

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

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO SOBRE  
EVENTOS CELULARES RELACIONADOS COM A METÁSTASE NO  
OSTEOSSARCOMA

ANA CRISTINA DE SÁ LOPES

Rio de Janeiro  
2015



INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA  
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

Ana Cristina de Sá Lopes

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO SOBRE  
EVENTOS CELULARES RELACIONADOS COM A METÁSTASE NO  
OSTEOSSARCOMA

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

**Orientador (es):** Profa. Dra. Suzana Assad Kahn  
Profa. Dra. Amanda dos Santos Cavalcanti

Rio de Janeiro  
Dezembro / 2015



INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEdia  
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

AUTOR: Ana Cristina de Sá Lopes

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO SOBRE  
EVENTOS CELULARES RELACIONADOS COM A METÁSTASE NO  
OSTEOSSARCOMA

ORIENTADOR(ES): Profa. Dra. Suzana Assad Kahn  
Profa. Dra. Amanda dos Santos Cavalcanti

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

Prof. Dr. Vivaldo Moura-Neto (Instituto Estadual do Cérebro)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Eugênia Leite Duarte (Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciana Ferreira Romão (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

Prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar (Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia)

Rio de Janeiro  
Dezembro / 2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

L864a Lopes, Ana Cristina de Sá.  
Avaliação do efeito do tratamento quimioterápico sobre eventos  
celulares relacionados com a metástase no osteossarcoma / Ana Cristina de  
Sá Lopes. — 2015.  
106 f.

Orientadores: Suzana Assad Kahn e Amanda dos Santos Cavalcanti.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema  
Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia  
Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2015.

1. Osteossarcoma. 2. Transição Epitelial-Mesenquimal. 3. Metástase  
Neoplásica. 4. Sarcoma. 5. Quimioterapia. 6. Ortopedia. I. Assad Kahn,  
Suzana, orient. II. Cavalcanti, Amanda dos Santos, orient. III. Título.

NLM WE 258

Dedico esta dissertação a grandes pessoas que fazem parte da minha vida, que lutaram, choraram, riram e torceram por mim, cada um a sua maneira. Primeiramente, aos meus pais, que tornaram possível a realização de todos os meus sonhos e sonharam comigo, dando toda a força para que eu realizasse meu sonho de ser médica e de ter alcançado todas as minhas realizações. A minha querida filha, razão da minha vida, por toda a amizade, paciência e companheirismo devotados a mim. E ao meu marido e amigo, que esteve ao meu lado pacientemente, torcendo e incentivando mesmo que em dias tão difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos aqueles que estiveram envolvidos comigo e com minha tese durante estes dois anos, principalmente a toda equipe de pesquisa, sem vocês o trabalho não seria o mesmo. Vocês me ensinaram o trabalho em equipe, a amizade e a tolerância no trabalho. A Dra. Maria Eugênia, por ter “lutado” pelo Mestrado no INTO e ter me dado incentivo para fazê-lo. Ao Dr. Walter Meohas por ter me mostrado e ensinado tanto a Oncologia Ortopédica e ter me dado força nessa nova caminhada. Agradeço as minhas orientadoras Suzana, que permitiu este trabalho, confiou em mim e me estimulou a estudar, pesquisar e realizar esta pesquisa, e Amanda, a quem tenho grande gratidão por todos os ensinamentos, paciência e dedicação. Também agradeço a Gabi, por ter me ensinado a lidar e gostar dos nossos pequenos nudes. A Ema por todos os experimentos. E gostaria de terminar agradecendo a todos os meus amigos do Centro de Oncologia Ortopédica e da Anatomia Patológica do INTO que me ajudaram neste desafio.

## RESUMO

**LOPES, Ana Cristina de Sá.** Avaliação do efeito do tratamento quimioterápico sobre os eventos celulares relacionados com a metástase no osteossarcoma. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Ministério da Saúde, 2015.

O osteossarcoma é o tumor maligno primário mais frequente do osso e afeta principalmente os ossos dos membros inferiores de crianças e adolescentes. Embora o tratamento quimioterápico seja realizado com a combinação de fármacos, como doxorrubicina (DOX), cisplatina (CIS) e metotrexato (MTX), os pacientes desenvolvem com frequência metástases e recidiva. A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um processo no qual as células epiteliais sofrem alterações bioquímicas, assumindo o fenótipo de células mesenquimais, que pela maior capacidade migratória e maior potencial de invasão está relacionada com o desenvolvimento de metástases. O objetivo geral deste estudo foi investigar a ocorrência de metástase em pacientes portadores de osteossarcoma e avaliar o efeito do tratamento quimioterápico *in vitro* sobre processos celulares relacionados com a metástase. Especificamente, analisamos (i) o momento da ocorrência da metástase em pacientes portadores de osteossarcoma em relação ao tratamento quimioterápico; (ii) a expressão de biomarcadores de EMT (E-caderina, claudina-1, zona ocludina (ZO-1), snail, N-caderina,  $\beta$ -catenina, slug e vimentina) em células primárias de osteossarcoma isoladas de seis pacientes antes e após o tratamento quimioterápico e (iii) o efeito *in vitro* de agentes farmacológicos utilizados em protocolos de quimioterapia do osteossarcoma sobre a expressão dos biomarcadores de EMT e sobre a migração celular em culturas primárias estabelecidas a partir de amostras tumorais. As metástases ocorreram em 57,5% dos pacientes, sendo que dentre estes em 73,7% ocorreu na vigência do tratamento quimioterápico. A identidade óssea das culturas primárias foi conferida pela expressão de osteoprotegerina. Não houve diferença na expressão dos marcadores de EMT antes e depois da quimioterapia. Embora sem significância estatística, houve redução na expressão do marcador snail, E-caderina e ZO-1. Os marcadores mesenquimais ( $\beta$ -catenina, slug) e epitelial (claudina-1) permaneceram estáveis ou aumentaram ligeiramente (N-caderina e vimentina) depois da quimioterapia. No experimento *in vitro* a maior expressão de N-caderina e de vimentina ocorreu nas células tratadas simultaneamente com todos os agentes. A maior expressão de snail e slug foi observada na exposição isolada ao metotrexato. A expressão de  $\beta$ -catenina não diferiu entre os diferentes tratamentos. Embora os resultados do presente estudo não nos permitam avançar no conhecimento sobre os mecanismos que controlam e regulam a evolução clínica do osteossarcoma, acreditamos que demos o passo inicial no sentido de definir marcadores, que potencialmente possam ser utilizados na caracterização biológica das diversas variantes do osteossarcoma e, desta forma, atuar com maior precisão no acompanhamento clínico e biológico da doença.

Palavras chaves: Osteossarcoma. Transição epitélio-mesenquimal. Metástase. Sarcomas. Quimioterapia.

## ABSTRACT

LOPES, Ana Cristina de Sá. Evaluation of chemotherapy effect on cellular events related to metastasis in osteosarcoma. Rio de Janeiro, 2015. Master Thesis. (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health, 2015.

Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumor and affects mainly the bones of the lower limbs in children and adolescents. Although chemotherapy is carried out with a combination of drugs such as doxorubicin (DOX), cisplatin (CIS) and methotrexate (MTX), patients often develop metastasis and recurrence. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process in which epithelial cells undergo biochemical changes, assuming the phenotype of mesenchymal cell with higher migration ability and increased potential for invasion and thus, to the development of metastasis. The aim of this study was to investigate the occurrence of metastasis in patients with osteosarcoma and evaluate the *in vitro* effect of chemotherapy on cellular processes related to metastasis. Specifically, we analyzed (i) the time of occurrence of metastasis in patients with osteosarcoma in relation to chemotherapy; (ii) expression of EMT biomarkers (E-cadherin, claudin-1, occludin zone (ZO-1), snail, N-cadherin,  $\beta$ -catenin, slug and vimentin) in isolated osteosarcoma primary cells from six patients before and after chemotherapy and (iii) the *in vitro* effect of pharmacological agents used in chemotherapy protocols for osteosarcoma on the expression of EMT biomarkers and on cell migration both in primary cultures established from tumor samples. Metastasis occurred in 57.5% of patients and in 73.7% it took place during chemotherapy. Bone identity of primary cultures was conferred by osteoprotegerin expression. There was no difference in the expression of EMT markers before and after chemotherapy. Although not statistically significant, there was a reduction in the expression of markers snail, E-cadherin and ZO-1. The mesenchymal markers ( $\beta$ -catenin, slug) and epithelial marker claudin-1 remained stable or increased slightly (N-cadherin and vimentin) after chemotherapy. In the *in vitro* experiment, most N-cadherin and vimentin expression occurred in cells treated simultaneously with all agents. The greatest expression of snail and slug was observed in isolated exposure to methotrexate. The  $\beta$ -catenin expression did not differ between the different treatments. Although the results of this study do not allow us to advance in the knowledge about the mechanisms that control and regulate the clinical progression of osteosarcoma, we believe that we have taken the first step to define markers that may potentially be used in the biological characterization of the different variants of osteosarcoma and thus operate with greater precision in biological and clinical monitoring of the disease.

Keywords Osteosarcoma. Epithelial-mesenchymal-transition. Metastasis. Sarcomas. Chemotherapy.

## SUMÁRIO

---

<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 Epidemiologia do osteossarcoma.....	15
1.2 Etiopatogenia .....	16
1.3 Topografia do osteossarcoma.....	17
1.4 Apresentação clínica .....	19
1.5 Diagnóstico do osteossarcoma.....	20
1.6 Aspectos radiográficos do osteossarcoma.....	21
1.7 Aspectos tomográficos do osteossarcoma.....	22
1.8 Aspecto do osteossarcoma em imagens de ressonância magnética .....	23
1.9 Cintilografia óssea no osteossarcoma .....	24
1.10 Diagnóstico diferencial do osteossarcoma.....	25
1.11 Aspectos anatomo-patológicos do osteossarcoma .....	25
1.11.1 Osteossarcoma central intramedular.....	26
1.11.2 Osteossarcoma de pequenas células.....	27
1.11.3 Osteossarcoma telangiectásico.....	28
1.11.4 Osteossarcoma Central de Baixo Grau .....	28
1.11.5 Osteossarcoma parosteal ou osteossarcoma justacortical.....	29
1.11.6 Osteossarcoma periosteal ou osteossarcoma condroblástico justacortical.....	29
1.11.7 Osteossarcoma de superfície de alto grau .....	30
1.11.8 Índice de Huvos.....	33
1.12 Tratamento do osteossarcoma.....	34
1.12.1 Tratamento quimioterápico .....	35
1.12.1.1 Doxorrubicina.....	38
1.12.1.2 Cisplatina.....	39
1.12.1.3 Metotrexato.....	41
1.12.2 Tratamento cirúrgico.....	41
1.13 Metástases do osteossarcoma .....	44
1.14 Transição epitélio-mesenquimal.....	45
1.14.1 Transição Epitélio-mesenquimal no osteossarcoma .....	50
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>52</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
3.1 Objetivo Principal.....	53
3.2 Objetivos Específicos.....	53
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>54</b>
4.1 Aspectos éticos.....	54

<b>4.2</b>	<b>Pacientes e coleta das amostras .....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Amostra obtida por biópsia .....	55
4.2.2	Amostra obtida da peça cirúrgica .....	55
<b>4.3</b>	<b>Isolamento e Manutenção das Células Derivadas de Osteossarcoma .....</b>	<b>57</b>
4.3.1	Células primárias .....	57
4.3.2	Células de linhagem comercial .....	58
<b>4.4</b>	<b>Imunocitoquímica .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5</b>	<b>Ensaio de Migração Celular .....</b>	<b>59</b>
<b>4.6</b>	<b>Imunoblotting (Western blotting).....</b>	<b>61</b>
<b>4.7</b>	<b>Ensaio de Viabilidade Celular .....</b>	<b>62</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
5.1	Avaliação da ocorrência de metástase em pacientes com osteossarcoma.....	64
5.2	Avaliação de resposta ao tratamento quimioterápico .....	64
5.3	Caracterização das amostras primárias .....	68
5.4	Viabilidade das células primárias sob tratamento com agentes quimioterápicos <i>in vitro</i> .....	70
5.5	Análise da expressão de biomarcadores de transição epitélio-mesenquimal em células primárias de osteossarcoma antes e após a quimioterapia .....	71
5.6	Efeito dos agentes quimioterápicos sobre a migração de células primárias de osteossarcoma .....	78
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>97</b>
	Anexo I. Parecer da Comissão de Ética do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia.....	97
	97	
	Anexo II. Parecer da Comissão de Ética do Instituto Nacional do Câncer.....	98
	98	
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>99</b>
	Apêndice I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	99
	Apêndice II. Termo do responsável .....	101
	Apêndice III. Características clínicas dos pacientes portadores de osteossarcoma.....	103

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

ABCB1	Multidrug resistance protein 1
ABCC1	Multidrug resistance associated protein 1
AMF	Fatores autócrinos de motilidade
ARAC	Arabinofuranosideo
ATP	Trifosfato de adenosina
BLM	Blomm Syndrome, ReQ Helicase-like
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CICLO	Ciclofosfamida
CIS	Cisplatina
CTR	Transportador de cobre
CTT	Células-tronco tumorais
CXCLA	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4
CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCR4	Chemokine Receptor Type 4
CXCR7	Chemokine Receptor Type 7
DEX	Dexrazoxane
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium com nutriente F-12
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EMT-TF	Fatores de transcrição de transição epitélio-mesenquimal
ERCC1	Excision repair cross-complementation group 1
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GPX1	Glutathione peroxidase
GSTM1	Enzima glutathione S transferase
GSTP1	Glutathione S-transferase P
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible Factor 1- Alpha
hTERT	Enzima transcriptase reversa da telomerase
IRF-8	Interferon regulatory factor 8
MEC	Matriz extracelular
MET	Mesenchymal-epithelial transition
MLH-1	DNA mismatch repair protein 1
MSC	Mesenchymal stem cell
MSH2	MutS protein homolog 2
MTHDF2	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> dependent)2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
MTX	Metotrexato
MUC1	Mucina 1
NF $\kappa$ B	Kappa Nuclear Factor of B- Cells 2
NOS3	Óxido nítrico sintase

NQO1	NADH desidrogenase
OS	Osteossarcoma
OS-QT	Osteossarcoma pós-quimioterapia
P62	Nucleoporin p62
PBS	Tampão Salino de Fosfato
PFA	Paraformaldeido
PVDF	Difluoreto de Polivinildieno
QT	Quimioterapia
RALBP1	RalA-binding protein 1
RB	Retinoblastoma
RECQL4	ATP-dependent DNA helicase Q4
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
SOD1	Superóxido dismutase
SQSTM1	Sequestosome 1
TC	Tomografia computadorizada
TBS-T	Solução tampão salino de Tris – Tween
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TIM-3	T cell Ig- and mucin- domain-containing molecules
TNF	Fator de necrose tumoral
TOP2A	Topoisomerase – II
TP53	Tumor protein p53
VDR	Receptor de vitamin D
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
XDH	Xantina desidrogenase
XPA	Xeroderma pigmentosum, Complementation group A
Wnt	Wnt signalling pathway
WRN	Werner Syndrome, RecQ Helicase-like
ZO-1	Zona occludens tight junction protein 1

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1-1 Esquema ilustrando as regiões anatômicas dos ossos longos. ....	18
Figura 1-2 Aspectos clínicos do osteossarcoma. ....	20
Figura 1-3 Apresentação radiográfica do osteossarcoma. ....	22
Figura 1-4 Tomografia computadorizada do osteossarcoma. ....	23
Figura 1-5 Ressonância magnética de paciente com osteossarcoma telangiectásico. .....	24
Figura 1-6 Cintilografia óssea em osteossarcoma. ....	25
Figura 1-7 Aspectos anatomo-patológicos das variantes do osteossarcoma.....	32
Figura 1-8 Esquema do mapeamento da peça cirúrgica para análise do Índice de Huvos no osteossarcoma. ....	34
Figura 1-9 Diagrama esquemático do mecanismo de ação da doxorubicina (DOX) sobre as células neoplásicas.....	39
Figura 1-10 Diagrama esquemático do mecanismo de ação da cisplatina (CIS). esenrolamento da dupla-hélice que resultam na inibição da replicação do DNA, eventualmente desencadeando apoptose.....	40
Figura 1-11 Diagrama esquemático do mecanismo de ação do metotrexato (MTX).. .....	41
Figura 1-12 Algoritmo de decisão no tratamento de pacientes com osteossarcoma.	43
Figura 1-13 Esquema ilustrando o processo da metástase. ....	44
Figura 1-14 Transição epitélio mesenquimal (EMT).....	49
Figura 4-1 Procedimento de coleta de amostras durante a biópsia e a ressecção tumoral. ....	56
Figura 4-2 Amostra de tecido tumoral. ....	56
Figura 4-3 Esquema do ensaio de migração celular. ....	59
Figura 4-4 Desenho esquemático do tratamento das células para ensaio de migração em placa com 24 poços.....	60
Figura 4-5 Desenho experimental do ensaio de migração. ....	61
Figura 5-1 Topografia e tipo histológico das lesões. ....	66
Figura 5-2 Marcação por imunocitoquímica para osteoprotegerina em células primárias de osteossarcoma (OS1 a OS4).....	69

Figura 5-3 Marcação por imunocitoquímica para osteoprotegerina em células primárias (OS5 e OS6) e linhagens (MG63 e Saos2) de osteossarcoma. ....	70
Figura 5-4 Efeito dos quimioterápicos sobre a viabilidade de células primárias de osteossarcoma.....	71
Figura 5-5 Efeito da quimioterapia sobre a expressão de marcadores mesenquimais em células primárias de osteossarcoma. ....	73
Figura 5-6 Efeito da quimioterapia sobre a expressão de marcadores epiteliais em células primárias de osteossarcoma. ....	74
Figura 5-7 Efeito <i>in vitro</i> de agentes quimioterápicos sobre a expressão dos marcadores mesenquimais snail (A), N-caderina (B) e $\beta$ -catenina (C) em células primárias de osteossarcoma. ....	76
Figura 5-8 Efeito <i>in vitro</i> de agentes quimioterápicos sobre a expressão dos marcadores mesenquimais slug (A) e vimentina (B) em células primárias de osteossarcoma.....	77
Figura 5-9 Efeito <i>in vitro</i> de agentes quimioterápicos sobre a expressão de marcadores epiteliais em células primárias de osteossarcoma.....	77
Figura 5-10 Ensaio de migração celular.....	79
Figura 5-11 Efeito da quimioterapia sobre a migração de células primárias de osteossarcoma.....	79

## LISTA E TABELAS

---

**Tabela 5-1 Características clínicas e do tratamento quimioterápico dos pacientes portadores de osteossarcoma incluídos nos experimentos in vitro.67**

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Epidemiologia do osteossarcoma

As doenças neoplásicas malignas ocupam o segundo lugar no Índice de Mortalidade do Brasil, sendo superadas apenas pelas doenças cardiovasculares (CAMARGO, 2012). Os tumores ósseos primários constituem de 0,7% a 3% das neoplasias (DAMRON *et al.*, 2007; EYRE *et al.*, 2010), sendo que os tumores ósseos malignos têm incidência anual de 8,7 pacientes em 1 milhão de pacientes com menos de 20 anos. Os tumores malignos do osso constituem a terceira neoplasia mais frequente em adolescentes e adultos jovens (LINK, 2002; PETRILLI *et al.*, 2006).

O osteossarcoma foi descrito pela primeira vez em 1805 por Dupuytren (JADÃO *et al.*, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é definido como “tumor ósseo maligno caracterizado pela formação direta de osso ou osteóide através da proliferação de células tumorais” (WHO, 2013).

O osteossarcoma é a oitava neoplasia maligna mais comum em crianças e adolescentes, sendo precedido pelas leucemia (30%), pelos tumores do sistema nervoso central (22,3%), pelo neuroblastoma (7,3%), pelo tumor de Wilms (5,6%), pelo linfoma não Hodgkin (4,5%), pelo rabdomiossarcoma (3,1%) e pelo retinoblastoma (2,8%) (OTTAVIANI e JAFFE, 2009). Dentre os tumores ósseos, o osteossarcoma é o tumor maligno primário mais comum, representando aproximadamente 20% de todos os sarcomas e 55% dos tumores ósseos malignos em crianças e adolescentes (DAMRON *et al.*, 2007; MIRABELLO *et al.*, 2009). Em todas as idades, o gênero masculino é mais acometido do que o feminino na proporção de 1,5:1 (LONGHI *et al.*, 2005), devido ao maior crescimento em estatura,

período mais longo do crescimento e pela presença de maior volume de tecido em crescimento nos homens (FUCHS e PRITCHARD, 2002).

Na distribuição por faixa etária, são observados dois picos de incidência. O primeiro, e mais frequente, é o clássico, que ocorre na segunda década de vida (MIRABELLO *et al.*, 2009), e que está relacionado ao rápido crescimento ósseo. O segundo pico de incidência ocorre em indivíduos em torno de 60 anos de idade devido ao osteossarcoma secundário à doença de Paget ou à radioterapia (MIRABELLO *et al.*, 2009). A taxa de incidência varia conforme a faixa etária. Até 24 anos, a ocorrência é de 4,4 casos em um milhão de pessoas, na faixa etária de 25 a 59 anos é de 1,7 casos e acima dos 60 anos a taxa aumenta novamente para 4,2 (WHO,2013). Na faixa etária acima de 60 anos, metade dos casos de osteossarcoma estão relacionados com a transformação maligna da doença de Paget (WHO, 2013).

