 5 µg/mL.

Em ainda outra forma de realização da divulgação, o referido tecido tumoral é obtido da fonte selecionada do grupo compreendendo sistema nervoso central, medula óssea, sangue, baço, timo, coração, glândula mamária, fígado, pâncreas, tiroide, músculo esquelético, rim, pulmão, intestino, estômago, esófago, ovário, bexiga, testículo, útero, tecido estromal e tecido conectivo ou quaisquer suas combinações, e o tumor ou o tecido tumoral é obtido cirurgicamente ou por biópsia ou como xenoinxerto ou quaisquer suas combinações; e o tumor ou o tecido tumoral é dividido em pequenos pedaços de secções de cerca de 100 µm a cerca de 3000 µm.

Em ainda outra forma de realização da divulgação, na plataforma de microambiente tumoral acima referenciada, o tecido tumoral é obtido da fonte selecionada do grupo compreendendo sistema nervoso central, medula óssea, sangue, baço, timo, coração, glândula mamária, fígado, pâncreas, tiroide, músculo esquelético, rim, pulmão, intestino, estômago, esófago, ovário, bexiga, testículo, útero, tecido estromal e tecido conectivo ou quaisquer suas combinações; em que o tumor ou o tecido tumoral é obtido cirurgicamente ou por biópsia ou como xenoinxerto ou quaisquer suas combinações; e o tumor ou o tecido tumoral é

dividido em pequenos pedaços de secções de cerca de 100  $\mu\text{m}$  a cerca de 3000  $\mu\text{m}$ ; em que a cultura do tecido tumoral é levada a cabo à temperatura variando de cerca de 30 °C a cerca de 40 °C, preferencialmente cerca de 37 °C; durante duração de tempo de cerca de 2 a 10 dias, preferencialmente cerca de 3 a 7 dias; e  $\text{CO}_2$  a cerca de 5%; e em que a plataforma de revestimento é selecionada do grupo compreendendo placa, base, frasco, prato, placa de Petri e prato de Petri.

Em ainda outra forma de realização da divulgação, a plataforma de microambiente acima referenciada é para manutenção das redes de sinalização da célula tumoral; e para manutenção de um microambiente de tecido, arquitetura celular e integridade da interação tumor-estroma intactos.

Em ainda outra forma de realização da divulgação, o meio de cultura é selecionado do grupo compreendendo Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ou RPMI1640 [Meio do Roswell Park Memorial Institute] à concentração variando de cerca de 60% a cerca de 100%, preferencialmente cerca de 80% 2 mL; FBS (Soro Fetal de Bovino) inativado pelo calor à concentração de cerca de 0,1% a cerca de 40%, preferencialmente cerca de 2% p/p; Penicilina-Estreptomicina à concentração variando de cerca de 1% a cerca de 2%, preferencialmente cerca de 1% p/p; piruvato de sódio à concentração variando de cerca de 10 mM a cerca de 500 mM, preferencialmente cerca de 100 mM; o aminoácido não essencial é L-glutamina à concentração variando de cerca de 1 mM a cerca de 10 mM, preferencialmente cerca de 5 mM; e HEPES (ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfónico) à concentração variando de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, preferencialmente cerca de 10 mM; o soro está à

concentração variando de cerca de 0,1% a cerca de 10%, preferencialmente cerca de 2%.

Em ainda outra forma de realização da divulgação, nos métodos acima referenciados, o tumor é selecionado do grupo compreendendo estômago, cólon, cabeça & pescoço, cérebro, cavidade oral, mama, gástrico, gastrointestinal, esofágico, colorretal, pancreático, pulmão, fígado, rim, ovários, uterino, osso, próstata, testicular, glioblastoma, astrocitoma, melanoma, tiroide, bexiga, células não pequenas do pulmão, células pequenas do pulmão, cancros hematológicos incluindo AML, Leucemia Mieloide Aguda, CML, Leucemia Mieloide Crônica, ALL, Leucemia Linfocítica Aguda, TALL, Leucemia Linfoblástica Aguda de células T, NHL, Linfoma não de Hodgkin, DBCL, Linfoma de células B Difusas, CLL, Leucemia Linfocítica Crônica, e mieloma múltiplo ou quaisquer suas combinações.

Em ainda outra forma de realização da divulgação, nos métodos acima referenciados, o ensaio é selecionado do grupo compreendendo ensaio para a viabilidade de células, morte de células, proliferação de células, morfologia tumoral, conteúdo no estroma tumoral, metabolismo de células, senescência ou quaisquer suas combinações; e em que o ensaio para a viabilidade de células e o metabolismo de células é selecionado do grupo compreendendo ensaio WST, ensaio de captação de ATP e ensaio de captação de glucose; o ensaio para a morte de células é selecionado do grupo compreendendo ensaio LDH, ensaio de Caspase 3 Ativada, ensaio de Caspase 8 Ativada e ensaio de Óxido Nítrico Sintase, TUNEL; o ensaio para a proliferação de células é selecionado do grupo compreendendo ensaio Ki67, ensaio de razão ATP/ADP e ensaio de captação de glucose; e o ensaio

para a morfologia tumoral e o estroma tumoral é H&E, coloração de Hematoxilina & Eosina; ou quaisquer suas combinações.

Em ainda outra forma de realização da divulgação, o método é usado para decisão de tratamento para o sujeito do grupo compreendendo quimioterapia, terapia visada, cirurgia, radiação ou quaisquer suas combinações; e em que o índice de sensibilidade se correlaciona com resposta clínica completa, resposta clínica parcial e nenhuma resposta clínica quando o índice de sensibilidade é maior do que 60, entre 20 e 60 e menor do que 20, respetivamente.

Em ainda outra forma de realização da divulgação, nos métodos acima referenciados, a atribuição uma pontuação ponderada de cada um da pluralidade de ensaios é baseada na natureza do fármaco usado.

Em ainda outra forma de realização da divulgação, nos métodos acima referenciados, a análise de *microarray* e Ácido Nucleico de DNA, RNA ou microRNA é levada a cabo para se detetar a modulação da via antes do e após o tratamento com fármaco; e em que a análise de *microarray* e Ácido Nucleico é confirmada usando ensaio selecionado do grupo compreendendo PCR em Tempo real, RTPCR, Análise imunohistoquímica, IHC, e perfil fosfo-proteómico.

### **Visão global do Presente Método**

**A visão global do protocolo usado na presente divulgação é proporcionada como em baixo:**

O primeiro passo é recolha de amostras de tecido e

recolha de amostras de sangue pós-obtenção do consentimento informado do paciente. As amostras são obtidas através de colaboração clínica usando procedimentos aprovados por IRB. Logo que o tumor seja obtido da respetiva fonte de pacientes é sujeito ao método de tratamento com explantes e/ou xenoenxerto.

No método de tratamento com explantes, o "Preditor da Resposta Clínica" é realizado para avaliação da resposta em tumor de paciente primário.

Alternativamente, quando a fonte tumoral é um xenoenxerto, o tumor de camundongos é excisado e adicionalmente sujeito a análise de explantes como descrito em baixo. Noutra forma de realização, o tumor é obtido e é implantado nos camundongos, subsequentemente, é permitido que cresça, depois é excisado e depois sujeito à presente análise "Preditor da Resposta Clínica".

Após obtenção da amostra de tecido é dividida para obtenção de várias entradas de a) ensaio de explantes; b) Ensaio baseado em histologia como IHC (imunohistoquímica)/H&E, e c) análise de eficácia de xenoenxertos derivados de tumores primários.

A) A amostra de tecido para análise de explantes é cortada usando Vibratome da Leica para gerar secções de espessura de cerca de 100-3000  $\mu\text{m}$ . Estas secções são cultivadas em placas revestidas com a composição de ECM específica do tipo de cancro em quadruplicado com meios contendo soros autólogos e também vários fármacos opcionalmente, durante um período de cerca de 48-96 horas. Os meios com fármaco e enriquecidos com

soro/plasma/PBMCs/ligantes derivados do soro são mudados a cada 24 horas. Após este período é feita análise MTT/WST para avaliar a percentagem de viabilidade de células (ensaio de ponto final). O sobrenadante da cultura de meios é removido a cada 24 hrs e avaliado quanto à proliferação (usando experiências de utilização de ATP e glucose) e morte de células (por avaliação de ensaios de lactato desidrogenase e medições de caspase-3 e caspase-8) para dar tendências de resposta cinética. Os resultados são quantificados contra um controlo não tratado com fármaco. Perda significativa na viabilidade/proliferação de células em comparação com controlo não tratado é indicativa de resposta ao fármaco/combinacão e também morte de células aumentada. As secções de tecido tanto tratadas como não tratadas são também dadas para avaliação histológica no final do período de cultura.

B) Os tecidos dados para avaliação histológica são avaliados quanto à apoptose por TUNEL e ensaio de caspase 3 ativada. Igualmente, a proliferação de células é avaliada quanto aos marcadores de proliferação padrão como Ki67, H&E é também rotineiramente realizada para avaliar as figuras mitóticas, necrose e características grosseiras gerais do tecido.

C) Tumores selecionados são implantados em camundongos imunocomprometidos como um xenoenxerto para gerar banco e tumores para o propósito de expansão e manutenção de tecidos através de passagem em série em camundongos imunocomprometidos.

Numa abordagem específica, o estudo de xenoenxertos é feito de modo a validar a resposta "Preditor da Resposta Clínica". A amostra dada para o estudo de xenoenxertos é

usada para implantar cerca de 3-5 camundongos SCID imunocomprometidos para gerar xenoenxertos de tumores primários que são subsequentemente sujeitos a estimativa da eficácia dos fármacos. Como capturado acima, a metodologia de xenoenxertos não é um procedimento de rotina, mas é uma parte da validação da presente resposta "Preditor da Resposta Clínica". Como parte da análise de resposta "Preditor da Resposta Clínica" é observado que os quimioterapêuticos e terapias visadas testados em sistema de explante e xenoenxerto são idênticos ao regime prescrito pelo médico para o paciente do qual o tecido tumoral é obtido.

Independentemente do tipo de cancro sólido testado, o mesmo procedimento como mencionado acima é seguido. A única diferença processual entre os diferentes tipos de cancros sólidos é o painel de fármacos testados e a composição de ECM da placa revestida. Adicionalmente, os ligantes derivados do soro são únicos de cada paciente testado no modelo de explantes.

Logo que o volume de tecido tumoral de explante alcance à volta de 500 mm<sup>3</sup>, o sistema de explantes é adicionalmente validado por teste do tecido em sistema de explantes idêntico ao tecido do paciente original e correlação dos dados de eficácia de todas estas leituras pré-clínicas, *i.e.*, leituras do sistema de xenoenxertos, sistema de explantes e sistema de tecidos do paciente original. O tempo tomado para gerar dados clínicos e dados de eficácia para xenoenxertos derivados de tumores primários é entre 3-8 meses. No entanto, o tempo de retorno para análise de explantes e avaliação histológica é cerca de 1 semana.

D) Todos os resultados pré-clínicos, tais como viabilidade de células, morte de células por apoptose, por citotoxicidade, e também estado de proliferação são finalmente integrados para dar uma única pontuação chamada pontuação M. Esta pontuação M foi inicialmente construída usando uma coorte de treino. Foi descoberto que baixa pontuação M é indicativa de fraca resposta enquanto elevada pontuação M corresponde a melhor resposta em cenário clínico. Isto é adicionalmente validado usando uma coorte de validação de ~ 100 tumores da cabeça e pescoço, em que a pontuação M para os tumores é gerada e correlacionada com o resultado clínico.

O resultado pré-clínico "Preditor da Resposta Clínica" é obtido em cerca de uma semana e o resultado clínico é reunido após cerca de 6 meses de terapia. Subsequentemente, os resultados obtidos de resultados pré-clínicos e clínicos são correlacionados. O mesmo procedimento "Preditor da Resposta Clínica" é usado para identificar respondedores e não respondedores; e é comparado com o resultado clínico em múltiplos cancros sólidos.

Num método exemplificativo, em conjunção com os ensaios para o "Preditor da Resposta Clínica", as amostras de tecido podem ser também avaliadas para se determinar o material genético do tecido tumoral para se entender a biologia do tumor. O tecido tumoral é sujeito a isolamento de ácido nucleico para avaliação de RNA e análise de *microarray* de miRNA, análise de genes para mutações específicas, sequenciação de exomas de DNA e Perfil genético.

Num método exemplificativo, o desenvolvimento de fármacos/assinatura tumoral/resistência a fármacos e diagnóstico acompanhante são feitos do seguinte modo. Por comparação do perfil genético de amostras tumorais não tratadas com aquele de amostras tratadas, as vias que foram afetadas devido ao tratamento com fármacos são deduzidas. Olhando para o perfil de mRNA total, as vias que foram moduladas como resultado do tratamento e seu efeito na resposta aos fármacos são correlacionadas. A sequência de DNA de respondedores e não respondedores é comparada para se obter uma assinatura para a resposta ou não resposta. Deste modo, uma assinatura para qualquer um dos resultados é deduzida. No caso de resistência aos fármacos, o material genético é isolado das células resistentes nos explantes e olha-se para a modulação da via em comparação com as amostras não tratadas para se entender a biologia por detrás da resistência. Para o desenvolvimento de diagnóstico acompanhante, a leitura de explantes é usada para segregar respondedores e não respondedores, e a informação genética subjacente é usada para reduzir isto à assinatura genética para uso como um diagnóstico acompanhante para esse tratamento com fármacos particular.

Num método exemplificativo, uma das vantagens de "Preditor da Resposta Clínica" é a capacidade manter o microambiente do tecido e arquitetura celular intactos, enquanto preserva também a integridade da interação tumor-estroma. É neste contexto biofísico e bioquímico que as células exibem tecido *bona fide* e especificidade de órgãos. Aqui é descrito um método de cultura de explantes usando fatias de tecido para manter a arquitetura e microambiente celulares. Os meios de cultura são também adicionalmente suplementados com ligantes derivados do paciente para mimetizar as vidas

de sinalização fisiologicamente relevantes similares ao ambiente nativo. Adicionalmente, o sistema de plataforma de teste de explantes utiliza a composição de ECM que é específica desse tipo de cancro. Deste modo, o sistema de explantes é um sistema que mimetiza o ambiente hospedeiro nativo tão intimamente quanto possível. Este sistema único permite-nos responder a questões específicas relacionadas com a sinalização tumoral e o efeito de inibidores de pequena molécula que visam vias específicas dentro do ambiente tumoral.

Num método exemplificativo é levado a cabo o método de criação de microambiente tumoral local *in vitro* que mimetiza o microambiente tumoral do paciente. O método para cultura organotípica a longo prazo de tecido tanto tumoral como estromal é levado a cabo, em que a referida cultura proporciona ligantes humanos para mimetizar sistemas de sinalização fisiologicamente relevantes. Uma cultura organotípica compreendendo de efetores imunes humanos e fatores angiogénicos para fenocopiar o microambiente de tecidos do hospedeiro é preparada. Na cultura organotípica, o tecido tumoral é obtido de tumores sólidos incluindo tumores da cabeça & pescoço (HNSCC), cérebro, cavidade oral, mama, gástrico, esofágico, colorretal (CRC), pancreático, pulmão, fígado, rim, ovários, uterino, osso, próstata, testicular, e outros tecidos de origem humana ou de camundongos bem como cancros hematológicos incluindo Leucemia Mieloide Aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), Leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfoblástica aguda de células T (TALL), linfoma não de Hodgkin (NHL), linfoma de células B difusas (DBCL) e leucemia linfocítica crónica (CLL). A cultura organotípica é para manutenção da viabilidade de tecidos tumorais e

redes de sinalização por cultura do referido tecido em placas pré-revestidas com um *cocktail* de proteínas extracelulares ou Matriz Extracelular definida específicas do estágio e tipo de cancro obtido de um tipo de tecido selecionado do grupo consistindo em cancros de cabeça & pescoço, cavidade oral, mama, ovários, útero, gastrointestinal, colorretal, pancreático, próstata, glioblastoma, astrocitoma, melanoma, tiroide, rim, bexiga, células não pequenas do pulmão, células pequenas do pulmão, fígado, osso e outros tecidos de origem humana ou de camundongo.

Noutro método, a cultura organotípica é suplementada com ligantes isolados de soro humano, em que o soro é soro humano autólogo, soro humano heterólogo. Adicionalmente, a cultura organotípica é suplementada com soro humano autólogo ou soro humano heterólogo ou com ligantes isolados de plasma humano autólogo ou com ligantes isolados de plasma humano heterólogo ou com ligantes isolados de sangue humano autólogo ou com ligantes isolados de sangue humano heterólogo ou com ligantes isolados de soro, plasma ou sangue não humano ou com PBMCs isoladas de sangue autólogo.

Em ainda outro método, a cultura organotípica é também suplementada com fatores imunes isolados de sangue humano tal que seja de sangue humano autólogo ou de sangue humano heterólogo. A cultura organotípica é suplementada com plasma humano autólogo ou com plasma humano heterólogo ou com sangue humano autólogo ou com sangue humano heterólogo ou com fatores imunes isolados de soro, plasma ou sangue não humano. A cultura organotípica é também suplementada com fatores angiogénicos isolados de soro humano tal como soro humano autólogo, soro humano heterólogo. A cultura

organotípica é suplementada com fatores angiogénicos isolados de soro, plasma ou sangue não humano ou com fatores angiogénicos comercialmente disponíveis.

Em ainda outro método, o tecido na referida cultura organotípica é viável durante mais do que 7 dias em cultura. As referidas condições de cultura e tecido tumoral são também usadas para estudar redes de sinalização. Adicionalmente, o tecido tumoral na cultura organotípica é excisado e processado para se manter a viabilidade de tecido máxima. A referida cultura organotípica é também usada para rastreio, cultura e expansão *ex vivo* de células cancerígenas. Noutra forma de realização é também feito processamento adicional e criopreservação da cultura organotípica resultante.

Em outro método, a aplicação do presente microambiente tumoral é na seleção da opção de tratamento ótima para o paciente sob investigação. O microambiente tumoral é também usado na - seleção de fármacos anticancerígenos para o paciente sob investigação, seleção de fármacos anticancerígenos para combinar com os fármacos que foram selecionados para o paciente sob investigação, decisão da opção de tratamento para o paciente de entre quimioterapia, terapia visada, cirurgia, radiação ou uma sua combinação, decisão de se o paciente responderá à quimioterapia, terapia visada, cirurgia, Radiação ou uma sua combinação, seleção de fármacos não para o cancro para o tratamento de paciente com cancro sob investigação.

Em outro método, a aplicação do presente microambiente tumoral é no desenvolvimento de fármacos anticancerígenos. O microambiente tumoral é também usado - no desenvolvimento

pré-clínico ou clínico de fármacos anticancerígenos, para identificar os tipos de cânceres para os quais o fármaco anticancerígeno sob investigação tem atividade ótima, para identificar os fármacos *standard of care* ótimos que possam ser combinados com o fármaco anticancerígeno sob investigação para proporcionar atividade ótima, para identificar as doses ótimas para o fármaco anticancerígeno sob investigação para proporcionar atividade ótima, para identificar as doses ótimas para fármacos *standard of care* que possam ser combinados com o fármaco anticancerígeno sob investigação para proporcionar atividade ótima, para identificar os pacientes ótimos aos quais possa ser administrado o fármaco anticancerígeno sob investigação para proporcionar atividade ótima sozinho ou em combinação com fármacos *standard of care*.

Em outro método, a aplicação do presente microambiente tumoral é no desenvolvimento de testes de diagnóstico acompanhantes para quimioterapias, fármacos visados. O microambiente tumoral é também usado - no desenvolvimento de testes de diagnóstico acompanhantes para quimioterapias ou fármacos visados incluindo biológicos, para estabelecer os "respondedores e não respondedores" para quimioterapêuticos ou fármacos visados incluindo biológicos, perfil molecular dos "respondedores e não respondedores" assim selecionados para quimioterapêuticos ou fármacos visados incluindo biológicos, que é usado para desenvolver os testes de diagnóstico acompanhantes para pré-selecionar os pacientes que é provável que respondam ao quimioterapêutico ou fármacos visados incluindo biológicos, como um teste de diagnóstico acompanhante funcional para pré-selecionar os pacientes que é provável que respondem ao quimioterapêutico ou fármacos visados incluindo biológicos.

Em ainda outro método, a aplicação da presente ferramenta de segregação de pacientes é também no desenvolvimento de fármacos para doenças autoimunes e disfunções inflamatórias e no desenvolvimento de testes de diagnóstico acompanhantes para os fármacos usados para doenças autoimunes e disfunções inflamatórias.

Em outro exemplo é apresentado um método para rastreio de células tumorais quanto à presença de marcadores específicos, em que o método compreende de IHC e outras técnicas; e determinação da viabilidade das referidas células, em que o crescimento e proliferação são indicativos do estado tumoral.

Em outro exemplo é apresentado um método para rastreio de agentes quanto ao seu efeito no tumor, em que o método compreende o ato de contacto de agentes candidatos com uma cultura e determinação do efeito do referido agente nas células tumorais na referida cultura.

Em outro exemplo, os métodos/aplicações acima mencionados usam fatia de tecido que é de origem humana ou de origem animal. Adicionalmente, o referido tecido é do sistema nervoso central, medula óssea, sangue (p.ex., monócitos), baço, timo, coração, glândulas mamárias, fígado, pâncreas, tiroide, músculo esquelético, rim, pulmão, intestino, estômago, esófago, ovário, bexiga, testículo, útero ou tecido conectivo. Em continuação, nos métodos acima, as referidas células são células estaminais ou as células são de mais do que um órgão ou as células são de um órgão ou órgãos saudáveis ou as células são de um órgão ou órgãos

doentes ou as células foram geneticamente alteradas ou as células são de um órgão animal transgênico.

Noutro exemplo, a presente divulgação relaciona-se com um método para rastreio de células tumorais quanto a marcadores específicos compreendendo o ato de - cultura do tecido tumoral do sujeito na presente plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 3 e tratamento do tecido tumoral cultivado com o(s) fármaco(s) para avaliar a resposta tumoral ao fármaco por pluralidade de ensaios para se obter pontuação de avaliação para cada um da pluralidade de ensaios. Subsequentemente é feita análise de *microarray* de RNA e microRNA para detetar modulação de via pós-tratamento em comparação com perfil pré-tratamento para identificar biomarcadores putativos; confirmação dos mesmos de alvos é feita usando RTPCR e IHC.

Os seguintes exemplos elaboram adicionalmente e ilustram os aspetos da presente divulgação. No entanto, estes exemplos não devem ser interpretados como limitando o âmbito da presente divulgação.

### **EXEMPLOS**

A presente divulgação apresenta os vários aspetos da invenção por meio dos seguintes exemplos ilustrativos, em que o exemplo 1 se relaciona com a preparação e revestimento de composição de ECM adequada em placas de células que é usada na presente análise "Preditor da Resposta Clínica". O cenário do sistema de análise "Preditor da Resposta Clínica" é elaborado no Exemplo 2, Os Exemplos 1 e 2 ilustram também a significância de revestimento das placas para a presente análise com ECM

específica do cancro e adição de ligantes derivados do soro no presente processo "Preditor da Resposta Clínica". O exemplo 3 proporciona o protocolo de Explantes (*i.e.*, protocolo do "Preditor da Resposta Clínica") em que a fonte do tecido tumoral pode ser do paciente ou seu xenoenxerto; e a metodologia de geração do tecido tumoral de xenoenxerto é proporcionada no Exemplo 4, O exemplo 5 apresenta o protocolo usado para determinação da eficácia terapêutica de fármacos em xenoenxertos tumorais de camundongos SCID/nus, de modo a validar os resultados obtidos pela Análise "Preditor da Resposta Clínica". O sistema "Preditor da Resposta Clínica" é depois sujeito a validação pré-clínica como ilustrado no Exemplo 6 e validação clínica no Exemplo 14, Os protocolos dos ensaios empregues na Análise "Preditor da Resposta Clínica" foram proporcionados no Exemplo 7 e o conceito de pontuação M é apresentado no Exemplo 8, O sistema "Preditor da Resposta Clínica" é adicionalmente testado para prever a resposta de múltiplos cancros sólidos nos Exemplos 9, 13 e 14, O exemplo 10 mostra o protocolo inteiro de "Preditor da Resposta Clínica" comparando os resultados obtidos com resultado clínico de modo a validar a presente análise. Os exemplos 11 e 12 proporcionam dados experimentais de modo a demonstrar que a presente análise "Preditor da Resposta Clínica" é um melhor preditor da resposta do que biomarcadores linhas de células, respetivamente.

**Exemplo 1: Preparação e Revestimento de Composição de ECM Adequada em Placas de Células:**

A fonte do tumor é tecido tumoral primário do paciente, derivado por protocolos padrão. Alternativamente, o tecido tumoral humano primário é implantado subcutaneamente em

camundongos SCID imunocomprometidos para gerar xenoenxertos tumorais humanos primários para uma variedade de cânceres sólidos. Após medição do volume tumoral de à volta de 1000 mm<sup>3</sup>, o tumor é excisado do xenoenxerto. A ECM é isolada do tumor do paciente ou de tecido tumoral do xenoenxerto de acordo com o protocolo proporcionado em baixo.

#### **Isolamento de ECM humana e sua caracterização:**

Os tecidos tumorais frescos cirurgicamente removidos são dissecados, cortados em secções de 1-2 mm, e suspensos em solução de dispase (Stem cell Technologies Inc.) e incubados durante 15 min a 48 °C. Os tecidos são homogeneizados numa solução tampão rica em sal contendo Tris a 0,05 M pH 7,4, cloreto de sódio a 3,4 M, 4 mM de EDTA, 2 mM de N-etilmaleimida e protease (Roche) e inibidores de fosfatase (Sigma). A mistura homogeneizada é centrifugada a 7000 g durante 15 min e o sobrenadante é descartado. O pélete é incubado em tampão de ureia a 2 M (cloreto de sódio a 0,15 M e Tris a 0,05 M pH 7,4) e agitado durante a noite a 48 °C. A mistura é depois finalmente centrifugada a 14,000 g durante 20 min, e ressuspensa no tampão de ureia a 2 M e armazenada a -80 °C em alíquotas. A estimativa das proteínas é feita usando o estojo de ensaio de proteínas DC (Lowry modificado, Bio-Rad) para estimar a quantidade de proteínas de ECM isoladas para quantificação. O revestimento de pratos de cultura de tecidos é levado a cabo com extratos de proteína a 37 °C durante 3 hr.

Após isolamento de ECM de uma variedade de tecidos tumorais para diferentes indicações, a composição destas ECM é analisada por espectrometria de massa, os resultados da qual

são ilustrados nas tabelas 1A a 1G. A distribuição e abundância de diferentes composições da Matriz Extracelular isolada de diferentes tumores primários (HNSCC, câncros do estômago, pancreático e cólon) são representadas nas Tabelas 1A a 1G. As amostras são purificadas e sujeitas a análise por LCMS. A abundância das principais proteínas da matriz é indicada para cada tipo de tumor. Como ilustrado nas tabelas acima mencionadas, os componentes requeridos para o revestimento de ECM são específicos de cada tipo de câncer. Conseqüentemente, todos os dados acima ajudam na identificação da composição da ECM a ser revestida nos poços na direção do tipo de tumor/câncer específico. As concentrações dos componentes requeridos na mistura de ECM são proporcionadas na tabela 1 em baixo, que é um resumo das tabelas 1A a 1G.

**Tabela 1: Concentração de constituintes de composição de ECM**

No de S.	Lista Hu-ECM	Concentração de revestimento ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	colagênio1	cerca de 0,01 a cerca de 100, preferencialmente cerca de 5, cerca de 20 e cerca de 50
2	colagênio3	cerca de 0,01 a cerca de 100, preferencialmente cerca de 0,1, cerca de 1, cerca de 10 e cerca de 100
3	colagênio4	cerca de 0,01 a cerca de 500, preferencialmente cerca de 5, cerca de 20 e cerca de 250
4	colagênio6	cerca de 0,01 a cerca de 500, preferencialmente cerca de 0,1, cerca de 1 e cerca de 10
5	FN	cerca de 0,01 a cerca de 750, preferencialmente cerca de 5, cerca de 20 e cerca de 500
6	VN	cerca de 0,01 a cerca de 95, preferencialmente cerca de 5 e cerca de 10
7	Caderina	cerca de 0,01 a cerca de 500, preferencialmente cerca de 1 e cerca de 5
8	Filamina A	cerca de 0,01 a cerca de 500, preferencialmente cerca de 5 e cerca de 10

No de S.	Lista Hu-ECM	Concentração de revestimento (µg/mL)
9	Vimentina	cerca de 0,01 a cerca de 100, preferencialmente cerca de 1 e cerca de 10
10	Laminina	cerca de 0,01 a cerca de 100, preferencialmente cerca de 5, cerca de 10 e cerca de 20
11	Decorina	cerca de 0,01 a cerca de 100, preferencialmente cerca de 10 e cerca de 20
12	Tenascina C	cerca de 0,01 a cerca de 500, preferencialmente cerca de 10 e cerca de 25
13	Osteopontina	cerca de 0,01 a cerca de 150, preferencialmente cerca de 1 e cerca de 5

Após avaliação de ECM de diferentes tipos de tumores de xenoenxertos primários em comparação com o tumor dador primário, experiências de revestimento foram também realizadas para teste das ECMs do mesmo tipo de cancro sólido (p.ex., Cólon), mas isoladas de diferente xenoenxertos tumorais primários (diferentes dadores primários). As placas de ECM diferentemente revestidas são também analisadas no que diz respeito à sua capacidade de proporcionarem suporte/estrutura para os tecidos testados em explantes. Todos os dados acima são agrupados para se chegar à ECM final a ser revestida na placa na direção de um tipo de tumor/cancro específico.

A viabilidade de tecidos tumorais em Matriz ECM diferencialmente revestida é monitorizada durante um período de cerca de 3 a cerca de 7 dias a 37 °C a CO<sub>2</sub> a 5%.