O osteossarcoma induzido por radiação ionizante representa 2,7 - 5,5% de todos os osteossarcomas (WHO, 2013). O intervalo entre a radiação e o diagnóstico do sarcoma pode variar de 1 a 55 anos, com maior incidência em mulheres com mais de 40 anos (UNNI e INWARDS, 2013). Raramente o osteossarcoma associa-se a outras doenças, tais como displasia fibrosa, cisto ósseo simples e tumor lipoesclerosante mixofibroso ou ainda induzido por metalose (WHO, 2013).

## **1.2 Etiopatogenia**

O mecanismo de desenvolvimento do osteossarcoma é complexo e a etiopatogenia exata ainda é desconhecida. Em crianças e adolescentes, o desenvolvimento do osteossarcoma está associado à maior taxa de proliferação celular na região de crescimento ósseo, o que sugere que fatores de crescimento

possam ter papel importante na sua etiopatogenia (LONGHI *et al.*, 2005).

A célula tronco-mesenquimal (MSC, do inglês *mesenchymal stem cell*) está relacionada com a gênese dos tumores ósseos, sendo possível que eles se originem a partir de mutações nessas células (VISVADER, 2011). No osteossarcoma, os dados que sustentam essa hipótese são provenientes de estudos *in vitro* (XIAO *et al.*, 2013) e de estudos com modelos animais transgênicos (LIN *et al.*, 2009).

Por outro lado, existem evidências em murinos de que células da linhagem osteoblástica em diferentes estágios de diferenciação, e não as MSC, sofrem mutações e dão origem às células tumorais (MUTSAERS e WALKLEY, 2014). Osteoblastos primários de origem humana foram capazes de gerar células tumorais após superexpressão de determinado oncogene PATANE *et al.* (2006). Em outro estudo, as MSC derivadas da medula óssea foram capazes de formar tumores apenas quando foi induzida a diferenciação osteogênica, sugerindo que os progenitores osteogênicos, mais do que as MSC indiferenciadas, são as células que originam o osteossarcoma (RUBIO *et al.*, 2013). Os osteócitos também já foram implicados no desenvolvimento do osteossarcoma (SOTTNIK *et al.*, 2014).

Síndromes genéticas hereditárias associadas às mutações em genes supressores de tumor também já foram associadas ao desenvolvimento do osteossarcoma (CALVERT *et al.*, 2012). Dentre elas, a síndrome de Rothmund-Thomson, a síndrome de Bloom, o retinoblastoma hereditário, a síndrome de Werner e a síndrome de Li-Fraumeni (CALVERT *et al.*, 2012).

### **1.3 Topografia do osteossarcoma**

O osteossarcoma acomete a metáfise dos ossos longos em 90% dos pacientes, em 9% acomete a diáfise e em 1% a epífise (KUNDU, 2014) (Figura 1-1).

A predileção pela região metafisária está relacionada com a placa de crescimento, onde ocorre rápida proliferação celular (WHO, 2013). Com a progressão da doença e o crescimento do tumor, ocorre destruição da placa epifisária e invasão da epífise (JESUS-GARCIA, 2013).

A relação entre o rápido crescimento ósseo durante a puberdade e o desenvolvimento de osteossarcoma já foi descrita (COTTERILL *et al.*, 2004). A altura é apontada como o fator de risco mais importante dentre diversos fatores, como idade, idade gestacional, idade à puberdade, história familiar, massa corporal, peso, malformações ao nascer e exposição pré-natal à radiação (GELBERG *et al.*, 1997). A articulação do joelho, composta pelo fêmur distal (30%) e tíbia proximal (15%), é a região mais acometida, seguida pelo úmero proximal (15%) (LINK, 2002; CAMARGO,2012). Em pacientes mais velhos, o osteossarcoma pode se desenvolver na mandíbula, pelve e coluna. O acometimento de ossos curtos de extremidades é raro (WHO, 2013).

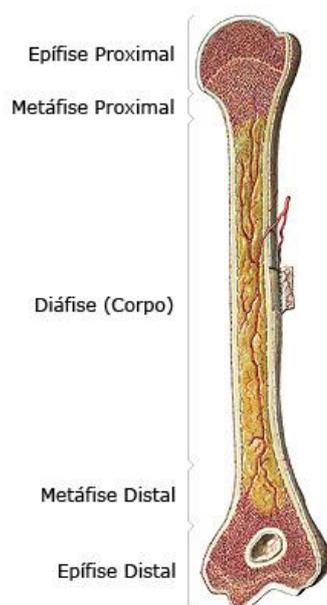


Figura 1-1 Esquema ilustrando as regiões anatômicas dos ossos longos.

#### **1.4 Apresentação clínica**

As manifestações clínicas dos tumores ósseos em adolescentes ativos geralmente são atribuídas a traumas. Embora a história de trauma quase sempre seja relatada, não desempenha papel na gênese da doença. O mais provável é que o trauma ocorra em uma área comprometida pelo tumor e transforme um tumor assintomático em sintomático (JESUS-GARCIA, 2013). Os principais sintomas são dor e aumento progressivo de volume local ou articular (ARNDT *et al.*, 2012). Com a progressão da doença, a massa tumoral torna-se palpável, mais dolorosa, podendo ter aumento da temperatura local e circulação colateral evidente (Figura 1-2) (WHO, 2013). Mesmo nos tumores muito volumosos, raramente existe comprometimento do estado geral do paciente. As fraturas patológicas não são frequentes, mas a sua presença pode comprometer o prognóstico devido a possibilidade de disseminação local do tumor. No entanto, a presença de fratura não modifica e não inviabiliza o protocolo de tratamento sistêmico (JESUS-GARCIA, 2013).



Figura 1-2 Aspectos clínicos do osteossarcoma. (A) Volumosa massa tumoral em coxa direita com a presença de veias dilatadas (circulação colateral). (B) Massa tumoral na perna direita evidenciando aumento de volume local. Fonte: arquivo pessoal.

### 1.5 Diagnóstico do osteossarcoma

O diagnóstico precoce do osteossarcoma é fundamental para o controle local da doença e o estabelecimento da melhor conduta terapêutica no sentido de aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes (CAMARGO, 2012; JADÃO *et al.*, 2013). Idealmente, o diagnóstico definitivo deve ocorrer até 21 dias após o início dos sintomas (BIELACK *et al.*, 2002).

A investigação diagnóstica é realizada por meio de exame radiográfico do local da lesão e de exames laboratoriais. Em 50% dos pacientes, os níveis séricos de fosfatase alcalina, que indica a atividade osteoblástica, estão elevados (JADÃO *et al.*, 2013). A avaliação bioquímica da fosfatase alcalina também pode ser utilizada no acompanhamento evolutivo da doença, uma vez que valores séricos aumentados após a ressecção tumoral e quimioterapia podem indicar a presença de doença metastática ou de recidiva (SCHAJOWICZ, 2000).

A gravidade do osteossarcoma é determinada através do estadiamento inicial que é realizado por meio de exames de imagem do tumor (radiografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética), tomografia computadorizada de tórax e cintilografia óssea, que auxiliam na avaliação da extensão da lesão e a presença de metástases (UNNI e INWARDS, 2013).

## **1.6 Aspectos radiográficos do osteossarcoma**

A apresentação radiográfica do osteossarcoma é variável e depende do grau de ossificação e calcificação tumoral. Os tumores podem ser completamente líticos ou predominantemente escleróticos, dependendo do tipo histológico, mas em geral apresentam uma combinação dessas duas características (UNNI e INWARDS, 2013). Os tumores predominantemente osteoblásticos apresentam áreas de osso esclerótico conferindo o aspecto mais característico do osteossarcoma (Figura 1-3A). A presença de reação periosteal espiculada, irradiando perpendicularmente com padrão “cabelo em pé” ou a partir de um ponto central, com uma aparência típica de “raios de sol” (Figura 1-3B e 1-3C) é altamente sugestiva de osteossarcoma. Frequentemente o osteossarcoma é representado por lesão central destrutiva com bordos irregulares que gradualmente destrói o osso cortical e invade as partes moles (Figura 1-3C). Em alguns casos o crescimento tumoral pode induzir a formação óssea entre o periósteo e a cortical subjacente, principalmente em crianças e adolescentes que apresentam o periósteo espessado, gerando uma imagem designada de “triângulo de Codman” (Figura 1-3C e 1-3D) (KUNDU, 2014). Outros aspectos radiográficos característicos do osteossarcoma são as áreas de lise e de degeneração cística nas lesões telangiectásicas (Figura 1-3E), focos de calcificação e de mineralização (Figura 1-3F). A destruição óssea pode estar limitada

à cavidade medular mas, em geral, também envolve a cortical, que na maioria dos casos, está rompida (JESUS-GARCIA, 2013). Estes achados radiográficos são frequentes, mas não são patognomônicos do osteossarcoma. Podem ser observados vários graus de densidade dentro do tumor, dependendo da produção de matriz osteóide calcificada e ossificada (KUNDU, 2014).

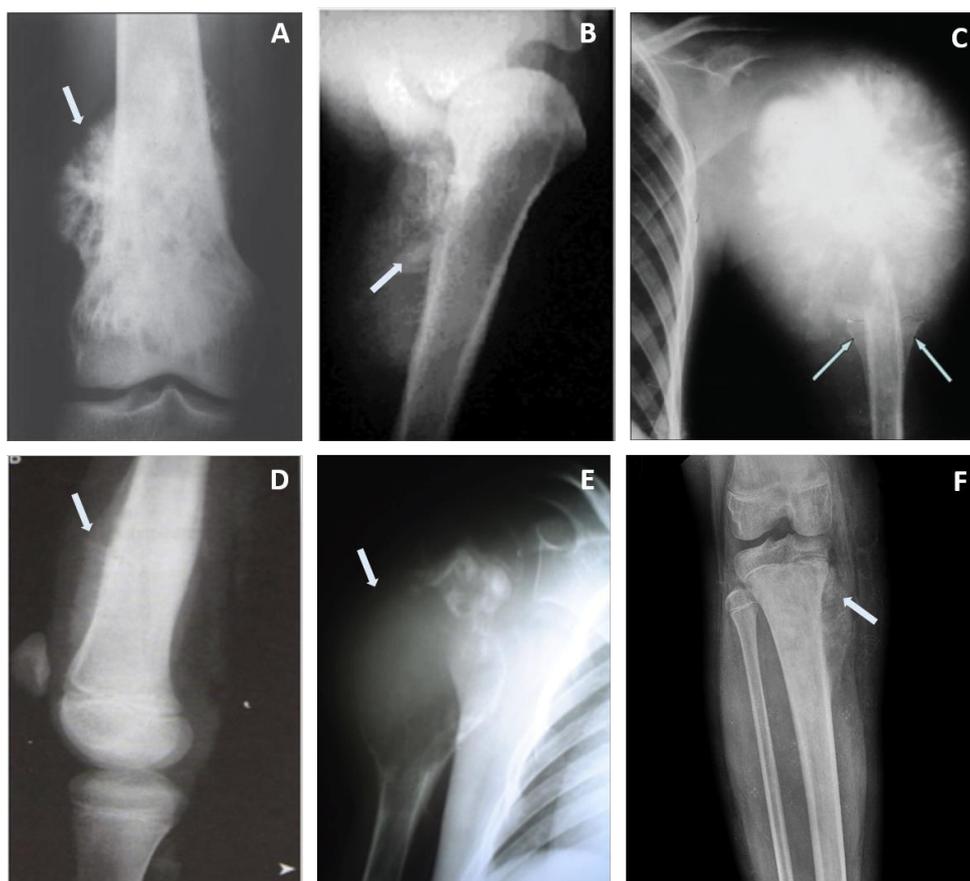


Figura 1-3 Apresentação radiográfica do osteossarcoma. (A) Radiografia do terço distal do fêmur mostrando aspecto típico do osteossarcoma com área de esclerose caracterizada pela produção de osso (seta). (B) Radiografia do terço proximal do úmero ilustrando o aspecto de “raios de sol” (seta). (C) Radiografia do terço proximal do úmero evidenciando aspecto de raios de sol e “triângulo de Codman” (seta). (D) Radiografia em perfil do terço distal do fêmur mostrando reação periosteal (seta). (E) Radiografia do terço proximal do úmero mostrando o aspecto lítico no osteossarcoma telangiectásico (seta). (F) Radiografia do terço proximal da tíbia exibindo focos de calcificação (seta). Fonte: arquivo pessoal.

## 1.7 Aspectos tomográficos do osteossarcoma

A tomografia computadorizada (TC) é um importante exame na avaliação da

destruição e da produção óssea por neoformação reacional ou neoplásica. O grau de extensão tumoral extra-óssea e a relação do tumor com as partes moles são demonstrados com precisão pela TC (MUHEREMU e NIU, 2015) (Figura 1-4). No paciente com osteossarcoma, a TC deve ser realizada de todo o osso acometido e do tórax para identificação de metástases. A TC realizada com reconstrução tridimensional é útil na avaliação dos tumores localizados na coluna, bacia e região escapular, facilitando a programação da abordagem cirúrgica e do planejamento de reconstrução (JESUS-GARCIA, 2013).

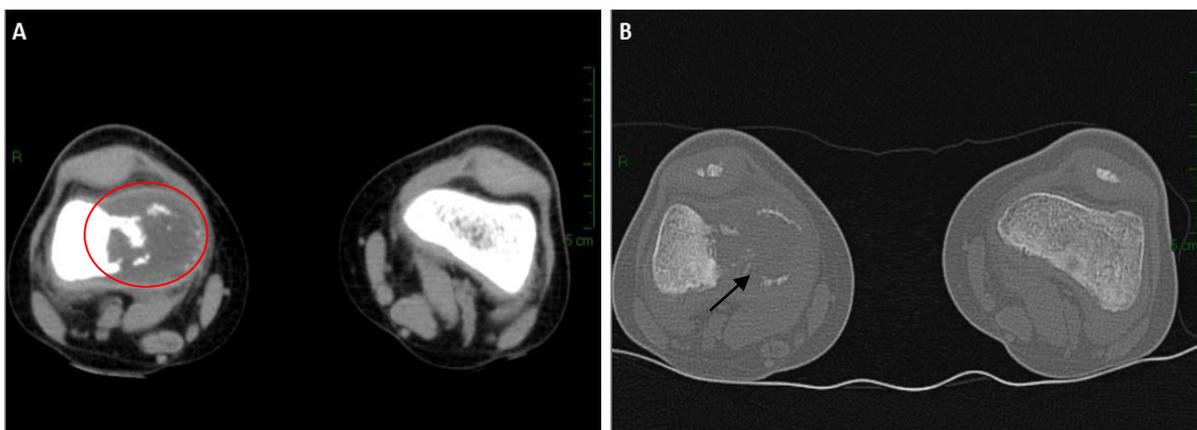


Figura 1-4 Tomografia computadorizada do osteossarcoma. (A) Aspecto característico de destruição óssea (círculo vermelho) (B) Ruptura do osso cortical e invasão para partes moles (seta). Fonte: arquivo pessoal.

### 1.8 Aspecto do osteossarcoma em imagens de ressonância magnética

A ressonância magnética (RM) é um dos exames mais importantes no diagnóstico do osteossarcoma. Quando analisada em conjunto com a TC, contribui para a avaliação tridimensional do tumor (Figura 1-5). A RM inclui imagens axiais e um conjunto de imagens longitudinais nos planos sagital ou coronal, ponderadas basicamente em T1 e T2, permitindo determinar com precisão o tamanho do tumor e a sua localização. O exame é de grande valor no diagnóstico da invasão das partes

moles, na avaliação do comprometimento intramedular, na invasão da placa de crescimento e da epífise e para avaliar o comprometimento do feixe neurovascular (HOLSCHER *et al.*, 1992; MORLEY e OMAR, 2014). Devido à superioridade das imagens obtidas pela RM em relação aos outros exames de imagem, o exame é considerado fundamental para o estadiamento e planejamento cirúrgico do osteossarcoma (GILLESPIY *et al.*, 1988; FOX e TROTTA, 2013).

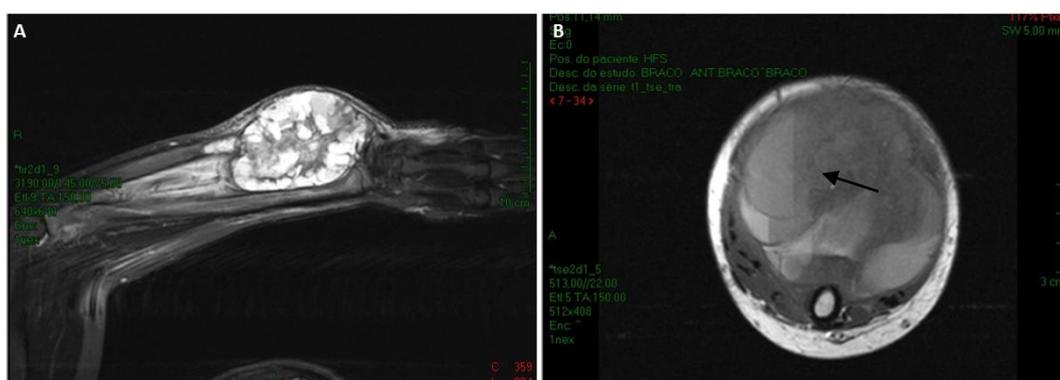


Figura 1-5 Ressonância magnética de paciente com osteossarcoma telangiectásico. (A) Massa tumoral comprometendo o terço distal da ulna com invasão de partes moles adjacentes. (B) Presença de nível líquido (seta) no interior da massa tumoral característico do osteossarcoma telangiectásico. Fonte: arquivo pessoal.

### 1.9 Cintilografia óssea no osteossarcoma

A cintilografia óssea com tecnécio- 99m evidencia regiões do esqueleto com atividade osteogênica e vascularização aumentadas (Figura 1-6). É um exame importante para o diagnóstico de extensão tumoral intra-óssea, fornecendo informações sobre a sua agressividade biológica. A cintilografia óssea também auxilia na detecção de metástases em outras regiões onde haja produção óssea, metástases salteadas, principalmente em fase inicial, especialmente de pequenas dimensões não identificadas na radiografia simples e TC (JESUS-GARCIA, 2013; MORLEY e OMAR, 2014).

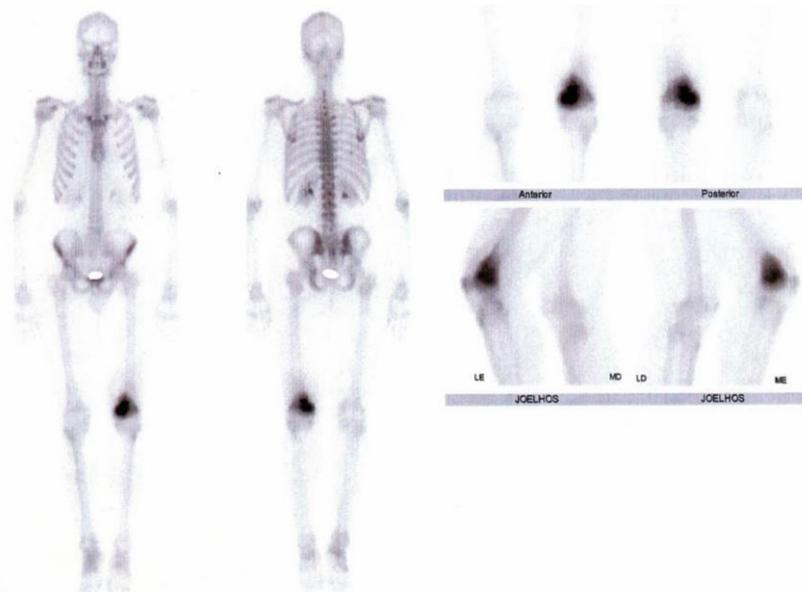


Figura 1-6 Cintilografia óssea em osteossarcoma. Lesão localizada no joelho evidenciando o aumento da captação do contraste na extremidade distal do fêmur esquerdo, identificando a localização e a extensão da massa tumoral. Fonte: arquivo pessoal.

### 1.10 Diagnóstico diferencial do osteossarcoma

Diversas lesões ósseas benignas e malignas são consideradas no diagnóstico diferencial clínico-radiográfico com o osteossarcoma. Dentre as lesões benignas estão incluídas o calo ósseo, a osteomielite subaguda, a miosite ossificante ativa, o cisto ósseo aneurismático e o granuloma eosinofílico. Dentre as lesões malignas estão incluídos o tumor de Ewing, o fibrossarcoma e o carcinoma metastático (JESUS-GARCIA, 2013). Pelo fato dessas lesões poderem ser similares sob o ponto de vista radiológico e histopatológico é extremamente importante para o estabelecimento do diagnóstico diferencial, a correlação entre os aspectos patológicos, radiológicos e clínicos, denominada como Tríade de Jaffé (MEOHAS, 2004).

### 1.11 Aspectos anatomo-patológicos do osteossarcoma

Apesar do osteossarcoma apresentar diversos aspectos macroscópicos e

diferentes padrões histológicos (Figura1-7), a presença de matriz osteóide tumoral é condição essencial para o seu diagnóstico (WHO, 2013).

A classificação histológica do osteossarcoma é fundamental para a definição da conduta terapêutica (FIGUEIREDO *et al.*, 2013). Os tumores são classificados de acordo com sua localização em centrais e de superfície e subdivididos em tipos histológicos conforme o predomínio do tipo celular. Os osteossarcoma centrais são subdivididos em intramedular central de alto grau ou clássico central, de pequenas células (1,5%), telangiectásico (4%) e central de baixo grau (1-2%). O osteossarcoma clássico central tipo osteoblástico é o mais frequente (50%) seguido pelos tipos condroblástico (25%) e fibroblástico (25%). Os osteossarcomas de superfície são menos frequentes e são subdivididos em parosteal ou justacortical (4%), periosteal ou condroblástico justacortical (2%) e de superfície de alto grau (1%) (WHO, 2013).

#### 1.11.1 Osteossarcoma central intramedular

O osteossarcoma clássico central pode apresentar superfície branca-acinzentada, avermelhada ou cinza-azulada. A consistência pode ser mole com massas duras de material fibroso ou cartilaginoso de permeio e com quantidades variáveis de calcificação e zonas irregulares de ossificação. Eles formam, frequentemente, massas escleróticas densas que ocupam a porção mais central do tumor. As áreas de hemorragias, necrose e degeneração cística podem ser extensas e, em geral, o tumor não se estende pela cavidade medular. Microscopicamente o tumor é constituído por massas celulares compactas, com acentuado grau de anaplasia. As células em geral possuem núcleos bizarros, hipercromáticos, nucléolos proeminentes, com figuras de mitose e atípicas evidentes. As células com

vários núcleos pleomórficos, hipercromáticos ou bizarros são frequentes (células gigantes malignas). Além da deposição de matriz osteóide pelos osteoblastos neoplásicos, em algumas regiões do tumor pode ser observada a formação tumoral de outros tecidos mesenquimais como cartilagem, tecido fibroso e mixóide (SCHAJOWICZ, 2000; WHO, 2013).

#### 1.11.2 Osteossarcoma de pequenas células

Este tipo de osteossarcoma tem localização intramedular metafisária e apresenta coloração branco-acinzentada, com aspecto de massa arenosa. Os achados macroscópicos do osteossarcoma de pequenas células são indistinguíveis do osteossarcoma central. Microscopicamente a lesão é constituída por células pequenas, com núcleos pequenos e ovais e com citoplasma escasso, associado à produção de osteóide. Com menor frequência este tipo tumoral apresenta células fusiformes, com núcleos ovais pequenos, e nucléolos pouco evidentes (SCHAJOWICZ, 2000; WHO, 2013).

### 1.11.3 Osteossarcoma telangiectásico

O osteossarcoma telangiectásico se caracteriza por ser uma lesão hemorrágica multicística, preenchida por coágulos sanguíneos, classicamente descritos como “bolsa de sangue”. Em geral existe extensa erosão e destruição da cortical associada com o envolvimento de partes moles. Microscopicamente o tumor é composto por espaços císticos com áreas de anaplasia celular, frequentemente associadas a células gigantes multinucleadas do tipo osteoclasto e com células gigantes neoplásicas com alto grau de atipia. Os septos que separam os espaços císticos contém células pleomórficas com núcleos hipercromáticos com figuras de mitose atípica frequentes que também podem ser encontradas nas áreas hemorrágicas. A formação de osteóide geralmente é focal e confluenta (SCHAJOWICZ, 2000; WHO, 2013).

### 1.11.4 Osteossarcoma Central de Baixo Grau

Macroscopicamente o osteossarcoma central de baixo grau é um tumor com superfície branco-acinzentada e textura firme e arenosa, que se origina na cavidade medular. Pode apresentar destruição da cortical com ou sem extensão para as partes moles. Microscopicamente o tumor é hipo ou moderadamente celular, caracterizado pela proliferação fibroblástica relacionada com quantidades variáveis de matriz osteóide. As células fusiformes são organizadas em fascículos ou em feixes entrelaçados que permeiam a cortical e o osso esponjoso. O aspecto geral é de um tecido fibro-ósseo, com poucas atipias celulares e poucas figuras de mitose. O padrão da produção óssea é variado e, em geral, é irregular com trabéculas

ósseas simulando o aspecto de displasia fibrosa (SCHAJOWICZ, 2000; WHO, 2013).

#### 1.11.5 Osteossarcoma parosteal ou osteossarcoma justacortical

O osteossarcoma parosteal ou justacortical é representado por uma massa lobulada dura de natureza primariamente óssea, com tamanhos variáveis e limites bem definidos. Na região periférica, pode apresentar áreas constituídas por tecido fibro-cartilagenoso. A maior parte do tumor é ossificada e compacta tendendo a ser mais esclerótica na base. Microscopicamente, a lesão é constituída por estroma fibroso composto por células fusiformes pouco pleomórficas e poucas figuras de mitoses, relacionado com fibras colágenas. A extensa formação óssea apresenta padrão trabeculado bem organizado, constituída por osso imaturo em diferentes fases de maturação. Os osteoblastos que circundam as trabéculas ósseas têm morfologia fusiforme, podendo exibir núcleos pleomórficos e hipercromáticos claramente malignos (SCHAJOWICZ, 2000; WHO, 2013).

#### 1.11.6 Osteossarcoma periosteal ou osteossarcoma condroblástico justacortical

O osteossarcoma periosteal ou condroblástico justacortical se caracteriza macroscopicamente por ser uma lesão lobulada e acinzentada pelo predomínio de matriz cartilaginosa. A base do tumor é mais firme devido às áreas de calcificação e ossificação e, particularmente, tem pouco ou nenhum envolvimento da cortical subjacente ou da cavidade medular. A superfície externa é bem delimitada do tecido circunjacente por uma pseudocapsula, resultante do espessamento periosteal e de fibrose reacional. Microscopicamente se caracteriza pela proliferação de células

cartilagenosas atípicas, ocasionalmente com focos de matriz mixóide. As áreas onde há deposição de matriz osteóide tumoral se assemelham ao osteossarcoma de grau intermediário (SCHAJOWICZ, 2000; WHO, 2013).

#### 1.11.7 Osteossarcoma de superfície de alto grau

O osteossarcoma de superfície de alto grau se localiza na superfície da cortical óssea, onde causa erosão. A consistência do tumor pode ser variável dependendo do predomínio osteoblástico, fibroblástico ou condroblástico. O tumor compromete as partes moles adjacentes formando uma massa lobulada circunscrita. Microscopicamente exhibe o mesmo aspecto histológico do osteossarcoma central, com um grau da atipia celular maior do que o osteossarcoma periosteal (SCHAJOWICZ, 2000; WHO, 2013).

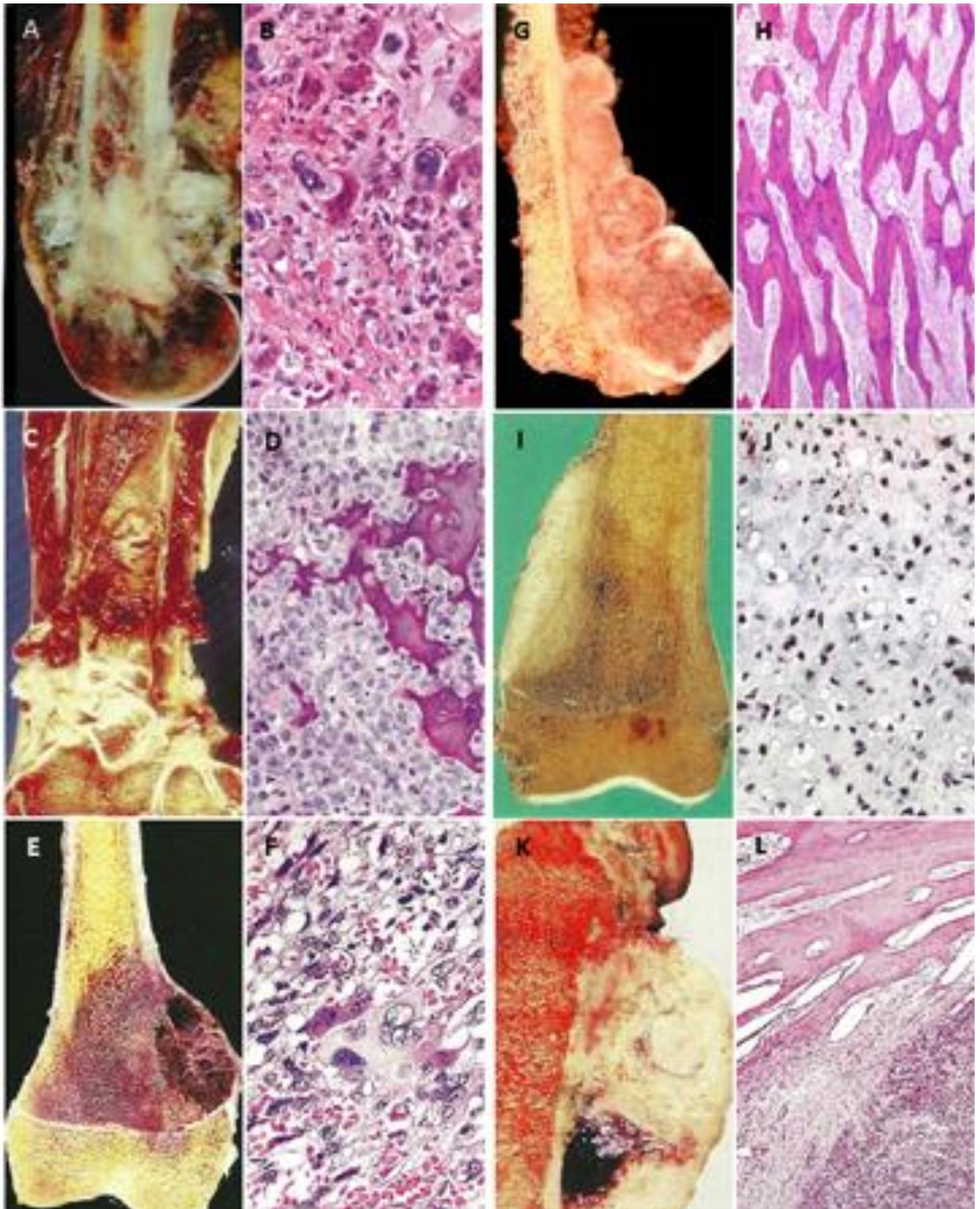


Figura 1-7 Aspectos anatomo-patológicos das variantes do osteossarcoma. *Osteossarcoma central intramedular* apresentando destruição da cortical e comprometimento das partes moles (A), e caracterizado pela proliferação de células malignas pleomórficas (B). *Osteossarcoma de pequenas células* localizado na metáfise distal da tíbia comprometendo as partes moles adjacentes ao tumor (C) e caracterizado histologicamente pela proliferação de células neoplásicas pequenas, redondas e com pouco citoplasma, relacionadas com a produção de matriz osteóide parcialmente mineralizada (D). *Osteossarcoma telangiectásico* permeando a cavidade medular, com áreas císticas hemorrágicas (E) delimitadas por septos contendo células neoplásicas com alto grau de anaplasia (F). *Osteossarcoma parosteal* caracterizado por volumosa massa tumoral esclerótica restrita a região justacortical, sem envolvimento da cavidade medular (G) se origina na camada externa do perióstio e é caracterizado pela formação de trabéculas ósseas com bom nível de organização em associação com células fusiformes neoplásicas com baixo grau de atípia (H). *Osteossarcoma periosteal* localizado na superfície do fêmur distal entre a cortical e o perióstio (I) com componente cartilaginoso proeminente (J). *Osteossarcoma de superfície de alto grau* localizado na superfície óssea comprometendo as partes moles adjacentes e a cortical (K) onde se observa a infiltração de células neoplásicas de aspecto fusiforme (L).

#### 1.11.8 Índice de Huvos

A resposta ao tratamento quimioterápico do osteossarcoma é avaliada utilizando-se a graduação de Huvos (HUVOS, 1991), que quantifica na peça cirúrgica o índice de necrose das células tumorais após a quimioterapia (LEE *et al.*, 1993).

Para a avaliação do grau de necrose e definição do Índice de Huvos é necessário fazer o mapeamento da peça, em partes que serão analisadas individualmente (Figura 1-8) para determinar a porcentagem da extensão da necrose. Este percentual é dado pela média aritmética da soma de todas as partes examinadas e tem relação direta com a resposta ao tratamento quimioterápico.

Uma vez estabelecido o percentual de necrose, as lesões são estratificadas em grau I quando a necrose é mínima ou inexistente e o paciente é considerado como não tendo respondido ao tratamento quimioterápico; grau II quando a necrose atinge a 50-90% da área tumoral e o paciente é considerado como tendo respondido parcialmente ao tratamento; grau III quando a necrose compromete mais de 90% da área tumoral com identificação de células neoplásicas em focos isolados e grau IV quando a necrose compromete 100% da lesão não sendo mais evidenciadas células neoplásicas (BACCHI *et al.*, 2005).



Figura 1-8 Esquema do mapeamento da peça cirúrgica para análise do Índice de Huvos no osteossarcoma. (A) Peça cirúrgica de osteossarcoma seccionada no seu maior eixo. (B) A peça é fotografada para a confecção da grade de mapeamento. (C) Peça óssea seccionada conforme o mapeamento. (D) Fragmentos prontos para serem processados para análise histológica seguindo posicionamento do mapeamento. Fonte: arquivo pessoal.

### 1.12 Tratamento do osteossarcoma

Antes da década de 70, o tratamento do osteossarcoma consistia em ressecção cirúrgica do tumor e estava associado a uma taxa de sobrevida de 10-20%. Em 1976, Norman Jaffe publicou o primeiro estudo com a utilização de agentes quimioterápicos, principalmente o metotrexato em altas doses, em pacientes com osteossarcoma metastático, com elevação das taxas de sobrevida para mais de 30% após 5 anos (JAFFE, 1976). A partir de 1970, vários estudos randomizados mostraram que a associação da quimioterapia (QT) à cirurgia melhorou significativamente os índices de cura, aumentando a taxa de sobrevida para 75% em pacientes com osteossarcoma não metastático e para 25% em pacientes com doença metastática (SPRINGFIELD *et al.*, 1988; MERCURI *et al.*, 1991; BIELACK *et al.*, 2009; GUISE *et al.*, 2009; LEWIS, 2009; LI, X. *et al.*, 2011; JONES *et al.*, 2012; SCHWAB *et al.*, 2013; JAFFE, 2014). Apesar do progresso no tratamento com a associação da quimioterapia, a sobrevida de pacientes com doença metastática ainda é baixa. Nos últimos 40 anos, sem o advento de novos

fármacos quimioterápicos, a taxa de sobrevida é a mesma dos anos 70 (JAFFE, 2014).

Nas duas últimas décadas, houve um grande avanço nas técnicas cirúrgicas e na qualidade das próteses ortopédicas, representando uma importante contribuição para a qualidade de vida dos pacientes com osteossarcoma, que resultou na redução da necessidade de amputação. A sobrevida livre de doença em cinco anos aumentou de 36% em 1980 para 67% no período de 2000 a 2004. Da mesma forma, a taxa de cirurgia conservadora aumentou de 53% para 97% (AYERZA *et al.*, 2010). Atualmente o tratamento do osteossarcoma consiste na realização de quimioterapia nos períodos pré e pós cirúrgico, definidos respectivamente como neoadjuvante e adjuvante; e de cirurgia, com algumas variações dependendo do estadiamento clínico do paciente (YAN *et al.*, 2015).

#### 1.12.1 Tratamento quimioterápico

O termo quimioterapia se refere ao tratamento de doenças através do uso de substâncias químicas que atuam sobre o metabolismo celular. O gás mostarda, descrito no século XX, foi a primeira droga utilizada na quimioterapia do câncer. Na poliquimioterapia é feita a associação de vários fármacos citotóxicos que atuam com diferentes mecanismos de ação, e têm como objetivo atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular. Utilizar a ação sinérgica dos fármacos diminui o desenvolvimento de resistência e promove maior resposta por dose administrada. Esta associação de dose e tempo de administração define o esquema quimioterápico (JAFFE *et al.*, 2013). O tratamento quimioterápico do osteossarcoma é indicado para os tumores classificados histologicamente como de alto grau.

Os principais agentes quimioterápicos com eficácia estabelecida no tratamento do osteossarcoma são a doxorubicina (DOX), a cisplatina (CIS), ifosfamida associada a ciclofosfamida, etoposídeo e metotrexato (MTX) (MEYERS *et al.*, 2008). O tratamento do osteossarcoma se baseia principalmente na combinação desses fármacos, dependendo da malignidade da doença (MARINA *et al.*, 2009). A CIS é um agente alquilante polifuncional que atua sobre células tumorais em todas as fases do ciclo impedindo a replicação celular; o MTX é um agente que atua inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA, impedindo a multiplicação e a divisão celular; a DOX é um antibiótico com ação anti-tumoral e citotóxica que atua através da interação com o DNA inibindo a sua síntese e, conseqüentemente, o desenvolvimento tumoral e o etoposídeo é um inibidor da Topoisomerase tipo II, atua interferindo na transcrição e na replicação do DNA

A DOX e o MTX foram descritos no início da década de 70 (ANDO *et al.*, 2013) e a incorporação da DOX no protocolo de tratamento do osteossarcoma foi imediatamente aceita. O uso do MTX, no entanto, foi inicialmente discutido, posteriormente foi rejeitado e, por fim, incorporado em altas doses ao regime de tratamento. A combinação do MTX com outros fármacos se mostrou eficaz na eliminação de metástases pulmonares, aumentou os índices de salvamento de membros e a eficácia da radioterapia no tratamento paliativo e melhorou o controle dos tumores inoperáveis (ANDO *et al.*, 2013; JAFFE, 2014).

O tipo de tratamento empregado no osteossarcoma é um importante fator para o prognóstico. Em 1991, foi iniciado o primeiro estudo para pacientes com osteossarcoma utilizando a intensificação da DOX em cinco ciclos associada a CIS ou ifosfamida na fase pré-operatória, sem associação com altas doses de MTX e com cirurgia realizada na 15<sup>a</sup> semana. A quimioterapia adjuvante constituía de sete

ciclos de ifosfamida e etoposídeo alternando com CIS e etoposídeo. Em 1994, iniciou-se o segundo estudo, onde a única modificação do protocolo foi a diminuição da quimioterapia adjuvante para quatro ciclos, totalizando 26 semanas de tratamento. Em 1996, uma nova associação de drogas foi iniciada, enfatizando o período neoadjuvante e intensificando o uso de compostos da platina. Foram associadas duas drogas, uma cardioprotetora (dexrazone) para suprimir os efeitos colaterais provenientes da infusão rápida da DOX e a outra, amifostine, para minimizar os efeitos nefrotóxicos e ototóxicos da CIS (FERMAN, 2010).

No Brasil, de acordo com o protocolo do Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento de Osteossarcoma (GCBTO), após a confirmação diagnóstica do osteossarcoma e estadiamento do paciente, a quimioterapia neoadjuvante é realizada por dez semanas. A cirurgia ocorre na décima primeira ou décima segunda semana, prazo este que pode ser estendido nos casos em que o paciente não apresenta condições clínicas para o procedimento, pela imunossupressão causada pela quimioterapia. Aproximadamente quatro semanas após o procedimento cirúrgico é iniciada a quimioterapia adjuvante até em torno da 104<sup>a</sup> semana. Nos casos da doença metastática pulmonar no momento do diagnóstico, o tratamento quimioterápico adjuvante é realizado por seis semanas e na 20<sup>a</sup> semana é realizada a toracotomia para ressecção dos nódulos pulmonares, sendo mantida por até 104 semanas (FERMAN, 2010).

Desde 2006, o GCBTO utiliza um esquema com altas doses de MTX, CIS e DOX, em associação com um medicamento cardioprotetor. A eficácia da adição de um agente antiangiogênico para manutenção da forma metronômica, com ciclofosfamida e MTX após o protocolo convencional para pacientes não-metastáticos e, durante o protocolo para pacientes metastáticos, foi mostrada em um

estudo randomizado (PENNA, 2010). Contudo, esse novo protocolo de tratamento, adotado desde 2006 pelo GCBTO, ainda está em seguimento clínico.

#### 1.12.1.1 Doxorrubicina

A DOX é um fármaco anticancer amplamente utilizado, com ação sobre as células neoplásicas através de dois mecanismos (i) inibição da topoisomerase II, interferindo na formação do complexo topoisomerase II-DNA e levando a quebras na cadeia dupla de DNA e (ii) geração de radicais livres que lesam as membranas celulares, o DNA e as proteínas intracelulares (D'ARPA e LIU, 1989; THORN *et al.*, 2011). No citoplasma, a DOX é oxidada a dox-semiquinona, um metabólito instável, que é reconvertido a DOX em um processo que libera espécies reativas de oxigênio. Esses compostos levam a peroxidação lipídica e dano à membrana e DNA e ao estresse oxidativo ativando as vias apoptóticas de morte celular. As moléculas envolvidas com a reação de oxidação são NQO1 (NADH desidrogenase), NOS3 (óxido nítrico sintase) e XDH (xantina desidrogenase). Alternativamente, a DOX pode entrar no núcleo e inibir a topoisomerase-II (TOP2A), que está relacionada aos mecanismos de reparo do DNA, levando ao dano irreversível do DNA e morte celular. Com isso, a duplicação celular e a transcrição do DNA para RNA mensageiro são bloqueados interferindo no processo de sinalização celular (Figura 1-9) (SINHA e MIMNAUGH, 1990).