**Tabela 1A: ESTÔMAGO**

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores gástricos e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
----------	----------	------	-------------------

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores gástricos e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
1	B1	Cadeia alfa-1 (I) do colagénio	0,7-49,5
2	B2	Cadeia alfa-2 (II) do colagénio	0,4-39,8
3	B15	Cadeia alfa-1 (III) do colagénio	1,1-38,3
4	B33	Proteína de fusão COL1A1 e PDGFB	0,8-21
5	B34	Isoforma de tuberina 1	0,5-15
6	B35	Isoforma de tuberina 4	1-19,3
7	B36	Isoforma de tuberina 5	0,3-35,8
8	B37	Precursor da isoforma 1 alfa-8 de protocaderina	0,9-6,3
9	B38	Precursor da isoforma 2 alfa-8 de protocaderina	0-3,5
10	B39	Precursor da isoforma 2 alfa-M de integrina	1-44,4
11	B40	Precursor da isoforma 1 alfa-M de integrina	1,5-12,7
1	C1	Actina, citoplasmática 1	0,2-25
2	C2	Actina, citoplasmática 2	0,4-37
3	C3	Actina, um músculo cardíaco	2-33,7
4	C4	Actina, um músculo esquelético	0,2-21,3
5	C9	Citoqueratina, tipo 1	0,1-35,5
6	C10	Citoqueratina, tipo 2	0,6-21,7
7	C19	Actina, músculo liso aórtico 1	0,4-28,9
8	C20	Actina, precursor da isoforma 2 do músculo liso gástrico	0,2-19,2
9	C21	Actina, músculo liso aórtico 2	0-9,7
10	C30	Distonina	0,2-11,3
1	R23	Proteína S100-A8	1-20,3
2	R25	Anexina A1	3-15,1
3	R34	Proteína S100-A9	2,8-12,8
4	R64	Hialuronano sintase 2	0,2-8,6
5	R65	Proteína tipo MICAL C-terminal	0,1-6,6
6	R66	Proteína tipo canal de cloreto CLIC 1	1-16,6
7	R67	Recetor da família GDNF alfa-1	0,2-23,7
8	R68	Componente de proteínas Rab geranylgeranyltransferase A	0,9-25,7

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores gástricos e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
		1	
9	R69	Basonuclina-1	0,9-30,9
10	R70	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2-alfa cinase 4	0,9-13,8
11	R71	Diacilglicerol cinase delta	0,8-5,2
12	R72	Protease tipo AMSH	0,8-18,3
13	R73	Tau-tubulina cinase 1	0,7-6,1
14	R74	Proteína cinase associada a Rho 2	0,6-26
15	R75	deacetilase sirtuina-1 dependente de NAD	0,8-11,1
16	R76	Glicogénio fosforilase, forma do cérebro	0,6-5
17	R77	Proteína de ligação a oxisterol 1	0,2-10,6
1	O6	Histona H4	0,5-3,6
2	O35	Membro da família do domínio de anquirina POTE F	0,2-8
3	O37	Membro da família do domínio de anquirina POTE E	0,7-6
4	O38	Isoforma 2 do membro da família do domínio de anquirina POTE I	0,7-7,6
5	O41	Proteína não caracterizada	0,1-5,2
6	O42	Pré-pró-proteína da albumina do soro	0,4-8,1
7	O43	Precursor da glicoproteína alfa-1-ácida 2	0,2-14
8	O44	Precursor do membro da superfamília de imunoglobulinas 2	0,2-20,4
9	O45	Isoforma de limcaína-b 1	0,1-9
10	O46	Isoforma de limcaína-b 3	0,1-9
11	O47	Isoforma de limcaína-b 2	0,1-9,2
12	O48	Inibidor da proteína de crescimento 2	0,1-9,9
13	O49	Subunidade de hemoglobina gama-2	0,5-4,6
14	O50	Subunidade de hemoglobina épsilon [ <i>Homo sapiens</i> ]	0,5-18,6
15	O51	Subunidade de hemoglobina delta	0,5-22,5
16	O52	Subunidade de hemoglobina beta	0,5-17,2
17	O53	Subunidade de hemoglobina gama-1	0,5-31,1
18	O54	Enzima modificante-ativante tipo ubiquitina 7	0,1-39

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores gástricos e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
19	O70	Proteína contendo domínio NudC 2	0,2-36,6
20	O71	Proteína apoptogénica 1, mitocondrial	0,2-8,6
21	O78	Proteína de ligação ao ribossoma	0,8-30,4
22	O80	Proteína C15orf2	0,1-21
23	O81	Proteína contendo domínio L1 ribossomal 1	0,9-51,4
24	O82	Proteína de ligação ao nucleótido guanina	0,8-38,3
25	O83	Fator tipo Krueppel	0,1-14,3
26	O84	Cadeia beta do recetor de células T	0,1-5

### Tabela 1B: CRC

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores colorretais e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 7)
1	M1	Miosina 1	0,3-25,5
2	M9	Miosina 9	0,2-12,4
3	M24	Isoforma 9 de Fibronectina	0,4-20,7
4	M25	Isoforma 10 de Fibronectina	0,3-23,1
5	M26	Pré-pró-proteína da isoforma 4 de fibronectina	0,2-11,2
6	M31	Isoforma DPI de Desmoplaquina	0,1-15,6
7	M37	Mucina-12	0,2-33,7
8	M38	Interface das microfibrilas de elastina 1	0-11,6
9	M39	Isoforma de obscurina b	0,2-12,3
10	M40	Isoforma de obscurina a	0,1-22,2
11	M41	Isoforma 2 da proteína ligante contendo domínio CAP-Gly 2	0,1-20,1
12	M42	Isoforma 1 da proteína ligante contendo domínio CAP-Gly 2	0,2-4,8
13	M43	Precursor da isoforma 1 da proteína tipo obscurina 1	0,1-5
14	M44	Precursor da isoforma 2 da proteína tipo obscurina 1	0,1-13,5
15	M45	Precursor da isoforma 3 da proteína tipo obscurina 1	0,1-17,4
1	B1	Cadeia alfa-1 (I) de colagénio	1,1-28,3

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores colorretais e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 7)
2	B2	Cadeia alfa-2 (I) de colagénio	0,9-42,8
3	B3	Isoforma 1 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	0-22,5
4	B15	Cadeia alfa-1 (III) de colagénio	0,9-36,7
5	B17	Proteína da membrana associada à vesícula 3	0,6-9,2
6	B37	Precursor da isoforma 1 alfa-8 de protocaderina	4,6-5,7
7	B38	Precursor da isoforma 2 alfa-8 de protocaderina	0,8-5,2
8	B42	Precursor da isoforma B da cadeia alfa-6 (IV) de colagénio	0,3-2,3
9	B43	Precursor da isoforma A da cadeia alfa-6 (IV) de colagénio	0,4-1,9
10	B44	Colagénio, tipo XXII, alfa 1	0,1-14,5
11	B45	Precursor de estabilina-2	0,1-3,5
12	B46	Isoforma 1 de semaforina-4G	0,2-13,8
13	B47	Isoforma 2 de semaforina-4G	0,2-22,7
14	B48	Precursor de Fat 1 de protocaderina	0,9-34,6
15	B49	Tetraspanina-11	0,2-4,2
16	B50	Cadeia alfa-1 (XX) de colagénio	0,3-18,6
1	C1	Actina, citoplasmática 1	0,2-30,9
2	C2	Actina, citoplasmática 2	0,1-19,2
3	C4	Actina, um músculo esquelético	0,1-23,8
4	C6	Tubulina-a	0,3-29,9
5	C7	Tubulina, b	0,3-14,8
6	C10	Citoqueratina, tipo 2	1,1-35,2
7	C12	Proteína de 69 KDa	0,5-17,7
8	C15	Coronina 1 A	0,3-24,8
9	C16	Placoglobina de junção	0,3-9,9
10	C18	Isoforma 1 de Filamina-A	0,9-15,8
11	C22	Vimentina	0,2-25,5
12	C23	Plastina 2	0,2-22,4
13	C28	Dineína	0,2-37,8
14	C35	Polipéptido pesado dos neurofilamentos	0,5-13,6
1	R1	Calmodulina	0,1-18,7

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores colorretais e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 7)
2	R24	Proteína do dedo de zinco putativa 137	0,5-25,9
3	R28	Homólogo 1 do fator autorregulador epidérmico deformado	0,6-16,6
4	R29	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, específica dos testículos	0,6-19,5
5	R30	Fator de transcrição MAFK	0,6-5,4
6	R31	Triptofano 2,3-dioxigenase	0,5-8,8
7	R32	Proteína associada à membrana eritroide	0,2-14,6
8	R33	Alquildi-hidroxiacetona-fosfato sintase	0,2-15,4
9	R37	Proteína transportadora mitocondrial de ligação ao cálcio	0,3-17,3
10	R74	Proteína cinase associada a Rho 2	0,6-18,1
11	R79	Pré-pró-proteína tripsina-1	0,3-32,9
12	R83	Proteína de ligação a cromodominio-helicase-DNA 7	0,1-10,1
13	R86	Isoforma 1 de BBX do fator de transcrição da caixa HMG	14,5
14	R87	Família contendo domínio de homologia com pleckstrina	0,2-21,9
15	R88	Exonuclease GOR	0,3-33,8
16	R89	Isoforma da neurobeachina 1	0,4-18,9
17	R90	Proteína tipo neuralizada 2	0,4-11,2
18	R91	2',5'-fosfodiesterase 12	0,3-25,7
19	R92	Ubiquitina E3-proteína ligase tipo NEDD	0,3-27,8
20	R93	Isoforma 1 da proteína do dedo de zinco 84	0,1-22,9
21	R94	Proteína de ER de homeostase do cálcio	0,2-9,5
22	R95	Grande subunidade de DNA primase	0,2-20,4
23	R96	Proteína ativante de Rho GTPase 22	0,9-28,6
24	R97	Isoforma 2 de Proteína Niban	0,4-38,8
25	R98	ARF-GAP com espiral enrolada, repetição ANK e proteína contendo domínio PH 3	0,4-14
26	R99	Serina protease HTRA1	0,2-11,7
27	R100	Molécula inibidora apoptótica Fas	0,3-16,2
28	R101	Aspartato aminotransferase, citoplasmática	0,1-16
29	R102	Isoforma b da proteína cinase 4 ativada por mitogénio	0,2-22,2
30	R103	Proteína cinase C delta	0,1-9,9

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores colorretais e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 7)
1	O20	Subunidades de Hb (alfa)	0,2-15,2
2	O23	Região de cadeia C de Ig a-1	0,1-27,8
3	O41	Proteína não caracterizada	0,3-17,5
4	O42	Pré-pró-proteína da albumina do soro	0,7-14,2
5	O51	Subunidade de hemoglobina delta	0,1-17,4
6	O52	Subunidade de hemoglobina beta	0,1-28,5
7	O53	Subunidade de hemoglobina gamma-1	0,1-15,2
8	O55	Proteína tipo antígeno paraneoplásica 6B	0,1-16,1
9	O56	Proteína tipo antígeno paraneoplásica 6A	0,5-16,1
10	O57	Proteína de biogênese do ribossoma BRX1	0-15,4
11	O83	Fator tipo Krueppel	0,3-19,4
12	O94	Isoforma gama de proteína tipo Max	0,5-13
13	O95	Ribonucleoproteína ligação a PTB 1	0,3-9,3
14	O96	Membro da subfamília G de cassete de ligação ao ATP 8	0,1-13,0
15	O97	Homólogo do ciclo de divisão de células 7	0,9-3
16	O98	Neurolisina, precursor mitocondrial	0,1-23,6
17	O99	Proteína hipotética LOC254778	0,5-18,1
18	O101	Proteína transportadora de fosfato, precursor da isoforma b mitocondrial	0,1-27,8
19	O102	Proteína de ligação a cinase 1 de ligação a TANK 1	0,1-26,2
20	O103	KRT8P11, pseudogene 11 de queratina 8	0,9-7
21	O104	Proteína contendo domínio SAM radical 1, precursor mitocondrial	0,3-20
22	O105	PRO2619	0,5-8,4

**Tabela 1C: CaBr**

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores da mama e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
1	M15	Troponina C, músculo esquelético	0,1-11,9

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores da mama e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
2	M33	Lumicano	0,5-26,7
3	M34	Isoforma de decorina c	0-14,2
4	M35	Isoforma de decorina a	0,4-6
1	B1	Cadeia alfa-1 (I) de colagénio	0,8-43,6
2	B2	Cadeia alfa-2 (I) de colagénio	0,1-40,9
3	B3	Isoforma 1 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	0,3-25,9
4	B5	Isoforma 4 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	0,1-15,8
5	B6	Isoforma 2C2 de Cadeia alfa-2 (VI) de colagénio	0,5-35,2
6	B7	Isoforma 2C2A' de Cadeia alfa-2 (VI) de colagénio	0,4-14,9
7	B8	Isoforma 2C2A de Cadeia alfa-2 (VI) de colagénio	0,5-39,8
8	B15	Cadeia alfa-1 (III) de colagénio	0,4-12,6
9	B20	Isoforma 5 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	0,8-6,6
10	B21	Isoforma longa de cadeia alfa-1 (XII) de colagénio	0,2-4,5
11	B22	Isoforma curta de cadeia alfa-1 (XII) de colagénio	0,6-14,4
12	B23	Cadeia alfa-1 (XIV) de colagénio	0,1-14,3
13	B24	Cadeia alfa-1 (VI) de colagénio	0,6-23,8
14	B25	Homólogo da família de fermitina 3	0-5
15	B26	Isoforma 1 do homólogo de proteína contendo domínio PH expresso na zona ventricular 1	0,5-11,5
16	B27	Isoforma 2 gama-B6 de protocaderina	0,1-8,4
17	B28	Isoforma 1 gama-B6 de protocaderina	0,1-17,4
18	B29	Isoforma 1 da proteína contendo domínio PH expresso na zona ventricular 1	1-8,7
19	B30	Isoforma 2 do homólogo de proteína contendo domínio PH expresso na zona ventricular 1	0,9-6,9
20	B31	Proteína transmembranar 63C	0,7-8,3
21	B32	Fator de von Willebrand, tipo C	2,1-8
1	C8	Actina, precursor da isoforma 1 do músculo liso gama-entérico	0,9-48
2	C9	Citoqueratina, tipo 1	0,9-26
3	C10	Citoqueratina, tipo 2	3,0-51

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores da mama e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
4	C22	Vimentina	0,3-15
5	C25	Isoforma de vinculina meta-VCL	0,1-22,3
6	C26	Isoforma de vinculina VCL	0,2-12,2
7	C27	Fostensina	0,8-13,6
8	C28	Dineína	1-14,7
9	C29	Proteína das fibras densas exteriores 2	0,2-6,2
1	R9	Frutose bifosfatoaldolase A	0,5-8
2	R10	Piruvato Cinase	1,6-15,2
3	R22	Olfactomedina-4	0,7-15,4
4	R25	Anexina A1	0,5-9,3
5	R26	Creatina Cinase tipo M	2,2-10
6	R27	Polirribonucleótido nucleotidiltransferase 1, precursor mitocondrial	0,5-13,6
7	R28	Homólogo do fator autorregulador epidérmico deformado 1	0,1-11,3
8	R48	Fator de crescimento tipo insulina II	0,4-13
9	R49	DDAH2	0,2-8,9
10	R50	Fumarato hidratase, precursor mitocondrial	0,3-6,6
11	R51	Coativador dos recetores nucleares 5	0,9-9,3
12	R52	Proteína BEX5	1-13,8
13	R53	Proteína THEMIS	0,2-9,8
14	R54	Fator de transcrição de oligodendrócitos	0,5-17,7
15	R55	Subunidade alfa da proteína do canal de sódio 8	0,1-9,2
16	R56	Fator de transcrição HIVEP2	0,9-10
17	R57	Serina/treonina-proteína cinase SMG1	1-20,1
18	R58	Proteína ativante de Ras GTPase putativa 4B	0,7-8,7
19	R59	Proteína ativante de Ras GTPase 4	0,3-13,7
20	R60	Proteína tipo humanina 3	1,6-8
21	R61	Proteína de caixa Homeo Nkx-6,1	2-16,9
22	R62	Sepiapterina redutase	3,2-16,9
23	R63	Adenilato ciclase 3	1-9,4

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores da mama e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
1	O8	Histona H1	0,3-9,8
2	O41	Proteína não caracterizada	0-14,9
3	O42	Pré-pró-proteína da albumina do soro	1,2-17,2
4	O60	Proteína ribossomal 39S L20	0,4-15,5
5	O66	Proteína tipo SMG1 não caracterizada putativa	1,5-35
6	O67	Isoforma 1 do fator de citocina tipo cardiotrofina 1	2-9,4
7	O68	Domínio de repetição de anquirina 13B	0,9-12,1
8	O69	Precursor da família de LGI de repetições ricas em leucina	1,4-23
		2	
9	O70	Proteína contendo domínio NudC 2	0,5-12,1
10	O71	Proteína apoptogénica 1, mitocondrial	1-14,2
11	O72	Proteína ribossomal 60S L39	4-23,7
12	O73	Subunidade do complexo promotor de anafase	0-14,1
13	O74	Proteína tumoral translacionalmente controlada	0,9-6
14	O75	Subunidade do fator de iniciação da tradução eIF-2B	1-8,6
15	O76	Proteína que interage com Rab5 putativa	0,5-8
16	O77	Inibidor da tripsina secretora pancreática	0,1-7,2

**Tabela 1D: H e N**

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
1	M1	Miosina 1	0,5-27
2	M2	Miosina 2	0,1-6,4
3	M9	Miosina 9	0,2-11
4	M17	Isoforma 1 de Fibronectina	0,1-7
5	M18	Isoforma 3 de Fibronectina	0-28
6	M19	Isoforma 4 de Fibronectina	0,1-12,5

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
7	M20	Isoforma 5 de Fibronectina	0,1-9,3
8	M21	Isoforma 6 de Fibronectina	0,1-10,5
9	M22	Isoforma 7 de Fibronectina	0,1-10,5
10	M23	Isoforma 8 de Fibronectina	0,1-3,3
11	M24	Isoforma 9 de Fibronectina	0,1-9
12	M25	Isoforma 10 de Fibronectina	0,1-8
13	M26	Pré-pró-proteína de fibronectina	0-5,1
14	M27	Isoforma 14 de Fibronectina	0,1-21
15	M28	Isoforma 15 de Fibronectina	0,1-4,6
16	M29	Isoforma 13 de Fibronectina	0-6,8
17	M30	Isoforma 11 de Fibronectina	0,1-12
18	M36	Molécula de adesão de células relacionada com CRA 16	0,6-5,4
1	B1	Cadeia alfa-1 (I) de colagénio	2,3-21,7
2	B2	Cadeia alfa-2 (I) de colagénio	1,4-24,1
3	B3	Isoforma 1 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	1-11,6
4	B4	Isoforma 2 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	1-8,4
5	B5	Isoforma 4 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	1-18,2
6	B6	Isoforma 2C2 de Cadeia alfa-2 (VI) de colagénio	0,3-6
7	B7	Isoforma 2C2A' de Cadeia alfa-2 (VI) de colagénio	0,3-4,7
8	B8	Isoforma 2C2A de Cadeia alfa-2 (VI) de colagénio	0,3-9,5
9	B15	Cadeia alfa-1 (III) de colagénio	0,2-13
10	B33	Proteína de fusão COL1A1 e PDGFB	0,2-9
11	B41	Proteína associada à membrana plasmática de adipócitos	0,5-13,9
1	C1	Actina, citoplasmática 1	1-5,4
2	C2	Actina, citoplasmática 2	0,4-4,6
3	C9	Citoqueratina, tipo 1	0,5-19
4	C10	Citoqueratina, tipo 2	6,6-35,8
5	C12	Proteína de 69 KDa	0,2-7,9
6	C22	Vimentina	0,1-14,8
7	C23	Plastina 2	0,2-6

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
8	C24	Proteína tipo actina 10	0,1-10,2
9	C31	Septina-11	0,9-7,2
10	C32	Isoforma 1 da proteína ácida fibrilar glial	0,5-4,1
11	C33	Isoforma 3 da proteína ácida fibrilar glial	0,2-5
12	C34	Isoforma 2 da proteína ácida fibrilar glial	0,1-3,4
1	R22	Olfactomedina-4	1-5,4
2	R35	Proteína UPF0696	0,6-7,6
3	R36	Proteína da vizinhança do atraso mental de X frágil 1	1,3-7,2
4	R37	Proteína transportadora mitocondrial de ligação ao cálcio	2-7,1
5	R38	Homólogo da proteína do complexo nucleolar 2	0,4-6,7
6	R39	Proteína contendo domínio HIT do dedo de zinco 1	0,6-5,7
7	R40	Fosfoproteína estável ao calor e ácido de 28 kDa	0,5-3,5
8	R41	Proteína topo fator de ADP-ribosilação 16	0,3-6,1
9	R42	Fator de transcrição LBX2	0,2-7
10	R43	Proteína contendo domínio em espiral enrolada 28B	1-2,5
11	R44	Péptido do suco gástrico 1	0,2-6,1
12	R45	Fator de <i>splicing</i> relacionado com sobrevivência de neurónios motores 30	0,1-3
13	R46	Proteína tipo DCN1 1	0,8-6,9
14	R47	R-spondina-1	0,6-4
15	R77	Proteína de ligação a oxisterol 1	1,8-6,6
16	R78	Isoforma a da proteína regulada por recetores de NMDA 2	0,5-6,9
17	R79	Pré-pró-proteína tripsina-1	0,1-6,4
18	R80	Histona-lisina N-metiltransferase SUV39H1	0,9-5,2
19	R81	Ubiquitina E3-proteína ligase RING1	0,6-4,6
20	R82	Subunidade do fator de estimulação da clivagem 2	0,7-4,9
21	R83	Proteína de ligação a cromodomínio-helicase-DNA 7	0,9-3,9
22	R84	Fator de tradução GUF1, mitocondrial	0,1-8
23	R85	Fator de transcrição CREB/ATF bZIP	0,6-9

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
1	08	Histona H1	0,2-12
2	020	Subunidades de Hb (alfa)	0,3-5,2
3	026	Beta globina	1,2-7
4	029	Dermicidina	0,6-4,4
5	031	Subunidade a do complexo associado ao polipéptido	1-8,7
6	033	Proteína de ligação ao complemento 1 Q	0,1-7,2
7	041	Proteína não caracterizada	1,3-12
8	042	Pré-pró-proteína da albumina do soro	0-6,3
9	052	Subunidade de hemoglobina beta	0,6-4
10	058	Proteína relacionada com recetores de lipoproteína de baixa densidade 10	0,6-8
11	059	Proteína FAM150A	0,6-2
12	060	Proteína ribossomal 39S L20	0,5-7
13	061	Proteína tipo TOMM20 1	0,5-6,7
14	062	Proteína ribossomal 60S L10a	0,1-7
15	063	Proteína UPF0711	0,1-6
16	064	Homólogo de SWI5	0,1-3
17	065	Proteína secretora neuroendócrina 55	0,1-9,2
18	085	Proteína contendo repetição WD 93	0,9-6,6
19	086	Subunidade do complexo SWI/SNF SMARCC2	0,1-5,9
20	087	Regulador de transcritos sem sentido	0-4,9
21	088	Proteína contendo domínio MAP7 1	0,6-5,3
22	089	Fator nuclear de células T ativadas, isoforma A citoplasmática 1	0,5-8
23	090	Isoforma 2 da proteína tipo NHS 2	0,4-1,7
24	091	Isoforma 4 do fator de iniciação da tradução eucariótico 4H	0,6-3,6
25	092	Pré-pró-proteína da proteína amiloide do soro A	0,1-5,8
26	093	Homólogo da proteína de reparação de DNA RAD52	1-8,1

**Tabela 1E: pâncreas**

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores pancreáticos e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
1	M31	Isoforma DPI de Desmoplaquina	0,2-16
2	M32	Isoforma DPII de Desmoplaquina	0,2-13
1	B1	Cadeia alfa-1 (I) de colagénio	0,8-12,8
2	B2	Cadeia alfa-2 (I) de colagénio	0,6-23,8
3	B3	Isoforma 1 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	0,08-4
4	B4	Isoforma 2 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	0,08-3,4
5	B5	Isoforma 4 de Cadeia alfa-3 (VI) de colagénio	0,08-6,5
6	B15	Cadeia alfa-1 (III) de colagénio	0,2-8
7	B33	Proteína de fusão COL1A1 e PDGFB	0,3-6
8	B37	Precursor da isoforma 1 alfa-8 de protocaderina	0,2-8
9	B38	Precursor da isoforma 2 alfa-8 de protocaderina	0,2-7,9
10	B51	Precursor da isoforma alfa-2 de neurexina-2-beta	0,1-7,5
11	B52	Precursor da isoforma alfa-1 de neurexina-2-beta	0,1-9,2
1	C9	Citoqueratina, tipo 1	2,5-42,4
2	C10	Citoqueratina, tipo 2	3,6-63,8
3	C12	Proteína de 69 KDa	0,5-19,3
4	C16	Placoglobina de junção	0,1-8
5	C22	Vimentina	0,4-8,7
6	C32	Isoforma 1 da proteína ácida fibrilar glial	0,5-9,6
7	C33	Isoforma 3 da proteína ácida fibrilar glial	0,2-4,9
8	C34	Isoforma 2 da proteína ácida fibrilar glial	0,3-9,4
1	R4	Peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerase	0,1-8,1
3	R18	Proteína regulada por glucose de 78 KDa	0,1-8,6
4	R37	Proteína transportadora mitocondrial de ligação ao cálcio	0,9-5,5
5	R53	Proteína THEMIS	0,3-9,8
6	R104	Proteína associada a AMY-1 expressa nos testiculos 1	0,1-5,1
7	R105	Isoforma 2 da proteína da caixa Homeo Meis3	0,1-6,7
8	R106	Proteína tipo acil-coenzima A oxidase	0,1-1,3
9	R107	Proteína de ligação a RNA do dedo de zinco	0-1,3

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores pancreáticos e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
10	R108	Membro da família contendo domínio Ras-GEF 1C	0,1-4
11	R109	Sacsina	0,3-9,9
12	R110	Amida de ácidos gordos hidrolase	0-9,5
13	R111	Subunidade catalítica zeta de DNA polimerase	0-2,4
14	R112	Domínio N-terminal de LON peptidase e proteína do dedo de RING 1	1,8-8
15	R113	Pré-pró-proteína da isoforma 1 de aciloxiacilo hidrolase	3-20,5
1	O16	HSP de 60 KDa	0-7
2	O20	Subunidades de Hb (alfa)	0,3-5
3	O21	Região C de cadeia Iq kapa	0,2-7,4
4	O22	Alfa de Proteína Tro H, mieloma	0,35-6,5
5	O23	Região de cadeia C de Iq a-1	0,2-7
6	O24	mRNA de proteína SNC73	0,1-12,3
7	O41	Proteína não caracterizada	1,7-20
8	O42	Pré-pró-proteína da albumina do soro	3,8-19,3
9	O51	Subunidade de hemoglobina delta	7,8-10,6
10	O52	Subunidade de hemoglobina beta	0,2-13,5
11	O53	Subunidade de hemoglobina gama-1	0-4,4
12	O68	Domínio de repetição de anquirina 13B	0-2,8
13	O85	Proteína contendo repetição WD 93	0,6-8,8
14	O93	Homólogo de proteína de reparação de DNA RAD52	0-2,4
15	O99	Proteína hipotética LOC254778	0,3-1,8
16	O101	Proteína transportadora de fosfato, precursor da isoforma b mitocondrial	1,3-7
17	O106	Proteína tipo ELAV 3	1,7-23,2
18	O107	Péptido-sinal, proteína contendo domínio tipo CUB e EGF 2	1,1-10
19	O108	Proteína associada à separação de proteínas vacuolares 45	0-1,9
20	O109	Proteína organizadora do feixe mitótico 2B	2-10,9
21	O110	Subunidade do complexo de partículas de proteínas de tráfego 8	0-2,7

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores pancreáticos e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	% de gama (n = 6)
22	O111	Isoforma 2 do membro 1 da família AF4/FMR2	0-15,1
23	O112	Isoforma a de proteína contendo domínio PDZ e LIM 3	0,2-11,4
24	O113	Isoforma 2 da proteína contendo domínio COBW 1	0,5-6
25	O114	Alfa fetoproteína	0,3-14,1

### Tabela 1F: OVÁRIOS

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores dos ovários e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	Percentagem de abundância relativa
			468
1	M19	Isoforma 4 de Fibronectina	0-22,9
2	M36	Molécula de adesão de células relacionada com CEA 16	0,3-13,8
3	M46	Fosfoglicoproteína extracelular da matriz	0,5-9,2
1	B15	Cadeia alfa-1 (III) de colagénio	0-37,7
2	B36	Isoforma 5 da tuberina	1-13,3
3	B49	Tetraspanina-11	0,3-23,4
4	B54	Proteína somente de domínio FCH 1	0,2-5
5	B55	Proteína do retículo sarcoplasmático juncional 1	0-11,5
6	B56	Claudina-10	1-12,1
1	C7	Tubulina, beta	0,1-7,8
2	C9	Citoqueratina, tipo 1	2-40,6
3	C10	Citoqueratina, tipo 2	0,7-37,1
1	R115	RNA polimerase dirigida a DNA I	0,1-16,8
1	O8	Histona H1	0,9-7
2	O63	Proteína UPF0711	0,1-1,2
3	O69	Precursor do membro da família de LGI de repetição rica em leucina 2	1-13,1

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores dos ovários e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	Percentagem de abundância relativa
			468
4	O74	Proteína tumoral translacionalmente controlada	0,5-6,7
5	O99	Proteína hipotética LOC254778	0-2,4
6	O116	Cadeia alfa de recetores de células T (Mβ1a)	0,2-8,8
7	O120	Pró-relaxina H2	0-6,9
8	O121	Interleucina-22	0,1-12,1
9	O122	Família de antigénios de cancro/testículos 45	0,3-11,5

**Tabela 1G: CÉREBRO**

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores de glioblastoma e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	Percentagem de abundância relativa
			435
1	M15	Troponina C, músculo esquelético	1-12,8
1	B1	Cadeia alfa-1 (I) de colagénio	0,6-22,8
2	B2	Cadeia alfa-2 (I) de colagénio	0,3-32,5
3	B53	Homólogo de proteína lin-7 C	0,9-13,3
1	C10	Citoqueratina, tipo 2	3,5-25
2	C36	Isoforma b da proteína tipo drebrina	1,6-21,6
3	C37	Isoforma a da proteína tipo drebrina	0,4-11,1
4	C38	Isoforma c da proteína tipo drebrina	0,1-23,8
1	R36	Proteína da vizinhança de atraso mental de X frágil 1	1-22,7
2	R114	Proteína contendo domínio de esclerostina 1	0,3-25,5
3	R115	RNA polimerase dirigida a DNA I	0,3-15,4

A tabela em baixo lista os componentes de ECM que foram isolados de tumores de glioblastoma e analisados por LCMS.

No de S.	Proteína	Nome	Percentagem de abundância relativa
			435
4	R116	R-spondina-3	1-23,4
1	O7	Histona H2	3,1-20
2	O23	Região de cadeia C de Ig a-1	1-33,4
3	O41	Proteína não caracterizada	1,5-30,5
4			
5	O115	região variável de cadeia pesada da imunoglobulina	0,4-13,4
6	O116	Cadeia alfa de recetores de células T (Mβ11a)	1,3-30
7	O117	Pequena proteína ácida	0,6-10,3
8	O118	Proteína FAM19A5	3-9,7
9	O119	Proteína putativa FAM220BP	0,2-18,5

Nas tabelas 1A a 1G acima, as proteínas com prefixo "B" são Proteínas da membrana de base; as proteínas com prefixo "C" são Proteínas citoesqueléticas; as proteínas com prefixo "R" são proteínas reguladoras; as proteínas com prefixo "M" são Proteínas da Matriz; e as proteínas com prefixo "O" são "outros".

A partir das tabelas 1A a 1G é evidente que as amostras tumorais de diferentes fontes, nomeadamente H&N, Estômago, Pâncreas, Cólon, Esófago e Cérebro têm viabilidade ótima em placas revestidas com mistura de ECM especificamente formulada para o tipo de tumor específico. A mistura de ECM é assim obtida para cada uma das indicações de cancro sólido que é usada nos explantes.

#### Processo de Revestimento:

Conseqüentemente, logo que a mistura de ECM específica para um tumor/cancro seja determinada pelos aspetos acima, a mistura de ECM para o tipo de cancro específico é preparada por adição de proteínas de ECM individuais e outros constituintes relevantes; e mistura dos conteúdos para formar *cocktail* (específico do cancro). O revestimento de ECM em placas com cerca de 96 poços é alcançado por uso de varas aplicadoras para revestir uniformemente os lados do poço. Em outros casos, cerca de 200 µL de extrato de ECM são adicionados a cada poço e é permitido que sequem durante cerca de 2 hrs num incubador a cerca de 37 °C. As placas revestidas são lavadas três vezes com 1X PBS estéril e armazenadas a cerca de -20 °C para armazenamento a longo prazo.

### **Exemplo 2: Cenário de Explantes**

Os ligantes do soro autólogos e ligantes do plasma autólogos e PBMCs autólogas são obtidos do paciente conforme protocolos padrão.

**Exemplo 2.1: A adição de ligantes do soro autólogos e revestimento de ECM recriam microambiente tumoral em cultura para mimetizar a sinalização intracelular tumoral nativa e viabilidade.**

Em outra forma de realização, as Figuras 2, 3(A) e 3(B) ilustram a natureza do presente sistema de explantes que é desenhado para mimetizar o microambiente tumoral do hospedeiro tão intimamente quanto possível. O objetivo primário é manter a arquitetura dos tecidos tumorais e este é onde a importância do componente de ECM das placas de

células se torna relevante. Tanto a integridade estrutural como a integridade funcional são cruciais para entender a biologia da rede tumoral e na elucidação da resposta ou resistência aos fármacos. Adicionalmente, o presente sistema é concebido tal que vise a manutenção do microambiente dos tecidos intacto de uma perspectiva de sinalização bem como estrutural. Isto é feito por suplementação dos meios com ligantes derivados do soro autólogos em cultura de explantes, o que é importante para proporcionar fatores que são parte da rede de sinalização nativa. Isto é especialmente relevante quando chega a altura de se testarem inibidores de pequena molécula ou terapêuticos visados ou mesmo quimioterapias que evidenciam a sua ação através de vias específicas. Pelo proporcionar de um ambiente onde tanto a integridade estrutural como a integridade funcional são mantidas, o presente modelo de explantes mostra viabilidade melhorada dos explantes em cultura e também que este modelo pré-clínico é clinicamente relevante.

A cultura de explantes suplementada com ligantes derivados do soro autólogos é requerida para manutenção das redes de sinalização nativas intactas. A adição de ligantes derivados do soro autólogos mantém a rede de sinalização crucial para mimetização do microambiente dos tecidos nativo (Figura 2). Os Painéis A e B da Figura 3 são explantes cultivados na ausência de ligantes derivados do soro autólogos e os Painéis D e E são explantes cultivados em meio suplementado com ligantes derivados do soro autólogos.