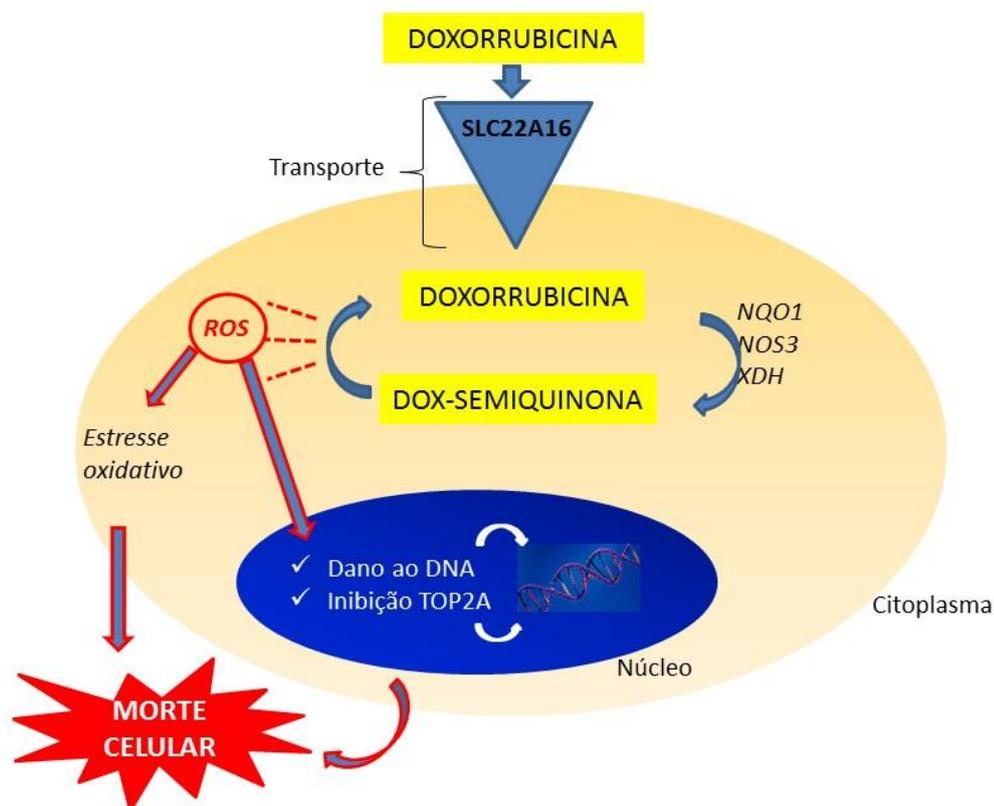


Figura 1-9 Diagrama esquemático do mecanismo de ação da doxorrubicina (DOX) sobre as células neoplásicas. A DOX é oxidada a dox-semiquinona através das moléculas NQO1 (NADH desidrogenase), NOS3 (óxido nítrico sintase) e XDH (xantina desidrogenase). Esta, por sua vez, é reconvertida a DOX liberando espécies reativas de oxigênio, que levam a peroxidação lipídica e dano da membrana, do DNA e morte celular. A DOX também pode penetrar no núcleo e inibir a topoisomerase-II (TOP2A), levando ao dano irreversível do DNA e morte celular.

#### 1.12.1.2 Cisplatina

A quimioterapia com CIS é frequentemente utilizada para o tratamento de diversos tumores malignos, como adenocarcinoma de ovário (KIM *et al.*, 2012), tumores infiltrantes de bexiga (ARCANGELI *et al.*, 2014), tumor de pulmão (O'GRADY *et al.*, 2014) e osteossarcoma (PETRILLI *et al.*, 2006). A CIS é transportada para o interior da célula ativamente ou passivamente através de transportadores de cobre CTR1 e CTR2. A molécula inalterada pode ser transportada para fora da célula pelos transportadores ATP7A e ATP7B, pode ser

metabolizada pelas enzimas glutatona S-transferase (GSTM1 e GSTP1) e pode ser transportada para o núcleo. No núcleo, interage e se intercala ao DNA formando ligações cruzadas e desenrolando as hélices do DNA. Essa alteração no DNA resulta na inibição da replicação celular, podendo levar a apoptose e necrose. Algumas proteínas como ERCC1 (*Excision Repair Cross-Complementation group 1*), XPA, XPD e XPF (Xeroderma Pigmentosum Complementation groups A, D and F) fazem o reparo das ligações cruzadas formadas pela cisplatina que resulta no aumento a resistência ao tratamento (Figura 1-10) (KUO *et al.*, 2007; RABIK e DOLAN, 2007).

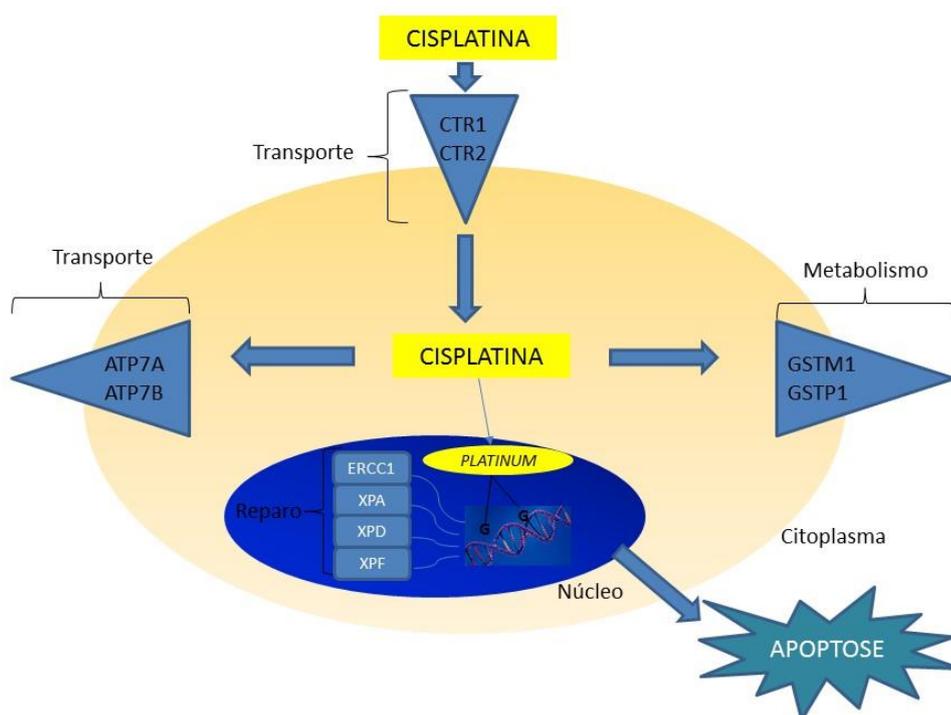


Figura 1-10 Diagrama esquemático do mecanismo de ação da cisplatina (CIS). A CIS penetra na célula por transporte ativo e passivo através de transportadores de cobre. Uma vez na célula, ela se torna hidratada e carregada positivamente. Nesta fase, ela é capaz de interagir e intercalar o DNA da célula tumoral, formando ligações cruzadas e promovendo o desenrolamento da dupla-hélice que resultam na inibição da replicação do DNA, eventualmente desencadeando apoptose. CTR (transportador de cobre), GSTM1 (enzima glutatona S transferase), GSTP1 (glutatona S-transferase P), ATP (trifosfato de adenosina), ERCC1 (excission repair cross-complementation group 1), XPA (xeroderma Pigmentosum Complementation group A, XPD (Xeroderma Pigmentosum Complementation group B), XPF (Xeroderma Pigmentosum Complementation group F). Adaptada de ROSE *et al.* (2014).

### 1.12.1.3 Metotrexato

O MTX é uma molécula análoga ao ácido fólico, que atua como inibidor competitivo da enzima ácido fólico redutase, responsável pela conversão do ácido fólico em ácido tetrahidrofólico. A inibição da síntese do ácido tetrahidrofólico, por sua vez, impede a síntese de coenzimas que atuam na biossíntese das purinas (adenina e guanina) e das pirimidinas (timina, citosina e uracila), levando ao bloqueio da replicação do DNA (Figura 1-11) (OPHARDT e LOSEY, 2015).

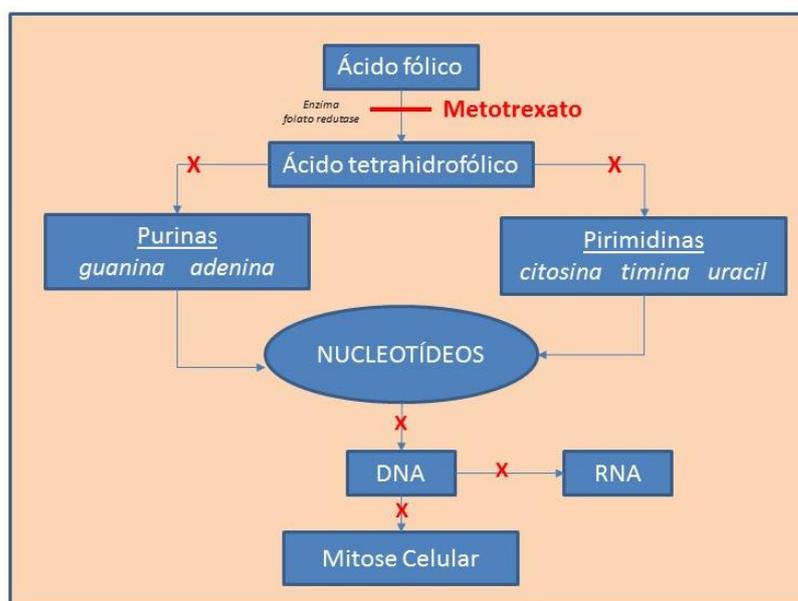


Figura 1-11 Diagrama esquemático do mecanismo de ação do metotrexato (MTX). O MTX inibe a enzima ácido fólico redutase, que converte o ácido fólico em ácido tetrahidrofólico. Esta inibição impede a síntese de coenzimas que atuam na biossíntese das purinas e pirimidinas, levando ao bloqueio da replicação do DNA.

### 1.12.2 Tratamento cirúrgico

O tratamento cirúrgico do osteossarcoma é realizado após a quimioterapia e consiste de cirurgia mutiladora ou conservadora. Ao longo do tempo, as técnicas cirúrgicas evoluíram, aumentando a indicação de cirurgias com preservação do membro (conservadoras) (JESUS-GARCIA, 2013). Nos tumores muito agressivos,

volumosos e com envolvimento de estruturas nobres, como vasos e nervos, ou nos casos de infecção, deve ser feita a cirurgia mutiladora, que consiste na amputação, desarticulação ou hemipelvectomy externa (MARINA *et al.*, 2004; UNNI e INWARDS, 2013).

O tratamento cirúrgico com a preservação do membro pode ser realizado por ressecção simples (nos casos dos tumores que não invadem a medula óssea), ressecção com reconstrução utilizando enxerto autólogo ou homoenxerto, por alongamento ósseo com transporte pela técnica de Ilizarov ou por endoprótese não convencional. Em geral, não é recomendado o uso de enxerto osteoarticular para tumores de alto grau que necessitam de quimioterapia adjuvante em virtude do maior risco de infecção (MALAWER *et al.*, 2003). A técnica mais utilizada é a ressecção tumoral com reconstrução por endoprótese não convencional. O algoritmo do tratamento do osteossarcoma está representado na figura 1-12.

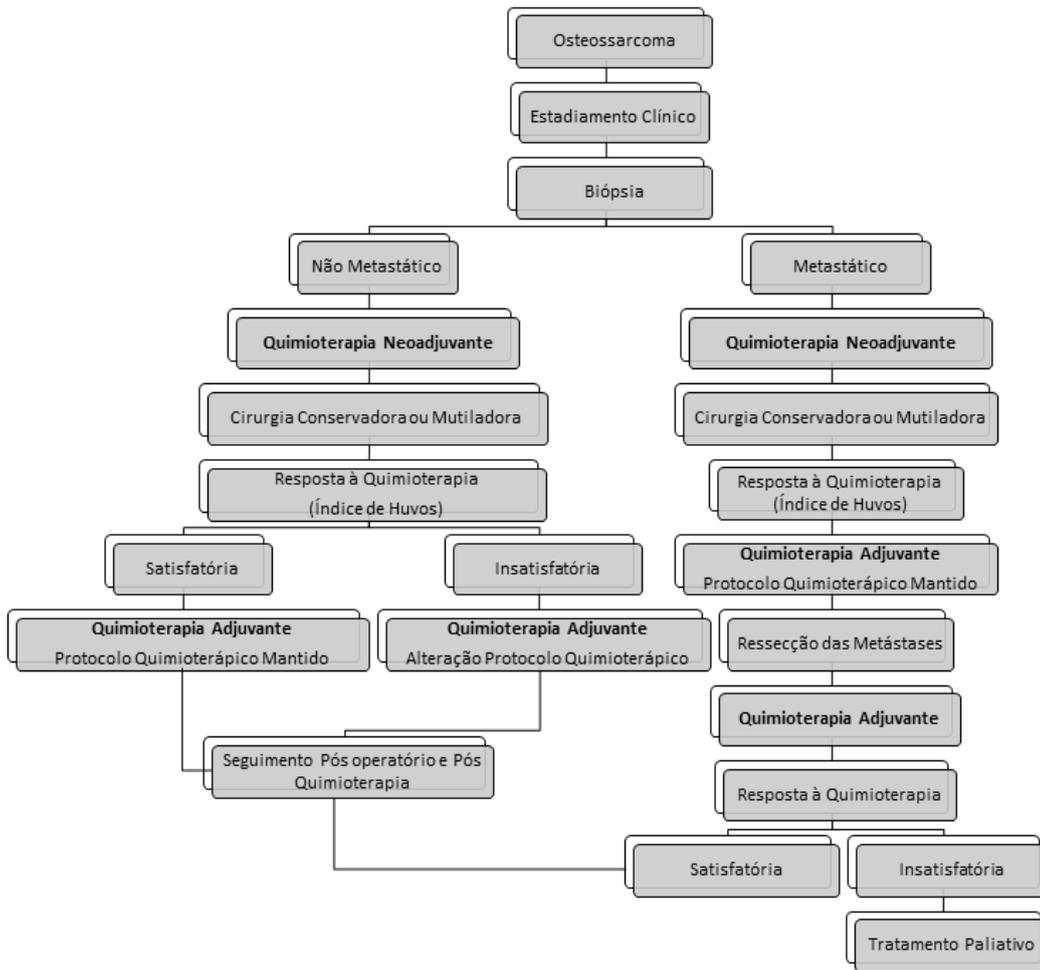


Figura 1-12 Algoritmo de decisão no tratamento de pacientes com osteossarcoma. Adaptado de JESUS-GARCIA (2013).

### 1.13 Metástases do osteossarcoma

O osteossarcoma tende a desenvolver metástases pulmonares, linfonodais, e metástases salteadas no próprio tecido ósseo. A metástase, que consiste na formação de uma nova lesão tumoral a distância, a partir do tumor primário, é um processo de múltiplas etapas que inclui o extravasamento local de células, a sua sobrevivência na circulação e a invasão de um órgão secundário onde ocorre a proliferação e, assim, o estabelecimento do sítio metastático (Figura 1-13) (NGUYEN *et al.*, 2009).

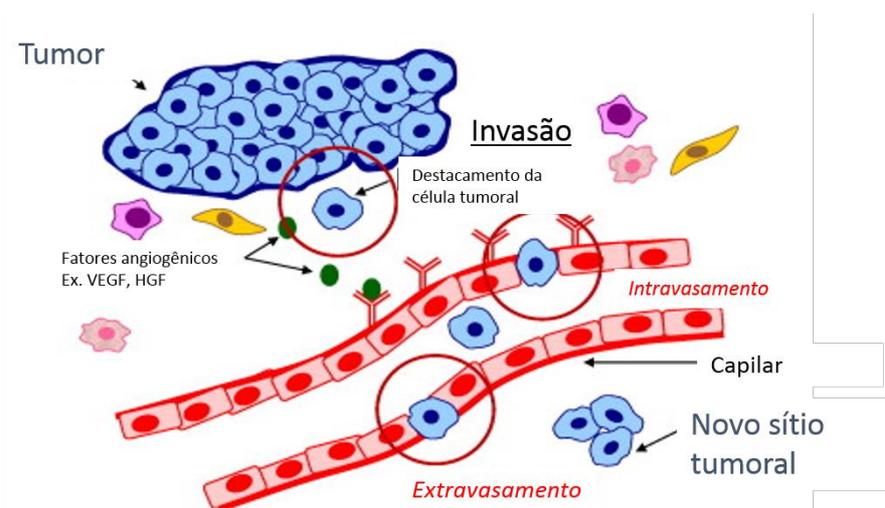


Figura 1-13 Esquema ilustrando o processo da metástase. As células tumorais se dissociam do tumor primário pela perda da capacidade de adesão célula-célula e invadem o estroma. Esse processo é caracterizado pela liberação de substâncias que degradam a membrana basal e a matriz extracelular e pela supressão/expressão de proteínas envolvidas no controle da migração celular. A interação entre as células tumorais e o estroma circunjacente é importante para o desenvolvimento da angiogênese tumoral. Os vasos sanguíneos próximos ao tumor constituem a via preferencial de entrada de células tumorais no sistema circulatório (processo de intravasamento). As células tumorais no sistema circulatório sobrevivem ao sistema imune, interagem com as células endoteliais penetram no endotélio e na membrana basal (processo de extravasamento) e as células tumorais que sobrevivem proliferam no sítio secundário. VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), HGF (fator de crescimento de hepatócitos). Adaptada de MARTIN e JIANG (2009).

Nesse processo, as quimiocinas interagem com receptores expressos nas células metastáticas e desempenham um papel crucial na migração celular para os

sítios secundários (MULLER *et al.*, 2001; HINTON *et al.*, 2010). O receptor de quimiocinas tipo 4 (CXCR4, do inglês *Chemokine Receptor Type 4*) é um receptor da quimiocina CXCL12 que desempenha papel importante no direcionamento de células tumorais metastáticas para sítios com alta expressão deste ligante (MULLER *et al.*, 2001). A superexpressão de CXCR4 já foi relatada em mais de 23 tipos de tumores, incluindo neoplasias de mama, ovário, próstata e melanoma (BALKWILL e COUSSENS, 2004).

O fator indutor de hipóxia (HIF-1 $\alpha$ , do inglês *Hypoxia-inducible Factor 1-Alpha*) é um fator de transcrição envolvido na resposta celular à hipóxia e seu envolvimento no crescimento tumoral já foi demonstrado (MUNOZ-GUERRA *et al.*, 2009). No osteossarcoma há evidências da participação da via de sinalização HIF-1 $\alpha$ /CXCR4 no potencial metastático (LAVERDIERE *et al.*, 2005; GUO *et al.*, 2014; GUAN *et al.*, 2015). BRENNECKE *et al.* (2014) mostraram que além da maior expressão de CXCR4 nas células metastáticas, o seu bloqueio inibe a formação de micrometástases. Outras moléculas como CXCR7 (GOGUET-SURMENIAN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (XIAO *et al.*, 2014), CXCL6 e CXCL4 (LI, Y. *et al.*, 2011) também já foram relacionadas com a evolução tumoral e com o potencial metastático do osteossarcoma.

#### **1.14 Transição epitélio-mesenquimal**

A transição epitélio-mesenquimal do inglês *epithelial-mesenchymal transition* (EMT), é um processo biológico no qual as células epiteliais polarizadas, que normalmente interagem com a superfície da membrana basal, sofrem alterações bioquímicas assumindo um fenótipo de células mesenquimais, o que aumenta sua capacidade migratória, seu potencial de invasão, sua resistência à apoptose e a

expressão e síntese de componentes da matriz extracelular (KALLURI e NEILSON, 2003; KALLURI e WEINBERG, 2009). Do ponto de vista celular, a transição se dá entre um morfotipo epitelióide, menos migratório, para um morfotipo fibroblastóide, mais migratório. Por muito tempo, este fenômeno foi chamado de desdiferenciação e definido por parâmetros morfológicos e não moleculares. Distintos processos moleculares estão envolvidos no início da transição como a ativação de fatores de transcrição, expressão de proteínas de superfície, reorganização e expressão de proteínas do citoesqueleto, síntese de enzimas que degradam a matriz extracelular e alterações na expressão de micro-RNAs. Com a EMT, as células tumorais adquirem propriedades invasivas e desenvolvem características de crescimento metastático. Esses eventos são facilitados pela diminuição da aderência célula-célula dada pela molécula E-caderina e pelo aumento da regulação de proteínas mesenquimais, tais como: vimentina, N-caderina e actina de músculo liso (YANG *et al.*, 2013). Vários fatores de transcrição da EMT (EMT-TFs), tais como: twist1, snail1, snail2 (também chamado de slug), zeb1 e zeb2 também estão envolvidos no processo da EMT e desempenham um papel importante na ocorrência de metástase (DE CRAENE e BERX, 2013).

Os membros da família do snail são fatores de transcrição necessários durante o desenvolvimento embrionário na formação do mesoderma, crista neural e do sistema nervoso central (YANG *et al.*, 2013). Eles induzem a EMT através da regulação negativa da e-caderina, uma molécula chave para adesão célula-célula, levando assim ao aumento da migração celular, invasão e progressão tumoral (CANO *et al.*, 2000).

A EMT está intimamente associada com a metástase, por ser um processo dinâmico desencadeado por estímulos provenientes do microambiente tumoral e por

estar associada a vários fatores como: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ), proteína morfogênica do osso (BMP), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e citocinas. A expressão de snail e slug pode ser encontrada na EMT. O efeito sinérgico do snail e da  $\beta$ -catenina fornece às células tumorais capacidade de sobreviver durante a disseminação e invasão (WANG *et al.*, 2013).

As caderinas são glicoproteínas expressas na superfície celular envolvidas na adesão e interação célula-célula através de uma ligação homofílica à célula adjacente dependente do íon cálcio (MOHAMET *et al.*, 2011). A e(epitelial)-caderina é um membro da família das caderinas tipo I, expressa especialmente por queratinócitos, conhecida pelo importante papel na regulação da adesão intercelular em tecidos epiteliais (BAGUTTI *et al.*, 1998). Essa molécula de adesão está localizada na superfície lateral das células epiteliais em uma região de contato célula-célula conhecido como junção aderente ou desmossômica (GUILFORD e WARSHAW, 1998). As caderinas se associam às cateninas, um grupo de proteínas intracelulares, ativando mecanismos transdutores de sinais que regulam o crescimento e diferenciação celulares. Existem três tipos de cateninas,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (OZAWA e KEMLER, 1998). A  $\beta$ -catenina atua como um oncogene pela ativação excessiva de genes que contribuem diretamente para a progressão tumoral. A desregulação da via Wnt da  $\beta$ -catenina é o evento chave na formação de alguns tumores incluindo colon, próstata, melanoma, carcinoma hepatocelular, e alguns tipos de câncer de mama (WHITE *et al.*, 2012).