Aquando da realização de IHC para cMet [Gene transformante MET ou MNNG HOS], os explantes cultivados na presença de

ligantes derivados do soro autólogos mostram presença marcadamente intensificada de cMet, testemunhando o facto de que o meio suplementado com ligantes derivados do soro autólogos contém fatores parácrinos cruciais para mimetização da rede de sinalização nativa. A Figura 3A ilustra que as placas revestidas com componentes de ECM específicos do tipo de cancro proporcionam suporte/molde apropriado para ajudar a manter a arquitetura dos tecidos intacta que é crucial para mimetização do microambiente dos tecidos nativo. Os explantes cultivados em placas revestidas com componentes de ECM específicos do tipo de cancro melhoram a viabilidade de células e proporcionam suporte/molde para manter a arquitetura dos tecidos. A coloração com H&E de tecido tumoral cultivado em placas com revestimento de ECM (painéis C e E) e sem (painéis B e D). A Figura 3B mostra que os explantes cultivados em placas revestidas com ECM em conjunto com meios suplementados com ligantes derivados do soro autólogos mostram viabilidade de células melhorada.

**Exemplo 2.2: Os ligantes autólogos e composição de Matriz Extracelular retêm o microambiente e rede de sinalização de tumores de pacientes em cultura.**

Tumores de biópsia de pacientes com HNSCC são seccionados (~200 microns) e cultivados em placas com 96 poços com FBS a cerca de 10% (controlo) ou soro autólogo a cerca de 2% e FBS a cerca de 8% (Soro autólogo) em meios RPMI durante cerca de três dias. A viabilidade de células é medida por ensaio WST. A percentagem de viabilidade de células é calculada e apresentada como representação gráfica de Caixa e bigodes (Figura 4(a)). A linha horizontal na porção do meio da caixa denota a média. As fronteiras do fundo e topo são os 25° e 75° percentis, respetivamente, os bigodes

inferiores e superiores, 5° e 95° percentis, respetivamente.  $**P < 0$  em comparação com controlo.

Os dados de IHC mostrando o efeito específico de soro autólogo na proliferação de tumores são representados graficamente como na Figura 4(b). As secções tumorais são coloridas com H&E e anticorpos contra Ki67 para avaliação de mudanças morfológicas e proliferação de células. A ampliação da imagem é 20X.

A Figura 4(c) mostra os efeitos da composição de Matriz Extracelular em viabilidade tumoral. A superfície interna da placa de cultura é revestida com gelatina, colagénio, matrigel ou Matriz Extracelular (ECM) isolada de HNSCC e as secções tumorais são cultivadas durante 3 dias. A viabilidade de células é medida por WST e a percentagem de células viáveis é calculada (média  $\pm$  s.e.m.).  $*P < 0,01$  em comparação com controlo T72 (análise da variância).  $n = 8$ , A Figura 4(d) mostra os perfis de IHC de tumores de explante aos cerca de 3 das pós-cultura na presença de composição de ECM. H&E (esquerda) e Ki-67 (direita). A pontuação de Ki-67 implicando o efeito melhor da composição de ECM em comparação com outros tipos suporte da matriz como está indicada na Figura 4(e).

A combinação de Soro Autólogo e composição de ECM mostra melhores efeitos na proliferação do que o complemento único, Figura 4(f). Secções tumorais são cultivadas durante cerca de 72 horas com controlo, soro autólogo (cerca de 2%), composição de ECM (cerca de 100 ug/mL) sozinho ou combinação de ambos. A pontuação de Ki-67 indica benefício da presença combinada de composição de ECM e soro autólogo em cultura.  $*P < 0,01$  em comparação com controlo T72,  $**P <$

0,05 em comparação com composição sozinha e AS sozinho (análise da variância)  $n = 5$ . Os dados de IHC correspondentes na Figura 4(g) revelam aumento similar em célula positiva quanto a Ki-67 após adição de composição de ECM e soro autólogo. Os tecidos tumorais são embebidos em parafina e seccionados (5 microns) e coloridos anticorpos anti-Ki-67.

**Exemplo 2.3: Composição de ECM e seus efeitos na viabilidade e proliferação.**

A composição de Matriz Extracelular (ECM) é revestida em placas antes da cultura de tecido tumoral conforme a percentagem de composição dos componentes de ECM indicada na Figura 5(a). Os explantes são cultivados durante cerca de 72 horas em placas revestidas com diferentes doses (1, 10 e 100 g/mL) de ECM isolada de fontes tumorais humanas heterólogas. A percentagem de viabilidade de células tumorais (média  $\pm$  s.e.m) é medida por WST.  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$  em comparação com o controlo T0 e T72, respetivamente, por ANOVA. Como visto na Figura 5(b), a ECM aumenta a viabilidade de tumores de um modo dependente da dose. A manutenção da heterogeneidade e integridade intratumorais globais é determinada por H&E (topo da Figura 5(c)), e a proliferação de células tumorais (fundo da Figura 5(c)) em cenários de explantes é avaliada usando anticorpos para Ki-67. Dados representativos de 5 experiências independentes realizadas em triplicado.

**Exemplo 2.4 Comparação dos efeitos de diferente Composição de ECM na proliferação e ativação de proteínas de sinalização do cancro.**

A superfície interna da placa de cultura é revestida com gelatina, colagénio, Matrigel ou Matriz Extracelular (ECM) isolada de cancro do cólon e secções tumorais são cultivadas durante 3 dias. Os perfis de IHC (imunohistoquímica) de tumores de explantes mostrados na Figura 6(a) indicam que as ECMs derivadas de pacientes exercem maior efeito na proliferação (Ki67) e fosforilação de ERK1/2 do que a proteína da matriz única padrão. A Figura 6(b) mostra a correspondente pontuação de Ki-67.  $*p < 0,01$  em comparação com controlo T72, por ANOVA ( $n = 5$ ). A representação gráfica de dispersão da pontuação de Ki-67 exibida na Figura 6(c) indica que a ECM derivada dos pacientes afeta positivamente os explantes em múltiplas experiências independentes realizadas sob condições similares. Cada ponto representa uma experiência ( $n = 33$ ). A linha horizontal representa média de todas as amostras.  $***P < 0,001$  em comparação com controlo. Os resultados acima indicam que a cultura de tumor na presença da ECM apropriada melhora a viabilidade e sinalização de tecido tumoral para mimetizar o microambiente tumoral do hospedeiro.

### **Exemplo 3:**

Logo que o tecido tumoral seja obtido do paciente ou fonte de xenoenxertos é sujeito ao Protocolo de Explantes/"Preditor da Resposta Clínica" como em baixo:

#### **Protocolo de Explantes:**

1. São gerados pequenos pedaços de fatia tumoral com cerca de 3 x 3 x 3 mm (todos com tamanho uniforme e isentos de massa necrótica).

2. A amostra tumoral é dividida em múltiplos pequenos pedaços usando Vibratome da Leica para gerar secções com cerca de 100-3000  $\mu\text{m}$  e cultivada em triplicado em placas de fundo plano com 96 poços que foram previamente revestidos com composição de ECM apropriada.

3. Os tecidos tumorais são mantidos em meios condicionados de cerca de 2 mL (DMEM suplementado com FBS inativado pelo calor a 2% em conjunto com Penicilina-Estreptomicina a 1%, piruvato de sódio a 100 mM, aminoácido não essencial, L-glutamina a 4 mM e HEPES a 10 mM). Os meios de cultura são suplementados com ligantes derivados do soro a cerca de 2% ou cerca de 2% de ligantes derivados após 12 horas ou cerca de 100.000 PBMCs por 96 poços são inoculadas com cerca de 10% de plasma autólogo e cultivados durante cerca de 72 hrs a cerca de 37 °C com CO<sub>2</sub> a cerca de 5% sob condições húmidas.

4. Mudar os meios aquando da adição de soro/plasma/PBMC.

5. Os meios são mudados a cada 24 horas em conjunto com suplementos.

6. 5  $\mu\text{L}$  de meios gastos são usados para se determinar a viabilidade de células, metabolismo de células, morte de células e fisiologia de células de tecido tumoral.

7. No final do período de cultura variando de cerca de 48 horas a cerca de 120 horas, o tecido é avaliado quanto a vários parâmetros. Após este período, a análise MTT/WST é realizada para se avaliar a percentagem de viabilidade de células. O sobrenadante da cultura de meios é removido a cada 24 hrs e avaliado quanto à proliferação (usando experiências de utilização de ATP e glucose) e morte de células (por avaliação do ensaios de lactato desidrogenase e medições de caspase-3 e caspase 8) para dar tendências de respostas cinéticas. Os resultados são

quantificados contra um controlo não tratado com fármacos. A perda significativa na viabilidade/proliferação de células em comparação com controlo não tratado é indicativa da resposta ao fármaco/combinacão e também morte de células aumentada. As secções de tecido tanto tratadas como não tratadas são também dadas para IHC e avaliação histológica no final do período de cultura. Os tecidos dados para avaliação histológica são avaliados quanto à apoptose por TUNEL e ensaio de caspase 3 ativada. Igualmente, a proliferação de células é avaliada quanto a marcadores da proliferação padrão como Ki67. H&E é também rotineiramente realizada para se avaliarem as figuras mitóticas, necrose e características grosseiras gerais do tecido.

#### **Exemplo 4:**

Logo que a composicão de ECM seja determinada e seja revestida nos poços, o tumor do paciente ou a fonte de xenoenxertos é sujeito a análise de explantes. Para gerar xenoenxerto tumoral humano para análise de explantes, o tumor é inicialmente nos camundongos SCID e subsequentemente o tumor excisado é sujeito ao protocolo de explantes e análise "Preditor da Resposta Clínica". O protocolo para a mesma é proporcionado em baixo:

#### **Implantacão em Animais e Geraçao de Xenoenxertos Tumorais:**

##### *Preparacão de Amostras:*

1. Transferir amostra tumoral humana recém-removida em tubo de cerca de 50 mL contendo DPBS (cerca de 5 mL).

2. Remover amostra e dissecar amostra para variedade de experiências.
3. Transferir amostra restante para um prato de Petri estéril contendo cerca de 2 mL de DPBS.
4. Cortar tumor em pedaços com lâmina de bisturi estéril cerca do tamanho de um apagador de lápis (cerca de 5 x 5 x 5 mm). Deve ser tomado cuidado para tornar os pedaços tão uniformes quanto possível. *Preparação de Animais:*
5. Escolher os animais usando com uma preensão convencional com os dedos indicadores e do meio colocados à volta do pescoço e sobre as pernas frontais.
6. Enxaguar a superfície de camundongos SCID fêmeas com idade de cerca de 5-6 semanas com EtOH a cerca de 70%.

*Implantação de amostra nos camundongos:*

7. Usar ambos os flancos para implantação sólida no espaço subcutâneo.
8. Após uma superfície corporal de camundongo ser enxaguada é colocada (lado ventral para baixo) num cone de nariz apropriadamente dimensionado ou na tampa da gaiola de camundongo com o lado dorsal virado para cima.
9. Usando quadrado de gaze saturado com etanol a cerca de 70% (vol/vol) limpar a área a partir do meio da espinha até à base da cauda para preparar a inserção de tumor com troca.
10. Imediatamente antes da implantação molhar/enxaguar o pedaço tumoral em cerca de 100X P/S.
11. Retirar pedaço sólido de tumor (cerca de 5 mm<sup>3</sup>) na ponta da troca e empurrá-lo para dentro usando fórceps ou bisturi estéril sem deixar a amostra tumoral secar.
12. Inserir a ponta da troca no espaço subcutâneo de camundongo horizontalmente acima da base da cauda,

diretamente cobrir o flanco e introduzir uma bolsa no espaço subcutâneo e inserir até ao meio do lado dorsal em ambos os flancos (um de cada vez) enquanto se mantém a parte do êmbolo e parte da agulha numa posição fixa e sem danificar o peritoneu.

13. Empurrar o pedaço de tumor individual (cerca de 50 mg ou cerca de 5 mm<sup>3</sup>) na bolsa criada usando troca.

14. Remover suavemente a troca sem perturbar o material inserido.

15. Marcar apropriadamente os camundongos usando material não tóxico (cabeça/corpo/cauda/nenhuma marca, etc.).

#### *Seguimento dos animais:*

16. Devolver os camundongos a uma gaiola limpa.

17. Tumor palpável (cerca de 50 mm<sup>3</sup>) é notado em primeiro lugar e depois começa a crescer.

18. Monitorizar os camundongos diariamente e medir o crescimento tumoral semanalmente, usando medição com calibrador como descrito em baixo. Brevemente, o crescimento tumoral é monitorizado semanalmente por imagiologia bioluminescente ou medições com calibrador externo (tamanho tumoral = [comprimento × largura × altura] × 0,52) durante cerca de 5-16 semanas.

19. Quando o tumor alcança um tamanho máximo de cerca de 700 mm<sup>3</sup>, eutanasiar o animal e remover o tumor e seguir o mesmo procedimento.

20. Os tumores removidos são divididos em múltiplos pedaços para diferentes estudos. Adicionalmente, potenciais locais de metastização tais como pulmões e linfonodos, abdómen e em casos selecionados cérebro são removidos e enviados em formalina.

21. Se o animal tiver um crescimento lento do tumor é implantado em estágio inicial para resgatar o crescimento. Todos os animais são eutanasiados ao final das 16 semanas.

#### **Exemplo 5:**

O protocolo para validação do "Preditor da Resposta Clínica" por análise de xenoenxertos é proporcionado em baixo:

#### **Determinação da Eficácia Terapêutica De Fármacos em Xenoenxertos Tumorais De Camundongos Scid/Nus: *Preparação de Animais:***

1. Usar os camundongos de P1 ou passagem subsequente (P1 ou P<sub>N</sub>, N > 1) para os estudos de eficácia.

#### ***Seguimento & Dosagem dos Animais:***

2. Monitorizar os camundongos diariamente e medir o crescimento tumoral semanalmente, usando medição com calibrador como descrito em baixo. O volume tumoral é calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = L \times W^2/2;$$

onde L = comprimento (mm), W = largura (mm).

3. Quando o tumor alcançar um tamanho de cerca de 150-200 mm<sup>3</sup> dosear os animais com fármaco apropriado (cerca de 1 dose/semana) durante cerca de 5 semanas. Monitorizar os camundongos diariamente e medir o crescimento tumoral

bissemanalmente, usando medição com calibrador como descrito acima.

4. Seguir os animais durante cerca de 4 semanas pós-tratamento quanto à regressão/crescimento tumoral.

5. No final do estudo eutanasiar os camundongos conforme o procedimento de eutanásia padrão usando câmaras de CO<sub>2</sub> e recolher amostras tumorais.

A lista detalhada de fármacos que são usados para teste na presente divulgação é dada na Tabela 2 em baixo. Esta lista é somente para propósito ilustrativo e é não limitante e não exaustiva

**Tabela 2: Lista de fármacos administrados na Análise "Preditor da Resposta Clínica"**

Tipo de Cancro	Subtipo	Combinação de Fármacos ( <i>Standard of Care</i> )
a) cancro de H&N	Nasofaringe	Cisplatina
		Carboplatina & Paclitaxel
		Cisplatina & 5-FU
	SCC	Cisplatina
		Docetaxel, Cisplatina & 5-FU
		Cetuximab
Tumor salivar	Cisplatina & 5-FU	
b) cancro Colorretal	Ressecável	Oxaliplatina, 5-FU, leucovorina
		5-FU & Leucoverina
		Oxaliplatina, 5-FU, leucovorina
	Não Ressecável	5-FU & Leucoverina
		Irinotecano, 5-FU, Leucoverina
		Irinotecano, 5-FU, Leucoverina, Bevacizumab
		Irinotecano & Cetuximab
		Panitumumab

<b>Tipo de Cancro</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Combinação de Fármacos (Standard of Care)</b>
		Epirrubicina, Cisplatina & Capecitabina
	Localmente Avançado	Docetaxel, Cisplatina, 5-FU Infusional
		Epirrubicina, Cisplatina & Capecitabina
	Metastático	Docetaxel, Cisplatina, 5-FU Infusional
c) cancro do Estômago & Esófago	Metastático	Epirrubicina, Cisplatina & Capecitabina
	Gástrico, Gastroesofágico (Her2 <sup>+</sup> )	Herceptina
	Estromal do GI	Imatinib
	estromal do GI Resistente a Imatinib	Sunitinib
d) cancro do Pâncreas, Vesícula Biliar, BÍlis	Vesícula Biliar	Cisplatina & Gemcitabina
	Colangiocarcinoma	Cisplatina & Gemcitabina
	Adenocarcinoma	Cisplatina & Gemcitabina
	Carcinoma Pancreático Ressecado	5-FU & Leucovorina
	Ca-Pâncreas	Erlotinib
e) cancro do Fígado	Carcinoma Hepatocelular	Sorafenib
f) cancro dos Ovários	Cancro das células germinativas	Bleomicina, Etoposídeo, Cisplatina
	Ca recorrente sensível à platina	Trabectedina, PLD Doxorubicina
	Ca resistente à platina	Docetaxel
	Carcinoma dos tecidos moles	Trabectedina, PLD Doxorubicina
	Ca avançado (progresso/recorrência)	Carboplatina & Gemcitabina.
	carcinoma peritoneal	Docetaxel

<b>Tipo de Cancro</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Combinação de Fármacos (Standard of Care)</b>
	Carcinoma das Trompas de Falópio	Docetaxel
	Carcinoma epitelial reincidente	Doxirrubicina (PLD) e Carboplatina.
	Ca Papilar	Carboplatina & Paclitaxel
	Ca Peritoneal	Carboplatina & Paclitaxel
	Carcinoma das trompas de Falópio	Carboplatina & Paclitaxel
	Ca epitelial invasivo	Carboplatina & Paclitaxel
g) Cancro da Mama	Primário	Cisplatina e Gemcitabina
		Ciclofosfamida & Paclitaxel
		Ciclofosfamida, Doxorubicina e Docetaxel
		Docetaxel e Ciclofosfamida
		Docetaxel, Ciclofosfamida, Epirubicina e Fluorouracil
		Filgrastim, Ciclofosfamida, Doxorubicina e Fluorouracil
		Filgrastim, Ciclofosfamida, Epirubicina e Fluorouracil
		Gemcitabina e Docetaxel
	Her2 <sup>+</sup> primário	Trastuzumab, Ciclofosfamida, Doxorubicina e Paclitaxel
		Ciclofosfamida, Paclitaxel e Trastuzumab
		Docetaxel, Carboplatina e Trastuzumab
		Docetaxel, Trastuzumab, Fluorouracil, Epirubicina e Ciclofosfamida
	Hormonal	Agonista de LHRH e tamoxifeno
		Tamoxifeno
	Ca-Br Inicial	Doxorubicina e Ciclofosfamida seguidas por Paclitaxel Semanal
Tipo de Cancro	Subtipo	Combinações de fármacos (SOC)

<b>Tipo de Cancro</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Combinação de Fármacos (Standard of Care)</b>
Cancro da Mama	Ca-Br de elevado risco	Ciclofosfamida (oral), Metotrexato e Fluorouracil
	Localmente avançado	Doxorrubicina e Ciclofosfamida seguidas por Docetaxel (TAXOTERE).
		Ciclofosfamida, Doxorrubicina e Fluorouracil
		Ciclofosfamida, Epirubicina e Fluorouracil
		Ciclofosfamida, Epirubicina, Fluorouracil e Filgrastim (G-CSF)
	Localmente avançado (Her2 <sup>+</sup> )	Doxorrubicina e Ciclofosfamida seguidas por Docetaxel (TAXOTERE) e Trastuzumab
	Metastático	Anastrozol
		Capecitabina
		Ciclofosfamida, Doxorrubicina e Fluorouracil
		Docetaxel
		Docetaxel e Capecitabina
		Doxorrubicina
		Doxorrubicina e Ciclofosfamida
		Enantato
		Gemcitabina
		Gemcitabina e Paclitaxel
		Paclitaxel
		Vinorelbina
	Metastático (Her2 <sup>+</sup> )	Trastuzumab
		Trastuzumab e Docetaxel
		Trastuzumab e Paclitaxel
	Metastático	Trastuzumab e Vinorelbina
	Metastizações ósseas	Clodronato
		Pamidronato

Tipo de Cancro	Subtipo	Combinação de Fármacos ( <i>Standard of Care</i> )
	Ca-Br avançado	Ciclofosfamida, Metotrexato e Fluorouracil
		Exemestano
		Letrozol
		Megestrol
	Ca-Br avançado (Her2 <sup>+</sup> )	Trastuzumab, Paclitaxel e Carboplatina
	Ca-Br inflamatório	Ciclofosfamida, Epirrubicina e Fluorouracil
		Ciclofosfamida, Doxorubicina e Fluorouracil
		Filgrastim, Ciclofosfamida, Epirrubicina e Fluorouracil

### **Exemplo 6: Validação Pré-clínica do Sistema de Explantes:**

Sabe-se que os xenoenxertos tumorais (HTX) gerados a partir de tumores são similares ao tumor dos pacientes e consequentemente a leitura de eficácia obtida de um tal sistema é indicativa da resposta do paciente a esse tratamento. No presente Sistema de explantes, a sensibilidade de HTX quando tratados com combinações de fármacos é muito similar ao resultado de resposta do explante para o mesmo tumor indicando que o sistema de explantes "Preditor da Resposta Clínica" tem elevado grau de previsibilidade da resposta dos pacientes aos fármacos ou combinações de fármacos. O mesmo é foi ilustrado pelo seguintes subexemplos:

**Exemplo 6.1: Passagens iniciais de xenoenxertos tumorais humanos retêm características moleculares de tumores originais.**

Passagens iniciais de xenoenxertos tumorais humanos retêm características moleculares de tumores originais. A Figura 7(A) ilustra representação gráfica de PCA a 3D gerada por *software* Genespring GX para mostrar o estreito agrupamento de amostras da mesma origem e passagem em série. A representação gráfica mostra cerca de 6 agrupamentos distintos compreendendo de cerca de 4 pares de carcinoma do cólon e cerca de 2 pares de amostras de HNSCC. O agrupamento hierárquico bidimensional não supervisionado de cancro do cólon e HNSCC é ilustrado no painel B da Figura 7.

**Exemplo 6.2: Cultura de explantes tumorais derivada de passagens iniciais de xenoenxerto tumoral humano e tumor de pacientes exibe efeito antitumoral idêntico.**

Cultura de explantes tumorais derivada de passagens iniciais de xenoenxerto tumoral humano e tumor de pacientes exibe efeito antitumoral idêntico. Explantes derivados de tumores de dadores primários (P0) e pós-enxertos (P1 e P2) gerados a partir deles são tratados com TPF (Cisplatina, Docetaxel, 5FU) ou DMSO [Sulfóxido de Dimetilo] como controlo. Cerca de setenta e duas horas pós-tratamento, a viabilidade é medida por WST e a percentagem de inibição da viabilidade é calculada (média  $\pm$  s.e.m.) usando controlo de DMSO correspondente como 100% (Figura 8a). Padrão de imunorreatividade de Ki-67 de explantes resultando de tumores P0 e P1, P2 após tratamento com TPF. A ampliação da imagem é 200X (Figura 8b). Pontuação de Ki-67

representativa indicando redução de células proliferantes dentro de explantes e medida com base no cálculo de células positivas quanto a Ki-67 por área (média  $\pm$  s.e.m. de triplicados).  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$  em comparação com o controlo correspondente por ANOVA.  $n = 4$  (Figura 8c). Os dados indicam que os tumores originais e xenoenxertos subsequentes mantêm estado de resposta idêntico a TPF e é descoberto que os tumores primários que são originalmente refratários mantêm o mesmo padrão em xenoenxertos subsequentes.

Os efeitos antitumorais de TPF e Cetuximab em cultura de explantes tumorais são similares a modelos de xenoenxertos tumorais humanos. Tumores de biópsia de pacientes com HNSCC são seccionados (~200 microns) e cultivados em placas com 96 poços revestidos por ECM com soro autólogo a cerca de 2% e FBS a cerca de 8% em meios RPMI durante cerca de três dias com DMSO (Controlo) e Docetaxel, Cisplatina e 5-FU (TPF). A viabilidade de células é medida por WST e a percentagem de viabilidade de células é calculada. A representação gráfica em caixas na Figura 9(a) está a mostrar inibição significativa em tumores tratados com TPF.  $** p < 0,001$  em comparação com controlo em múltiplos dados ( $n = 20$ ) por teste T emparelhado. A Figura 9(b) mostra o perfil de IHC correspondente. As secções tumorais tratadas com DMSO (controlo) e TPF são coloridas com H&E e Ki-67. Representação gráfica representando amostras de explantes que mostraram diferencialmente resposta a TPF (inibição de vezes normalizada ao controlo T72). Cada ponto representa uma experiência ( $n = 50$ ).  $**P < 0,001$  em comparação com controlo. A Figura 9(g) representa a inibição do crescimento tumoral em camundongos tratados com Cetuximab. Os tumores HNSCC usados para a cultura de explantes com

Cetuximab (e) são crescidos em camundongos imunocomprometidos e tratados com salino normal (Controlo) ou Cetuximab (Tratados) três vezes por semana durante cerca de 23 dias. Os volumes tumorais são medidos aos pontos temporais indicados. Os dados são volume tumoral médio  $\pm$  s.e.m de 10 camundongos por grupo.  $^*p < 0,001$  em comparação com controlo de veículo correspondente. A Figura 9(h) representa dados de IHC sublinhando as mudanças moleculares semelhantes à inibição tumoral *in vivo*. Os tumores são recolhidos de camundongos eutanasiados cerca de 6 horas após a última dose de Cetuximab. As secções tumorais são coloridas com H&E, Ki-67, TUNEL e pERK. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ , e inserções 100  $\mu\text{m}$ .

Tumores de biópsia de pacientes com HNSCC são seccionados (~200 microns) e cultivados em placas com 96 poços revestidos por ECM com soro autólogo a cerca de 2% e FBS a cerca de 8% em meios RPMI durante dias com DMSO (Controlo) e Cetuximab. A viabilidade de células é medida por WST. A representação gráfica em caixas na Figura 9(e) representa a percentagem de inibição da viabilidade de células em tumores tratados com Cetuximab em múltiplas experiências em comparação com controlos correspondentes ( $n = 20$ ).  $^{**}p < 0,001$  em comparação com controlo em múltiplos como calculado por teste T emparelhado. Imagem de IHC representativa, a Figura 9(f) ilustra mudanças na proliferação e morfologia. As secções tumorais tratadas com DMSO (controlo) e Cetuximab são coloridas com H&E e Ki-67. A representação gráfica representa amostras de explantes que mostraram diferencialmente resposta a Cetuximab (inibição de vezes normalizada ao controlo T72). Cada ponto representa uma experiência ( $n = 40$ ). A linha horizontal representa a média de todas as amostras. Os não

respondedores têm níveis muito baixos de inibição em comparação com os respondedores. A Figura 9(c) mostra a inibição do crescimento tumoral *in vivo*. Os mesmos tumores de pacientes são crescidos em camundongos imunocomprometidos. Os camundongos transportando tumores são tratados diariamente com salino normal (Controlo) e (TPF) durante 21 dias. Os volumes tumorais são medidos aos pontos temporais indicados. Os dados são volume tumoral médio  $\pm$  s.e.m de 6 camundongos por grupo. \* $p < 0,001$  em comparação com controlo de veículo correspondente. Os tumores são dissecados, pesados e a percentagem de tumores residuais é calculada. As características de IHC representativas de tumores no final do tratamento são ilustradas na Figura 9(d). Os tumores dissecados de camundongos eutanasiados de grupos de controlo e com TPF são embebidos, seccionados e coloridos com H&E, Ki-67 e TUNEL como indicado. Barras de escala, 50  $\mu$ m e inserções 100  $\mu$ m.

**Exemplo 6.3: Correlação de plataforma de resposta aos fármacos guiada por "Preditor da Resposta Clínica" com a eficácia *in vivo*.**

Os dados obtidos dos explantes tratados com TPF/cetuximab são independentemente pontuados para avaliação da inibição da viabilidade, proliferação e indução da apoptose. A contribuição relativa de cada ensaio é determinada como elaborado no Exemplo 8. Uma pontuação de resposta "Preditor da Resposta Clínica" compósita final (inibição) é calculada por integração de todos os componentes da inibição tumoral e sua correlação com os dados de inibição do crescimento tumoral obtidos dos estudos de eficácia *in vivo* usando os mesmos tumores de pacientes individuais e fármacos em HTX.

O método de coeficiente de correlação de Spearman é usado para calcular a associação linear. O valor  $R^2$  significou correlação positiva entre a resposta *in vivo* e a resposta guiada por "Preditor da Resposta Clínica" (n = 15) (Figura 10). O nível de inibição tumoral visto em "Preditor da Resposta Clínica" corresponde àquele visto no modelo HTX.

### **Exemplo 7: Ensaios Empregues no Protocolo de Explantes**

As amostras tumorais obtidas do paciente ou da fonte de xenoenxertos são subseqüentemente sujeitas à análise "Preditor da Resposta Clínica" por meio dos seguintes ensaios para se obter a Pontuação M. O conceito de pontuação M é elaborado no Exemplo 7.

#### **Exemplo 7.1: Ensaios Para Determinação da Viabilidade de Células:**

##### **a) ENSAIO MTT PARA MEDIÇÃO DA VIABILIDADE DE TECIDOS DE EXPLANTES TUMORAIS SÓLIDOS:**

É usada versão modificada de ensaio MTT regular (Veira V *et al. Max Loda Lab PNAS* 2010). Brevemente, os tecidos são cortados precisamente em secções iguais pelo Vibratome (fatia de 400 microns) e cultivados em RPMI 1640 [RPMI - Roswell Park Memorial Institute] à concentração variando de cerca de 60% a cerca de 100%, preferencialmente cerca de 80%; durante até 72 horas. A viabilidade de tecidos é avaliada usando um ensaio MTT 1-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazano (Sigma Aldrich) ao ponto temporal T0 e também a T72. As fatias de tecido são incubadas com 5 mg/mL de MTT a 37 °C durante 4 horas, recolhidas, e extraídas com sal precipitado por incubação com HCl-álcool de isopropilo

a 0,1 M à temperatura ambiente durante 25 min. Um valor de viabilidade é determinado por divisão da densidade ótica do formazano a 570 nm pelo peso seco dos explantes. Amostras da linha de base (T0) são usadas como calibradores (1×) para normalizar a variação interamostras nas leituras da absorvância, e a viabilidade de tecidos é expressa como uma percentagem de viabilidade em relação a amostras T0. Para diferentes tipos de cancro, as fatias de tecido em explantes são incubadas com meios contendo diferentes fármacos à concentração no plasma no pico durante até 72 hrs. Os meios contendo fármacos são mudados a cada 24 hrs e MTT é realizado ao ponto temporal T72 e T0 como usual. Para avaliar a eficácia dos fármacos, a viabilidade de tecidos no final do período de estudo é classificada em relação à viabilidade de tecidos ao ponto temporal T0 em que o tecido não está exposto a qualquer fármaco.

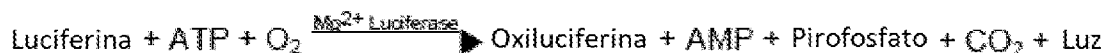
**b) ANÁLISE WST:**

Brevemente, os tecidos são cortados precisamente em secções iguais pelo Vibratome (fatia de 400 microns) e cultivados em RPMI 1640 [RPMI - Roswell Park Memorial Institute] à concentração variando de cerca de 60% a cerca de 100%, preferencialmente cerca de 80%; durante até 72 horas. A viabilidade de tecidos é avaliada usando um ENSAIO WST. No final da incubação de 72 hrs, 40 µL de CCK-8 (Estojo cell counting-8, Dojindo Laboratories, Japão) são adicionados a cada poço e a incubação foi continuada durante outras 3 hrs a 37 °C/CO<sub>2</sub> a 5%. Durante a incubação, a placa foi suavemente agitada dentro do incubador a cerca de 90 rpm no agitador de microplacas. No final da incubação de cerca de 3 hrs, as fatias de tecido são cuidadosamente removidas para os respetivos tubos com formalina a 10% e submetidas

aos estudos Imunohistoquímicos. Paralelamente, a absorvância é medida a 450 nm usando leitor de microplacas (Bio-Rad, EUA).

### c) ENSAIO DE UTILIZAÇÃO DE ATP:

Adenosina-5'-trifosfato (ATP) é uma molécula central na química de todas as coisas vivas e é usada para monitorizar muitos processos biológicos. A utilização de ATP é estudada usando o **Estojo de Ensaio de ATP StayBrite™** (BioVision). Um método confiável, preciso para detetar níveis mínimos de ATP é a Luciferase/Luciferina. O ensaio é totalmente automatizado para elevada produtividade (1 seg/amostra) e é extremamente sensível e é ideal para deteção da produção de ATP.



**Curva Padrão:** Para se calcular o conteúdo de ATP absoluto em amostras é gerada uma curva padrão de ATP. Adicionar 10 µL de solução de *stock* de ATP a cerca de 990 µL de Tampão de lise para preparar uma solução de ATP a cerca de  $10^{-4}$  M ATP, num tubo marcado S1, depois preparar cerca de 3 - 5 mais diluições de 10 vezes (*i.e.*, cerca de 10 µL + cerca de 90 µL de Tampão de Lise para gerar S2, S3, S4, contendo ATP a cerca de  $10^{-5}$  M, cerca de  $10^{-6}$  M, cerca de  $10^{-7}$  M, *etc.*).

**Medição:** Adicionar cerca de 10 µL de amostra ou padrão a placa com 96 poços. Adicionar cerca de 90 µL da Mistura Reacional preparada aos poços, misturar, depois ler a luminescência (L). (cerca de 10 µL de ATP a  $10^{-4}$  M dão cerca de 1 nmol por poço, cerca de 10 µL de ATP a  $10^{-7}$  M

dão cerca de 1 pmol por poço, etc.). Para corrigir a luminescência de fundo adicionar em primeiro lugar cerca de 90 µL de Mistura Reacional (BL), e depois adicionar cerca de 10 µL de amostra ou padrão aos poços, misturar, e ler a luminescência total (L).

**Cálculos:** Corrigir o fundo por subtração de BL de cada leitura de L para amostras e padrões. Representar graficamente a curva padrão. A quantidade de ATP nos poços de amostra é calculada a partir da curva padrão usando regressão linear. A concentração de ATP nas amostras pode ser calculada usando a seguinte fórmula:

$$C = Sa/Sv \text{ (pmol/}\mu\text{L ou nmol/mL, ou } \mu\text{M)}$$

Onde: Sa é quantidade de amostra (em pmol) da curva padrão.

Sv é volume de amostra (em µL) adicionado aos poços de amostra.

Peso molecular de ATP: 507,18 g/mol.

#### **d) ENSAIO DE GLUCOSE (MÉTODO GOD-POD)**

Cerca de 2 µL de sobrenadante são retirados de cada poço da placa de teste e adicionados a uma placa com 96 poços. Como um padrão, similarmente cerca de 2 µL de reagente padrão de Glucose (Conc 100 mg/dL) são também adicionados à placa com 96 poços em triplicados. A estes poços cerca de 200 µL de reagente de Glucose (Medsorce Ozone) são adicionados e incubados durante cerca de 10 min à temperatura ambiente. As absorvâncias são medidas a cerca de 490 nm usando leitor de placas da BioRad. Os gráficos são representados graficamente e analisados usando *software* Graph Pad Prism.

**Exemplo 7.2: Ensaios para Determinação da Morte de Células****e) ENSAIO DE LACTATO DESIDROGENASE**

A avaliação da Lactose Desidrogenase é feita usando o Estojo de Ensaio da Citotoxicidade de LDH (Cayman). No primeiro passo, a LDH catalisa a redução de  $\text{NAD}^+$  até  $\text{NADH}$  e  $\text{H}^+$  por oxidação de lactato até piruvato. No Segundo passo da reação, a diaforase usa o  $\text{NADH}$  recém-formado e  $\text{H}^+$  para catalisar a redução de um sal de tetrazólio (INT) até formazano altamente colorido que absorve fortemente a 490-520 nm. A quantidade de formazano produzido é proporcionado à quantidade de LDH libertada no meio de cultura como resultado da citotoxicidade.

**Configuração de Placas:** Cada placa deve conter uma curva padrão, poços sem células, e poços contendo células com tratamento experimental ou veículo.

As placas de tecido com 96 poços são centrifugadas a cerca de 400 x g durante cinco minutos. Usando uma nova placa com 96 poços transferir cerca de 100  $\mu\text{L}$  dos padrões preparados acima para os poços apropriados. Transferir cerca de 100  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante de cada poço das células cultivadas para poços correspondentes na nova placa. Adicionar cerca de 100  $\mu\text{L}$  de Solução de Reação a cada poço usando um pipetador de repetição. Incubar a placa com agitação suave num agitador orbital durante cerca de 30 minutos à temperatura ambiente. Ler a absorvância a cerca de 490 nm com um leitor de placas.

**Cálculos:** Os valores de absorvância médios dos poços contendo somente meio de tampão de ensaio (os brancos) são

subtraídos dos valores de absorvância de todos os outros poços. Uma Curva padrão é representada graficamente para a absorvância a 490 nm como uma função da concentração de LDH e a equação da linha é determinada. A determinação da atividade de LDH presente na amostra é calculada usando a fórmula em baixo:

$$\text{Atividade de LDH } (\mu\text{U}) = \frac{(A_{490\text{ nm}} - \text{interceção com y})}{\text{declive}}$$

$$\text{Atividade Total de LDH } (\mu\text{U/mL}) \text{ em amostra} = \frac{\text{Valor do ensaio da atividade de LDH } (\mu\text{U})}{\text{volume de x amostra avaliado (usualmente 0,1 mL)}}$$

#### **f) ENSAIO DE CASPASE-3**

O Estojo de Ensaio de Protease Fluorométrica de CPP32/Caspase-3 (BioVision) é usado para avaliação da atividade de caspase dependente de DEVD. O ensaio é baseado na deteção da clivagem do substrato DEVD-AFC (AFC: 7-amino-4-trifluorometil coumarina). DEVD-AFC emite luz azul ( $\lambda_{\text{máx}} = 400 \text{ nm}$ ); após clivagem do substrato por CPP32 ou caspases relacionadas, a AFC livre emite uma fluorescência amarela-verde ( $\lambda_{\text{máx}} = 505 \text{ nm}$ ), que é quantificada usando um fluorómetro ou um leitor de microplacas de fluorescência. A comparação da fluorescência de AFC de uma amostra apoptótica com um controlo não induzido permite a determinação do aumento de vezes na atividade de caspase-3/CPP32.

#### **Procedimento de Ensaio**

1. Induzir apoptose em células por método desejado. Concorrentemente incubar uma cultura de controlo sem indução.

2. Contar células e peletizar cerca de  $1-5 \times 10^6$  células ou usar cerca de 20-200  $\mu\text{g}$  de lisados de células (dependendo do nível de apoptose).

Para amostras de tecido, o tecido é homogeneizado em Tampão de Lise (para 1X volume de tecido adicionar cerca de 3X volume de tampão de lise) para gerar lisado de tecido, depois seguir o procedimento do estojo. 3. Ressuspender células em cerca de 50  $\mu\text{L}$  de Tampão de Lise de Células frio.

4. Incubar células em gelo durante cerca de 10 minutos.

5. Adicionar cerca 50  $\mu\text{L}$  de 2X Tampão de Reação (contendo DTT a cerca de 10 mM) a cada amostra.

6. Adicionar cerca de 5  $\mu\text{L}$  de substrato DEVD-AFC a cerca de 1 mM (concentração final de cerca de 50  $\mu\text{M}$ ) e incubar a cerca de 37 °C durante cerca de 1-2 horas.

7. Ler amostras num fluorómetro equipado com um filtro de excitação de 400 nm e filtro de emissão de 505 nm. Para uma configuração de leitura de placas transferir as amostras para uma placa com 96 poços. O ensaio inteiro pode ser também realizado diretamente numa placa com 96 poços. O aumento de vezes na atividade de CPP32 é determinado por comparação destes resultados com o nível do controlo não induzido.

#### **g) ENSAIO DE CASPASE-8**

O Estojo de Ensaio de Protease Fluorométrica de FLICE/Caspase-8 (BioVision) é usado para avaliação da atividade de caspases que reconhecem a sequência IETD. O ensaio é baseado na deteção da clivagem do substrato IETD-

AFC (AFC: 7-amino-4-trifluorometil coumarina). IETD-AFC emite luz azul ( $\lambda_{\text{máx}} = 400 \text{ nm}$ ); após clivagem do substrato por FLICE ou caspases relacionadas, a AFC livre emite uma fluorescência amarela-verde ( $\lambda_{\text{máx}} = 505 \text{ nm}$ ), que é quantificada usando um fluorómetro ou um leitor de microplacas de fluorescência. A comparação da fluorescência de AFC de uma amostra apoptótica com um controlo não induzido permite a determinação do aumento de vezes na atividade de FLICE.

### **Procedimento de Ensaio**

1. Induzir apoptose em células por método desejado. Concorrentemente incubar uma cultura de controlo sem indução.
2. Contar células e peletizar cerca de  $1-5 \times 10^6$  células ou usar cerca de 50-200  $\mu\text{g}$  de lisados de células se a concentração de proteínas tiver sido medida.
3. Ressuspender células em cerca de 50  $\mu\text{L}$  de Tampão de Lise de Células frio. Incubar células em gelo durante cerca de 10 minutos.
5. Adicionar cerca de 50  $\mu\text{L}$  de 2X Tampão de Reação (contendo DTT a cerca de 10 mM) a cada amostra. Adicionar cerca de 5  $\mu\text{L}$  de substrato IETD-AFC a cerca de 1 mM (concentração final de cerca de 50  $\mu\text{M}$ ). Incubar a cerca de 37 °C durante cerca de 1-2 horas.
7. Ler amostras num fluorómetro equipado com um filtro de excitação de 400 nm e filtro de emissão de 505 nm. Para uma configuração de leitura de placas transferir as amostras para uma placa com 96 poços. O ensaio inteiro pode ser também realizado diretamente numa placa com 96 poços. O aumento de vezes na atividade de FLICE pode ser

determinado por comparação destes resultados com o nível do controlo não induzido.

**Exemplo 7.3: Ensaio para Determinação da Senescência de Células:**

**h) COLORAÇÃO DE BETA-GAL ASSOCIADA À SENESCÊNCIA**

No caso de secções de tecidos, tecido instantaneamente congelado em nitrogénio líquido (LN<sub>2</sub>) embebido em Temperatura de corte ótima (OCT) é montado em lâminas supercongeladas. As células são depois incubadas a cerca de 37 °C durante cerca de 20 hr com solução de coloração (ácido cítrico fosfato de sódio a cerca de 40 mM, pH 6,0, 5-bromo-4-cloro-3-isolil-β-D-galactosídeo a cerca de 1 mg/mL [X-gal, Fisher], ferricianeto de potássio a cerca de 5 mM, ferrocianeto de potássio a cerca de 5 mM, NaCl a cerca de 150 mM, MgCl<sub>2</sub> a cerca de 2 mM). Após incubação, as células são lavadas duas vezes com PBS e vistas sob microscopia de campo brilhante quanto à coloração azul.

**Exemplo 7.4: Ensaio para Avaliação Histológica/Ensaio de IHC:**

**i) ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMIA (IHC):**

O tumor é fixo em formalina tamponada a cerca de 10% e embebido em parafina. Secções tumorais são cortadas (cerca de 5 μm) e desparafinadas em xileno seguido por reidratação em graus decrescentes de etanol. As secções são coloridas com Hematoxilina e Eosina (H&E). A recuperação dos antigénios é feita em Vector<sup>®</sup> Antigen Unmasking Solution (Baseada em citrato, Vector Laboratories) por

exposição a aquecimento por micro-ondas durante cerca de 30 min. É permitido que as lâminas arrefeçam e são subsequentemente lavadas em salino tamponado com Tris. A extinção de peroxidase endógena é feita por incubação das secções em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cerca de 3% durante cerca de 15 min. O bloqueio de proteínas é levado a cabo à temperatura ambiente durante cerca de 1 hr com soro de cabra a cerca de 10%. Os passos de incubação subsequentes são seguidos por lavagens em Salino Tamponado com Tris (TBS). As secções são incubadas com anticorpo primário às condições acima mencionadas seguido por incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano-silvestre (HRP) (SignalStain<sup>®</sup> Boost IHC Detection Reagent; Cell Signaling Technology) durante 1 hr à TA. O desenvolvimento cromogénico é feito usando 3,3'-diaminobenzidina (Estojo de Substrato de Peroxidase DAB; Vector Laboratories). Os tecidos são contracoloridos com Hematoxilina (Solução de Papanicolaou 1a; Merck).

Fosfo-AKT monoclonal de coelho (Ser473; D9E XPTM) e Fosfo-AMPK $\alpha$  (Thr172) (clone 40H9, Cell Signaling Technology) são usados à diluição de cerca de 1:50 e cerca de 1:100, respetivamente, para incubação durante a noite a cerca de 4 °C. Proteína Ribossomal fosfo-S6 monoclonal de coelho (pS6RP) (Ser235/236; D57,2,2E XPTM) e fosfo-PRAS40 (Thr246, C77D7) são obtidas da Cell Signaling Technology e usadas à diluição de cerca de 1:200 para incubação durante a noite a cerca de 4 °C; GLUT1 policlonal de coelho (Abcam) à diluição de cerca de 1:200 é usado para incubação de cerca de 1 hr à temperatura ambiente (TA) variando de cerca de 25 °C a cerca de 35 °C; Ki67 policlonal de coelho (Vector Laboratories) é usado à diluição de cerca de 1:600 durante cerca de 1 hr à TA. A indução da apoptose é detetada por

coloração de Caspase 3 clivada usando anticorpo para anti-Caspase 3 clivada policlonal (Asp175) (policlonal de coelho, Cell Signaling Technology) à diluição de cerca de 1:600 durante cerca de 1 hr à TA. Controlo de isotipo com correspondência de IgG é usado para cada anticorpo primário. Cada lâmina é independentemente examinada por dois especialistas e a pontuação/classificação é realizada conforme a fórmula da pontuação H.

#### **j) COLORAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDOS FIXOS - FOSFO ERK/FOSFO EGFR**

O princípio básico que subjaz a esta técnica é a reação antigénio-anticorpo que é amplificada e visualizada. O antigénio alvo pode estar fisicamente inacessível ao anticorpo devido à dobragem das proteínas causada durante a fixação. Isto é ultrapassado por um procedimento chamado recuperação de antigénios, onde é usado calor para alterar a dobragem das proteínas e os antigénios tornam-se acessíveis. A extinção da peroxidase endógena, o bloqueio de proteínas e bloqueio de biotina endógena são passos importantes para evitar coloração de fundo e ligação não específica. Este protocolo padronizado usa um sistema de deteção em três camadas que envolve o anticorpo primário (usualmente mAb de coelho/camundongo) que se liga ao antigénio alvo; anticorpo secundário biotinilado (usualmente IgG anticoelho de cabra) que se liga ao anticorpo primário; e o complexo avidina biotina (ABC; peroxidase de rábano-silvestre biotinilado que se liga à avidina para formar um complexo) que visa a biotina ligada ao anticorpo secundário. Os anticorpos ajudam na deteção de antigénio e ampliação do sinal. A enzima peroxidase, que está presente em ABC, catalisa uma reação onde DAB (3,3'-

diamnobenzidina) produz um precipitado castanho que pode ser visualizado sob um microscópio, detetando em última instância o antigénio alvo.

**Procedimento:**

1. A Desparafinização e Reidratação são levadas a cabo como proporcionado em baixo:

a. Xileno - 2 lavagens - 6 min cada	}	Desparafinização
b. Etanol a 100% - 1 lavagem - 3 min		
c. Etanol a 90% - 1 lavagem - 3 min	}	Desxilenização
d. Etanol a 70% - 1 lavagem - 3 min		
e. Água da torneira (a correr) - 10 min	}	Reidratação
f. Água destilada - 1 lavagem - 5 min		

2. Isto é seguido por recuperação de antigénios

a. Preparar: cerca de 600 mL de água destilada + cerca de 5,6 mL de Antigen Unmasking Solution (Vector Labs #H-3300) numa proveta de 1 L.

b. Embeber as lâminas na solução durante cerca de 10 minutos.

c. Aquecimento no micro-ondas dos conteúdos da proveta e das lâminas como se segue:

M-Baixa	: cerca de 5 min
Média	: cerca de 5 min
M-Elevada	: cerca de 5 min
Elevada	: cerca de 5 min

- d. Arrefecer as lâminas até à temperatura ambiente por colocação da proveta num banho cheio com água da torneira.
- e. Lavar as lâminas com água destilada cerca de 4 vezes durante cerca de 5 min cada lavagem (Jarra Coplin).
- f. Lavar lâminas em 1X PBS durante 5 min (Jarra Coplin).

3. A extinção de peroxidase endógena é feita

- a. Preparação Fresca: cerca de 9 mL de  $H_2O_2$  (30%) + cerca de 75 mL de Água destilada
- b. Incubar lâminas em solução de  $H_2O_2$  durante cerca de 15 min (Jarra Coplin).
- c. Lavar lâminas em água da torneira a correr durante cerca de 2 min.
- d. Lavar lâminas em 1X PBS durante cerca de 7 min (Jarra Coplin).
- e. Fazer um círculo no tecido usando caneta Pap hidrofóbica (isto é feito para manter o volume de anticorpos tão pequeno quanto possível).

4. O bloqueio de proteínas é feito. Este e os passos subsequentes requerem uma câmara humidificada (uma bandeja com papel filtro Whatman húmido).

- a. Preparar Soro de cabra a cerca de 10% (250  $\mu$ L de soro de cabra + 2,5 mL de 1X PBS)
- b. Adicionar cerca de 75  $\mu$ L de soro de cabra a cada secção de tecido e incubar durante cerca de 1 hora.
- c. Descartar o soro. Nenhuma lavagem requerida.

5. O Bloqueio de Avidina/Biotina (obtida dos Vector Labs #SP2001) é levado a cabo

- a. Distribuir quantidades requeridas de Avidina e Biotina em dois tubos Eppendorf.
- b. Adicionar cerca de 75  $\mu$ L de Avidina a cada secção de tecido e incubar durante cerca de 15 min.
- c. Descartar Avidina e enxaguar as lâminas em 1X PBS brevemente (Jarra Coplin).
- d. Adicionar cerca de 75  $\mu$ L de Biotina a cada secção de tecido e incubar durante cerca de 15 min.
- e. Enxaguar as lâminas em 1X PBS brevemente (Jarra Coplin).

6. Anticorpo Primário é adicionado

- a. Preparar Fosfo-Erk/Fosfo-EGFR cerca de 1:200 (obtida da Cell Signalling Technology #4370/#2237) com 1X PBS.
- b. Adicionar cerca de 75  $\mu$ L a cada secção de tecido e incubar durante cerca de 1 hora.
- c. Lavar lâminas três vezes em 1X PBS durante cerca de 3 min cada lavagem (Jarra Coplin).

7. Isto é seguido por adição do Anticorpo Secundário

- a. Preparar IgG anti-Coelho de Cabra 1:1000 (Vector Labs #BA-1000) com 1X PBS.
- b. Adicionar cerca de 75  $\mu$ L a cada secção de tecido e incubar durante cerca de 1 hora.
- c. Lavar lâminas três vezes em 1X PBS durante cerca de 5 min cada lavagem (Jarra Coplin).

8. Reagente ABC (obtido dos Vector Labs; Estojo Vectastain ABC Peroxidase Goat IgG #PK-4005) é adicionado

- a. Preparar reagente: cerca de 1 gota de solução A + cerca de 1 gota de solução B + cerca de 2,5 mL de 1X PBS. Incubar o reagente durante cerca de 30 min antes do uso à temperatura ambiente. Quaisquer quantidades extra podem ser armazenadas a cerca de 4 °C durante até um mês
- b. Adicionar cerca de 75 µL de reagente a cada secção de tecido e incubar durante cerca de 30 min.
- c. Lavar lâminas três vezes em 1X PBS durante cerca de 5 min cada lavagem (Jarra Coplin).

#### 9. Substrato DAB (Vector Labs #SK4100)

Os seguintes passos são para ser feitos numa câmara escura.

- a. Preparação fresca substrato DAB: cerca de 1 gota de Tampão + cerca de 2 gotas de DAB + cerca de 1 gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cerca de 2,5 mL de água destilada dupla.
- b. Adicionar cerca de 75 µL do reagente a cada secção de tecido e observar sob microscópio para decidir o tempo de exposição apropriado.
- c. Descartar o reagente em solução de permanganato de potássio e lavar as lâminas em água da torneira.

#### 10. As lâminas são sujeitas a contracoloração usando Hematoxilina

- a. Imergir as lâminas 2-3 vezes em hematoxilina.
- b. Lavar as lâminas em água da torneira a correr durante cerca de 5 min.
- c. Lavar as lâminas em Solução de carbonato de sódio a cerca de 1% durante cerca de 30 segundos
- d. Etanol a 70% - 1 lavagem - cerca de 3 min
- e. Etanol a 95% - 1 lavagem - cerca de 3 min
- f. Etanol a 100% - 2 lavagens - cerca de 3 min

g. Xileno - 2 lavagens - cerca de 3 min

11. A montagem das lâminas é feita com DPX (obtido da Merck #61803502501730)

a. Montar as lâminas com lamínulas limpas usando DPX e deixar secar

b. Marcar apropriadamente.

#### **k) COLORAÇÃO POR TÚNEL DE TECIDOS FIXOS**

A marcação das extremidades *nick* dUTP de deoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL) é um método para detecção da fragmentação de DNA por marcação da extremidade terminal de ácidos nucleicos. TUNEL é usado para detecção da fragmentação de DNA que resulta de cascatas de sinalização apoptótica. O ensaio baseia-se na presença de *nicks* no DNA que podem ser identificados por deoxinucleotidil transferase terminal ou TdT, uma enzima que catalisará a adição de dUTPs que são secundariamente marcados com um marcador. Pode também marcar células que sofreram danos graves ao DNA.

#### **Procedimento:**

1. O primeiro passo envolve desparafinização e reidratação

a. Xileno - 2 lavagens - 6 min cada	}	Desparafinização
b. Etanol a 100% - 1 lavagem - 3 min		
c. Etanol a 90% - 1 lavagem - 3 min	}	Desxilenização
d. Etanol a 70% - 1 lavagem - 3 min		
e. Água da torneira (a correr) - 10 min	}	Reidratação
f. Água destilada - 1 lavagem - 5 min		

2. Isto é seguido por recuperação de antigénios

- a. Preparar Proteinase K a cerca de 1:1000 (Qiagen # 19131) com 1X PBS.
- b. Adicionar cerca de 50  $\mu$ L a cada secção de tecido e incubar durante 1 cerca de 5 min.
- c. Lavar lâminas em dH<sub>2</sub>O duas vezes durante cerca de 2 min cada lavagem (Jarra Coplin).

3. A extinção é feita por peroxidase endógena

- a. Preparação Fresca: cerca de 7,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) + cerca de 67,5 mL de Água destilada
- b. Incubar lâminas em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante cerca de 5 min (Jarra Coplin).
- c. Lavar lâminas em água da torneira a correr durante cerca de 2 min.
- d. Lavar lâminas em 1X PBS duas vezes durante cerca de 5 min (Jarra Coplin).
- e. Fazer um círculo no tecido usando caneta Pap hidrofóbica (isto é feito para manter o volume de anticorpos/reagentes tão pequeno quanto possível).

4. Segue-se o tratamento com tampão de equilíbrio. Este e os passos subsequentes requerem uma câmara humidificada (uma bandeja com papel filtro Whatman húmido).

- a. Adicionar cerca de 13  $\mu\text{L}$  de tampão de equilíbrio a cada secção de tecido e incubar durante pelo menos cerca de 10 segundos (até cerca de 6 min está bem)
- b. Descartar o reagente. Nenhuma lavagem requerida.

5. Enzima TdT é adicionada

- a. Diluir enzima TdT em Tampão de reação na razão de cerca de 3:7 (Por ex: cerca de 30  $\mu\text{L}$  de TdT em cerca de 70  $\mu\text{L}$  de Tampão de reação).
- b. Adicionar cerca de 15  $\mu\text{L}$  a cada secção de tecido e incubar durante cerca de 1 hora a cerca de 37 °C numa câmara humidificada.
- c. Descartar o reagente.

6. Tampão de Paragem/Lavagem é adicionado

- a. Preparar tampão de Paragem/Lavagem por adição de cerca de 1 mL de tampão de *stock* a cerca de 34 mL de  $\text{dH}_2\text{O}$ .
- b. Colocar lâminas no tampão e agitar durante cerca de 15 segundos. Incubar durante cerca de 10 min à temperatura ambiente.
- c. Lavar lâminas três vezes em 1X PBS durante cerca de 1 min cada lavagem (Jarra Coplin).
- d. Remover uma alíquota de Conjugado Anti-digoxigenina e colocar à temperatura ambiente.

7. Conjugado Anti-Digoxigenina é adicionado

- a. Adicionar 15  $\mu\text{L}$  de Conjugado anti-digoxigenina a cada secção de tecido e incubar numa câmara humidificada durante cerca de 30 min à temperatura ambiente.

b. Lavar lâminas cerca de quatro vezes em 1X PBS durante cerca de 2 min cada lavagem (Jarra Coplin).

8. As lâminas são tratadas com substrato de peroxidase: DAB

a. Preparar substrato DAB - diluição de cerca de 1:50 com tampão de diluição de DAB.

b. Adicionar cerca de 15  $\mu$ L de reagente a cada secção de tecido e incubar durante cerca de 3-6 min.

Observar sob microscópio para se determinar o tempo de exposição apropriado.

c. Lavar lâminas três vezes em dH<sub>2</sub>O durante cerca de 1 min cada lavagem (Jarra Coplin).

d. Incubar lâminas em dH<sub>2</sub>O durante cerca de 5 min à temperatura ambiente.

9. A contracoloração usando Verde de metilo é feita

a. Contracolorir em verde de metilo a cerca de 0,5% durante cerca de 10 min à temperatura ambiente.

b. Lavar as lâminas em cerca de 3 mudanças de dH<sub>2</sub>O numa jarra Coplin, imersão da lâmina cerca de 10 vezes cada nas primeira e segunda lavagens, seguido por cerca de 30 segundos sem agitação na terceira lavagem.

c. Lavar as lâminas em 3 mudanças de N-Butanol a 100% numa jarra Coplin, imersão da lâmina cerca de 10 vezes cada nas primeira e segunda lavagens, seguido por cerca de 30 segundos sem agitação na terceira lavagem.

10. Montagem

- a. Desidratar o tecido por colocação em cerca de 2 mudanças de Xileno, incubação durante cerca de 2 min em cada jarra.
- b. Montar sob uma lamínula de vidro usando DPX (Merck #61803502501730).

**1) COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)** é um método de coloração popular em histologia. H&E é rotineiramente realizado para avaliar as figuras mitóticas, necrose e características grosseiras gerais do tecido. O ensaio de Hematoxilina & Eosina (H&E) é também usado para determinação do conteúdo estromal tumoral.

**Exemplo 7.4: Ensaios para Proliferação de Células.**

O ensaio de IHC é também usado para os ensaios para os marcadores de proliferação padrão como Ki67 e PCNA para se determinar a proliferação de células.

**Exemplo 7.6: Ensaios para Ácido nucleico.**

O isolamento de ácido nucleico é adicionalmente avaliado em análise de RNA e *microarray* de miRNA e análise de genes quanto a mutações específicas somente para amostras selecionadas. Igualmente, a sequenciação de exomas pode ser realizada para DNA somente para amostras selecionadas. O perfil genético é usado em casos selecionados para entendimento da biologia de tumor e não como uma parte do "Preditor da Resposta Clínica".

**m) PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL A PARTIR DE TECIDOS:**

A purificação de RNA total de tecidos é feita conforme o estojo de extração de RNA da Qiagen.

1. Remover tecidos com estabilização mais tarde do RNA do reagente usando fórceps.
2. Usar cerca de 30-50 mg de tumor.
3. Colocar o tecido pesado em tubo de cerca de 1,2 mL. Adicionar cerca de 350  $\mu$ L de tampão RLT ao tecido, imediatamente homogeneizar num microdesmembrador de tecidos a cerca de 3000 rpm durante cerca de 60 segundos.
4. Recolher o lisado num tubo separado, centrifugar durante cerca de 3 min à velocidade total. Remover cuidadosamente o sobrenadante por pipetação, e transferi-lo para um novo tubo de microcentrífuga.
5. Adicionar cerca de 1 volume (cerca de 350  $\mu$ L) de etanol a cerca de 70% ao lisado clarificado, e misturar imediatamente por pipetação.
6. Transferir a amostra para uma coluna RNeasy spin colocada em tubo de recolha de cerca de 2 mL. Fechar a tampa suavemente e centrifugar durante cerca de 15 seg a cerca de 10000 rpm. Descartar o fluxo.
7. Adicionar cerca de 350  $\mu$ L de tampão RW1 à coluna RNeasy spin. Fechar a tampa suavemente e centrifugar durante cerca de 15 seg a cerca de 10000 rpm. Descartar o fluxo.
8. Adicionar cerca de 10  $\mu$ L de soluções de *stock* de DNase 1 a cerca de 70  $\mu$ L de tampão RDD. Misturar por inversão suave do tubo.
9. Adicionar cerca de 80  $\mu$ L de mistura de incubação de DNase 1 à membrana da coluna RNeasy spin, incubar durante cerca de 15 min à temperatura ambiente.

10. Adicionar cerca de 350  $\mu$ L de tampão RW1 à coluna RNeasy. Fechar a tampa suavemente e centrifugar durante cerca de 15 seg a cerca de 10000 rpm. Descartar o fluxo
11. Adicionar cerca de 500  $\mu$ L de tampão RPE à coluna RNeasy. Fechar a tampa suavemente, e centrifugar durante cerca de 15 seg a cerca de 10000 rpm. Descartar o fluxo.
12. Adicionar cerca de 500  $\mu$ L de tampão RPE à coluna RNeasy. Fechar a tampa suavemente, e centrifugar durante cerca de 2 min a cerca de 10000 rpm. Descartar o fluxo.
13. Colocar a coluna RNeasy num novo tubo de recolha de 2 mL e descartar o tubo de recolha velho com o fluxo. Fechar a tampa suavemente e centrifugar à velocidade total durante cerca de 1 min
14. Colocar a coluna RNeasy num novo tubo de recolha de 1,5 mL. Adicionar cerca de 35  $\mu$ L de água isenta de RNase diretamente à membrana da coluna spin. Fechar a tampa suavemente e centrifugar durante cerca de 1 min a cerca de 10000 rpm
15. Eluir o RNA e armazenar a cerca de -85 °C

**n) ISOLAMENTO DE RNA TOTAL E MICROARRAY:**

A biópsia nuclear com estabilização mais tarde do RNA e amostras de xenoinxertos tumorais humanos correspondentes são lisadas usando microdesmembrador (Sartorius) de acordo com o procedimento de operação padrão. O RNA total isolado de tecidos pulverizados é subsequentemente avaliado quanto à integridade por bioanalizador e nanogota.

*Microarray* de RNA tumoral (cRNA) é levado a cabo usando a plataforma de sistema Agilent Sure Print G3 Human GE 8x60K Microarrays (Agilent Technologies). Para *microarray* de RNA, um valor RIN acima de cerca de 7 é usado como um limiar de

exclusão. Aproximadamente cerca de 200 ng de RNA extraído de amostras tumorais ou controlo correspondido são reversamente transcritos finalmente para gerar cRNA amplificado marcado com cy3/cy5 e é perfilado usando Estojos e plataforma Agilent (Agilent Technologies). Os dados de *array* são normalizados usando *software* de extração Feature e *software* Gene-Spring da Agilent. Análise estatística adicional é levada a cabo usando *software* apropriado para este estudo. Os dados expressos como diferenças de vezes (para genes tanto sobrerregulados como subregulados) comparados com controlo correspondente. Um mapa térmico é gerado e a relação (similaridade de genes) é elucidada entre diferentes amostras tumorais primárias e tumorais de xenoenxertos com base no seu estado de resposta. *Array* não supervisionado é usado para geração de uma árvore mostrando a relação de tumor primário derivado de CR, PR ou PD com xenoenxertos correspondentes com base no perfil funcional no contexto de resposta aos fármacos. A análise ANOVA de dados normalizados é realizada para distinguir os genes diferencialmente expressos (a  $P < 0,05$ ) entre diferentes tumores e grupos de xenoenxertos correspondentes.