Na célula tumoral, qualquer perda de adesão é um passo importante para a invasão tumoral. A redução ou ausência de expressão de e-caderina, além de  $\alpha$ ,  $\beta$  e

$\gamma$  cateninas em carcinomas primários da mama estão associadas com o desenvolvimento de metástases (VAN ROY e BERX, 2008). A N-caderina é um membro da família das caderinas tipo I. Durante a transformação maligna e a EMT, as células epiteliais se tornam mais invasivas, fenômeno que está associado a diminuição da expressão de e-caderinas e aumento da expressão de caderinas mesenquimais, como a N-caderina e a caderina-11 (HAZAN *et al.*, 1997; HAZAN *et al.*, 2000).

A vimentina é uma proteína responsável pela manutenção da morfologia celular, integridade do citoplasma e pela estabilização do citoesqueleto. É encontrada nas células mesenquimais de tecidos durante a fase de desenvolvimento e responsável pela manutenção da integridade do tecido (COULOMBE e WONG, 2004). Ela está associada com a invasão tumoral e prognóstico desfavorável em diversos tumores, incluindo câncer de mama, câncer de próstata, melanoma, e câncer de pulmão (SATELLI e LI, 2011; LEHTINEN *et al.*, 2013). Apesar da vimentina estar mais expressa mais tardiamente no câncer, o seu papel na regulação da malignidade ainda não foi totalmente esclarecido.

As claudinas pertencem a uma família de 27 proteínas que compõem as *tight junctions* (junções de adesão) das células epiteliais. As junções de adesão são as junções intercelulares mais apicais nas células e estabelecem uma barreira que controla a permeabilidade (difusão paracelular de moléculas e íons) e mantém a polaridade celular regulando assim a homeostase (KRAUSE *et al.*, 2008). A perda da função das junções de adesão pode levar a invasão e metástase em diversos tipos de câncer (MARTIN e JIANG, 2009).

A ocludina é uma proteína transmembrana com quatro domínios que atravessam a membrana celular (FLETCHER e RAPPOPORT, 2014). A ocludina é

recrutada para formação de junções de adesão onde é coexpressa com a claudina-4 (SINGH *et al.*, 2010).

Esses fatores podem ser utilizados como biomarcadores para identificar a transformação celular que culmina na degradação da membrana basal e na formação de uma célula com fenótipo mesenquimal que migra do tecido de origem (Figura 1-14) (KALLURI e NEILSON, 2003). Assim, a EMT é caracterizada pelo aumento de expressão de vimentina, snail, twist, slug, N-caderina e metaloproteinasas e pela redução de expressão de E-caderina e ocludina (VOULGARI e PINTZAS, 2009).

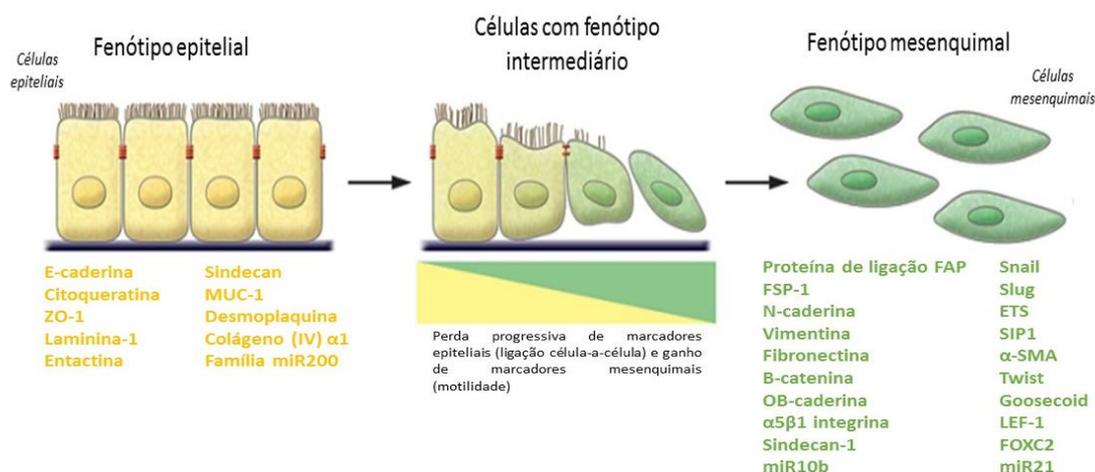


Figura 1-14 Transição epitélio mesenquimal (EMT). As células diminuem a expressão de proteínas de adesão, características do fenótipo epitelial, e aumentam a expressão de proteínas do fenótipo mesenquimal, resultando na diminuição da ligação célula-célula e no aumento da motilidade celular. Os biomarcadores comumente utilizados para identificar o fenótipo celular estão identificados. ZO-1, zona occludens tight junction protein 1; MUC1, mucina 1. Adaptada de KALLURI e WEINBERG (2009).

São descritas três ocasiões em que ocorre a EMT. A EMT do tipo 1 está associada à implantação, embriogênese e ao desenvolvimento de órgãos e é necessária para a morfogênese. A EMT tipo 2 está associada à regeneração e fibrose tissular secundária a inflamação e seu desencadeamento depende do processo inflamatório. Neste caso, as células mesenquimais ativadas geram grande

quantidade de matriz extracelular rica em colágeno. A EMT do tipo 3, por sua vez, não está relacionada a processos fisiológicos e ocorre durante o crescimento e a progressão tumoral, quando as células da periferia do tumor sofrem o processo e adquirem fenótipo mesenquimal e conseqüentemente ganham propriedade invasiva e potencial metastático. A indução desse tipo é facilitada pelas alterações genéticas adquiridas pelas células tumorais (KALLURI e WEINBERG, 2009).

#### 1.14.1 Transição Epitélio-mesenquimal no osteossarcoma

O papel da EMT em sarcomas derivados do mesênquima ainda não está bem fundamentado. A superexpressão de fatores autócrinos de motilidade na linhagem celular de osteossarcoma MG-63 induz a EMT associada ao aumento da malignidade. O silenciamento desses fatores induz a transição mesenquimo-epitelial, MET, do inglês *mesenchymal-epithelial transition*, associada a expressão de biomarcadores epiteliais como E-caderina e citoqueratinas, supressão de biomarcadores mesenquimais, como vimentina, inibição do crescimento e da metástase tumoral em camundongos imunodeficientes e indução da diferenciação das células em osteoblastos maduros (NIINAKA *et al.*, 2010). Esses dados sugerem a participação do fenômeno de EMT na malignidade do osteossarcoma.

Recentemente foi mostrado que as células telomerase-positivas desempenham um papel nesse processo (YU *et al.*, 2014). A expressão gênica do *twist2*, um fator de transcrição de EMT, foi inversamente relacionada ao potencial tumorigênico em camundongos e a perda da expressão foi associada à progressão do tumor (ISHIKAWA *et al.*, 2013). Os autores mostraram que o *twist2* inibe a formação de um microambiente favorável ao crescimento tumoral e conseqüentemente atenua a tumorigênese no osteossarcoma. O fator de regulação

do interferon 8 (IRF-8) e a expressão de biomarcadores mesenquimais também estão relacionados à aquisição de fenótipo celular metastático em células de osteossarcoma. O IRF-8 aumenta a migração e invasão celulares via ativação do receptor de TGF- $\beta$ . Além disso, os mesmos autores demonstraram a expressão de IRF-8 e TGF- $\beta$  no tecido tumoral em 45/54 (84%) e 47/54 (87%) amostras de osteossarcoma, respectivamente (SUNG *et al.*, 2014).

Os biomarcadores twist e E-caderina têm valor prognóstico e preditivo em amostras de pacientes portadores de osteossarcoma (YIN *et al.*, 2012). Os autores mostraram por imunohistoquímica maior expressão de twist (31,8%; 34/107) e menor expressão de E-caderina (20,6%; 22/107) no tecido de 107 pacientes com metástase de osteossarcoma. Os pacientes com marcação positiva de twist tiveram menor sobrevida global e sobrevida livre de doença quando comparados aos pacientes com marcação negativa. A expressão das proteínas TIM-3 (do inglês *T cell Ig- and mucin- domain-containing molecules*), ativamente envolvidas com o desenvolvimento tumoral, tem relação com a expressão dos biomarcadores de EMT em células primárias de osteossarcoma (SHANG *et al.*, 2013).

No osteossarcoma e em outros tumores, há o envolvimento da enzima transcriptase reversa da telomerase (hTERT) no fenômeno de EMT, bem como na auto-renovação de células-tronco tumorais (CTT) (LIU *et al.*, 2013). No tecido tumoral, já foi mostrado que a hTERT está expressa em 30% dos osteossarcomas primários e que a sua presença está associada à recidiva tumoral bem como à redução da sobrevida global (SANDERS *et al.*, 2004). Células de osteossarcoma telomerase-positivas apresentam maior expressão de diversos biomarcadores mesenquimais, 2,6 vezes mais capacidade migratória e maior capacidade de formar sarcosferas *in vitro* (YU *et al.*, 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

---

O Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) é o órgão do Ministério da Saúde, referência em traumatologia e ortopedia. O Centro de Oncologia Ortopédica do INTO é responsável pelo tratamento cirúrgico dos pacientes portadores de tumores ósseos, dentre esses, o osteossarcoma. Este tumor maligno do osso altamente agressivo acomete majoritariamente crianças e adolescentes cuja sobrevida global é de 65% em cinco anos e de 25% para pacientes com metástase. Salienta-se que as medidas terapêuticas adotadas no tratamento do osteossarcoma, particularmente a quimioterapia, além do alto grau de toxicidade não estão relacionadas com uma boa resposta clínica.

A compreensão dos mecanismos de formação de tumores e de metástases é essencial para o desenvolvimento de estratégias que permitam melhorar a oferta de tratamento do osteossarcoma.

O fenômeno da EMT está envolvido com a migração e invasão celular, resistência à apoptose, expressão e síntese de componentes da matriz extracelular e sua correlação com a ocorrência de metástases já foi demonstrada em carcinomas. Considerando que o fenômeno EMT está pouco fundamentado nos sarcomas, a identificação dos indutores de EMT no osteossarcoma pode ser uma estratégia para o controle da progressão deste tumor. Visto que a doença metastática acarreta em pior prognóstico no osteossarcoma, a possibilidade de avaliar a capacidade migratória e identificar marcadores modulados pelo tratamento quimioterápico na população de células neoplásicas que constituem o osteossarcoma poderá contribuir para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de metástase neste tumor.

### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 Objetivo Principal

Avaliar a ocorrência de metástase em pacientes portadores de osteossarcoma e o efeito do tratamento quimioterápico *in vitro* sobre eventos celulares relacionados com a metástase.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o momento da ocorrência da metástase em pacientes portadores de osteossarcoma em relação ao tratamento quimioterápico;
- Avaliar a expressão de biomarcadores de transição epitélio-mesenquimal (e-caderina, claudina-1, zona ocludina (ZO-1), snail, n-caderina,  $\beta$ -catenina, slug e vimentina) em células primárias de osteossarcoma isoladas de pacientes antes e após o tratamento quimioterápico;
- Avaliar o efeito *in vitro* do tratamento das células primárias de osteossarcoma com agentes farmacológicos utilizados em protocolos de quimioterapia do osteossarcoma sobre a expressão dos biomarcadores de transição epitélio-mesenquimal e sobre a migração celular.

## **4 METODOLOGIA**

---

### **4.1 Aspectos éticos**

Este estudo foi realizado no INTO com participação do Instituto Nacional do Câncer (INCA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa de ambas as Instituições (ANEXOS I e II). Os pacientes foram atendidos no ambulatório do INTO e após confirmação diagnóstica foram encaminhados ao INCA para acompanhamento clínico e tratamento quimioterápico, seguindo o protocolo do GCBTO, fazendo uso de DOX, CIS e/ou MTX. O tratamento cirúrgico foi realizado no INTO ou no INCA. Os participantes foram incluídos mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do próprio ou do responsável legal, no caso de menores de idade (APÊNCIDES I e II).

### **4.2 Pacientes e coleta das amostras**

Foram incluídos no estudo todos os pacientes encaminhados para o Centro de Oncologia Ortopédica (CONCO) do INTO no período de 2012 a 2014 e submetidos à biópsia de lesão óssea com suspeita clínica de osteossarcoma e os que realizaram ressecção tumoral após o tratamento quimioterápico neoadjuvante no INCA. Tanto o procedimento da biópsia óssea como o da ressecção da lesão são etapas do protocolo de abordagem e tratamento do paciente com osteossarcoma.

#### 4.2.1 Amostra obtida por biópsia

A biópsia óssea do tipo percutânea, foi realizada no centro cirúrgico, sob efeito de anestesia local e sedação, com agulha de biópsia de medula óssea tipo Jamshidi com diâmetro interno de 3 mm. As amostras foram obtidas com a orientação de intensificador de imagem de regiões do tumor distantes das áreas centrais de necrose e da periferia de lesão (Figura 4-1). Um fragmento da amostra foi encaminhado ao Centro de Tecnologia Celular (CTC-INTO) para isolamento e expansão celular *in vitro*. Os demais fragmentos da amostra foram encaminhados para a Unidade de Anatomia Patológica (UANAT) para processamento e diagnóstico histopatológico (Figura 4-2).

#### 4.2.2 Amostra obtida da peça cirúrgica

Cerca de duas semanas após o término do tratamento quimioterápico, os pacientes eram encaminhados para o tratamento cirúrgico. Após a ressecção tumoral, através de cirurgia conservadora ou mutiladora, ainda no centro cirúrgico, eram retirados em média duas amostras representativas da lesão, da mesma forma (agulha de biópsia de medula óssea tipo Jamshidi com diâmetro interno de 3 mm) que no procedimento de biópsia (Figura 4-1D). O processamento laboratorial das amostras provenientes da peça cirúrgica foi o mesmo das amostras provenientes das biópsias.

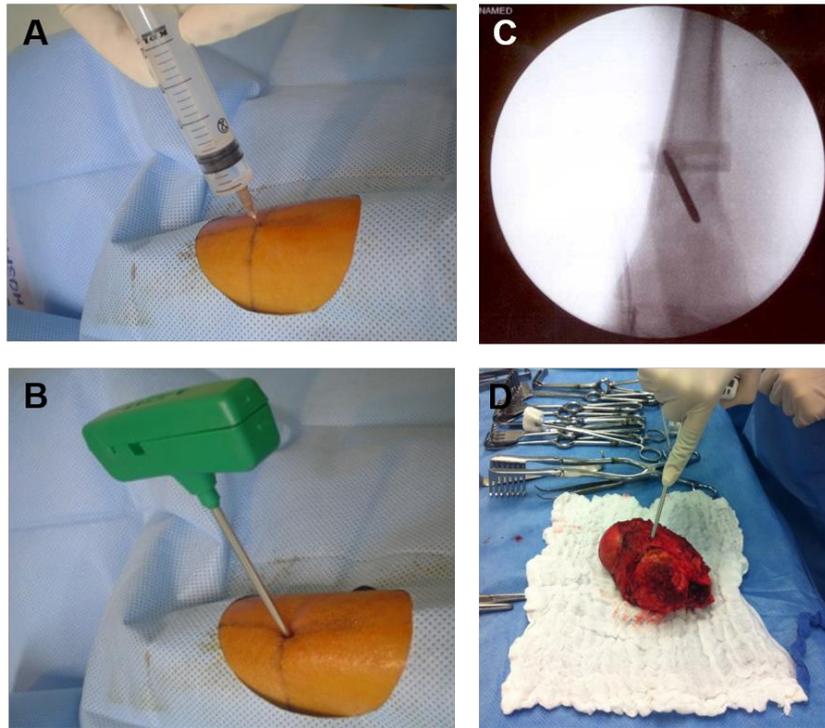


Figura 4-1 Procedimento de coleta de amostras durante a biópsia e a ressecção tumoral. (A) Anestesia local com xilocaína 2%. (B) Introdução da agulha de biópsia no osso. (C) Radioscopia mostrando o posicionamento da agulha de biópsia. (D) Coleta de amostra da peça cirúrgica após ressecção tumoral.

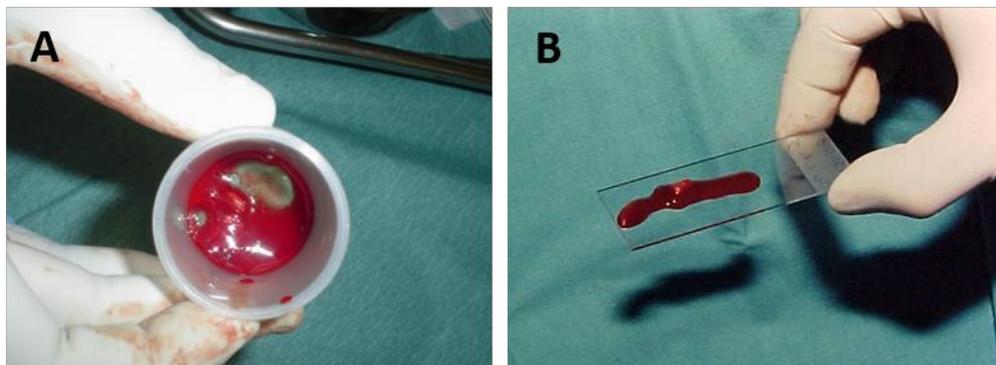


Figura 4-2 Amostra de tecido tumoral. (A) Fragmento encaminhado para processamento histopatológico. (B) Amostra encaminhada para isolamento e expansão celular *in vitro*.

### 4.3 Isolamento e Manutenção das Células Derivadas de Osteossarcoma

#### 4.3.1 Células primárias

As amostras do tecido tumoral proveniente das biópsias (pré-QT) ou da peça cirúrgica (pós-QT) foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) com 0,6% de glicose até a completa eliminação de resíduos de sangue. Posteriormente, a amostra foi fragmentada mecanicamente e digerida enzimaticamente com 200 µL de Colagenase tipo II 2,5% por 12 horas em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> em 800 µL de meio de cultura base acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina. Após o tempo de incubação o material foi fragmentado novamente e a suspensão resultante foi centrifugada a 413g por 3 minutos. A massa celular foi tratada com 2 mL de tampão de lise de hemácias gelado (ACK Lysing Buffer, Gibco), incubada em gelo por 3 minutos, lavada com PBS gelado e novamente centrifugada por 3 minutos a 413g a 4°C. Por fim, a massa celular foi ressuspensa com 1000 µL de meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina e passada em um filtro de nylon com poro de 70 µm (Cell strainer, BD). A base do meio de cultura utilizada foi DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium com nutriente F-12, Gibco) ajustado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma). Uma vez feito o isolamento das células, 3,3x10<sup>5</sup> células foram cultivadas em garrafa de cultura com DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina (0,5 mg/mL, Sigma). O acompanhamento do isolamento foi feito duas vezes por semana até que a cultura estivesse estabelecida. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas celulares primárias de osteossarcoma foram expandidas até a décima

primeira passagem para a realização dos experimentos. Ao longo do estudo as células foram criopreservadas a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3.2 Células de linhagem de banco de células

Duas linhagens comerciais de osteossarcoma foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, as linhagens MG63 e Saos2. As linhagens foram mantidas *in vitro* sob as mesmas condições das células primárias (descrito item 4.3.1).

### 4.4 Imunocitoquímica

Foram cultivadas  $5 \times 10^4$  células em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB em lamínulas de vidro previamente cobertas com Poli-lisina. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 minutos e lavadas com PBS 1X. As células foram permeabilizadas com Triton 0,02% durante 5 minutos, lavadas com PBS 1X, e o bloqueio foi realizado com albumina sérica bovina (BSA) 5% por 30 minutos. Após lavagem, as células foram incubadas por 12 horas em câmara úmida a  $4^{\circ}\text{C}$  com o anticorpo primário anti-osteoprotegerina humana (Abcam) diluído em BSA 1%. Após esse período, as lâminas foram lavadas com PBS 1X e as células incubadas com o anticorpo secundário (Abcam) em câmara úmida por 2 horas ao abrigo da luz. A marcação nuclear foi realizada com DAPI por 1 minuto e as lamínulas foram colocadas sobre lâminas de vidro com o meio de montagem Fluoromount® (Sigma).

#### 4.5 Ensaio de Migração Celular

Para avaliar o efeito da quimioterapia sobre o potencial migratório das células, foi realizado o ensaio de migração celular nas culturas celulares pré e pós-QT mantidas até a décima primeira passagem. Foram semeadas  $1,5 \times 10^5$  células por poço, em placa de 24 poços em meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina (0,5 mg/mL) seguido de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após confluência, o meio de cultivo suplementado foi substituído por meio DMEM-F12 base sem suplementação e as células incubadas por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados 10 µM de citosina β-D-arabinofuranosideo (ARA-C, Sigma) e as células foram incubadas nas mesmas condições por mais 24 horas. O meio de cultivo foi removido e foi realizado um risco vertical centralizado com ponteira plástica de 10 µL em cada poço (Figura 4-3).