**o) RT-PCR EM TEMPO REAL.**

Os genes significativamente expressos de *microarray* são confirmados por RT-qPCR usando sondas específicas e conjuntos de iniciadores usando a plataforma de PCR em tempo real da Stratagene.

**p) SEQUENCIAÇÃO DE EXOMAS PARA ANÁLISE DE MUTAÇÕES.**

DNAs genômicos são isolados de tumores HNSCC primários usando o Estojo de Tecidos DNAeasy (Qiagen). Após verificação da qualidade, a sequenciação de exomas dos DNAs é conduzida para análise de mutações conforme procedimentos descritos previamente. Brevemente, iniciadores de sequenciação e nucleótidos marcados específicos são para gerar reação e sequências de genes específicas são analisados na plataforma Exome Sequencing da Illumina. São determinadas as diferenças no espectro de mutações em grupos respondedores e não respondedores clínicos.

**Exemplo 8: Geração de algoritmos para prever o resultado clínico:**

Logo que o tumor seja excisado do paciente é sujeito a análise de explantes como descrito nos exemplos 1-3 com múltiplos fármacos (sozinhos ou em combinação). A resposta tumoral ao fármaco é avaliada por múltiplos ensaios como descrito no Exemplo 6. Em paralelo, os resultados clínicos são medidos conforme protocolos estabelecidos. Diferentes ponderações são dadas aos resultados de ensaios individuais de explante tal que a pontuação combinada que é obtida tenha uma correlação linear com o resultado clínico observado; *i.e.*, elevada pontuação combinada (>60, por exemplo) está correlacionada com resposta clínica (CR) completa, baixa pontuação combinada (<20, por exemplo) está correlacionada com não resposta (NR) clínica.

Logo que um tal sistema de pontuação seja concebido pode ser usado para prever a resposta clínica de um paciente futuro a partir da análise de explantes.

São dadas ponderações aos parâmetros individuais tal que os

dados ponderados cumulativos tenham boa correlação com o resultado clínico observado. Diferentes algoritmos usam diferentes ponderações individuais (de 0-100%) para os parâmetros incluídos na correlação.

Adicionalmente à atribuição manual das ponderações (como mostrado nos 5 algoritmos exemplificativos mostrados), "Análise multivariantes" usando um computador é também possível, onde diferentes ponderações são atribuídas para se chegar à fórmula de melhor ajuste que tenha a menor quantidade de desvio entre a resposta clínica prevista e a resposta clínica observada.

As pontuações em bruto obtidas pelos vários ensaios de explantes são proporcionadas na Tabela 4. Dá também a leitura clínica (Resposta completa, Resposta Parcial ou Não Resposta obtida conforme os critérios PERCIST convencionais).

**Tabela 4: Dados Experimentais de ensaios de explantes e avaliação clínica.**

#	Análise de explantes				Leitura Clínica	
	Viabilidade	Histologia	Proliferação	Apoptose	RECIST	Representação Numérica
1	5	20	0	120	NR	1
2	27	42	20	100	PR	2
3	32	50	10	100	PR	2
4	58	60	53	154	CR	3
5	22	0	0	150	NR	1
6	25	50	50	70	PR	2
7	21	47	55	80	PR	2
8	48	72	43	120	CR	3
9	9	0	0	100	NR	1

#	Análise de explantes				Leitura Clínica	
	ID da Amostra	Viabilidade	Histologia	Proliferação	Apoptose	RECIST
10	24	38	27	120	PR	2
11	19	43	55	80	PR	2
12	27	62	20	75	PR	2
13	16	55	20	68	PR	2
14	32	42	35	70	PR	2
15	35	33	60	65	PR	2
16	27	28	28	72	PR	2
17	29	36	25	80	PR	2
18	23	50	75	75	PR	2
19	19	0	0	100	NR	1
20	22	44	62	50	PR	2
21	27	51	25	65	PR	2
22	25	0	0	100	NR	1
23	35	34	42	25	PR	2
24	20	19	35	55	PR	2
25	5	0	0	25	NR	1
26	27	0	0	42	NR	1
27	8	0	0	50	NR	1
28	35	50	36	50	PR	2
29	18	0	36	18	NR	1
30	36	48	58	30	PR	2
31	29	14	20	55	PR	2
32	32	34	16	20	PR	2
33	44	28	35	30	PR	2
34	24	12	0	50	NR	1
35	52	44	0	20	PR	2
36	29	10	22	42	PR	2
37	21	9	46	0	PR	2
38	66	55	40	74	CR	3
39	41	12	0	20	NR	1
40	11	17	27	54	PR	2

#	Análise de explantes				Leitura Clínica	
ID da Amostra	Viabilidade	Histologia	Proliferação	Apoptose	RECIST	Representação Numérica
41	15	22	33	35	PR	2
42	7	0	0	30	NR	1
43	15	15	28	36	PR	2
44	62	50	64	70	CR	3
45	36	41	43	24	PR	2
46	24	52	36	45	PR	2

A Tabela 5 dá valor numérico para a leitura clínica observada. O valor de 3, 2 e 1 é dado para resposta completa, resposta parcial e não resposta, respetivamente. A Tabela 6 mostra as ponderações que são dadas para os ensaios de explantes em cada um dos 5 algoritmos representativos.

Estas ponderações são dadas com base na natureza dos fármacos usados na análise de explantes. Por exemplo, aos fármacos que se sabe exibirem a sua atividade por disrupção da proliferação de células são dadas ponderações mais elevadas para a proliferação de células.

**Tabela 5: Representação numérica de resposta clínica, Resposta Parcial e não resposta.**

Resposta Completa	3
Resposta Parcial	2
Não Resposta	1

**Tabela 6: Ponderação dada a diferentes resultados de ensaios de explantes nos 5 algoritmos representativos.**

Ponderação do Índice de Sensibilidade (%)			
	Viabilidade	Histologia	Apoptose

Ponderação do Índice de Sensibilidade (%)				
	Viabilidade	Histologia	Proliferação	Apoptose
Método 1	25%	25%	25%	25%
Método 2	20%	30%	25%	25%
Método 3	30%	15%	25%	30%
Método 4	30%	30%	30%	10%
Método 5	10%	20%	30%	40%

O índice de sensibilidade (*i.e.*, a pontuação M) para cada paciente é calculado por multiplicação da pontuação em bruto com o fator de ponderação correspondente e adição dos números resultantes, como ilustrado na Tabela 7. Por exemplo, o paciente 1 tem pontuação de análise de explantes de 5, 20, 0 e 120 para viabilidade, histologia, proliferação, e apoptose, respectivamente. Sob o algoritmo 1 (ou método 1), a cada um destes fatores é dada uma ponderação de 25%. Assim, o índice de sensibilidade para o paciente 1 usando o algoritmo 1 será calculado como se segue:

$$\text{Índice de sensibilidade} = (5 \cdot 25\%) + (20 \cdot 25\%) + (0 \cdot 25\%) + (120 \cdot 25\%) = 36$$

O Índice de Sensibilidade assim calculado é convertido no resultado clínico previsto (Tabelas 8-12) como se segue:

Se o Índice de Sensibilidade > 60, Resultado clínico previsto = 3 (= Resposta completa).

Se 20 < Índice de Sensibilidade < 60, resultado clínico previsto = 2 (= Resposta parcial).

Se o Índice de Sensibilidade < 20, resultado clínico previsto = 1 (= Não Resposta).

**Tabela 7: Índice de sensibilidade medido pela aplicação das ponderações para os ensaios de explantes como medido pelos 5 algoritmos representativos.**

Índice de Sensibilidade				
Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
36	37	41	20	53
47	48	49	37	57
48	49	50	38	56
81	81	86	67	95
43	42	52	22	62
49	50	49	45	56
51	52	51	45	60
71	72	72	61	80
27	27	33	13	41
52	53	56	39	66
49	50	50	43	59
46	48	45	40	51
40	42	38	34	46
45	45	46	40	50
48	48	50	45	54
39	39	41	32	46
43	43	44	35	50
56	57	56	52	65
30	29	36	16	42
45	46	44	43	50
42	43	42	37	46
31	30	38	18	43
34	34	34	36	33
32	32	34	28	38
8	7	9	4	11
17	16	21	12	20
15	14	17	7	21
43	44	42	41	44
18	17	20	18	20

Índice de Sensibilidade				
Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
43	44	42	46	43
30	29	32	24	34
26	26	25	27	23
34	33	35	35	33
22	21	24	16	25
29	29	28	31	22
26	25	28	23	28
19	18	19	23	18
59	58	60	56	59
18	17	20	18	15
27	28	29	22	34
26	27	27	25	30
9	9	11	5	13
24	24	25	21	27
62	61	63	60	63
36	36	35	38	34
39	41	38	38	42

O resultado clínico previsto é comparado com o resultado clínico observado para medir o poder preditor dos algoritmos (Tabelas 8-12). As porções sombreadas ilustram casos onde existe correspondência entre o resultado previsto e o resultado observado.

**Tabela 8: Eficácia Preditora do algoritmo 1:** Comparação entre "resultado clínico previsto" e "Resultado Clínico observado". Se o Índice de sensibilidade  $>60$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 3 (*i.e.*, Resposta Completa). Se o Índice de sensibilidade  $< 20$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 1 (*i.e.*, Não Resposta). Se  $20 < \text{Índice de sensibilidade} < 60$ ,

é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 2  
(i.e., Resposta Parcial).

## Algoritmo 1

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
36	2	1
47	2	2
48	2	2
81	2	2
43	2	1
49	2	2
51	2	2
71	2	2
27	2	1
52	2	2
49	2	2
46	2	2
40	2	2
45	2	2
48	2	2
39	2	2
43	2	2
56	2	2
30	2	1
45	2	2
42	2	2
31	2	1
34	2	2
32	2	2
8	1	1
17	1	1
15	1	1
43	2	2
18	1	1
43	2	2
30	2	2
26	2	2
34	2	2
22	2	1
29	2	2
26	2	2
19	1	2
59	2	3
18	1	1
27	2	2
26	2	2
9	1	1

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
24	2	2
62	3	3
36	2	2
39	2	2

**Tabela 9: Eficácia Preditora do algoritmo 2-** Comparação entre "resultado clínico previsto" e "Resultado Clínico observado". Se o Índice de sensibilidade  $>60$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 3 (*i.e.*, Resposta Completa). Se o Índice de sensibilidade  $< 20$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 1 (*i.e.*, Não Resposta). Se  $20 < \text{Índice de sensibilidade} < 60$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 2 (*i.e.*, Resposta Parcial).

Algoritmo 2

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
37	2	1
48	2	2
49	2	2
81	3	3
42	2	1
50	2	2
52	2	2
72	3	3
27	2	1
53	2	2
50	2	2
48	2	2
42	2	2
45	2	2
48	2	2
39	2	2
43	2	2
57	2	2
29	2	1
46	2	2
43	2	2
30	2	1
34	2	2
32	2	2
7	1	1

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
16	1	1
14	1	1
44	2	2
17	1	1
44	2	2
29	2	2
26	2	2
33	2	2
21	2	1
29	2	2
25	2	2
18	1	2
58	2	3
17	1	1
28	2	2
27	2	2
9	1	1
24	2	2
61	3	3
36	2	2
41	2	2

**Tabela 10: Eficácia Preditora do algoritmo 3:** Comparação entre "resultado clínico previsto" e "Resultado Clínico observado". Se o Índice de sensibilidade  $>60$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 3 (*i.e.*, Resposta Completa). Se o Índice de sensibilidade  $< 20$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 1 (*i.e.*, Não Resposta). Se  $20 < \text{Índice de sensibilidade} < 60$ ,

é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 2  
(i.e., Resposta Parcial).

## Algoritmo 3

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
41	2	1
49	2	2
50	2	2
86	2	2
52	2	1
49	2	2
51	2	2
72	2	2
33	2	1
56	2	2
50	2	2
45	2	2
38	2	2
46	2	2
50	2	2
41	2	2
44	2	2
56	2	2
36	2	1
44	2	2
42	2	2
38	2	1
34	2	2
34	2	2
9	1	1
21	1	1
17	1	1
42	2	2
20	1	1
42	2	2
32	2	2
25	2	2
35	2	2
24	2	1
28	2	2
28	2	2
19	1	2
60	2	2
20	2	3
29	2	2
27	2	2
11	1	1

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
25	2	2
63	3	3
35	2	2
38	2	2

**Tabela 11: Eficácia Preditora do algoritmo 4:** Comparação entre "resultado clínico previsto" e "Resultado Clínico observado". Se o Índice de sensibilidade  $>60$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 3 (*i.e.*, Resposta Completa). Se o Índice de sensibilidade  $< 20$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 1 (*i.e.*, Não Resposta). Se  $20 < \text{Índice de sensibilidade} < 60$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 2 (*i.e.*, Resposta Parcial).

#### Algoritmo 4

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
20	2	1
37	2	2
38	2	2
67	3	3
22	2	1
45	2	2
45	2	2
61	3	3
13	2	1
39	2	2
43	2	2
40	2	2
34	2	2
40	2	2
45	2	2
32	2	2
35	2	2
52	2	2
16	2	1
43	2	2
37	2	2
18	2	1
36	2	2
28	2	2
4	1	1
12	1	1
7	1	1

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
41	2	2
18	1	1
46	2	2
24	2	2
27	2	2
35	2	2
16	2	1
31	2	2
23	2	2
23	1	2
56	2	3
18	1	1
22	2	2
25	2	2
5	1	1
21	2	2
60	2	3
38	2	2
38	2	2

**Tabela 12: Eficácia Preditora do algoritmo 5:** Comparação entre "resultado clínico previsto" e "Resultado Clínico observado". Se o Índice de sensibilidade  $>60$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 3 (*i.e.*, Resposta Completa). Se o Índice de sensibilidade  $< 20$ , é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 1 (*i.e.*, Não Resposta). Se  $20 < \text{Índice de sensibilidade} < 60$ ,

é dada ao Resultado clínico previsto uma pontuação de 2  
(i.e., Resposta Parcial).

### Algoritmo 5

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
53	2	1
57	2	2
56	2	2
95	2	2
62	3	1
56	2	2
60	2	2
08	2	2
41	2	1
66	3	2
59	2	2
51	2	2
46	2	2
50	2	2
54	2	2
46	2	2
50	2	2
65	3	2
42	2	1
50	2	2
46	2	2
43	2	1
33	2	2
38	2	2
11	1	1
20	1	1
21	1	1
44	2	2
20	1	1
43	2	2
34	2	2
23	2	2
33	2	2
25	2	1
22	2	2
28	2	2
18	1	2
59	2	3
15	1	1
34	2	2
30	2	2
13	1	1

Índice de Sensibilidade	Resultado Clínico Previsto	Resultado Clínico Observado
27	2	2
63	3	3
34	2	2
42	2	2

Ao invés de se darem ponderações manuais nas Tabelas 6-13, um computador pode ser usado opcionalmente para usar um método de análise de multirregressão para dar tais ponderações aos sistemas de explantes individuais. Em tais casos, o computador usará um ajuste polinomial (equação linear, quadrática ou de ordem mais elevada) usando os dados de explantes observados e produzirá um resultado clínico previsto que tem o menor desvio em relação ao resultado clínico observado.

#### **Exemplo 9: Uso de Sistema de Explantes em Múltiplos Cancros Sólidos Para Gerar Previsão da Resposta Clínica**

O ensaio funcional dirigido por "Preditor da Resposta Clínica" permite rastreio rápido de um painel de agentes anticancerígenos. Um painel de agentes anticancerígenos estabelecidos e em investigação (tanto citotóxicos como visados) é selecionado principalmente com base nas suas propriedades de inibição do crescimento tumoral conhecidas. A eficácia *ex vivo* destes fármacos é testada para um painel de explantes derivados de pacientes em ensaio de proliferação (Ki-67) e viabilidade (WST) de 72 horas. A percentagem de inibição é determinada com referência ao controlo não tratado. Os resultados são ilustrados na Figura 11. A inibição acima de 50% é considerada como resposta completa. A inibição abaixo de 50% mas acima de 20% é considerada como resposta parcial. Nos grupos não respondedores, os fármacos que não exibem (0% a 20%)

inibição são considerados como não resposta e similares a doenças estáveis. Os fármacos que mostram aumento na proliferação celular para uma indicação particular são considerados como doenças progressivas. Os resultados obtidos indicam que o "Preditor da Resposta Clínica" mimetiza amostra de xenoenxerto tumoral. Consequentemente é adicionalmente validado usando resultados clínicos.

#### **Exemplo 10:**

Amostras tumorais são recolhidas de pacientes em conjunto com o seu soro conforme protocolos padrão. Os pacientes tiveram avaliação PETCT ou CT antes do início da análise de explantes "Preditor da Resposta Clínica". As amostras recolhidas são processadas para análise de explantes com Preditor da Resposta Clínica.

Pequenos pedaços com cerca de 3 x 3 x 3 mm de fatia tumoral são gerados. As amostras tumorais são divididas em múltiplos pedaços pequenos usando Vibratome da Leica para gerar secções com cerca de 100-300 µm e cultivadas em triplicado em placas de fundo redondo com 96 poços que foram previamente revestidos com ECM específica do cancro como indicado no Exemplo 1. Os tecidos tumorais são mantidos em meios condicionados de cerca de 2 mL (DMEM suplementado com FBS inativado pelo calor a cerca de 2% em conjunto com Penicilina-Estreptomicina, piruvato de sódio a 100 mM, aminoácido não essencial, L-glutamina a 4 mM e HEPES a 10 mM). Os meios de cultura são suplementados com ligantes derivados do soro a cerca de 2% após 12 horas. Os fármacos são opcionalmente adicionados no início da cultura em conjunto com meios ou separadamente. Os meios são mudados aquando da adição de soro. Os meios são também

mudados a cada 24 horas em conjunto com suplementos. Cerca de 5 µL de meios gastos são usados para se determinar a viabilidade de células, proliferação de células, histologia, e morte de células de tecido tumoral. No final do período de cultura variando de cerca de 72 horas, o tecido é avaliado quanto aos parâmetros. Após este período, análise de MTT/WST é realizada para se avaliar a percentagem de viabilidade de células. O sobrenadante da cultura de meios é removido a cada 24 hrs e avaliado quanto à proliferação (usando experiências de utilização de ATP e glucose) e morte de células (por avaliação de ensaios de lactato desidrogenase e medições de caspase-3 e caspase 8) para dar tendências de respostas cinéticas. Os resultados são quantificados contra um controlo não tratado com fármacos. As secções de tecido tanto tratadas com fármaco(s) como não tratadas são também dadas para avaliação de IHC e histológica no final do período de cultura. Os tecidos dados para avaliação histológica são avaliados quanto à apoptose por TUNEL e ensaio de caspase 3 ativada. Igualmente, a proliferação de células é avaliada quanto aos marcadores da proliferação padrão como Ki67 e PCNA.

Todos os resultados pré-clínicos, tais como viabilidade de células, morte de células por apoptose, avaliação histológica e também estado de proliferação, são finalmente integrados para dar uma única pontuação chamada Índice de Sensibilidade (ou pontuação M), ilustrada na Tabela 3 proporcionada em baixo.

Os pacientes inscritos para a presente análise de explantes tiveram também tratamento clínico e foram avaliados quanto à resposta no final de 6-8 meses por PETCT ou CT. O

resultado "Preditor da Resposta Clínica" (pontuação M) é depois comparado com o resultado clínico. Os resultados obtidos são ilustrados na Tabela 3 em baixo.

A Tabela 3 indica o tipo de amostra tumoral obtida dos respetivos pacientes (tendo um dos seguintes tipos de cancro - HNSCC, Glioblastoma, Ca-Ovários, Ca-Mama, Ca-Esófago, CRC, Ca-Pâncreas, Ca-Estômago) e o fármaco ou combinações de fármacos com o que o paciente é tratado, tanto para análise através de "Preditor da Resposta Clínica" como para tratamento clínico.

Como evidente a partir dos resultados obtidos na tabela em baixo, o "Preditor da Resposta Clínica" previu com sucesso o resultado clínico com uma eficácia de cerca de 100% para não respondedores e cerca de 88% para respondedores.

As amostras tumorais do Paciente 1 tendo cancro da Cabeça e Pescoço são tratadas com uma combinação de Cisplatina + 5FU + Docetaxel pelo "Preditor da Resposta Clínica". Os resultados pré-clínicos obtidos por análise de tecidos através de viabilidade de células, avaliação histológica, proliferação de células e morte de células por apoptose são integrados para dar um Índice de Sensibilidade (ou pontuação M) de 8. Uma vez que o Índice de sensibilidade do tratamento pré-clínico no Paciente 1 é  $<20$ ; é previsto que o tratamento tenha fraco resultado clínico quando a mesma combinação de fármacos é administrada ao paciente. Isto é validado a partir dos resultados dos dados de RECIST obtidos para a resposta clínica onde ao paciente é dada uma pontuação de 1, indicando não resposta clínica.

As amostras tumorais do Paciente 3 tendo cancro da Cabeça e Pescoço são tratadas com uma combinação de Carboplatina e Paclitaxel pelo "Preditor da Resposta Clínica". Os resultados pré-clínicos obtidos por análise de tecidos através de viabilidade de células, avaliação histológica, proliferação de células e morte de células por apoptose são integrados para dar um Índice de Sensibilidade (ou pontuação M) de 47. Uma vez que o Índice de sensibilidade do tratamento pré-clínico no Paciente 3 é  $<20$  mas  $<60$ ; é previsto que o tratamento tenha resultado clínico parcial quando a mesma combinação de fármacos é administrada ao paciente. Isto é validado a partir dos resultados dos dados de RECIST obtidos para a resposta clínica onde ao paciente é dada uma pontuação de 2, indicando resposta parcial.

As amostras tumorais do Paciente 38 tendo cancro da Cabeça e Pescoço são tratadas com uma combinação de Cisplatina, 5FU e Docetaxel pelo "Preditor da Resposta Clínica". Os resultados pré-clínicos obtidos por análise de tecidos através de viabilidade de células, avaliação histológica, proliferação de células e morte de células por apoptose são integrados para dar um Índice de Sensibilidade (ou pontuação M) de 90. Uma vez que o Índice de sensibilidade do tratamento pré-clínico no Paciente 38 é  $>60$ ; é previsto que o tratamento tenha resultado clínico completo quando a mesma combinação de fármacos é administrada ao paciente. Isto é validado a partir dos resultados dos dados de RECIST obtidos para a resposta clínica onde ao paciente é dada uma pontuação de 3, indicando resposta clínica completa.

**Tabela 3**

			<b>Preditor da Resposta Clínica</b>	<b>Índice de Sensibi-</b>	<b>Leitura clínica</b>
--	--	--	-------------------------------------	---------------------------	------------------------

ID da Amostra	Tipo de Cancro	Tratamento	Viabilidade	Histologia	Proliferação	Apoptose	Idade	RECIST
1	HNSCC	Cisplatina + 5FU + Docetaxel	5	20	-100	120	8	1
2	Glioblastoma	Temozolomida	27	42	20	100	49	2
3	HNSCC	Carboplatina + Paclitaxel	32	50	10	100	47	2
4	Ca-Ovários		58	60	53	154	88	3
5	Ca-Mama	Capecitabina + Lapatinib	22	-20	-125	150	16	1
6	Ca-Esófago	5FU + Leucovorina	25	50	50	70	48	2
7	HNSCC	Cetuximab	21	47	55	80	52	2
8	Ca-Mama		48	72	43	120	70	3
9	Ca-Esófago		9	-68	-80	100	10	1
10	CRC	Irinotecano + 5FU	24	38	27	120	57	2
11	Ca-Pâncreas	Gemcitabina + Cisplatina	19	43	55	80	51	2
12	Ca-Pâncreas	Gemcitabina + Erlotinib	27	62	20	75	41	2
13	Ca-Esófago	5FU + Leucovorina	16	55	20	68	35	2
14	HNSCC	Carboplatina + Paclitaxel	32	42	35	70	46	2
15	Ca-Esófago	Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina	35	33	60	65	53	2
16	Ca-Pâncreas	Gemcitabina + Cisplatina	27	28	28	72	42	2
17	CRC	Cetuximab	29	36	25	80	45	2
18	Ca-Mama	Vinorelbina	23	50	75	75	58	2
19	Ca-Pâncreas	Gemcitabina + Cisplatina	19	-48	-50	100	35	1
20	Ca-Pâncreas	5FU + Leucovorina	22	44	62	50	67	2

ID da Amostra	Tipo de Cancro	Tratamento	Preditor da Resposta Clínica				Índice de Sensibilidade	Leitura clínica RECIST
			Viabilidade	Histologia	Proliferação	Apoptose		
21	Ca-Pâncreas	Gemcitabina + Erlotinib	27	51	25	65	59	2
22	Ca-Esófago	Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina	25	-35	-70	100	28	1
23	Ca-Mama	Herceptina	35	34	42	25	51	2
24	Ca-Ovários	Bleomicina + Cisplatina + Etoposídeo	20	19	35	55	55	2
25	Ca-Mama	Cisplatina + 5FU + Docetaxel	5	-22	-18	25	6	1
26	HNSCC	Cetuximab	27	-46	-35	42	17	1
27	HNSCC	Carboplatina + Paclitaxel	8	-58	-10	50	24	1
28	CRC	Irinotecano + 5FU	35	50	36	50	61	2
29	Ca-Ovários	Carboplatina + Paclitaxel	18	-62	36	18	36	1
30	Ca-Estômago	Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina	36	48	58	30	62	2
31	HNSCC	Cisplatina + 5FU + Docetaxel	29	14	20	55	52	2
32	HNSCC	Carboplatina + Paclitaxel	32	34	16	20	34	2
33	Ca-Estômago	5FU + Leucovorina	44	28	35	30	55	2
34	Ca-Mama	Ciclofosfamida + Doxorubicina + Paclitaxel	24	12	-20	50	27	1

ID da Amostra	Tipo de Cancro	Tratamento	Preditor da Resposta Clínica				Índice de Sensibilidade	Leitura clínica RECIST
			Viabilidade	Histologia	Proliferação	Apoptose		
35	Ca-Esófago	5FU + Leucovorina	52	44	0	20	36	2
36	Ca- Estômago	Cisplatina + 5FU + Docetaxel	29	10	22	42	47	2
37	HNSCC	Carboplatina + Paclitaxel	21	9	46	0	34	2
38	HNSCC	Cisplatina + 5FU + Docetaxel	66	55	40	74	90	3
39	Ca-Ovários	Carboplatina + Paclitaxel	41	12	-10	20	26	1
40	Ca- Estômago	Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina	11	17	27	54	46	2
41	HNSCC	Cetuximab	15	22	33	35	42	2
42	Ca-Esófago	Cisplatina + 5FU + Docetaxel	7	-16	-15	30	11	1
43	Ca-Esófago	Cisplatina + 5FU + Docetaxel	15	15	28	36	40	2
44	Ca-Mama	Ciclofosfami da + Doxorrubicin a + Paclitaxel	62	50	64	70	98	3
45	Ca-Esófago	Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina	36	41	43	24	44	2
46	CRC	Irinotecano + 5FU	24	52	36	45	53	2

**Exemplo 11: "Preditor da Resposta Clínica" É um Melhor Preditor da Resposta do que Biomarcadores**

Como mencionado acima, embora biomarcadores sejam usados na técnica anterior como ferramenta de previsão, existem muitos constrangimentos associados aos mesmos. Estes constrangimentos são ultrapassados pelas ferramentas e métodos da presente divulgação. "Preditor da Resposta Clínica" não está limitado aos fármacos ou à doença que foram usados para a validação inicial. "Preditor da Resposta Clínica" é uma tecnologia de plataforma. Por exemplo, logo que "Preditor da Resposta Clínica" tenha sido desenvolvido para um modelo de Cancro colorretal para um fármaco particular, digamos 5-FU, e tenha sido mostrado que este modelo é útil na previsão da eficácia de 5-FU, o modelo é transponível para outros fármacos. Isto é porque os constrangimentos de entrada para "Preditor da Resposta Clínica" estão ligados ao paciente sob consideração (ou ao tumor derivado do paciente) e não ao fármaco.

Outra grande diferença é a diferença entre biomarcadores "condutores" e "passageiros". Para muitos fármacos visados, os pacientes são segregados com base em se têm um biomarcador particular ou não. No entanto, a presença de um dado biomarcador não verifica se os pacientes responderão ou não ao fármaco. Isto é devido à natureza heterogénea do cancro onde múltiplos fatores são responsáveis pela afetação da eficácia dos fármacos. Em contraste, porque o "Preditor da Resposta Clínica" é uma abordagem não enviesada e considera o tecido tumoral como um todo na decisão de se o paciente responderá ao fármaco, este é mais relevante na determinação do resultado clínico real.

Embora estejam disponíveis biomarcadores (gene/proteína que é diferencialmente expresso em respondedores vs. não

respondedores a um fármaco particular) para uma mão-cheia de fármacos tais como Herceptina (biomarcador de Her2), não estão disponíveis para uma ampla variedade de outros fármacos. Onde disponíveis têm baixa correlação com resultado clínico. P.ex.: KRAS, o biomarcador aprovado para Erbitux no Cancro colorretal, tem um poder preditor na gama de 10-30%. Este aspeto de biomarcadores foi ilustrado na Tabela 13.

**Tabela 13: Todos os não respondedores são marcados como NR e os respondedores são marcados como R.**

# de ID do Paciente	Resposta Clínica	Resposta "Preditor da Resposta Clínica"	Pontuação M	KRAS	BRAF	PIK3CA	AREG	EREG
1	R	R	62	WT	WT	WT	Baixo	Elevado
2	NR	NR	18	Mut	WT	WT	Elevado	Elevado
3	NR	NR	14	WT	Mut	WT	Baixo	Baixo
4	NR	NR	2	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
5	NR	NR	5	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
6	NR	NR	19	WT	WT	Mut	Baixo	Baixo
7	NR	NR	22	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
8	NR	NR	11	Mut	WT	WT	Baixo	Baixo
9	NR	NR	18	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
10	NR	NR	19	WT	WT	Mut	Baixo	Baixo
11	NR	NR	4	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
12	NR	NR	1	Mut	WT	WT	Baixo	Baixo
13	R	R	72	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
14	R	R	54	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
15	NR	NR	12	WT	Mut	WT	Baixo	Baixo
16	NR	NR	21	Mut	WT	WT	Elevado	Elevado
17	NR	NR	16	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
18	NR	NR	25	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
19	NR	NR	20	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
20	R	R	67	WT	WT	WT	Elevado	Elevado

# de ID do Paciente	Resposta Clínica	Resposta "Preditor da Resposta Clínica"	Pontuação M	KRAS	BRAF	PIK3CA	AREG	EREG
21	NR	NR	11	Mut	WT	WT	Baixo	Baixo
22	NR	NR	3	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
23	NR	NR	20	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
24	R	R	66	WT	WT	WT	Elevado	Baixo
25	NR	NR	12	Mut	WT	WT	Elevado	Elevado
26	NR	NR	3	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
27	NR	NR	9	WT	WT	WT	Elevado	Baixo
28	NR	NR	17	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
29	NR	NR	11	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
30	NR	NR	6	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
31	R	R	52	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
32	R	R	41	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
33	R	R	54	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
34	NR	NR	4	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
35	NR	NR	13	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
36	NR	NR	24	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
37	NR	NR	12	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
38	R	R	56	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
39	NR	NR	8	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
40	R	R	63	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
41	R	R	52	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
42	R	R	74	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
43	NR	NR	2	WT	WT	WT	Baixo	Elevado
44	NR	NR	9	WT	WT	WT	Baixo	Elevado
45	NR	NR	17	WT	WT	WT	Elevado	Baixo
46	NR	NR	14	WT	WT	WT	Elevado	Baixo
47	NR	NR	11	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
48	NR	NR	9	WT	WT	WT	Baixo	Baixo
49	R	R	53	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
50	R	R	68	WT	WT	WT	Elevado	Elevado
51	NR	NR	14	WT	WT	WT	Baixo	Elevado

# de ID do Paciente	Resposta Clínica	Resposta "Preditor da Resposta Clínica"	Pontuação M	KRAS	BRAF	PIK3CA	AREG	EREG
52	NR	NR	15	WT	WT	WT	Baixo	Baixo

As amostras testadas quanto à resposta a Cetuximab na tabela acima são amostras de cancro do cólon de estágio III/IV. A maioria das amostras testadas que é NR tinha mutações em genes-chave que afetam a resposta a Cetuximab, tais como KRAS, BRAF e PIK3CA. Os ligantes de EGFR Anfirregulina e Epirregulina estão também implicados nesta via. Foi mostrado que a baixa expressão destes ligantes era a causa de NR e acredita-se que afeta a resposta a Cetuximab. No entanto, ao contrário dos resultados esperados, existe um subconjunto de amostras que são NR na ausência destes biomarcadores. Além do mais foi descoberto que alguns pacientes *viz.* pacientes números 2, 7, 13, 20, 23, 25, 26, 28, 31-42, 49, e 50 eram NR embora tenha sido descoberto que a expressão de ambos os ligantes Anfirregulina e Epirregulina era elevada. No entanto, o resultado da análise de explantes "Preditor da Resposta Clínica" corresponde ao resultado clínico sem ter sido impactado pela expressão de biomarcadores e ligantes de EGFR.

Assim é necessário diferenciar entre um biomarcador "Condutor" e "Passageiro" pois a presença de um biomarcador não é frequentemente um fator decisivo na decisão de se um fármaco responderia ou não num paciente particular. Igualmente, os biomarcadores estão frequentemente ligados a um fármaco particular e um tipo de cancro particular. Em contraste, o presente modelo "Preditor da Resposta Clínica"

proporciona leitura funcional específica do paciente particular.

**Exemplo 12: "Preditor da Resposta Clínica" É um Melhor Preditor da Resposta Do Que Linhas de Células**

A deficiência fundamental com os testes *in vitro* de linhas de células e modelos de xenoenxertos à base de linhas de células é que o cancro é uma doença heterogénea enquanto as linhas de células são homogéneas por definição. Pensa-se que estes modelos sobressimplificam o problema.

O uso pelos Preditores da Resposta Clínica de soro/plasma/PBMCs/ligantes derivados do soro, uso de matriz extracelular individualizada em relação ao tipo de tumor e matriz extracelular não perturbada do tecido tumoral autólogo asseguram que fatores de ligação parácrinos apropriados estão em lugar para as células tumorais permanecerem viáveis; isto por seu turno permite o estudo de vias de sinalização envolvidas na iniciação, manutenção, progressão e supressão tumorais, e ultrapassa os defeitos associados aos sistemas de segregação de pacientes baseados em linhas de células disponíveis na técnica anterior.

Este aspeto foi elaborado adicionalmente na Tabela 14 a baixo:

**Tabela 14: Resposta a Cetuximab em linhas de células, onde Y indica resposta a Cetuximab, N indica não resposta a Cetuximab e ND indica que a resposta a Cetuximab não está indicada.**

No de S.	Linha de células	K-Ras	B-Raf	PIK3Ca	Resposta a Cetuximab
----------	------------------	-------	-------	--------	----------------------

No de S.	Linha de células	K-Ras	B-Raf	PIK3Ca	Resposta a Cetuximab
1	CaC02	WT	WT		Y
2	HT29	WT	MUT	MUT "P449T"	N
3	COLO-205	WT	MUT		N
4	SW480	MUT "C12"	WT		N
5	SW620	MUT "C12"	WT	WT	N
6	HCT116	MUT "C13"	WT	MUT "H1047R"	N
7	LoVo	MUT "C13"	WT	WT	N
8	LS1034	MUT "C146"	WT		N
9	LIM1215	WT	WT	WT	Y
10	GEO	MUT "C12"	WT	WT	Y
11	SW403	MUT "C12"	WT	WT	Y
12	SW837	MUT "C12"	WT	WT	Y
13	SW1463	MUT "C12"	WT	WT	ND
14	Gp5d	MUT "C12"	WT	MUT	N
15	Co94	MUT	WT		ND
16	HCA46	WT	WT		ND
17	COLO-741	WT	MUT	WT	ND
18	LS-174T	MUT "C12"	WT	MUT "H1047R"	Y
19	SNG-M	MUT "C12"	WT	MUT "R88Q"	ND
20	NCI-H1975	WT	WT	MUT "G118D"	Y
21	SW948	MUT "C12"	WT	MUT	Y
22	SKCO1	MUT	WT	WT	Y
23	HCT8	MUT	WT		Y
24	COLO-201	WT	MUT		ND
25	COLO-320HSR	WT	WT	WT	ND
26	KM12	WT	WT	WT	Y
27	HCA7	WT	WT		Y
28	HT-55	WT	MUT		ND
29	WIDr	WT	MUT		Y
30	COLO-201	WT	MUT		ND
31	SW48	WT	WT	WT	N
32	SW1417	WT	MUT	WT	ND
33	N87	WT	WT	WT	N

No de S.	Linha de células	K-Ras	B-Raf	PIK3Ca	Resposta a Cetuximab
34	HCC70	WT	WT	WT	N
35	COLO-201	WT	MUT		N

Como ilustrado na Tabela 14 acima, as linhas de células representam um modelo muito homogêneo e como tal têm utilidade limitada para o desenvolvimento de fármacos. Mais do que 80% das linhas de células que são Tipo Selvagem (WT) quanto a K-RAS e B-RAF e PIK3Ca elicitam respostas a cetuximab. No entanto, clinicamente, somente 10-30% dos pacientes respondem a cetuximab. Esta não correspondência é devido à ausência de relevância clínica do modelo de linhas de células. É mostrado que o modelo "Preditor da Resposta Clínica" é uma ferramenta pré-clínica clinicamente relevante no Exemplo 11 (Tabela 13). Usando uma abordagem de biologia de sistemas, esta plataforma captura a heterogeneidade inerente da doença para servir como um melhor preditor do resultado clínico para permitir desenvolvimento racional de fármacos.

Vantagens de "Preditor da Resposta Clínica" no que diz respeito a outra tecnologia conhecida na técnica:

- Os modelos de camundongos geneticamente manipulados usados na técnica anterior são bons modelos mas seriam úteis somente quando as vias mediadas pelos fármacos são conhecidas. Igualmente, numa variedade de cancros, e para uma variedade de fármacos, múltiplas vias estão envolvidas. Esta é uma grande deficiência dos modelos de camundongos geneticamente manipulados. A presente invenção usa tecidos sólidos frescos derivados do paciente. Adicionalmente, a comunicação célula-célula não é perturbada pela presente invenção pois o tecido é

processado para os ensaios. O microambiente local é também mantido no caso de ensaios de explantes.

➤ MammaPrint (da Agendia) e Oncotype-Dx (da Genomic Health) são testes que são usados para classificar os pacientes em elevado risco ou baixo risco com base no perfil genético. MammaPrint usa perfil da expressão de *microarray* de genes selecionados enquanto Oncotype-Dx usa análise por RT-PCR de genes selecionados. Nenhum destes testes é personalizado em relação ao paciente nem diz que combinação de fármacos específica é mais bem adequada para o dado paciente. Em contraste, "Preditor da Resposta Clínica" é um teste funcional que usa o próprio tumor do paciente e o próprio microambiente tumoral do paciente para decidir qual é a combinação de fármacos ótima para esse paciente específico.

➤ No que diz respeito ao teste de quimiossensibilidade, a presente divulgação é capaz de ultrapassar as deficiências associadas ao referido teste por meio do seguinte: Em primeiro lugar, a presente invenção identificou que certos fatores parácrinos são essenciais para assegurar que a sinalização funcional é mantida nos tecidos tumorais. Em segundo lugar, a presente invenção descobriu adicionalmente que existe uma diferença na correlação clínica de tais fatores parácrinos são derivados de soro autólogo do que o soro heterólogo. Em terceiro lugar, adicionalmente a isto, é importante revestir as placas de células com matriz extracelular que tenha sido derivada do mesmo subtipo de cancro. Em quarto lugar é importante manter o tecido num tamanho particular (cerca de 100  $\mu\text{m}$  - 300  $\mu\text{m}$ ) para assegurar que a quantidade correta de difusão pelo tecido tenha lugar. Tomados em conjunto, a combinação destes fatores resulta

em "Preditor da Resposta Clínica" sendo um refletor confiável do resultado clínico.

**Exemplo 13: "Preditor da Resposta Clínica" Para Prever a Resposta Clínica**

É levado a cabo estudo clínico em pacientes tendo diferentes tipos de tumor para se estudar a resposta a fármacos para o cancro específicos ou suas combinações. Os mesmos fármacos e suas combinações são usados na análise "Preditor da Resposta Clínica" da presente invenção. Os resultados obtidos (Pontuação M baseada na inibição das vias) estão correlacionados com a resposta clínica do paciente a um fármaco ou combinação de fármacos, com base em estudos feitos num ambiente tumoral personalizado para o paciente específico.

**Exemplo 13.1:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente masculino com 67 anos de idade com Cancro da Cabeça e Pescoço, sendo o local tumoral Sino piriforme direito. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de cirurgia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T3N0M0 e o tipo da amostra foi categorizado como primário.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas

em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 1	Cisplatina	66
R <sub>x</sub> 3	Cisplatina + 5-Fluorouracil	37
R <sub>x</sub> 4	Cisplatina + Docetaxel + 5-Fluorouracil	61

Tabela B: Não Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 2	Carboplatina + Paclitaxel	23
R <sub>x</sub> 5	Cetuximab	19

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(A), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) Cisplatina
- 2) Cisplatina + Docetaxel + 5-Fluorouracil
- 3) Cisplatina + 5-Fluorouracil.

### **Exemplo 13.2:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente masculino com 55 anos de idade com Cancro da Cabeça e Pescoço, sendo o local tumoral Sino

piriforme direito. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de cirurgia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T3/4N2cM0 e o tipo da amostra foi categorizado como linfonodo metastático.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Responder

<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 1 Cisplatina	39
R <sub>x</sub> 2 Carboplatina + Paclitaxel	74
R <sub>x</sub> 4 Cisplatina + Docetaxel + 5-Fluorouracil	63

Tabela B: Não Responder

<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 3 Cisplatina + 5-Fluorouracil	21
R <sub>x</sub> 5 Cetuximab	14

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(B), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção

terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) Carboplatina + Paclitaxel
- 2) Cisplatina + Docetaxel + 5-Fluorouracil
- 3) Cisplatina

### **Exemplo 13.3:**

A presente Análise “Preditor da Resposta Clínica” foi testada num paciente masculino com 40 anos de idade com Cancro do Cólon, sendo o local tumoral cólon retossigmoide. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de cirurgia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como Estágio IV e o tipo da amostra foi categorizado como metastização.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como “Visão global do presente método”. Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Responderdor

Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 1 Oxaliplatina + 5-Fluorouracil + Leucovorina	64
R <sub>x</sub> 3 Irinotecano + 5-Fluorouracil + Leucovorina	32

Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 7 Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina	51

Tabela B: Não Responder

Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 2 5-Fluorouracil + Leucovorina	28
R <sub>x</sub> 4 Irinotecano + 5-Fluorouracil + Leucovorina + Bevacizumab	21
R <sub>x</sub> 5 Irinotecano + Cetuximab	12
R <sub>x</sub> 6 Panitumumab	19

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(C), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) Oxaliplatina + 5-Fluorouracil + Leucovorina
- 2) Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina
- 3) Irinotecano + 5-Fluorouracil + Leucovorina

#### **Exemplo 13.4:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente masculino com 56 anos de idade com Cancro do Cólon, sendo o local tumoral massa perínea (Ca-Reto). A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T3N0M0 e o tipo da amostra foi categorizado como Recc.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Responder

<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 1 Oxaliplatina + 5-Fluorouracil + Leucovorina	46
R <sub>x</sub> 3 Irinotecano + 5-Fluorouracil + Leucovorina	61
R <sub>x</sub> 4 Irinotecano + 5-Fluorouracil + Bevacizumab	39

Tabela B: Não Responder

<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 2 5-Fluorouracil + Leucovorina	14
R <sub>x</sub> 5 Irinotecano + Cetuximab	21
R <sub>x</sub> 6 Panitumumab	27
R <sub>x</sub> 7 Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina	18

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(D), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) Irinotecano + 5-Fluorouracil + Leucovorina
- 2) Oxaliplatina + 5-Fluorouracil + Leucovorina

3) Irinotecano + 5-Fluorouracil + Leucovorina + Bevacizumab

### Exemplo 13.5:

A presente Análise “Preditor da Resposta Clínica” foi testada num paciente masculino com 49 anos de idade com Cancro do Estômago, sendo o local tumoral píloro do estômago. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral era desconhecido e o tipo da amostra foi categorizado como recc com linfonodos metastáticos.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como “Visão global do presente método”. Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Responderdor

	Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 1	Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina	47
R <sub>x</sub> 3	Imatinib	66

Tabela B: Não Responderdor

	Fármacos Testados	Pontuação M
--	-------------------	-------------

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 2	Herceptina	14
R <sub>x</sub> 4	Sunitinib	25

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(E), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) Imatinib
- 2) Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina

#### **Exemplo 13.6:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente feminino com 68 anos de idade com Cancro do Estômago, sendo o local tumoral estômago. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral era desconhecido e o tipo da amostra foi categorizado como recc.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi

observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Respondedor

	Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 1	Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina	56

Tabela B: Não Respondedor

	Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 2	Herceptina	15
R <sub>x</sub> 3	Imatinib	24
R <sub>x</sub> 4	Sunitinib	09

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(F), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações é a seguinte:

- 1) Epirrubicina + Cisplatina + Capecitabina

### **Exemplo 13.7:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente feminino com 45 anos de idade com Cancro Pancreático, sendo o local tumoral fígado. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral era desconhecido e o tipo da amostra foi categorizado como metastização.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos

baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 1	Cisplatina + Gemcitabina	37
R <sub>x</sub> 3	5-Fluorouracil + Leucovorina	54

Tabela B: Não Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 2	Erlotinib	21

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(G), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

**Exemplo 13.8:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente masculino com 50 anos de idade com Cancro Pancreático, sendo o local tumoral pâncreas. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de cirurgia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T2N0M0 e o tipo da amostra foi categorizado como primário.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Responder

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 1	Cisplatina + Gemcitabina	72

Tabela B: Não Responder

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 2	Erlotinib	14
R <sub>x</sub> 3	5-FU + Leucovorina	23

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(H), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

### **Exemplo 13.9:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente feminino com 40 anos de idade com Cancro dos Ovários, sendo o local tumoral ovário. A amostra

tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral era desconhecido e o tipo da amostra foi categorizado como metastização.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 1	Bleomicina + Etoposídeo + Cisplatina	76
R <sub>x</sub> 2	Trabectedina + PLD Doxorubicina	36
R <sub>x</sub> 4	Carboplatina + Gemcitabina	73

Tabela B: Não Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 3	Docetaxel	26
R <sub>x</sub> 5	Doxorubicina (PLD) + Carboplatina	19
R <sub>x</sub> 6	Carboplatina + Paclitaxel	25

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(I), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) Bleomicina + Etoposídeo + Cisplatina

- 2) Carboplatina + Gemcitabina
- 3) Trabectedina + PLD Doxorubicina

**Exemplo 13.10:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente feminino com 56 anos de idade com Cancro dos Ovários, sendo o local tumoral ovário. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de cirurgia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral era desconhecido e o tipo da amostra foi categorizado como primário.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Responder

Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 1 Bleomicina + Etoposídeo + Cisplatina	53
R <sub>x</sub> 2 Trabectedina + PLD Doxorubicina	64
R <sub>x</sub> 6 Carboplatina + Paclitaxel	33

Tabela B: Não Responder

	Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 3	Docetaxel	19
R <sub>x</sub> 4	Carboplatina + Gemcitabina	12
R <sub>x</sub> 5	Doxorrubicina (PLD) + Carboplatina	15

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(J), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) Trabectedina + PLD Doxorrubicina
- 2) Bleomicina + Etoposídeo + Cisplatina
- 3) Carboplatina + Gemcitabina

#### **Exemplo 13.11:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente feminino com 49 anos de idade com Cancro da Mama, sendo o local tumoral Linfonodo regional (R) Mama. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T3N1M0 e o tipo da amostra foi categorizado como metastização e recc.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a

fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 2	Ciclofosfamida + Doxorrubicina + 5-Fluorouracil	52
R <sub>x</sub> 5	Docetaxel + Capecitabina	39
R <sub>x</sub> 10	Gemcitabina + Paclitaxel	48

Tabela B: Não Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 1	Anastrozol	20
R <sub>x</sub> 3	Capecitabina	26
R <sub>x</sub> 4	Docetaxel	26
R <sub>x</sub> 6	Doxorrubicina	17
R <sub>x</sub> 7	Doxorrubicina + Ciclofosfamida	15
R <sub>x</sub> 8	Enantato	08
R <sub>x</sub> 9	Gemcitabina	21
R <sub>x</sub> 11	Paclitaxel	11
R <sub>x</sub> 12	Vinorelbina	19

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(K), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) Ciclofosfamida + Doxorrubicina + 5-Fluorouracil
- 2) Gemcitabina + Paclitaxel
- 3) Docetaxel + Capecitabina

**Exemplo 13.12:**

A presente Análise “Preditor da Resposta Clínica” foi testada num paciente feminino com 51 anos de idade com Cancro da Mama, sendo o local tumoral mama. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral era indeterminado e o tipo da amostra foi categorizado como primário.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como “Visão global do presente método”. Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Respondedor

Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 3 Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Docetaxel	43
R <sub>x</sub> 6 Filgrastim + Ciclofosfamida + Doxorrubicina + 5-Fluorouracil	77
R <sub>x</sub> 7 Filgrastim + Ciclofosfamida + Epirubicina + 5-Fluorouracil	42
R <sub>x</sub> 8 Gemcitabina + Docetaxel	62

Tabela B: Não Respondedor

Fármacos Testados	Pontuação M
-------------------	-------------

Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 1 Cisplatina + Gemcitabina	17
R <sub>x</sub> 2 Ciclofosfamida + Paclitaxel	23
R <sub>x</sub> 4 Docetaxel + Ciclofosfamida	22
R <sub>x</sub> 5 Docetaxel + Ciclofosfamida + Epirrubicina + 5-Fluorouracil	19

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(L), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) Filgrastim + Ciclofosfamida + Doxorubicina + 5-Fluorouracil
- 2) Gemcitabina + Docetaxel
- 3) Ciclofosfamida + Doxorubicina + Docetaxel
- 4) Filgrastim + Ciclofosfamida + Epirrubicina + 5-Fluorouracil

### **Exemplo 13.13:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente masculino com 50 anos de idade com Cancro do Fígado, sendo o local tumoral fígado. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de cirurgia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T3NxM1 e o tipo da amostra foi categorizado como metastização.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos

baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada.

Tabela A: Não Responder

Fármacos Testados		Pontuação M
R <sub>x</sub> 1	Sorafenib	16

Com base na Pontuação M obtida da tabela acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(M), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere Sorafenib não é uma porção terapêutica ótima para o presente paciente. Testes adicionais necessitam de ser levados a cabo usando outros agentes anticancerígenos para ver se qualquer uma das outras SOCs pode ser usada neste paciente.

#### **Exemplo 13.14:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente masculino com 56 anos de idade com Cancro do Fígado, sendo o local tumoral fígado. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de cirurgia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T4N0M0 e o tipo da amostra foi categorizado como primário.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a

fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. A tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada.

Tabela A: Responder

Fármacos Testados		Pontuação M
R <sub>2</sub> 1	Sorafenib	46

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(N), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que Sorafenib é uma opção terapêutica ótima para o tratamento do paciente.

**Exemplo 13.15:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente masculino com 56 anos de idade com Cancro do Colorreto, sendo o local tumoral massa perínea. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> e o tipo da amostra foi categorizado como recorrente.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Responder

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 1	Oxaliplatina + 5-FU + Leucovorina	75
R <sub>x</sub> 2	Irinotecano + 5-FU + Leucovorina	72
R <sub>x</sub> 3	Oxaliplatina + 5-FU	35

Tabela B: Não Responder

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 4	Capecitabina + Erbitux	24
R <sub>x</sub> 5	Avastina	20

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(0), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) R<sub>x</sub>1 - Oxaliplatina + 5-FU + Leucovorina
- 2) R<sub>x</sub>2 - Irinotecano + 5-FU + Leucovorina
- 3) R<sub>x</sub>3 - Oxaliplatina + 5-FU
- 4) R<sub>x</sub>4 - Capecitabina + Erbitux
- 5) R<sub>x</sub>5 - Avastina

### **Exemplo 13.16:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente masculino com 59 anos de idade tendo Cancro do Colorreto com pulmão metastático (mets), sendo o local tumoral retossigmoide. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado

como T<sub>4</sub>N<sub>2</sub>M<sub>x</sub> e o tipo da amostra foi categorizado como metastático.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Respondedor

Fármacos Testados		Pontuação M
R <sub>x</sub> 1	Oxaliplatina + Irinotecano	73
R <sub>x</sub> 3	5-FU + Leucovorina	29

Tabela B: Não Respondedor

Fármacos Testados		Pontuação M
R <sub>x</sub> 2	Erbitux + Capecitabina	22
R <sub>x</sub> 4	Irinotecano + Erbitux	24

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(P), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) R<sub>x</sub>1 - Oxaliplatina + Irinotecano
- 2) R<sub>x</sub>2 - Erbitux + Capecitabina

- 3) R<sub>x3</sub> - 5-FU + Leucovorina
- 4) R<sub>x4</sub> - Irinotecano + Erbitux

**Exemplo 13.17:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente feminino com 45 anos de idade tendo Cancro Pancreático com fígado mets, sendo o local tumoral pâncreas. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T<sub>3</sub>N<sub>2</sub>M<sub>1</sub> e o tipo da amostra foi categorizado como metastático.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Responder

Fármacos Testados		Pontuação M
R <sub>x3</sub>	Abraxano	50
R <sub>x4</sub>	Erlotinib + Gemcitabina	68

Tabela B: Não Responder

Fármacos Testados		Pontuação M
R <sub>x1</sub>	Cisplatina + Gemcitabina	23
R <sub>x2</sub>	Oxaliplatina + 5-FU	23
R <sub>x5</sub>	5-FU + Leucovorina	20

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(Q), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) R<sub>x</sub>1 - Cisplatina + Gemcitabina
- 2) R<sub>x</sub>2 - Oxaliplatina + 5-FU
- 3) R<sub>x</sub>3 - Abraxano
- 4) R<sub>x</sub>4 - Erlotinib + Gemcitabina
- 5) R<sub>x</sub>5 - 5-FU + Leucovorina

**Exemplo 13.18:**

A presente Análise "Preditor da Resposta Clínica" foi testada num paciente feminino com 49 anos de idade tendo Cancro da Mama com mets, sendo o local tumoral Linfonodo regional (Rt Br). A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como T<sub>3</sub>N<sub>1</sub>M<sub>1</sub> e o tipo da amostra foi categorizado como recorrente.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como "Visão global do presente método". Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela

A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 1	Ciclofosfamida + Metotrexato + 5-FU	77
R <sub>x</sub> 3	Doxorrubicina + Ciclofosfamida + 5-FU	68
R <sub>x</sub> 4	Doxorrubicina + Ciclofosfamida + Paclitaxel	70
R <sub>x</sub> 7	Doxorrubicina + Ciclofosfamida	29
R <sub>x</sub> 8	Doxorrubicina + Capecitabina	32

Tabela B: Não Respondedor

	<b>Fármacos Testados</b>	<b>Pontuação M</b>
R <sub>x</sub> 2	Abraxano	20
R <sub>x</sub> 5	Avastina	18
R <sub>x</sub> 6	Capecitabina + Lapatinib	20

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(R), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) R<sub>x</sub>1 - Ciclofosfamida + Metotrexato + 5-FU
- 2) R<sub>x</sub>2 - Abraxano
- 3) R<sub>x</sub>3 - Doxorrubicina + Ciclofosfamida + 5-FU
- 4) R<sub>x</sub>4 - Doxorrubicina + Ciclofosfamida + Paclitaxel
- 5) R<sub>x</sub>5 - Avastina
- 6) R<sub>x</sub>6 - Capecitabina + Lapatinib
- 7) R<sub>x</sub>7 - Doxorrubicina + Ciclofosfamida
- 8) R<sub>x</sub>8 - Docetaxel + Capecitabina

**Exemplo 13.19:**

A presente Análise “Preditor da Resposta Clínica” foi testada num paciente feminino com 40 anos de idade tendo Cancro da Mama com Metastização de Linfonodos Subclávio (SCLN mets), sendo o local tumoral linfonodo supraclavicular. A amostra tumoral foi obtida com o consentimento do paciente através de biópsia. O tumor obtido foi analisado, o estágio tumoral foi determinado como  $T_xN_xM_z$  e o tipo da amostra foi categorizado como metastático.

A amostra tumoral foi obtida e sujeita ao método da presente invenção capturado acima como “Visão global do presente método”. Subsequentemente, os dados obtidos baseados na resposta do tumor no que diz respeito a fármacos específicos são obtidos e apresentados nas tabelas em baixo. As tabelas em baixo representam a resposta do paciente na direção dos fármacos testados, tal que a tabela A ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta foi observada e a tabela B ilustra os fármacos na direção dos quais a resposta não foi observada.

Tabela A: Responder

Fármacos Testados		Pontuação M
R <sub>x</sub> 1	Capecitabina + Lapatinib	68
R <sub>x</sub> 2	Gemcitabina + Erlotinib	48

Tabela B: Não Responder

Fármacos Testados		Pontuação M
R <sub>x</sub> 3	Herceptina	15
R <sub>x</sub> 4	Metotrexato + Ciclofosfamida	19
R <sub>x</sub> 5	Avastina	14

Fármacos Testados	Pontuação M
R <sub>x</sub> 6 5-FU + Carboplatina	17

Com base na Pontuação M obtida das tabelas acima e nos dados de eficácia ilustrados na Figura 13(S), a análise "Preditor da Resposta Clínica" sugere que a opção terapêutica mais ótima para o paciente está na administração dos fármacos/suas combinações na seguinte ordem:

- 1) R<sub>x</sub>1 - Capecitabina + Lapatinib
- 2) R<sub>x</sub>2 - Gemcitabina + Erlotinb
- 3) R<sub>x</sub>3 - Herceptina
- 4) R<sub>x</sub>4 - Metotrexato + Ciclofosfamida
- 5) R<sub>x</sub>5 - Avastina
- 6) R<sub>x</sub>6 - 5-FU + Carboplatina

#### **Exemplo 14: "Preditor da Resposta Clínica" para Testar a Eficácia de Fármacos**

Amostra tumoral de H&N primária de pacientes inscritos nos ensaios clínicos programados para receberem Cisplatina, Paclitaxel e 5-FU é sujeita à análise "Preditor da Resposta Clínica". A amostra tumoral é recolhida por biópsia por punção. O estágio tumoral da amostra recolhida é Estágio clínico II/III. Avaliação de explantes "Preditor da Resposta Clínica" é levada a cabo para prever o resultado clínico como explicado no Exemplo 5. Os Ensaio conduzidos para se chegar à pontuação M são WST, KI e TUNEL. Independentemente, imagiologia por PET-CT é levada a cabo antes do ou após o tratamento para se avaliar o resultado clínico conforme os critérios de PERCIST e o paciente é

sujeito a ensaios clínicos. A previsão "Preditor da Resposta Clínica" é comparada com o resultado clínico para se avaliar o poder preditor do "Preditor da Resposta Clínica" (Figura 12).

Cerca de 112 pacientes com tumor H&N são inscritos neste estudo como ilustrado na tabela 15 capturada em baixo, em que o "Preditor da Resposta Clínica" é usado para se determinar o índice de sensibilidade e correlacionar o mesmo com o resultado clínico.

**Tabela 15**

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
1	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	18	25	10	10	16	Doença Progressiva
2	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	22	12	5	20	15	Doença Progressiva
3	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	82	82	25	75	66	Resposta Completa

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
4	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	42	50	15	65	43	Resposta Parcial
5	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	31	10	5	7	13	Doença Progressiva
6	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	21	6	9	25	15	Doença Progressiva
7	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	52	66	75	66	65	Resposta Completa
8	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	55	34	42	68	50	Resposta Parcial
9	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	87	70	54	92	76	Resposta Completa
10	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	65	35	15	45	40	Resposta Parcial
11	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	62	76	64	20	56	Resposta Parcial
12	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	8	42	10	35	24	Doença Progressiva
13	Cisplatina + Docetaxel	24	15	18	65	31	Resposta Parcial

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
	+ 5FU						
14	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	59	85	25	90	65	Resposta Completa
15	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	31	54	15	48	37	Resposta Parcial
16	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	56	55	63	70	61	Resposta Completa
17	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	12	8	9	12	10	Doença Progressiva
18	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	82	100	53	76	78	Resposta Completa
19	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	11	83	11	67	43	Resposta Parcial
20	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	23	14	22	64	31	Resposta Parcial
21	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	47	74	28	57	52	Resposta Parcial
22	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	7	0	15	0	6	Doença Progressiva
23	Cisplatina +	73	87	15	100	69	Resposta Completa

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
	Docetaxel + 5FU						
24	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	61	35	20	55	43	Resposta Parcial
25	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	42	82	48	72	61	Resposta Completa
26	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	52	78	65	100	74	Resposta Completa
27	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	21	58	33	25	34	Resposta Parcial
28	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	31	0	5	10	12	Doença Progressiva
29	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	42	72	45	24	46	Resposta Parcial
30	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	27	77	42	52	50	Resposta Parcial
31	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	55	65	80	56	64	Resposta Completa
32	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	47	31	20	47	36	Resposta Parcial
33	Cisplatina	66	72	58	100	74	Resposta

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
	+ Docetaxel + 5FU						Completa
34	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	72	32	29	41	44	Resposta Parcial
35	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	34	25	19	35	28	Resposta Parcial
36	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	42	40	15	65	41	Resposta Parcial
37	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	10	2	5	10	7	Doença Progressiva
38	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	72	21	13	32	35	Resposta Parcial
39	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	77	57	51	62	62	Resposta Completa
40	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	18	0	7	12	9	Doença Progressiva
41	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	31	55	24	72	46	Resposta Parcial
42	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	29	88	32	100	62	Resposta Completa

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
43	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	44	27	20	44	34	Resposta Parcial
44	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	51	55	12	36	39	Resposta Parcial
45	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	32	42	15	65	39	Resposta Parcial
46	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	37	85	46	92	65	Resposta Completa
47	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	10	15	5	0	8	Doença Progressiva
48	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	22	65	26	44	39	Resposta Parcial
49	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	56	65	32	88	60	Resposta Completa
50	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	43	32	24	57	39	Resposta Parcial
51	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	52	41	22	54	42	Resposta Parcial
52	Cisplatina + Docetaxel	48	45	32	65	48	Resposta Parcial

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
	+ 5FU						
53	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	32	23	14	40	27	Resposta Parcial
54	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	3	0	2	0	1	Doença Progressiva
55	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	55	63	31	90	60	Resposta Completa
56	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	60	55	41	32	47	Resposta Parcial
57	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	45	22	15	45	32	Resposta Parcial
58	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	5	15	4	0	6	Doença Progressiva
59	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	64	42	10	35	38	Resposta Parcial
60	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	31	43	25	55	39	Resposta Parcial
61	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	22	35	12	0	17	Doença Progressiva
62	Cisplatina +	15	52	17	64	37	Resposta Parcial

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
	Docetaxel + 5FU						
63	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	85	58	17	49	52	Resposta Parcial
64	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	54	72	42	67	59	Resposta Parcial
65	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	7	8	6	30	13	Doença Progressiva
66	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	42	32	16	65	39	Resposta Parcial
67	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	24	42	55	56	44	Resposta Parcial
68	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	29	0	5	12	12	Doença Progressiva
69	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	62	62	32	46	51	Resposta Parcial
70	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	16	0	5	25	12	Doença Progressiva
71	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	67	54	30	45	49	Resposta Parcial
72	Cisplatina	41	76	43	100	65	Resposta

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
	+ Docetaxel + 5FU						Completa
73	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	58	32	35	85	53	Resposta Parcial
74	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	0	50	10	20	20	Doença Progressiva
75	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	31	45	31	47	39	Resposta Parcial
76	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	2	34	20	21	19	Doença Progressiva
77	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	43	45	41	65	49	Resposta Parcial
78	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	72	65	88	89	79	Resposta Completa
79	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	25	54	45	43	42	Resposta Parcial
80	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	14	8	12	30	16	Doença Progressiva
81	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	23	85	21	50	45	Resposta Parcial

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
82	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	55	78	57	90	70	Resposta Completa
83	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	32	64	33	32	40	Resposta Parcial
84	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	27	88	62	100	69	Resposta Completa
85	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	64	39	42	32	44	Resposta Parcial
86	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	25	5	2	15	12	Doença Progressiva
87	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	55	33	21	32	35	Resposta Parcial
88	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	39	85	65	75	66	Resposta Completa
89	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	37	47	65	55	51	Resposta Parcial
90	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	2	3	6	7	5	Doença Progressiva
91	Cisplatina + Docetaxel	11	13	2	15	10	Doença Progressiva

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
	+ 5FU						
92	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	34	28	25	34	30	Resposta Parcial
93	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	77	56	32	75	60	Resposta Completa
94	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	47	67	42	50	52	Resposta Parcial
95	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	21	22	4	10	14	Doença Progressiva
96	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	72	85	45	72	69	Resposta Completa
97	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	33	75	66	87	65	Resposta Completa
98	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	17	0	8	5	8	Doença Progressiva
99	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	41	37	62	45	46	Resposta Parcial
100	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	72	46	31	84	58	Resposta Parcial
101	Cisplatina +	50	85	70	100	76	Resposta Completa

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
	Docetaxel + 5FU						
102	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	32	3	10	5	13	Doença Progressiva
103	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	65	56	39	45	51	Resposta Parcial
104	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	58	72	65	95	73	Resposta Completa
105	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	35	100	69	87	73	Resposta Completa
106	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	42	33	27	45	37	Resposta Parcial
107	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	0	20	5	0	6	Doença Progressiva
108	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	19	43	42	54	40	Resposta Parcial
109	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	18	53	32	48	38	Resposta Parcial
110	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	32	15	12	0	15	Doença Progressiva
111	Cisplatina	44	85	52	95	69	Resposta

No. de SI	Tratamento	Preditor da Resposta clínica				Índice de Sensibilidade	Previsão do Índice de Sensibilidade
		Inibição da Proliferação	Inibição da proliferação	Histologia	TÚNEL		
	+ Docetaxel + 5FU						Completa
112	Cisplatina + Docetaxel + 5FU	21	0	12	0	8	Doença Progressiva

A partir da tabela acima bem a partir da figura 12, o seguinte pode ser derivado: O painel esquerdo da Figura 12 (pré-dose e pós-dose) exhibe as imagens de CT mostrando a localização dos tumores antes da e após a quimioterapia. O painel esquerdo do topo mostra que o tumor encolheu e que a pessoa respondeu à terapia. O tumor desta pessoa, após ser avaliado usando *oncoprint*, recebeu uma pontuação M de 62 indicativa de resposta clínica completa que está alinhada com o resultado clínico real. O painel direito do topo mostra a resposta clínica de 30 amostras tumorais que tiveram pontuação M  $\geq 60$ , mais do que 90% dos pacientes teve resposta completa, enquanto 10% teve resposta parcial. No entanto, nenhuns deles foram não respondedores.