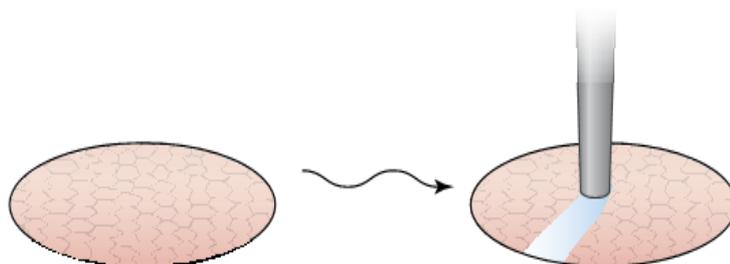


Figura 4-3 Esquema do ensaio de migração celular. É realizado um risco vertical centralizado com uma ponteira plástica de 10 µL na monocamada celular de cada poço. Adaptada de Vedula et al. (2013)

Os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X e o risco foi fotografado em microscópio de contraste de fase Nikon TS100 (Nikon, Japan), sendo considerado o tempo zero (tempo 0h). As células foram então tratadas por 24hs, com a concentração de 100 µM de cada quimioterápico em duplicatas, padronizada no ensaio de viabilidade celular, a saber hidrocloreto de doxorubicina (Sigma, D1515),

cloridrato de cisplatina (Sigma, P4394) e metotrexato (Sigma, M9929) isoladamente ou em conjunto e incubadas por 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Paralelamente, as células foram tratadas com o veículo de cada quimioterápico, no mesmo volume do tratamento, a saber, glicose 5% (veículo da DOX), cloreto de sódio 0,9% (veículo da CIS) e hidróxido de sódio 1M (veículo do MTX). Dois poços foram utilizados como controle, apenas com o meio de cultura (Figura 4-4). Após o período de 24 horas de exposição aos quimioterápicos ou aos veículos, o risco foi novamente fotografado para avaliação da migração celular (tempo 24h). Os poços foram fotografados em microscópio óptico com aumento de 40X e o local fotografado foi feito uma marcação com caneta dermatográfica, para a obtenção do mesmo ponto nas fotografias posteriores.

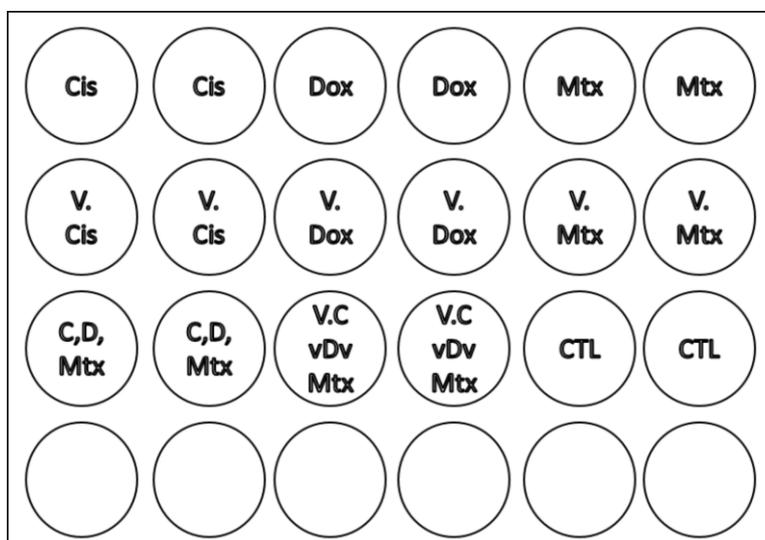


Figura 4-4 Desenho esquemático do tratamento das células para ensaio de migração em placa com 24 poços. Cis: cisplatina, Dox: doxorubicina, Mtx: metotrexato, V.Cis: veículo cisplatina, V.Dox: veículo doxorubicina, V.Mtx: veículo metotrexato, C,D,Mtx: Cis + Dox + Mtx, CTL: controle

A análise das imagens nos tempos 0h e 24h foi realizada no programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>), através da medida da quantidade de pixels na área do

risco. A média da quantidade de pixels das imagens em duplicata, foi calculada para cada condição e a área de migração foi obtida subtraindo-se o valor de 0h do valor de 24h. Foi calculada então a razão entre a área de migração de cada tratamento sobre a área de migração do poço controle (sem tratamento) e a razão foi multiplicada por 100. O resultado foi expresso em percentual em relação ao poço controle. O desenho experimental do ensaio está representado na figura 4-5.

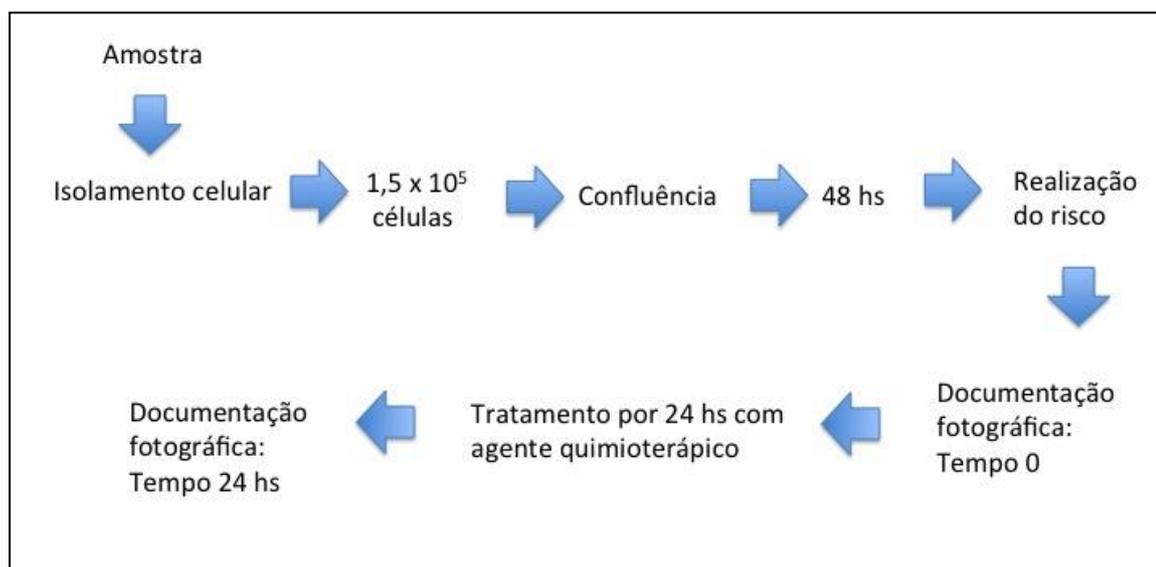


Figura 4-5 Desenho experimental do ensaio de migração.

#### 4.6 Imunoblotting (Western blotting)

Para este ensaio foram utilizadas as células primárias provenientes das amostras teciduais pré e pós-QT mantidas até a terceira passagem e células tratadas por 24hs com a concentração de 100  $\mu$ M de cada quimioterápico (hidroclorato de doxorrubicina, cloridrato de cisplatina e metotrexato) isoladamente ou em conjunto e incubadas por 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado e lisadas em 1% NP40, Triton X-100 1%, deoxicolato de sódio 1%, Tris-HCl 10 mmol/L pH 7.5, NaCl 100 mmol/L, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0.1% e 5 mM EDTA, suplementado com coquetel completo

de inibidores de proteases e fosfatases, conforme indicação de uso do fabricante (Complete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack, Roche). A concentração protéica foi determinada usando o Kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific). As amostras (50 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF). Após o bloqueio com 5% de albumina sérica bovina (BSA) em solução salina tamponada com TRIS com 0,1% Tween-20 (TBS-T) por 30 minutos em agitação, as membranas foram incubadas por 12 horas, a 4°C, com os anticorpos primários (Epithelial-Mesenchymal Transition - EMT Antibody Sampler Kit, Cell Signaling). As proteínas  $\alpha$ -tubulina e ciclofilina B foram usadas como controle interno das amostras. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 2h a temperatura ambiente, com o respectivo anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Os anticorpos primários foram utilizados na diluição de 1:1000 e os anticorpos secundários na diluição de 1:2000. A seguir as membranas foram incubadas com um substrato quimioluminescente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate e SuperSignal West Femto Substrate, Thermo Scientific) e as bandas foram obtidas após sua exposição a filme de raio X. A densitometria das bandas foi realizada no programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Foi calculada a razão entre a banda da proteína alvo (marcadores epiteliais e mesenquimais) e a banda da proteína constitutiva.

#### **4.7 Ensaio de Viabilidade Celular**

Cinco mil células até a terceira passagem foram cultivadas por 24h em estufa 37°C / 5% CO<sub>2</sub> em placa de 96 poços contendo 100µL de meio de cultura com SFB.

Após esse período as células foram incubadas com 10, 100, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$  de cada quimioterápico em triplicata ( hidrocloreto de doxorubicina, cloridrato de cisplatina e metotrexato) por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Após esse período foram adicionados 10 $\mu\text{L}$ /poço de uma solução de 5mg/mL de 3-(4,5- Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Brometo de Difeniltetrazolium (MTT) (Sigma Aldrich®). Foi realizada incubação em estufa  $37^{\circ}\text{C}$  / 5%  $\text{CO}_2$  durante 2h. Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$ /poço de DMSO e a placa foi mantida sob agitação durante 15 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (Polaris, Antares) com filtro de referência a 620 nm e filtro de leitura de 570 nm.

#### **4.8 Análise Estatística**

Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão (SEM). O teste t não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para comparações dos grupos pré e pós QT no ensaio de *imunoblotting*. Para comparações entre o os quimioterápicos no experimento *in vitro* realizado para os ensaios de migração e *imunoblotting* foi realizado o teste ANOVA para dois fatores (two way) seguido de pós teste de Bonferroni. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism, Versão 5,00.

## **5 RESULTADOS**

---

### **5.1 Avaliação da ocorrência de metástase em pacientes com osteossarcoma**

A amostra inicial deste estudo foi constituída por 35 pacientes portadores de osteossarcoma com idade entre 5 e 56 anos e diagnóstico confirmado por exame histopatológico. Foram excluídos do estudo dois pacientes por falta de informação sobre a metástase, totalizando 33 pacientes. Em seis pacientes foram obtidas amostras teciduais pré e pós-QT das quais foram estabelecidas as culturas primárias celulares (Tabela 5-1). As características clínicas, o protocolo do tratamento quimioterápico e evolução dos pacientes, que constituíram a amostra do estudo constam no apêndice III.

O tempo de seguimento médio dos pacientes foi de 20,5 meses (1,3 a 37,8 meses). A metástase pulmonar e/ou linfonodal foi identificada em 57,6% (19/33) pacientes. Destes, em 15,8% (3/19) foi diagnosticada antes do tratamento quimioterápico e em 73,7% (14/19) após o início do tratamento quimioterápico, com um intervalo médio entre o tratamento e a identificação da metástase de 11,5 meses (3,4 a 22,1 meses). Em dois pacientes não foi possível avaliar o momento da ocorrência da metástase em relação a quimioterapia (em um paciente não foi realizada a quimioterapia ou evoluiu para o óbito e no outro não foi possível obter a informação).

### **5.2 Avaliação de resposta ao tratamento quimioterápico**

Com o objetivo de avaliar a eficácia da quimioterapia na contenção dos eventos celulares envolvidos com o desenvolvimento da metástase, as células

isoladas de seis pacientes da amostra anterior e obtidas antes e depois do tratamento quimioterápico foram incluídas no estudo *in vitro*. A faixa etária dos pacientes variou entre seis e quatorze anos, sendo que quatro do gênero masculino. Em cinco pacientes o tumor estava localizado no membro inferior (quatro na região do joelho) e em um paciente no membro superior (terço distal da ulna) (Figura 5-1). O tempo de evolução nesses pacientes, considerando o início do relato dos sintomas, variou entre 0,5 e 6,5 meses. Cinco pacientes eram portadores de osteossarcoma clássico central e um paciente de osteossarcoma telangiectásico. Entre 0,9 e 20,4 meses após o diagnóstico observou-se a ocorrência de metástase pulmonar (n=4) e linfonodal (n=1) em cinco dos seis pacientes. Três pacientes foram tratados com ressecção cirúrgica e três com amputação do membro. Após a quimioterapia neoadjuvante, o índice de Huvos realizado na peça cirúrgica indicou má resposta à quimioterapia em cinco pacientes (graus I e II) e boa resposta em um paciente (grau III). Ao longo do período de observação do estudo, um paciente apresentou recidiva e, evoluiu para o óbito após 26,7 meses de acompanhamento clínico (Tabela 5-1).

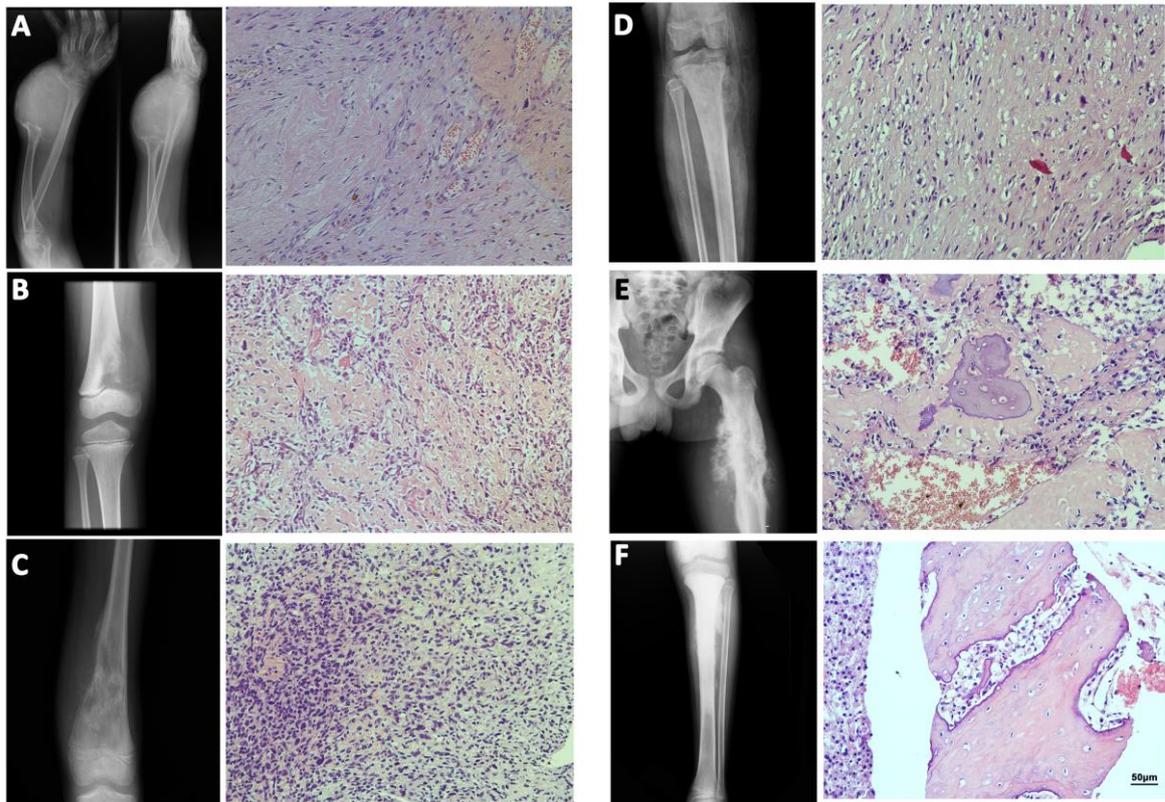


Figura 5-1 Topografia e tipo histológico das lesões. (A) Paciente OS1 com tumor no terço distal da ulna e diagnóstico histopatológico de osteossarcoma telangiectásico caracterizado pela presença de células neoplásicas em meio a estroma conjuntivo denso. (B) Paciente OS2 com tumor no terço distal do fêmur e diagnóstico histopatológico de osteossarcoma clássico central caracterizado por células neoplásicas com diferentes graus de atipias, relacionadas com deposição de matriz osteóide. (C) Paciente OS3 com tumor no terço distal do fêmur e diagnóstico histopatológico de osteossarcoma clássico central caracterizado por alta celularidade, núcleos pleomórficos e hiper cromáticos. (D) Paciente OS4 com tumor no terço proximal da tíbia e diagnóstico histopatológico de osteossarcoma clássico central caracterizado por células neoplásicas poliédricas em meio a estroma conjuntivo denso. (E) Paciente OS5 com tumor na região proximal do fêmur e diagnóstico histopatológico de osteossarcoma clássico central evidenciando células neoplásicas relacionadas com formação óssea. (F) Paciente OS6 com tumor no terço proximal da tíbia apresentando reação periosteal. Microsscopicamente diagnóstico histopatológico de osteossarcoma clássico central esclerosante com componente extracompartimental caracterizado por células neoplásicas infiltrando e destruindo parte de trave óssea. Barra de escala = 50µM.

Tabela 5-1 Características clínicas e do tratamento quimioterápico dos pacientes portadores de osteossarcoma incluídos nos experimentos *in vitro*.

<b>Parâmetro/Identificação paciente</b>	<b>OS1</b>	<b>OS2</b>	<b>OS3</b>	<b>OS4</b>	<b>OS5</b>	<b>OS6</b>
<b>Idade ao diagnóstico</b>	14	6	9	14	12	10
<b>Gênero</b>	M	M	F	M	F	M
<b>Topografia da lesão</b>	1/3 distal da ulna direita	1/3 distal do fêmur direito	1/3 distal do fêmur esquerdo	1/3 proximal da tibia direita	Região proximal do fêmur esquerdo	1/3 proximal da tibia esquerda
<b>Tempo de evolução relatado (meses)</b>	6,5	0,5	0,5	6	2	3
<b>Tipo histológico</b>	Osteossarcoma telangiectásico	Osteossarcoma clássico central	Osteossarcoma clássico central	Osteossarcoma clássico central	Osteossarcoma clássico central	Osteossarcoma clássico central
<b>Metástase (meses após diagnóstico)</b>	4,7	20,4	13,5	Não	0,9	14,0
<b>Local da metástase</b>	Pulmão	Pulmão	Pulmão	Não	Pulmão	Linfonodo inguinal
<b>Recidiva</b>	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
<b>Início do tratamento quimioterápico (semanas após diagnóstico)</b>	5,2	3,2	5,2	5,6	4,8	5,6
<b>Tratamento quimioterápico</b>	DOX, CIS, MTX	DOX, CIS, MTX	DOX, CIS, MTX	DOX, CIS, MTX	DOX, CIS, MTX	DOX, CIS, MTX
<b>Tratamento cirúrgico</b>	Amputação	Ressecção	Ressecção	Amputação	Ressecção	Amputação
<b>Resposta histológica (Huvos)</b>	I	II	III	I	II	I
<b>Óbito</b>	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
<b>Tempo de acompanhamento (meses)</b>	31,2	26,7	27,2	6,0	18,0	14,0

NO – dado não obtido. DOX – doxorubicina; CIS – cisplatina; MTX – metotrexato

Huvos I – mínima ou sem necrose tumoral II - 50 a 90% necrose III - > 90% necrose IV - 100% necrose

### **5.3 Caracterização das amostras primárias**

A caracterização fenotípica das células isoladas dos seis pacientes foi realizada por ensaio de imunocitoquímica para osteoprotegerina (marcador de diferenciação osteoblástica). Todas as células em cultura foram positivas para o marcador confirmando a identidade óssea das células isoladas. As células das linhagens comerciais de osteossarcoma, MG-63 e Saos2, foram utilizadas como controle positivo da expressão do marcador (Figuras 5-2 e 5-3).