Similarmente, o painel esquerdo do topo é uma representação de um respondedor parcial cuja pontuação M é determinada como sendo 45. Como previsto para a pontuação entre 25 e  $<60$ , o paciente é indicativo de Resposta Parcial. Dos 53 tumores de pacientes tendo pontuação M nesta categoria, mais do que 79% foram respondedores parciais com 8% tendo resposta completa e 13% tendo não resposta.

O painel do fundo é representativo de não respondedores, em

que a CT pós-dose à esquerda mostra que o paciente tem doença progressiva após tratamento e foi atribuída ao tumor uma pontuação M de 18 indicativa de não resposta. Dos 29 pacientes previstos como tendo não resposta pelo "Preditor da Resposta Clínica", 100% deles exibiram de facto não resposta indicando o poder desta tecnologia para prever confiavelmente o resultado clínico.

### **APLICAÇÕES:**

#### **Aplicação de desenvolvimento de fármacos:**

*Correspondência de pacientes a fármacos:* No contexto do desenvolvimento de fármacos é importante saber que pacientes é mais provável que respondam ao fármaco sob desenvolvimento mesmo antes de o fármaco ser administrado aos pacientes. Adicionalmente é particularmente importante no contexto de cancro pois é necessário decidir que fármacos existentes necessitam de ser combinados com o fármaco sob desenvolvimento sob a estratégia de "Combinação" que é usada no tratamento de cancro. É também útil na decisão de que tipo de cancro visar (p.ex.: cancro do cólon vs. cancro pancreático). Globalmente é útil no desenvolvimento de uma melhor estratégia de ensaio clínico que resulte em tempo de desenvolvimento mais rápido, menor custo e probabilidades de sucesso aumentadas.

#### **Aplicação de diagnóstico:**

*Seleção de tratamento:* É útil como um modelo de diagnóstico na ajuda aos médicos em decidirem que opção de tratamento, de entre as opções correntemente disponíveis, é mais bem adequada para o paciente sob investigação. Isto é

particularmente útil em pacientes com cancro secundário (reincidente) bem como metastático, onde a taxa de sucesso de tratamento corrente é  $< 20\%$  e vaira de paciente para paciente. É também útil na decisão do tratamento de primeira linha onde a taxa de sucesso corrente é  $\sim 50\%$ . A aplicação de diagnóstico de "Preditor da Resposta Clínica" foi validade no contexto de Cancro da Cabeça & Pescoço, Cancro da mama, Cancro gástrico, Cancro pancreático, Cancro colorretal, Cancro do fígado, Cancro dos ovários, Cancro esofágico, AML & CML. O poder de previsão é  $\sim 100\%$  no caso de não respondedores,  $\sim 75\%$  no caso de respondedores parciais e  $\sim 90\%$  no caso de respondedores.

#### **Aplicação de biologia translacional:**

No desenvolvimento de fármacos anticancerígenos, identificação do cancro ótimo para os fármacos a serem desenvolvidos, seleção de fármaco *Standard of Care* como uma Estratégia de codesenvolvimento para os fármacos a serem desenvolvidos, seleção de perfil de paciente mais provável de responder ao fármaco ou combinação de fármacos a ser estudado, e a identificação de biomarcadores de prognóstico para o fármaco ou combinação de fármacos a ser estudado. Adicionalmente, a presente invenção utiliza também a ferramenta de segregação de pacientes no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico acompanhantes para fármacos anticancerígenos incluindo quimioterapêuticos, fármacos visados, e biológicos.

## **REIVINDICAÇÕES**

- 1.** Uma composição de Matriz Extracelular, ECM, compreendendo os componentes - colagénio 1, colagénio 3, colagénio 4, colagénio 6, Fibronectina, Vitronectina, Caderina, Filamina A, Vimentina, Osteopontina, Laminina, Decorina e Tenascina C.
- 2.** A composição de ECM de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente um ou mais componentes selecionados do grupo consistindo em Proteínas da membrana de base, Proteínas citoesqueléticas e Proteínas da matriz.
- 3.** Um método para se obter composição de Matriz Extracelular, ECM, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo o referido método combinação dos componentes da ECM - colagénio 1, colagénio 3, colagénio 4, colagénio 6, Fibronectina, Vitronectina, Caderina, Filamina A, Vimentina, Osteopontina, Laminina, Decorina, Tenascina C para se obter a composição de ECM.
- 4.** O método de acordo com a reivindicação 3, em que os componentes compreendem adicionalmente um ou mais componentes selecionados do grupo consistindo em Proteínas da membrana de base, Proteínas citoesqueléticas e Proteínas da matriz.
- 5.** Uma plataforma de microambiente tumoral para cultura de tecido tumoral, compreendendo o referido microambiente a composição de ECM como reivindicado na reivindicação 1 ou 2, meio de cultura opcionalmente em conjunto com soro, plasma ou PBMCs e fármaco.

**6.** Um método para obtenção da plataforma de microambiente tumoral para cultura de tecido tumoral de acordo com a reivindicação 5, compreendendo o referido método o ato de revestimento da plataforma com composição de ECM como reivindicado na reivindicação 1 ou 2 e adição de meio de cultura em conjunto com soro, plasma ou PBMCs e fármaco, à plataforma para se obter a plataforma de microambiente tumoral.

**7.** Um método de cultura organotípica de tecido tumoral, compreendendo o referido método o ato de cultura do tecido tumoral na plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 5 para se obter uma cultura organotípica.

**8.** Um método de previsão da resposta de um sujeito tumoral ao(s) fármaco(s), compreendendo o referido método os atos de:

- a. cultura do tecido tumoral do sujeito na plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 5, para se obter tecido tumoral cultivado;
- b. tratamento do tecido tumoral cultivado com o(s) fármaco(s) e condução de ensaio;
- c. conversão da leitura do ensaio em métrica numérica para se obter o índice de sensibilidade e, deste modo, previsão da resposta do sujeito ao(s) fármaco(s); e
- d. opcionalmente, correlação do índice de sensibilidade com a resposta clínica do sujeito ao(s) fármaco(s).

**9.** Um método de previsão da resposta de um sujeito tumoral ao(s) fármaco(s), compreendendo o referido método os atos de:

- a. cultura do tecido tumoral do sujeito na plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 5, para se obter tecido tumoral cultivado;
- b. tratamento do tecido tumoral cultivado com o(s) fármaco(s);
- c. avaliação da resposta tumoral ao fármaco por pluralidade de ensaios para se obter pontuação de avaliação para cada um da pluralidade de ensaios;
- d. atribuição de uma pontuação ponderada para cada um da pluralidade de ensaios;
- e. multiplicação da pontuação de avaliação de cada um da pluralidade de ensaios com a pontuação ponderada do ensaio correspondente da pluralidade de ensaios para se obter a pontuação de ensaio independente para cada um da pluralidade de ensaios;
- f. combinação da pontuação de ensaio independente de cada um da pluralidade de ensaios para se obter o índice de sensibilidade e deste modo previsão da resposta do sujeito ao(s) fármaco(s); e
- g. opcionalmente, correlação do índice de sensibilidade com a resposta clínica do sujeito ao(s) fármaco(s).

**10.** Um método de rastreio ou desenvolvimento de agente anticancerígeno, compreendendo o referido método os atos de:

- a. cultura do tecido tumoral do sujeito na plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 5, para se obter tecido tumoral cultivado;
- b. tratamento do tecido tumoral cultivado com o agente, avaliação da resposta tumoral ao agente por ensaio para se determinar o efeito do referido agente na célula tumoral.

**11.** Um método para rastreamento de células tumorais quanto a marcadores específicos, compreendendo o referido método os atos de:

- a. cultura do tecido tumoral do sujeito na plataforma de microambiente tumoral como reivindicado na reivindicação 5, para se obter tecido tumoral cultivado;
- b. tratamento do tecido tumoral cultivado com fármaco(s) e avaliação da resposta tumoral ao fármaco por ensaio; e
- c. condução de análise de *microarray* e Ácido Nucleico para rastrear quanto aos biomarcadores.

**12.** A composição de Matriz Extracelular, ECM, de acordo com a reivindicação 1, em que a composição de Matriz Extracelular, ECM, é específica do tumor; e em que o colagénio 1 está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL ou cerca de 50 µg/mL; o colagénio 3 está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/ mL, preferencialmente a cerca de 0,1 µg/mL ou cerca de 1 µg/mL ou cerca de 100 µg/mL; o colagénio 4 está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL ou cerca de 250 µg/mL; o colagénio 6 está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 0,1 µg/mL ou cerca de 1 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL; a Fibronectina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 750 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL ou cerca de 500 µg/mL; a Vitronectina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 95 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL; a Caderina está à concentração

variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 1 µg/mL e cerca de 5 µg/mL; a Filamina A está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL; a Vimentina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, preferencialmente a cerca de 1 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL; a Laminina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, preferencialmente a cerca de 5 µg/mL ou cerca de 10 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL; a Decorina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, preferencialmente a cerca de 10 µg/mL ou cerca de 20 µg/mL; a Tenascina C está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 500 µg/mL, preferencialmente a cerca de 10 µg/mL ou cerca de 25 µg/mL; e a Osteopontina está à concentração variando de cerca de 0,01 µg/mL a cerca de 150 µg/mL, preferencialmente a cerca de 1 µg/mL ou cerca de 5 µg/mL.

**13.** Os métodos de acordo com as reivindicações 6 a 11, em que o referido tecido tumoral é obtido da fonte selecionada do grupo compreendendo sistema nervoso central, medula óssea, sangue, baço, timo, coração, glândula mamária, fígado, pâncreas, tiroide, músculo esquelético, rim, pulmão, intestino, estômago, esófago, ovário, bexiga, testículo, útero, tecido estromal e tecido conectivo ou quaisquer suas combinações; e em que o tumor ou o tecido tumoral é obtido cirurgicamente ou por biópsia ou como xenoenxerto ou quaisquer suas combinações; e o tumor ou o tecido tumoral é dividido em pequenos pedaços de secções de cerca de 100 µm a cerca de 3000 µm.

**14.** O microambiente tumoral de acordo com a reivindicação

5, em que o tecido tumoral é obtido da fonte selecionada do grupo compreendendo sistema nervoso central, medula óssea, sangue, baço, timo, coração, glândula mamária, fígado, pâncreas, tiroide, músculo esquelético, rim, pulmão, intestino, estômago, esófago, ovário, bexiga, testículo, útero, tecido estromal e tecido conectivo ou quaisquer suas combinações; em que o tumor ou o tecido tumoral é obtido cirurgicamente ou por biópsia ou como xenoenxerto ou quaisquer suas combinações; e o tumor ou o tecido tumoral é dividido em pequenos pedaços de secções de cerca de 100 µm a cerca de 3000 µm; em que a cultura do tecido tumoral é levada a cabo à temperatura variando de cerca de 30 °C a cerca de 40 °C, preferencialmente cerca de 37 °C; durante duração de tempo de cerca de 2 a 10 dias, preferencialmente cerca de 3 a 7 dias; e CO<sub>2</sub> a cerca de 5%; e em que a plataforma de revestimento é selecionada do grupo compreendendo placa, base, frasco, prato, placa de Petri e prato de Petri.

**15.** A plataforma de microambiente tumoral de acordo com a reivindicação 5, em que a referida plataforma de microambiente é para manutenção das redes de sinalização da célula tumoral; e para manutenção de um microambiente de tecido, arquitetura celular e integridade da interação tumor-estroma intactos.

**16.** O microambiente tumoral de acordo com a reivindicação 5, em que o meio de cultura é selecionado do grupo compreendendo Meio de Eagle Modificado por Dulbecco ou RPMI1640 [Meio do Roswell Park Memorial Institute] à concentração variando de cerca de 60% a cerca de 100%, preferencialmente cerca de 80%; em que o meio de cultura compreende opcionalmente adicionalmente Soro Fetal de

Bovino, PBS, inativado pelo calor à concentração variando de cerca de 0,1% a cerca de 40%, preferencialmente cerca de 2% p/p; Penicilina-Estreptomicina à concentração variando de cerca de 1% a cerca de 2%, preferencialmente cerca de 1% p/p; piruvato de sódio à concentração variando de cerca de 10 mM a cerca de 500 mM, preferencialmente cerca de 100 mM; o aminoácido não essencial é L-glutamina à concentração variando de cerca de 1 mM a cerca de 10 mM, preferencialmente cerca de 5 mM; e HEPES (ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico) à concentração variando de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, preferencialmente cerca de 10 mM ou qualquer sua combinação; e o soro no meio de cultura está à concentração variando de cerca de 0,1% a cerca de 10%, preferencialmente cerca de 2%.

**17.** Os métodos de acordo com as reivindicações 6 a 11, em que o tumor é selecionado do grupo compreendendo estômago, cólon, cabeça & pescoço, cérebro, cavidade oral, mama, gástrico, gastrointestinal, esofágico, colorretal, pancreático, pulmão, fígado, rim, ovários, uterino, osso, próstata, testicular, glioblastoma, astrocitoma, melanoma, tireoide, bexiga, células não pequenas do pulmão, células pequenas do pulmão, câncros hematológicos incluindo AML, Leucemia Mieloide Aguda, CML, Leucemia Mieloide Crônica, ALL, Leucemia Linfocítica Aguda, TALL, Leucemia Linfoblástica Aguda de células T, NHL, Linfoma não de Hodgkin, DBCL, Linfoma de células B Difusas, CLL, Leucemia Linfocítica Crônica, e mieloma múltiplo ou quaisquer suas combinações.

**18.** Os métodos de acordo com as reivindicações 8 a 11, em que o ensaio é selecionado do grupo compreendendo ensaio

para a viabilidade de células, morte de células, proliferação de células, morfologia tumoral, conteúdo no estroma tumoral, metabolismo de células, senescência ou quaisquer suas combinações; e em que o ensaio para a viabilidade de células e o metabolismo de células é selecionado do grupo compreendendo ensaio WST, ensaio de captação de ATP e ensaio de captação de glucose; o ensaio para a morte de células é selecionado do grupo compreendendo ensaio LDH, ensaio de Caspase 3 Ativada, ensaio de Caspase 8 Ativada e ensaio de Óxido Nítrico Sintetase, TUNEL; o ensaio para a proliferação de células é selecionado do grupo compreendendo ensaio Ki67, ensaio de razão ATP/ADP e ensaio de captação de glucose; e o ensaio para a morfologia tumoral e o estroma tumoral é H&E, coloração de Hematoxilina & Eosina; ou quaisquer suas combinações.

**19.** Os métodos de acordo com as reivindicações 8 e 9, em que o método é usado para decisão de tratamento para o sujeito do grupo compreendendo quimioterapia, terapia visada, cirurgia, radiação ou quaisquer suas combinações; e em que o índice de sensibilidade se correlaciona com resposta clínica completa, resposta clínica parcial e nenhuma resposta clínica quando o índice de sensibilidade é maior do que 60, entre 20 e 60 e menor do que 20, respectivamente.

**20.** O método de acordo com a reivindicação 9, a atribuição uma pontuação ponderada de cada um da pluralidade de ensaios é baseada na natureza do fármaco usado.

**21.** O método de acordo com a reivindicação 11, em que a análise de *microarray* e Ácido Nucleico de DNA, RNA ou

microRNA é levada a cabo para se detetar a modulação da via antes do e após o tratamento com fármaco; e em que a análise de *microarray* e Ácido Nucleico é confirmada usando ensaio selecionado do grupo compreendendo PCR em Tempo real, RTPCR, Análise imunohistoquímica, IHC, e perfil fosfo-proteómico.

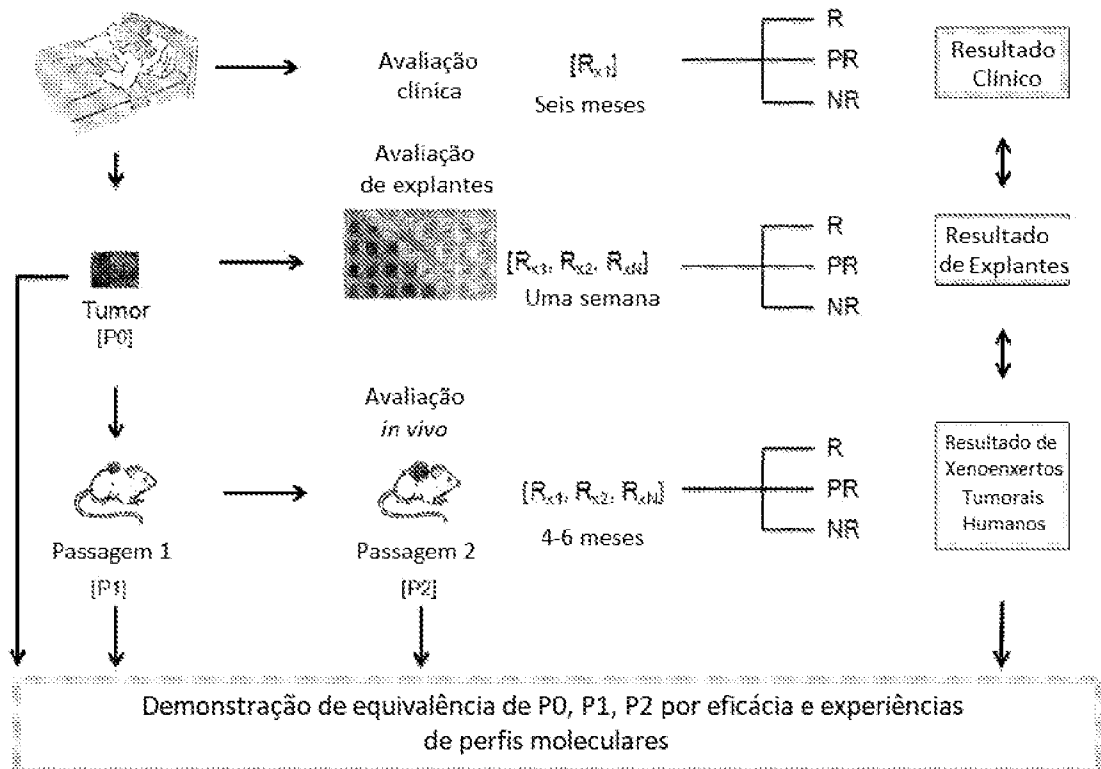
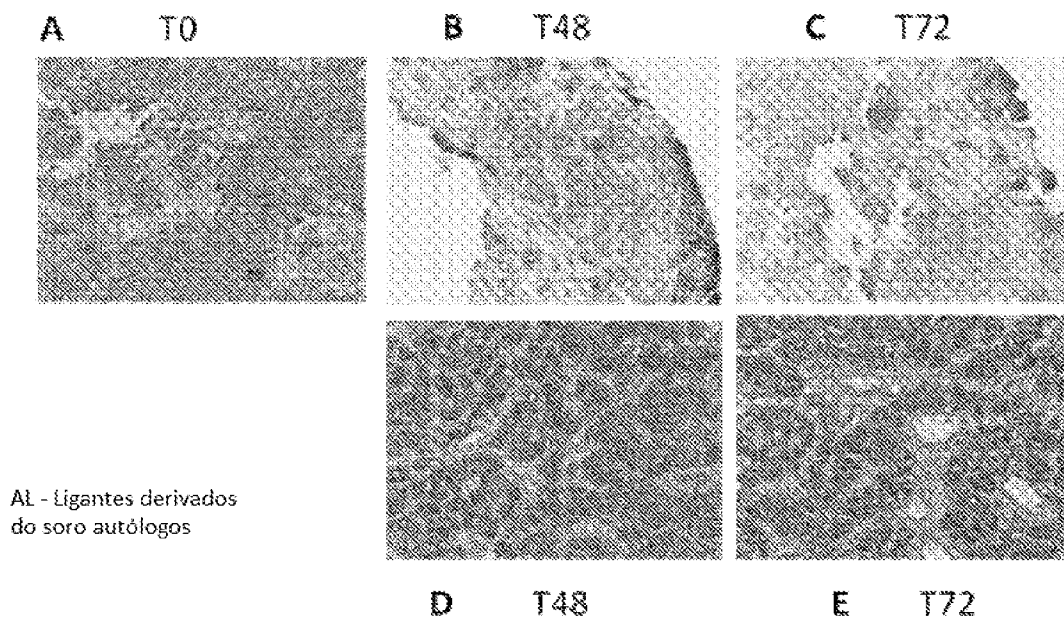