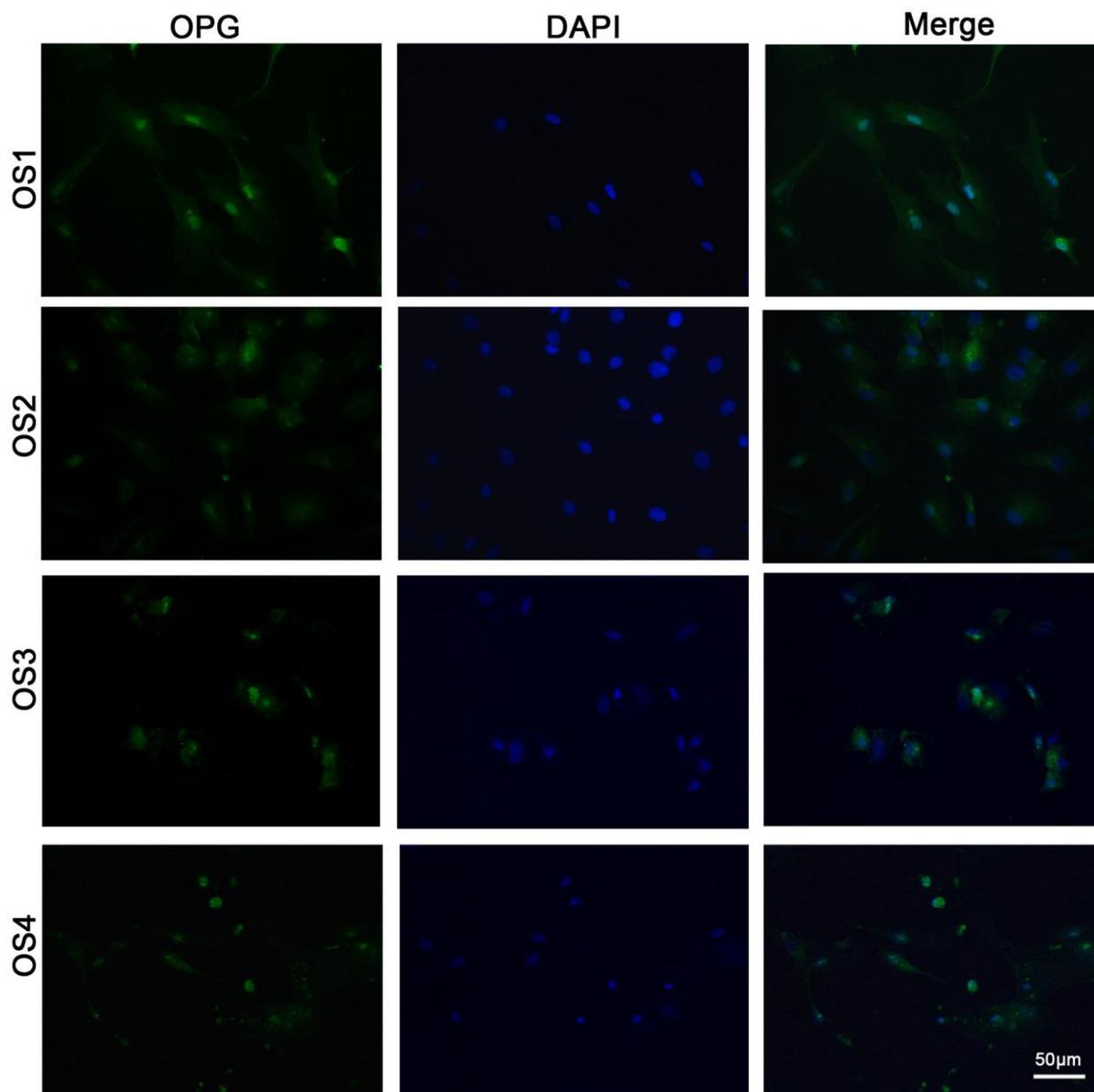


Figura 5-2 Marcação por imunocitoquímica para osteoprotegerina em células primárias de osteossarcoma (OS1 a OS4). Barra de escala = 50µm. OPG = osteoprotegerina

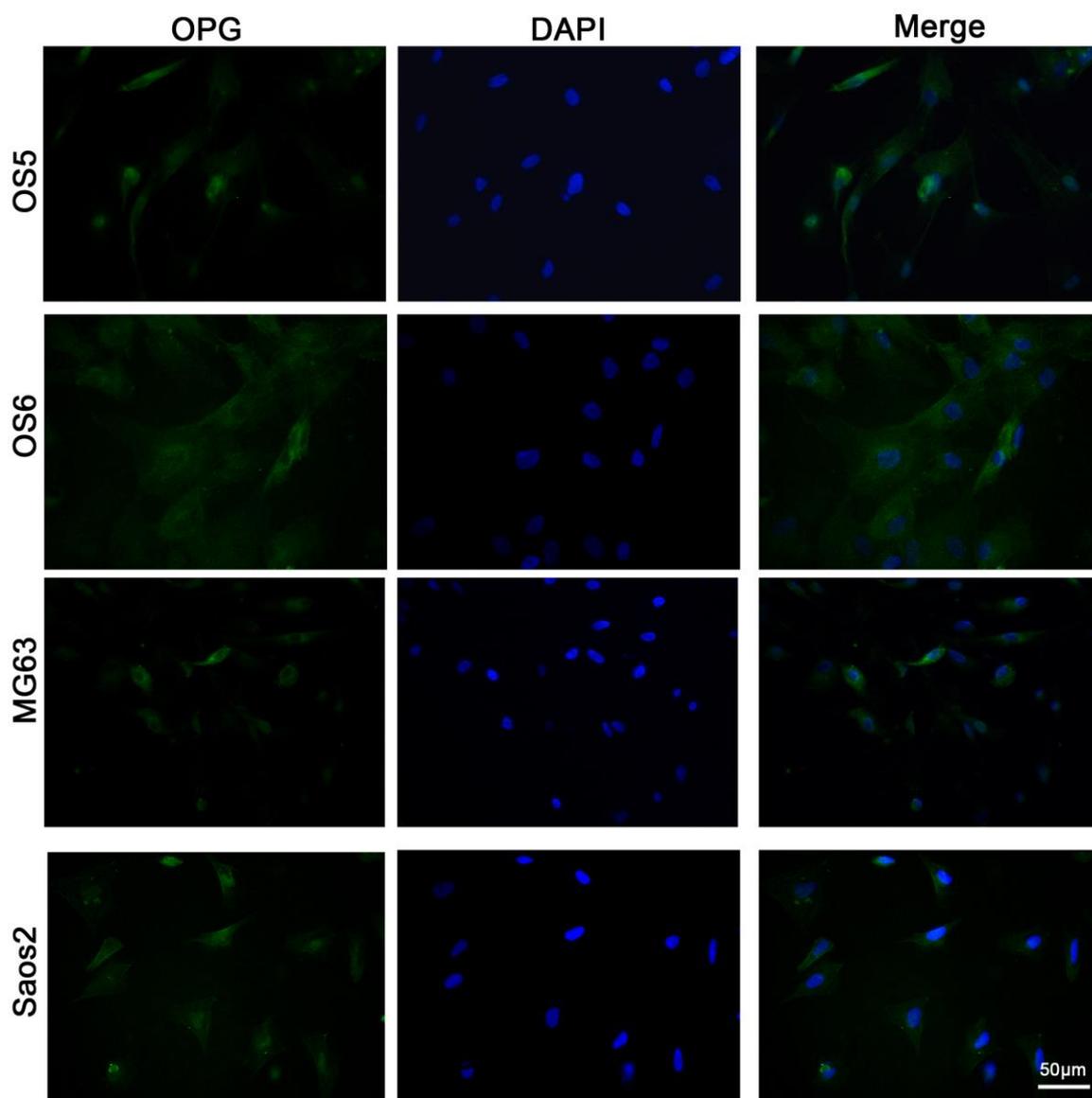


Figura 5-3 Marcação por imunocitoquímica para osteoprotegerina em células primárias (OS5 e OS6) e linhagens (MG63 e Saos2) de osteossarcoma. Barra de escala = 50µm. OPG = osteoprotegerina

#### 5.4 Viabilidade das células primárias sob tratamento com agentes quimioterápicos *in vitro*

Inicialmente, realizamos um experimento piloto para determinar a concentração ótima dos agentes quimioterápicos para ser usada no condicionamento do meio de cultura. As células obtidas de amostras tumorais dos pacientes OS1, OS2 e OS3 foram incubadas *in vitro* com os quimioterápicos DOX, CIS e MTX em conjunto ou isoladamente. Inicialmente, foi realizada uma curva

dose-resposta através do ensaio de redução do MTT. Nas amostras OS1, OS2 e OS3, ocorreu diminuição da viabilidade celular de forma dose-dependente na presença dos quimioterápicos CIS (Figura 5-4 A) e DOX (Figura 5-4 B). Por outro lado, a maior concentração de MTX aumentou a viabilidade de células tumorais isoladas de OS1 (Figura 5-4 C). Com base na diminuição de 20% a 40% da viabilidade em 72 horas, foi selecionada a concentração de 100 $\mu$ M para utilização nos ensaios posteriores.

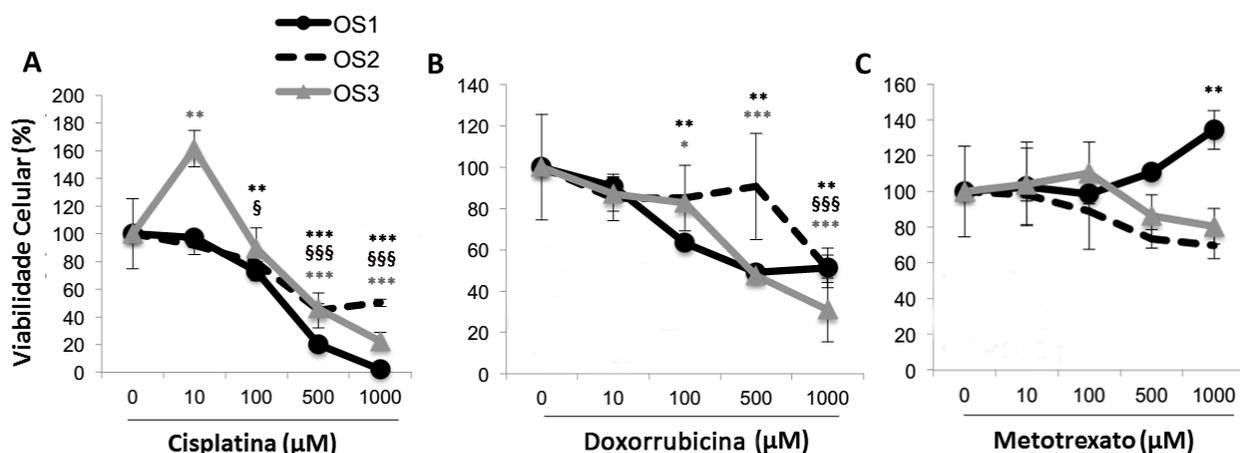


Figura 5-4 Efeito dos quimioterápicos sobre a viabilidade de células primárias de osteossarcoma. As células primárias isoladas dos pacientes OS1, OS2 e OS3 foram tratadas com diferentes concentrações dos quimioterápicos e a viabilidade foi determinada pelo ensaio de redução do MTT. (\*\*\*) e (§§§)  $p < 0,001$ ; (\*\* e §§)  $p < 0,01$ ; (\* e §)  $p < 0,05$  indicam significância estatística em relação ao controle (0 $\mu$ M). ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

### 5.5 Análise da expressão de biomarcadores de transição epitélio-mesenquimal em células primárias de osteossarcoma antes e após a quimioterapia

Na investigação do fenômeno EMT, foram avaliados os biomarcadores mesenquimais e epiteliais nas células isoladas de amostras coletadas de três pacientes antes (OS) e após o tratamento quimioterápico (OS QT). A análise por *Western blotting* foi realizada para as proteínas e-caderina, claudina-1, ZO-1, snail,

n-caderina,  $\beta$ -catenina, slug e vimentina nos três pacientes nos quais foram obtidas amostras pareadas. Após o tratamento quimioterápico, os três pacientes foram diagnosticados com metástase pulmonar. A comparação entre a expressão dos marcadores de EMT antes e depois da quimioterapia não mostrou diferença estatisticamente significativa em nenhuma das três amostras (snail,  $p=0,35$ ; vimentina e ZO-1,  $p=0,20$ ; N-caderina,  $\beta$ -catenina, claudina-1 e slug,  $p=0,50$ ; E-caderina,  $p=0,10$ ). Embora sem significância estatística, observamos que depois do tratamento quimioterápico houve redução na expressão do marcador mesenquimal snail e dos marcadores epiteliais E-caderina e ZO-1. A expressão dos demais marcadores mesenquimais,  $\beta$ -catenina e slug, e do marcador epitelial claudina-1 permaneceu estável ou aumentaram ligeiramente (N-caderina e vimentina) depois da quimioterapia (Figuras 5-5 e 5-6).

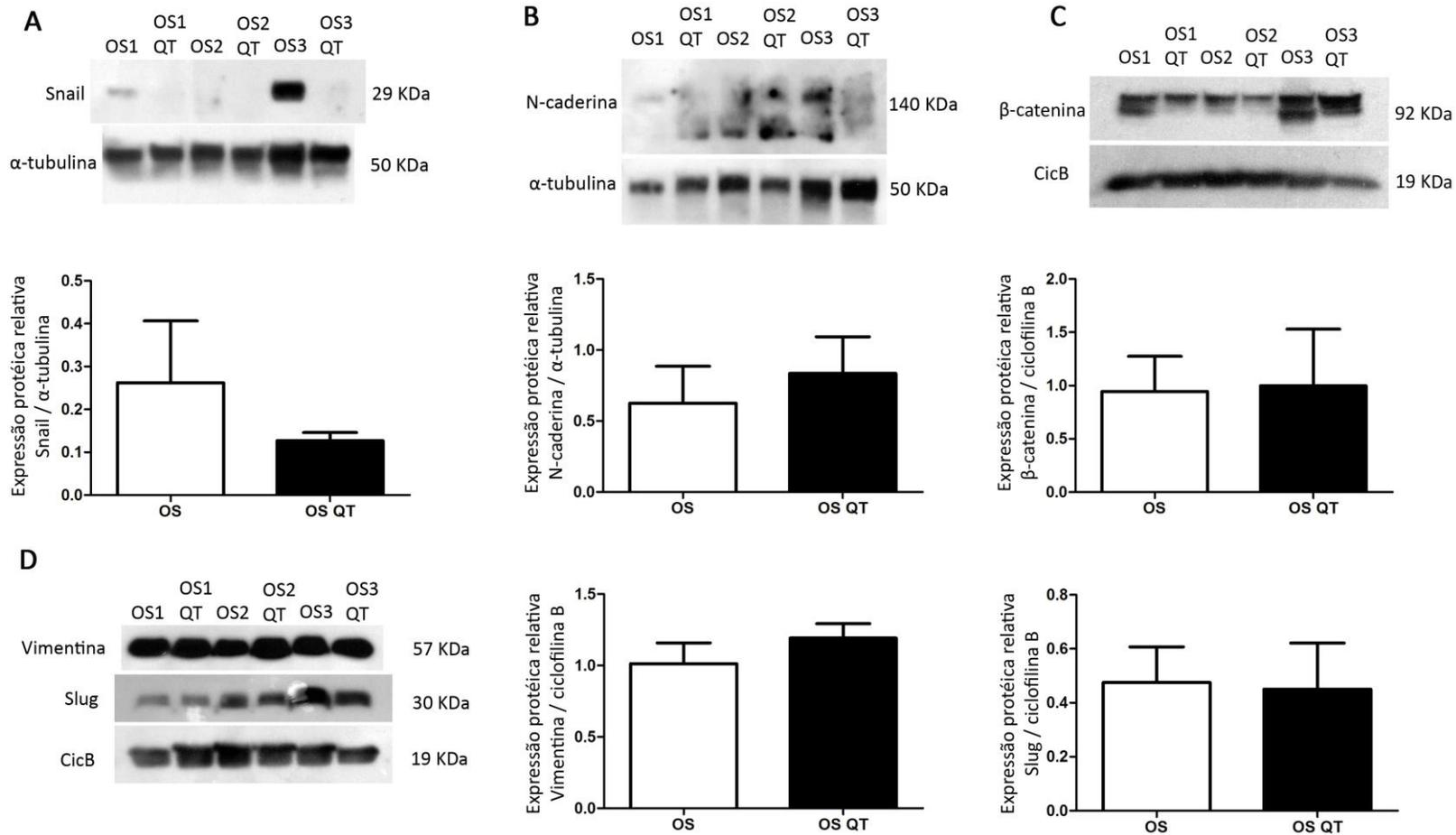


Figura 5-5 Efeito da quimioterapia sobre a expressão de marcadores mesenquimais em células primárias de osteossarcoma. As células foram isoladas de pacientes antes (OS1, OS2 e OS3) e após (OS1 QT, OS2 QT e OS3 QT) o tratamento quimioterápico e a expressão de biomarcadores mesenquimais foi analisada por *Western blotting*. Expressão de snail (A); N-caderina (B); β-catenina (C) e vimentina e slug (D). KDa – peso molecular em kilodaltons. Ciclofilina B e α-tubulina foram utilizadas como controles de carregamento.

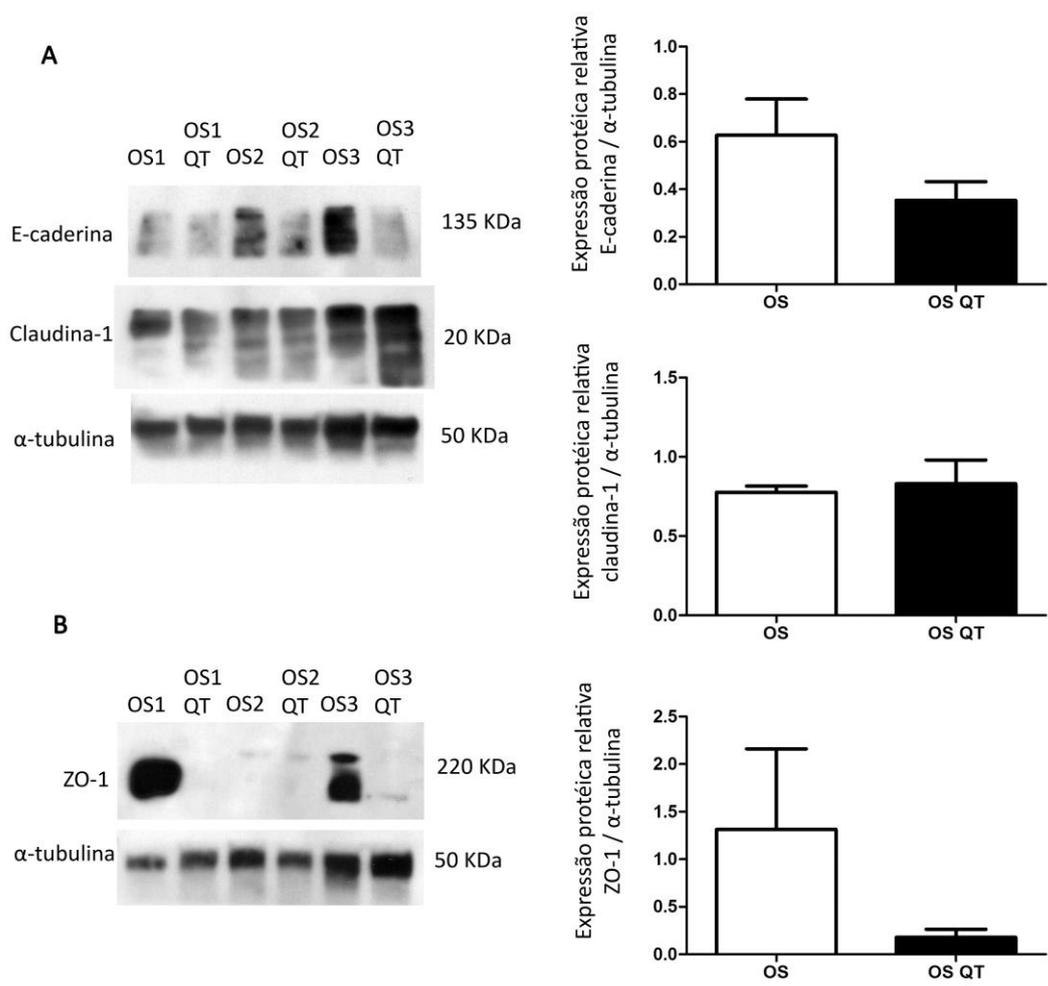


Figura 5-6 Efeito da quimioterapia sobre a expressão de marcadores epiteliais em células primárias de osteossarcoma. As células foram isoladas de pacientes antes (OS1, OS2 e OS3) e após (OS1 QT, OS2 QT e OS3 QT) o tratamento quimioterápico. Expressão de E-caderina e claudina-1 (A) e de zona ocludina-1 (ZO-1) (B). KDa – peso molecular em kilodaltons. Ciclofilina B e  $\alpha$ -tubulina foram utilizadas como controle de carregamento.

A avaliação do efeito *in vitro* dos quimioterápicos foi realizada nas culturas primárias, estabelecidas a partir de amostras tumorais obtidas de dois pacientes antes da quimioterapia (OS1 e OS4). A maior expressão de N-caderina e de vimentina ocorreu nas células tratadas simultaneamente com todos os agentes. A maior expressão de snail e slug foi observada na exposição isolada ao metotrexato. A expressão de  $\beta$ -catenina não diferiu entre os diferentes tratamentos (isolado ou combinado) (Figuras 5-7 e 5-8).

Em relação aos marcadores epiteliais foi observada menor expressão de claudina-1 e de E-caderina na exposição combinada com todos os agentes (Figura 5-9). A expressão de ZO-1 não foi avaliada neste experimento. Em todas as situações as células foram expostas aos agentes quimioterápicos por 24 horas.

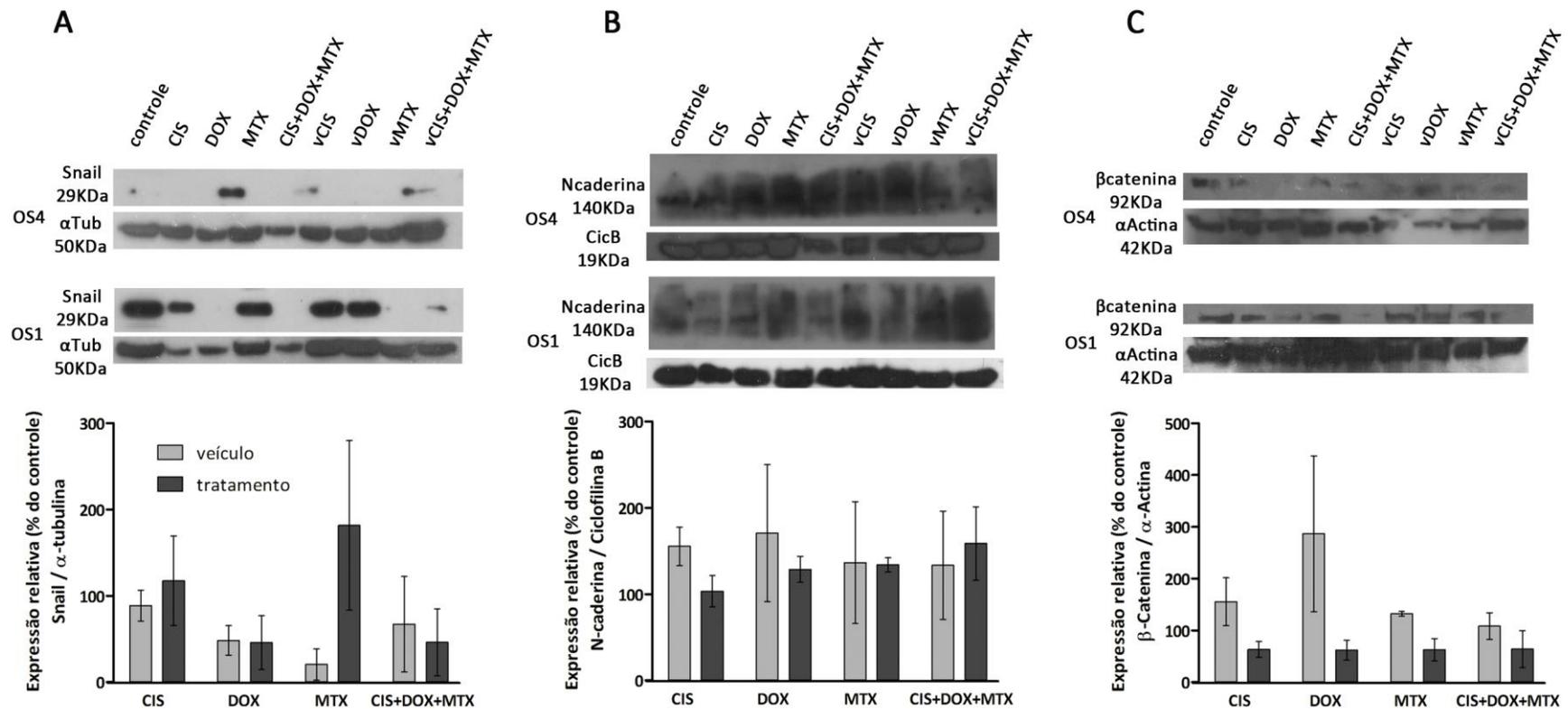


Figura 5-7 Efeito *in vitro* de agentes quimioterápicos sobre a expressão dos marcadores mesenquimais snail (A), N-caderina (B) e β-catenina (C) em células primárias de osteossarcoma. As células foram isoladas de pacientes (OS1 e OS4) antes do tratamento quimioterápico e tratadas *in vitro* por 24 horas com 100μM de Cisplatina (CIS), de Doxorrubicina (DOX), de Metotrexato (MTX) e com as combinações dos três agentes e seus respectivos veículos. A expressão de biomarcadores mesenquimais foi analisada por *Western blotting*. KDa – peso molecular em kilodaltons. α-tubulina, ciclofilina B e α-actina foram utilizadas como controles de carregamento.