Figura 1



**Figura 2**

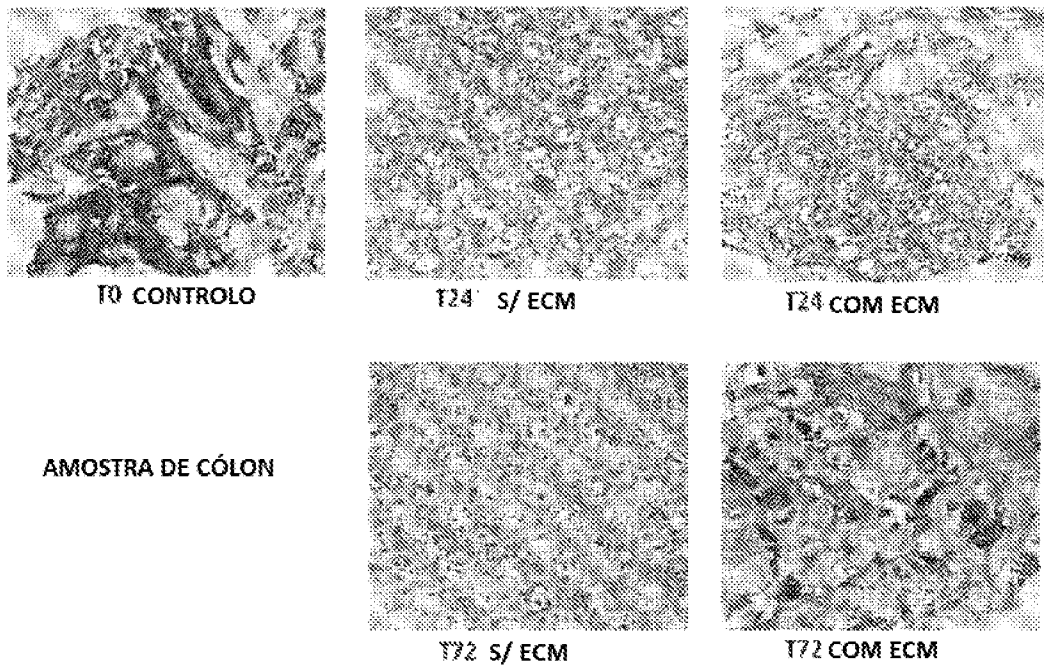


Figura 3A

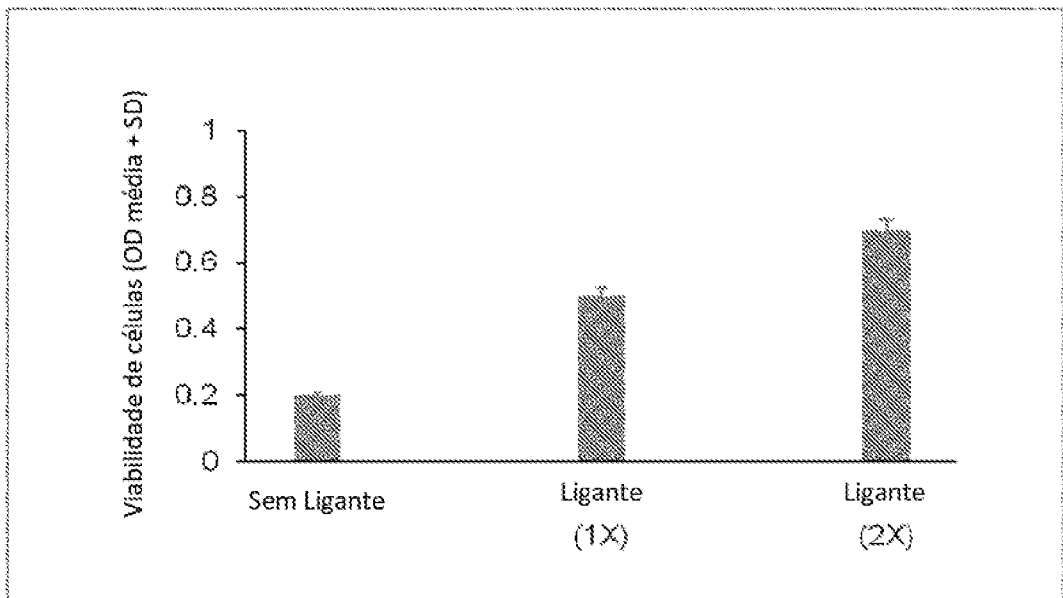


Figura 3B

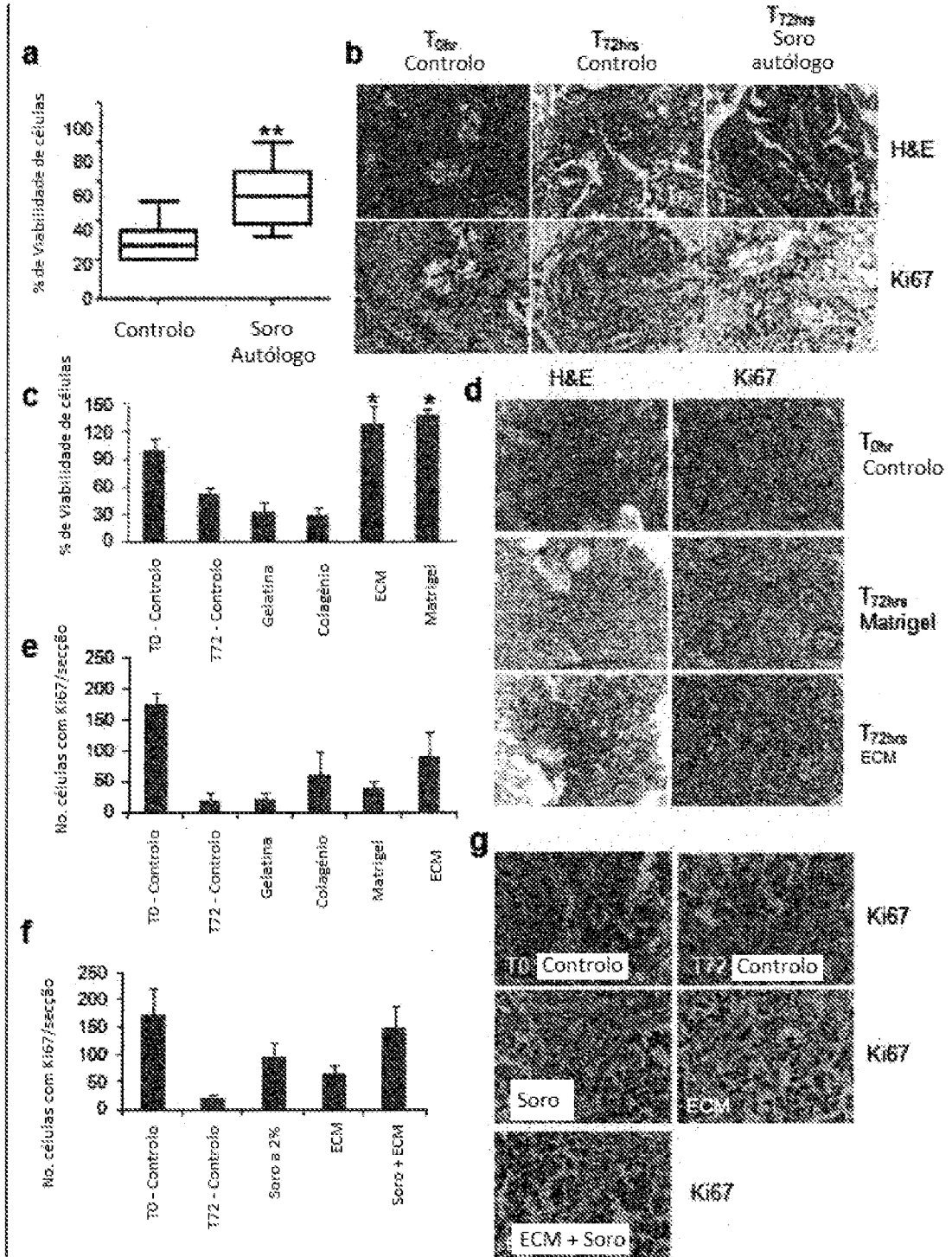


Figura 4

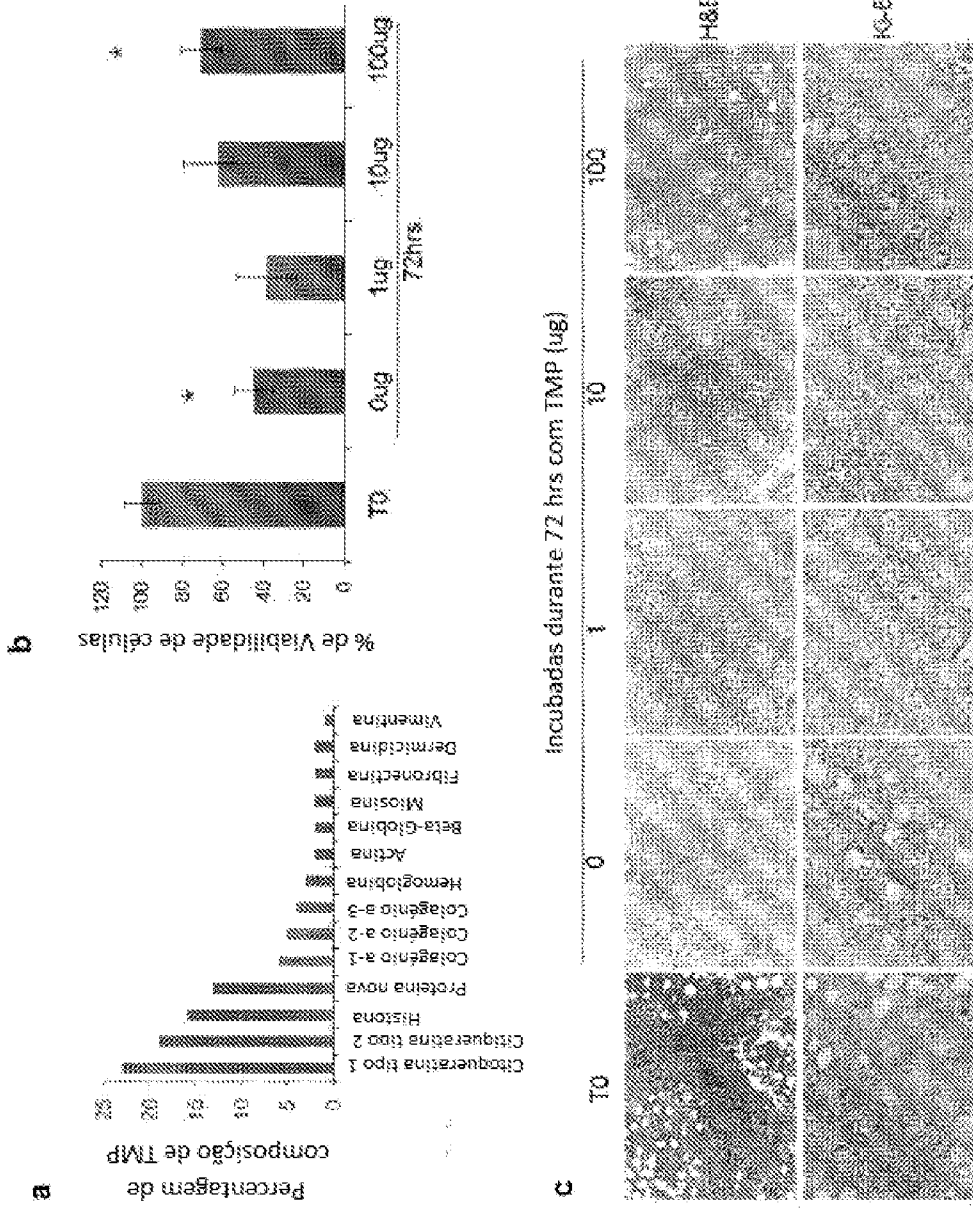


Figura 5

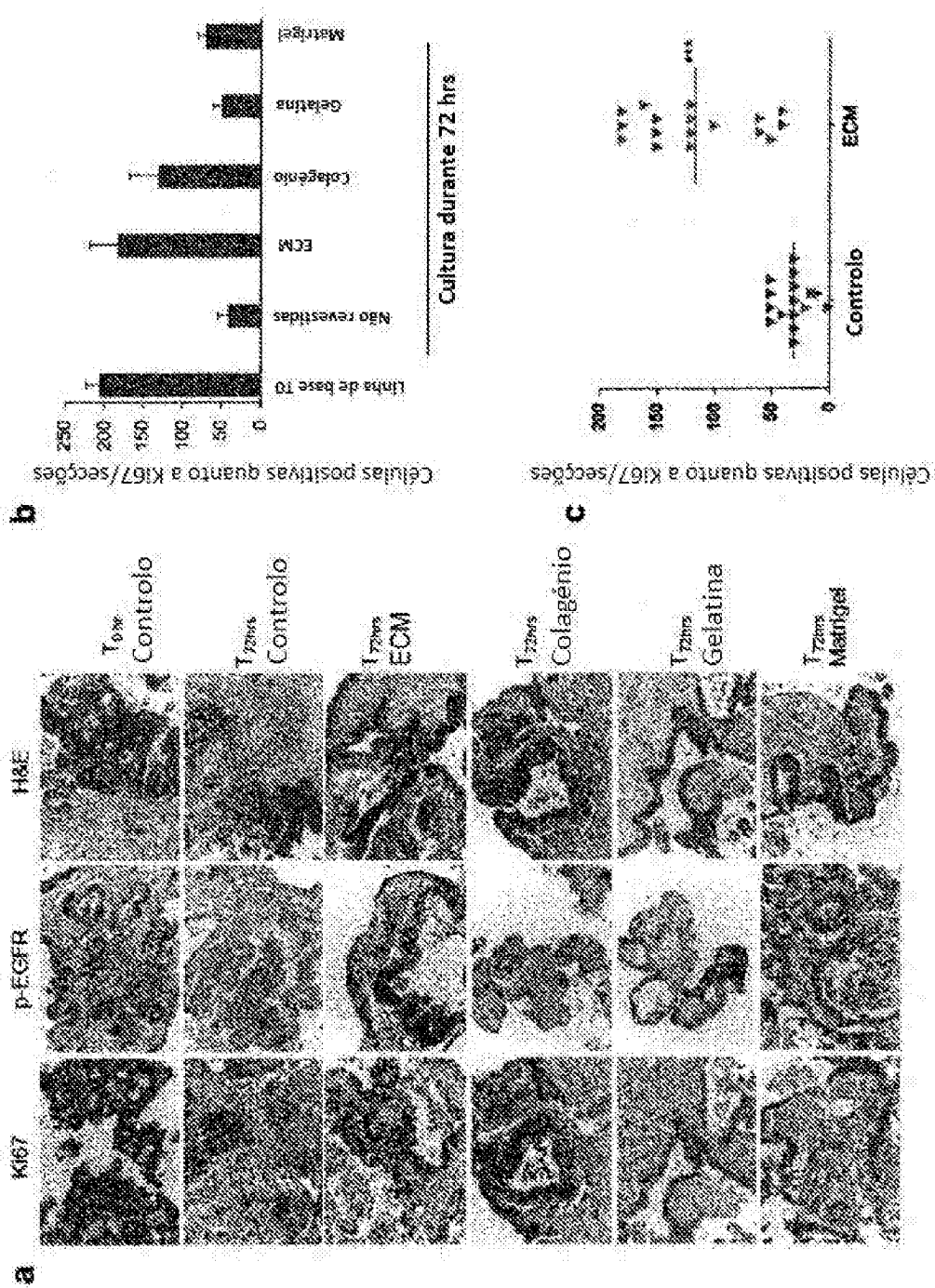


Figura 6



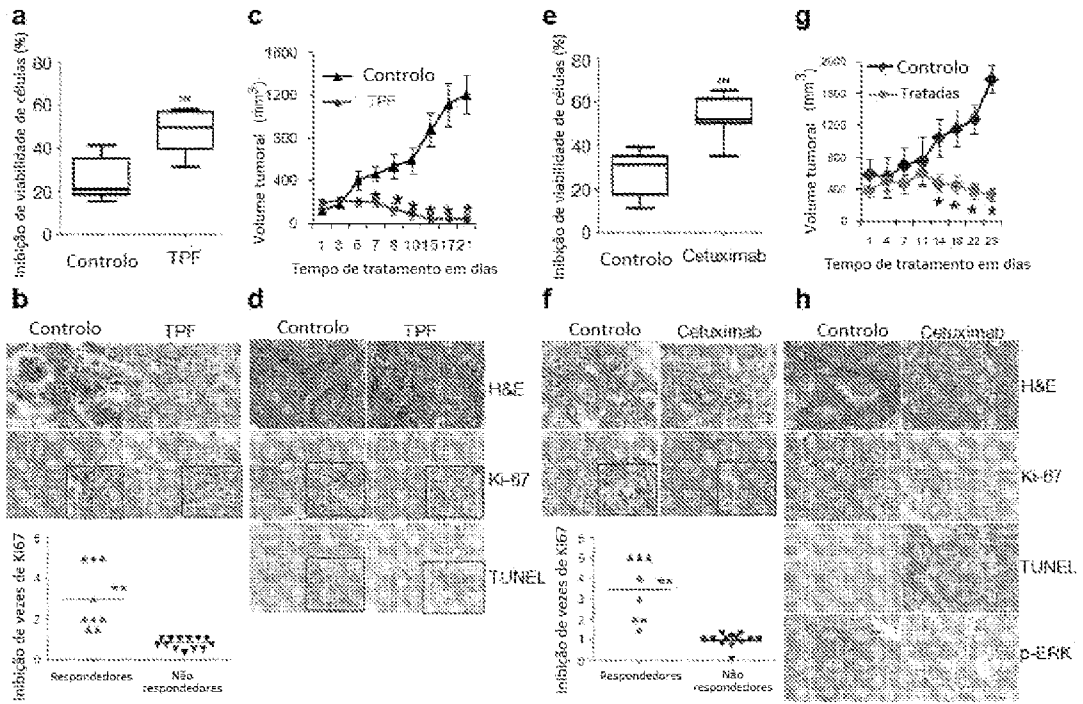


Figura 9

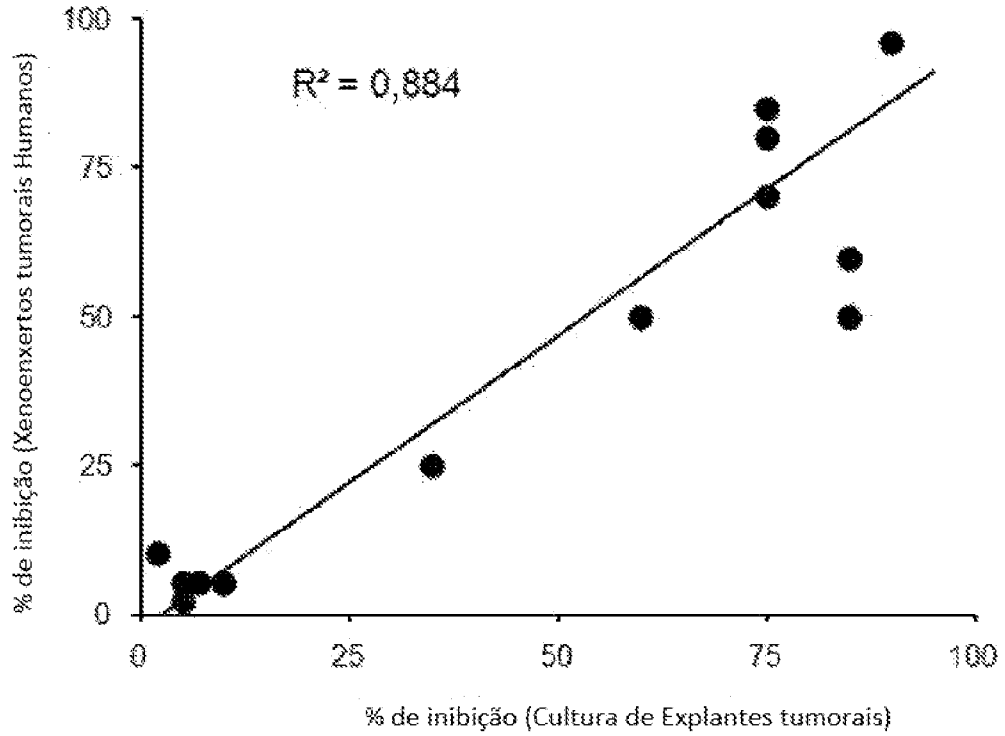


Figura 10

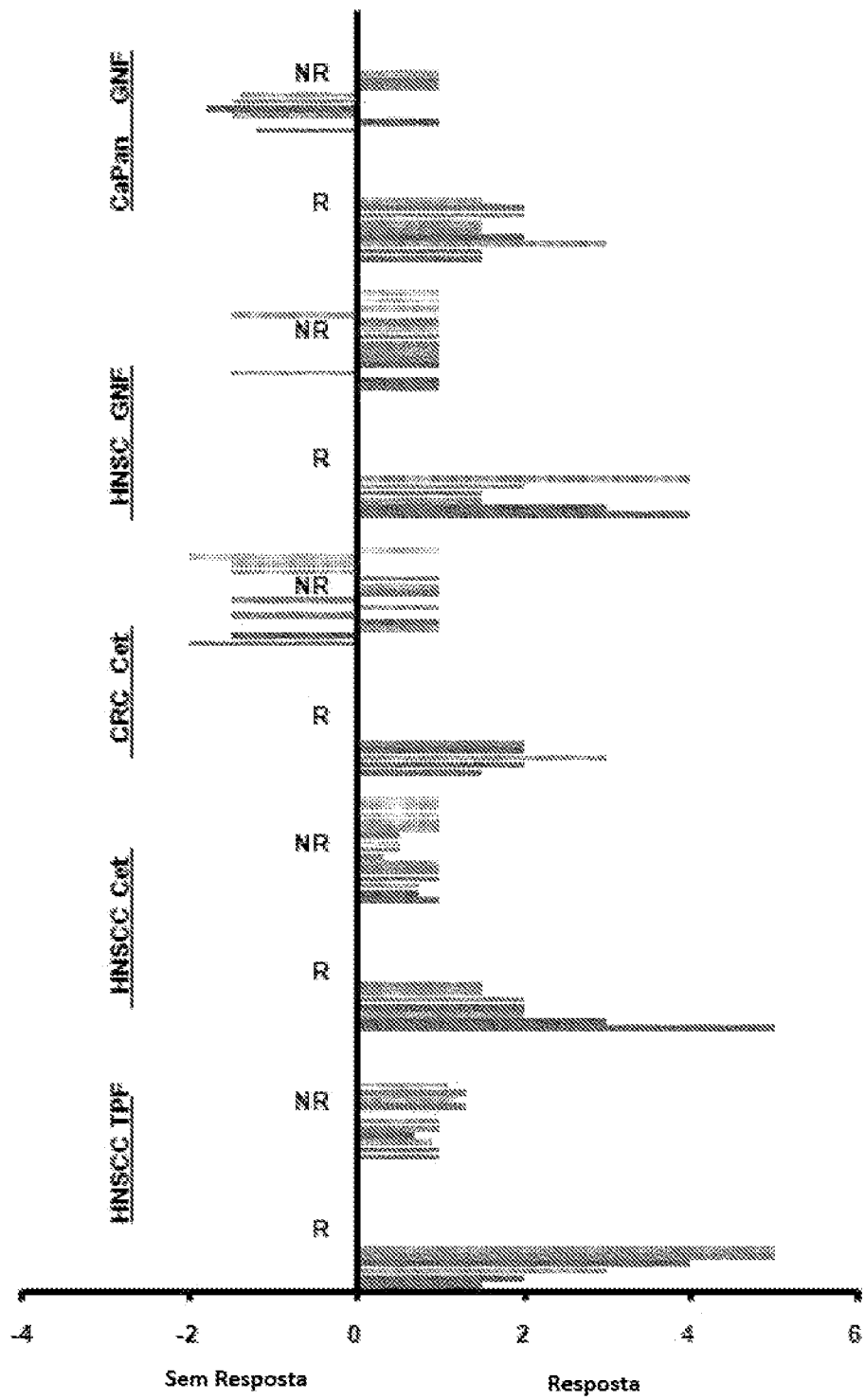


Figura 11

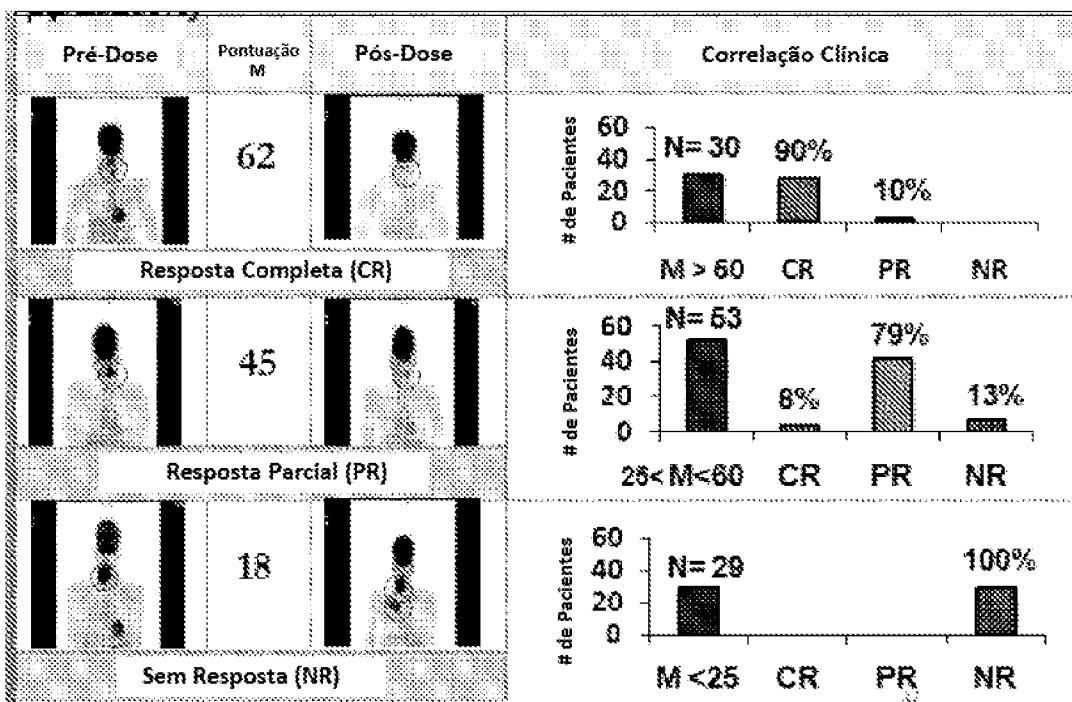


Figura 12

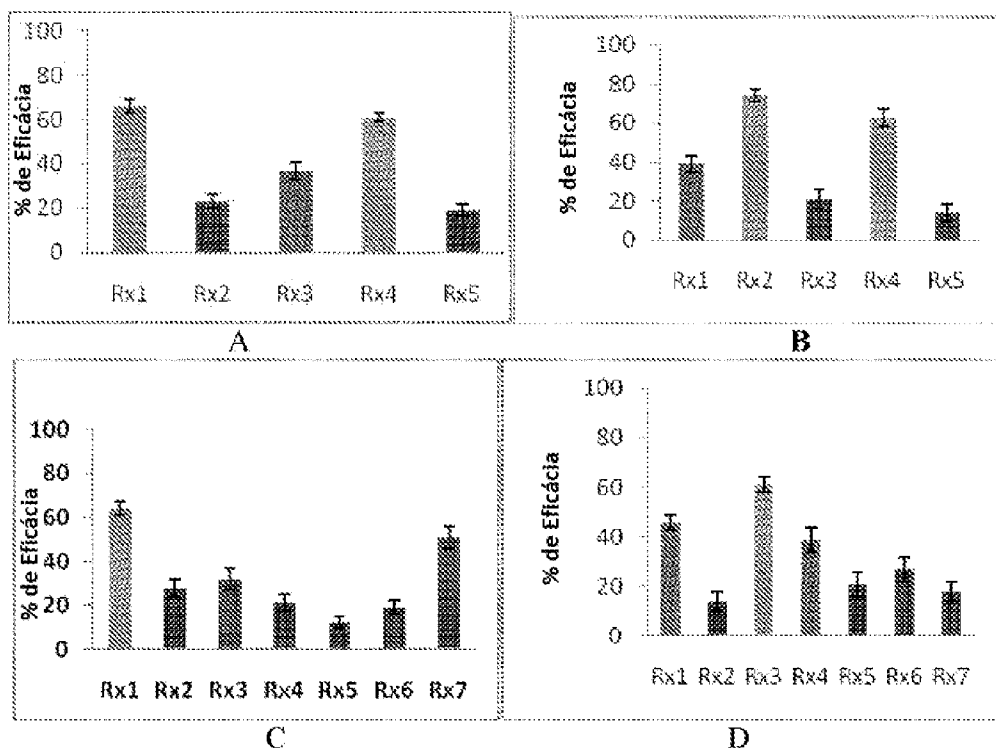


Figura 13

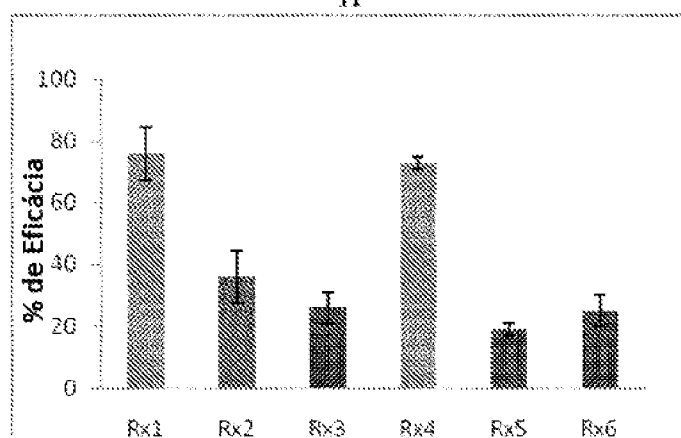
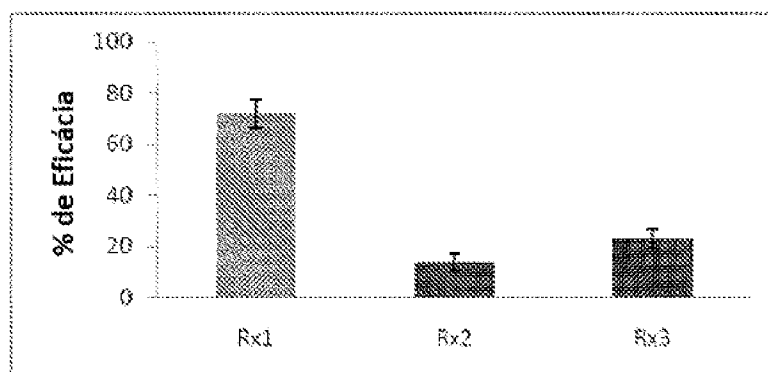
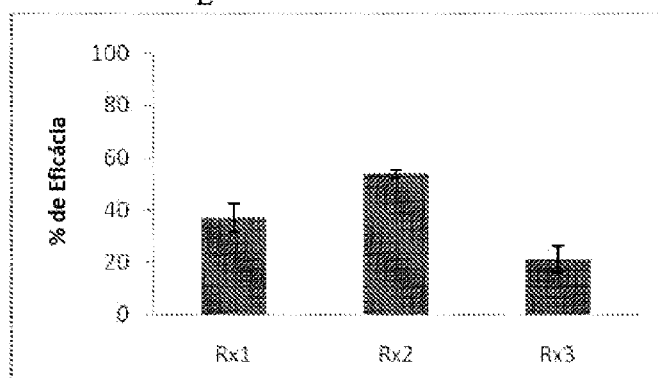
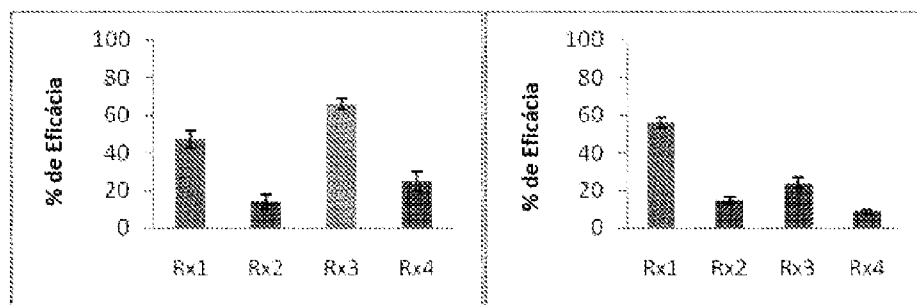
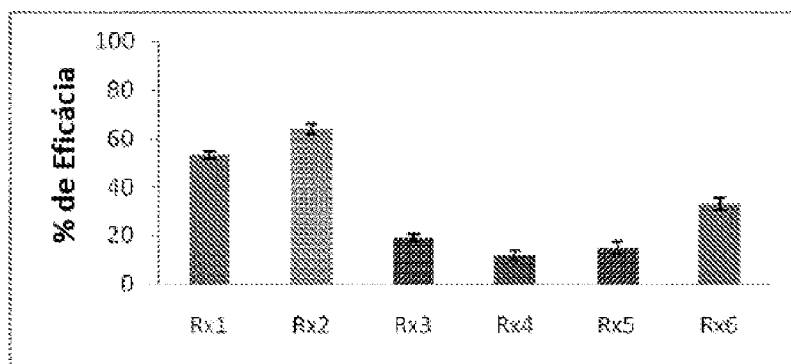
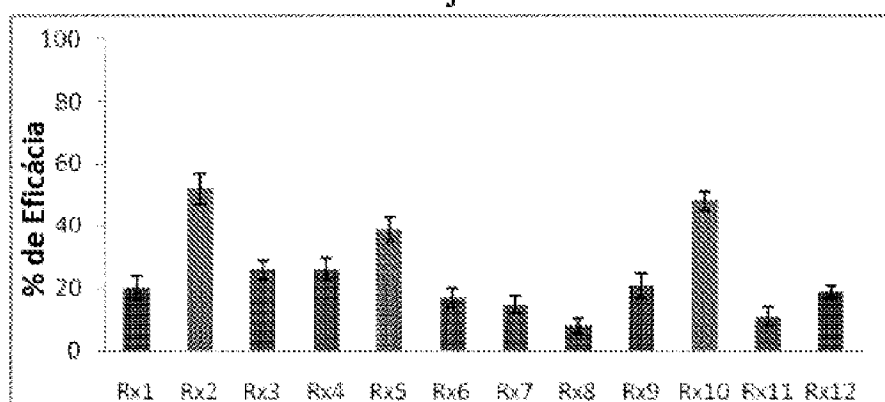


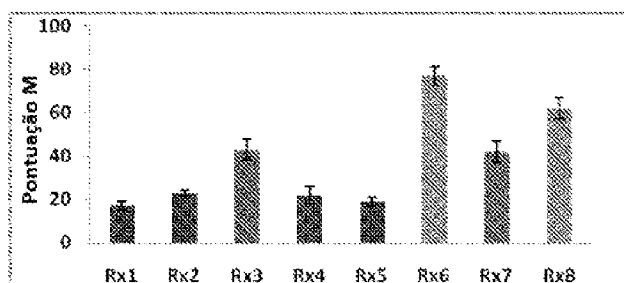
Figura 13



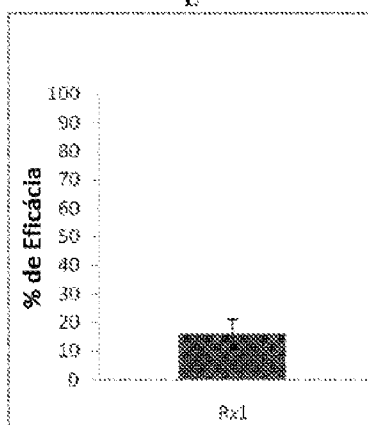
J



K

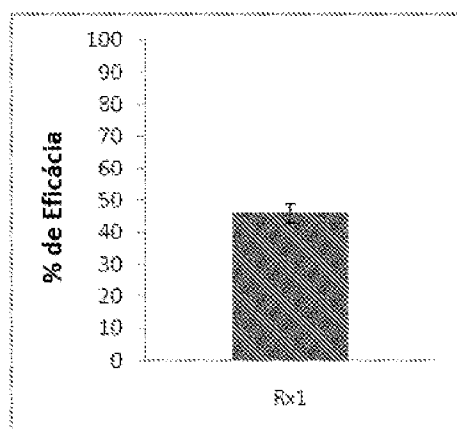


L

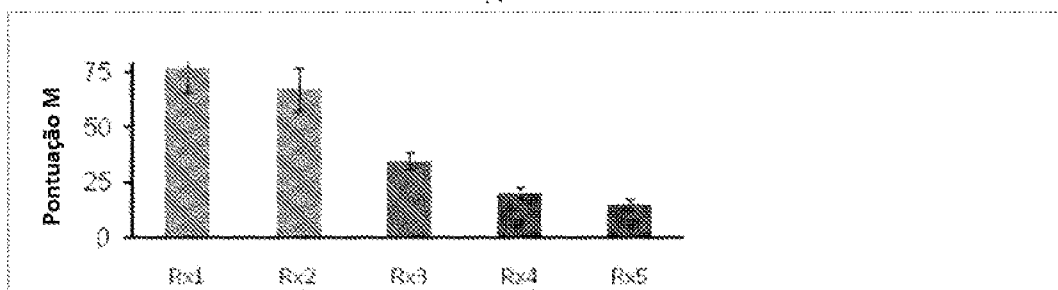


M

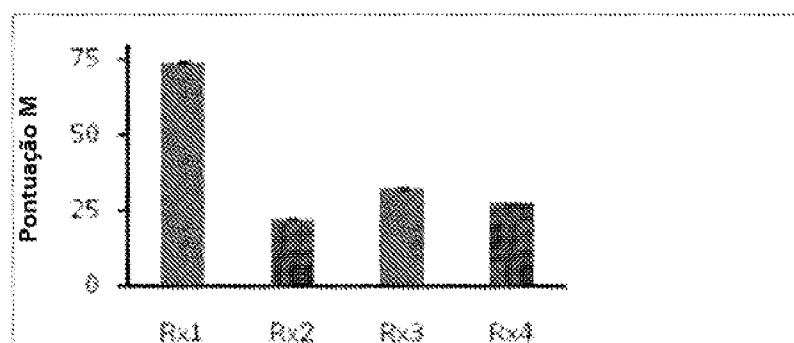
Figura 13



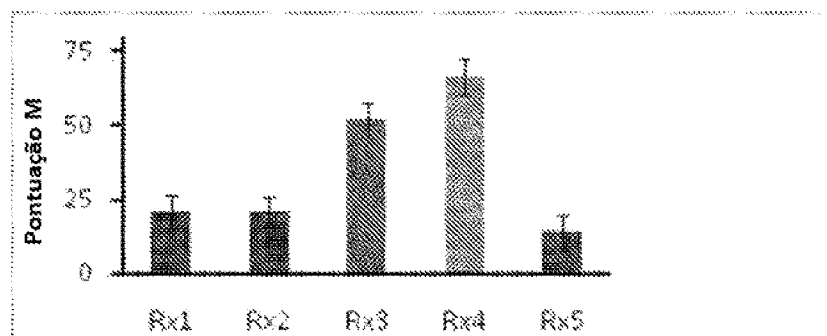
N



O



P



Q

Figura 13

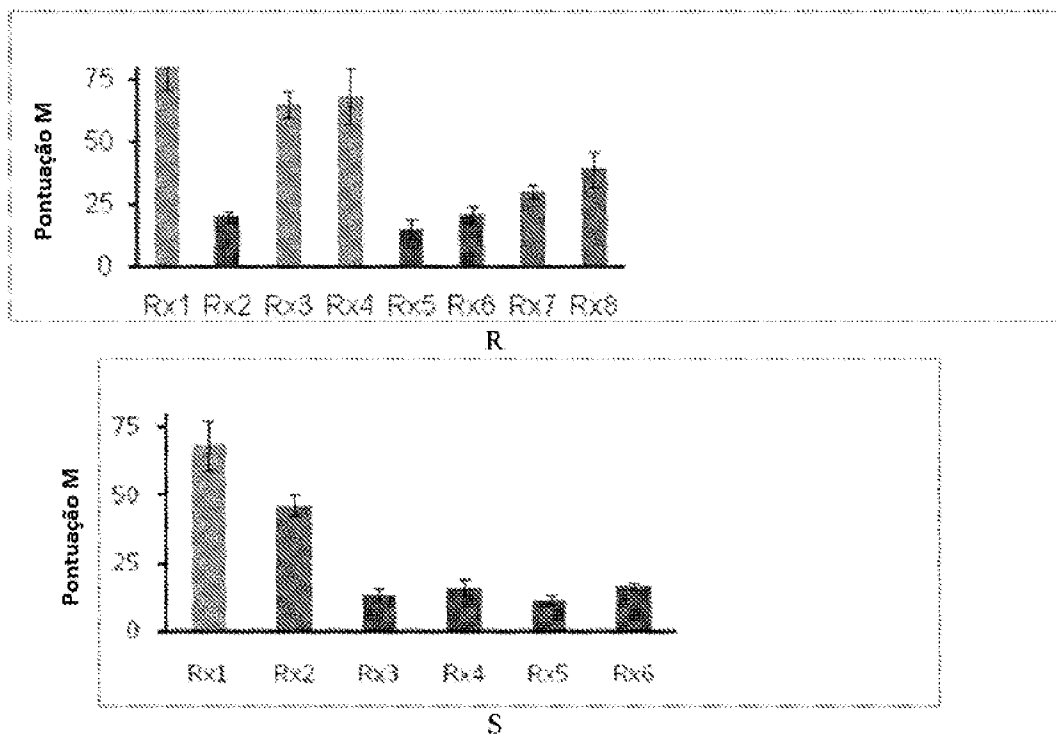


Figura 13