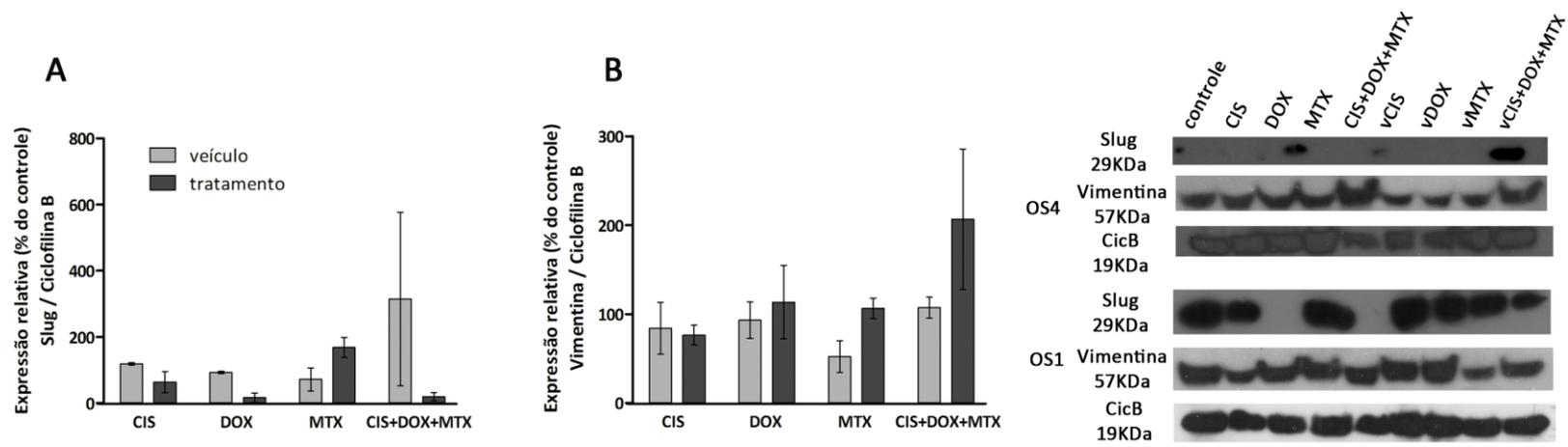


Figura 5-8 Efeito *in vitro* de agentes quimioterápicos sobre a expressão dos marcadores mesenquimais slug (A) e vimentina (B) em células primárias de osteossarcoma. As células foram isoladas de pacientes (OS1 e OS4) antes do tratamento quimioterápico e tratadas *in vitro* por 24 horas com 100µM de Cisplatina (CIS), de Doxorubicina (DOX), de Metotrexato (MTX) e com as combinações dos três agentes e seus respectivos veículos. A expressão de biomarcadores mesenquimais foi analisada por *Western blotting*. KDa – peso molecular em kilodaltons. Ciclofilina B foi utilizada como controle de carregamento.

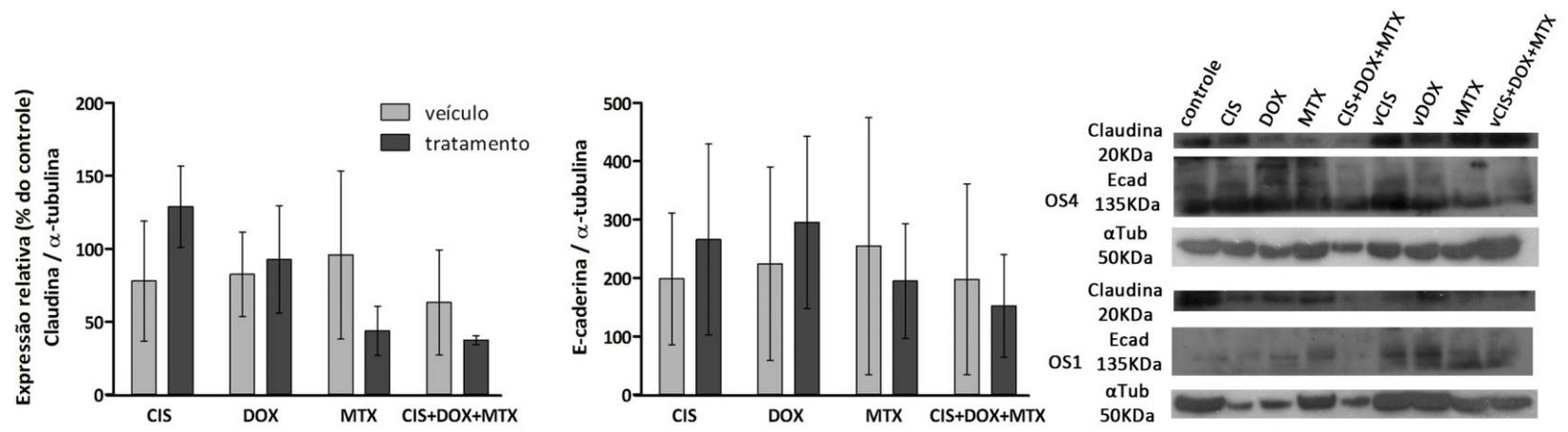


Figura 5-9 Efeito *in vitro* de agentes quimioterápicos sobre a expressão de marcadores epiteliais em células primárias de osteossarcoma. As células foram isoladas de pacientes (OS1 e OS4) antes do tratamento quimioterápico e tratadas *in vitro* por 24 horas com 100µM de Cisplatina (CIS), Doxorubicina (DOX), Metotrexato (MTX) e com as combinações dos três agentes e seus respectivos veículos. A expressão dos biomarcadores epiteliais claudina-1 e E-caderina foi analisada por *Western blotting*. KDa – peso molecular em kilodaltons. α-tubulina foi utilizada como controle de carregamento.

## **5.6 Efeito dos agentes quimioterápicos sobre a migração de células primárias de osteossarcoma**

A ação dos quimioterápicos sobre o potencial migratório das amostras OS1, OS4, OS5 e OS6 foi avaliada através do ensaio do risco sobre monocamada de células (Figura 5-10).

Foi observada tendência à diminuição da migração nas células tratadas com DOX e CIS em relação ao veículo. O percentual de células que migraram em relação ao controle foi 115,4% para o veículo vs 98,5% para DOX e 119,1% para o veículo e 97,6% para CIS. Para o MTX, foi observada tendência ao aumento da migração de 96% (veículo) para 101,4% para a droga. A associação dos quimioterápicos potencializou o efeito dos agentes sobre a migração. O tratamento com a combinação dos veículos promoveu 96,6% de migração celular, enquanto no tratamento com a combinação das drogas o percentual de migração baixou para 47,4% ( $p = 0,01$ ) (Figura 5-11). De forma geral, a combinação dos três agentes foi a mais eficaz na contenção da migração celular nas quatro amostras.

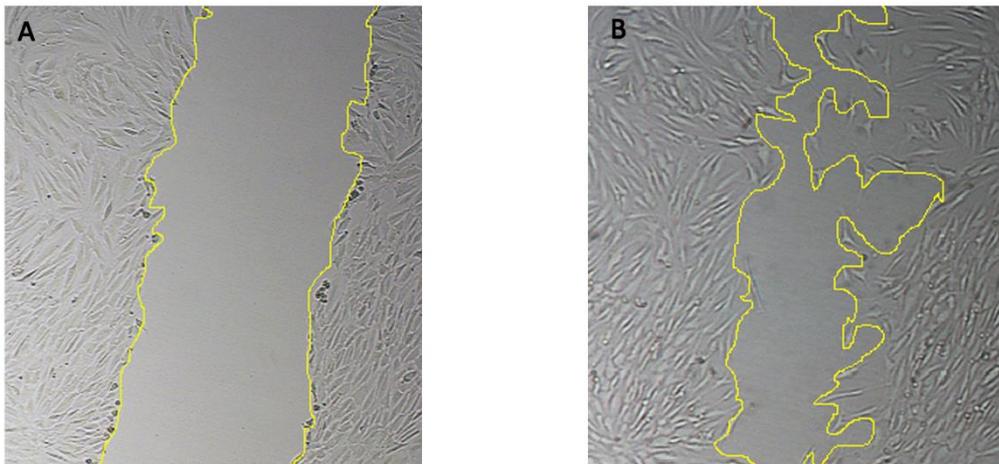


Figura 5-10 Ensaio de migração celular. Foi realizado um risco sobre a monocamada de células primárias de osteossarcoma. Fotomicrografias da cultura de células com área do risco delimitada pela linha amarela nos tempos 0h (A) e 24h (B).

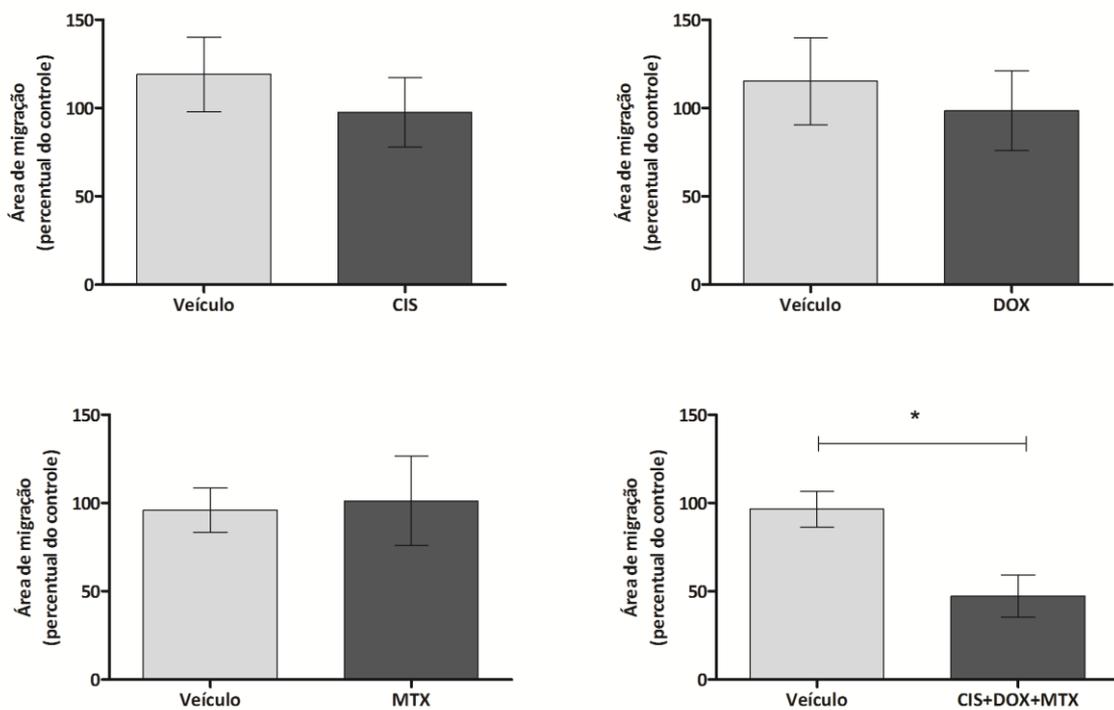


Figura 5-11 Efeito da quimioterapia sobre a migração de células primárias de osteossarcoma. A área de migração no ensaio do risco sobre monocamada foi quantificada em quatro linhagens celulares isoladas a partir de amostras de pacientes OS1, OS4, OS5 e OS6. As células foram tratadas com o quimioterápico e com o mesmo volume do veículo correspondente. Resultado de dois experimentos independentes para a linhagem celular OS1, três experimentos independentes para as linhagens OS5 e OS6 e quatro experimentos independentes para a linhagem OS4. Área de migração expressa em percentual sobre as células sem tratamento quimioterápico (controle). CIS – cisplatina; DOX – doxorubicina; MTX metotrexato; CIS+DOX+MTX – tratamento combinado de DOX, CIS e MTX. \*p = 0,01, teste de Mann Whitney.

## 6 DISCUSSÃO

---

Apesar dos relatos de que o tratamento quimioterápico tem um impacto positivo na sobrevivência de pacientes com osteossarcoma, reduzindo os índices de metástase (LINK *et al.*, 1986), na nossa casuística a incidência de metástase pulmonar e/ou linfonodal teve um aumento de 4,6 vezes após o tratamento quimioterápico. Em estudo realizado no Brasil, PETRILLI *et al.* (2006) mostraram que numa amostra constituída por 209 pacientes com osteossarcoma, 44 tinham metástase no momento do diagnóstico e um percentual mais de duas vezes maior (n=92) desenvolveu metástase na vigência do tratamento quimioterápico. Esses resultados mostram que, da mesma forma como no nosso estudo, a quimioterapia não teve um efeito protetor sobre a ocorrência de metástase. É provável que a instalação de implantes secundários no pulmão e linfonodos em pacientes com osteossarcoma represente apenas uma etapa do processo evolutivo da doença, sem relação tão direta com o tratamento quimioterápico.

O método de avaliação da resposta do osteossarcoma à quimioterapia evoluiu pouco desde 1991 (HUVOS, 1991). O índice de Huvos, que quantifica na peça cirúrgica, por métodos histológicos, a extensão da necrose do tecido tumoral após o tratamento, ainda é a principal ferramenta de avaliação da resposta do osteossarcoma a quimioterapia (LEE *et al.*, 1993). Portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos de análise mais específicos e precisos, que permitam caracterizar marcadores relacionados com a progressão de doenças neoplásicas, não apenas sob o ponto de vista diagnóstico e de acompanhamento dos pacientes, mas como importantes ferramentas na definição da etiopatogenia dessa doença.

No contexto das neoplasias malignas, e em particular no osteossarcoma, os marcadores de transição EMT podem levar a um importante avanço no conhecimento dos mecanismos que resultam na grande variação da resposta aos tratamentos poliquimioterápicos. Neste sentido, utilizamos linhagens celulares primárias, obtidas de amostras de pacientes com osteossarcoma para avaliar a expressão de marcadores de fenótipo epitelial e mesenquimal como indicadores moleculares de EMT.

Inicialmente caracterizamos para os estudos *in vitro* as amostras celulares visando assegurar a sua identidade osteoblástica. A osteoprotegerina foi utilizada como marcador do fenótipo osteoblástico (KIESLINGER *et al.*, 2005) nas culturas primárias estabelecidas a partir das células isoladas de amostras de três pacientes. Já foi demonstrado que, em cultura de células isoladas de osteossarcoma (PAUTKE *et al.*, 2004) e também células provenientes de linhagens (BURMESTER *et al.*, 2014) preservam alguns aspectos do fenótipo de osteoblastos normais. No presente estudo, tanto as células isoladas das lesões como as células provenientes das duas linhagens celulares (MG63 e Saos2) foram positivas para a osteoprotegerina, molécula expressa por osteoblastos. Assim, com as linhagens primárias devidamente caracterizadas, deu-se sequência nos experimentos com os agentes quimioterápicos.

A ação citotóxica da cisplatina e da doxorubicina sobre células de culturas primárias de osteossarcoma é dose-dependente, fenômeno este também observado em linhagens comerciais de células de osteossarcoma (FELLENBERG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010). Este padrão de ação citotóxica dose-dependente não foi observado para o metotrexato que, nas mesmas condições de cultivo *in vitro* dos

dois outros agentes, exerceu um efeito protetor sobre a viabilidade celular na amostra tumoral de um dos pacientes.

Em modelo estabelecido com células endoteliais de cordão umbilical humano (células HUVEC), ANNUSSEK *et al.* (2014) observaram que o efeito do metotrexato sobre a viabilidade celular é tempo-dependente, ficando comprometida após seis dias de incubação com o metotrexato em concentrações entre 1-1000 nM. Resultados semelhantes foram relatados por FELLEBERG *et al.* (2010) para as células Saos2 tratadas com metotrexato em concentrações entre 3,3-100 nM por 96 horas. O menor tempo de exposição que utilizamos no nosso estudo (24 horas) poderia explicar, pelo menos em parte, a ausência de ação sobre a viabilidade celular, uma vez que na concentração que utilizamos (100 nM), o metotrexato é capaz de induzir morte celular.

A mudança da expressão de E-caderina para N-caderina é um indicador de transição epitélio-mesenquimal considerado crucial para a progressão tumoral do câncer de próstata (GRAVDAL *et al.*, 2007). A redução da expressão de E-caderina também foi descrita em associação com aumento do potencial de invasão tumoral em osteossarcomas (LIU *et al.*, 2015). Kashima e colaboradores (2003) avaliaram em linhagens de osteossarcoma, as consequências funcionais da superexpressão de N-caderina sobre o potencial de migração celular e sobre o desenvolvimento de metástase pulmonar em murinos. Os autores observaram que *in vitro*, a N-caderina não interferiu com o potencial proliferativo das células, mas inibiu a migração. *In vivo*, a ação se traduziu por acentuada redução na indução de metástase, demonstrando que o processo de perda da adesão célula-célula, mediada pela N-caderina, é uma etapa crítica para o estabelecimento de metástase pulmonar em osteossarcoma.

Nos experimentos *ex-vivo* com as amostras pareadas de três pacientes, que visou estabelecer a relação entre a expressão de marcadores mesenquimais de EMT e a resposta ao tratamento quimioterápico, observamos que houve um pequeno aumento da expressão N-caderina e redução da expressão de E-caderina depois da quimioterapia, que em ambos os casos não obteve significância estatística. Estes achados, embora necessitem de estudos mais robustos com amostras maiores para serem confirmados, apontam para a possibilidade de que o tratamento quimioterápico do osteossarcoma induza o aumento da relação N-caderina/E-caderina e/ou induza a inibição da expressão de E-caderina.

Para simular a situação clínica do tratamento poliquimioterápico, submetemos as células obtidas de duas amostras tumorais à ação isolada e combinada de cisplatina, doxorubicina e metotrexato por 24 horas. A maior expressão de N-caderina e a menor expressão de E-caderina foi observada nas células submetidas simultaneamente a ação dos três agentes. A semelhança no padrão de expressão de N-caderina e E-caderina nos dois experimentos (com amostras pareadas e exposição *in vitro* aos agentes) reforça a possibilidade de que o protocolo poliquimioterápico utilizado no tratamento do osteossarcoma não contenha os mecanismos de metástase.

A vimentina responde pela manutenção da morfologia celular, da integridade citoplasmática e pela estabilização do citoesqueleto (COULOMBE e WONG, 2004) e a sua expressão está relacionada às propriedades invasivas das células tumorais e, conseqüentemente, à disseminação metastática (YANG *et al.*, 2013). Em leiomiossarcomas foi demonstrado que o aumento da expressão da E-caderina associada a redução da vimentina (*cadherin switching*), o que resulta na expressão do fenótipo epitelial, está relacionada com melhor prognóstico da doença. De fato,

os autores comprovaram que neste tipo de sarcoma, a expressão de vimentina está associada com maior risco de recidiva, de metástase e com piores índices de sobrevida (TIAN *et al.*, 2013). Em estudos conduzidos com a linhagem celular Saos-2 cultivada em condições de hipóxia, SUN *et al.* (2015) confirmaram este achado, mostrando haver um aumento do potencial proliferativo e de invasão associado ao *cadherin switching*.

Os resultados dos experimentos com as amostras pareadas mostram que, apesar da ausência de significância estatística, houve uma pequena elevação dos níveis de expressão de vimentina após o tratamento, que poderia ser interpretada, sob o ponto de vista desta molécula, como uma possível resposta insatisfatória à quimioterapia. Os resultados da avaliação da expressão de vimentina nos experimentos *in vitro* reforçam esta possibilidade.

O efeito sinérgico dos membros da família do snail e a  $\beta$ -catenina fornece às células tumorais capacidade de sobrevivência durante a disseminação, que resulta na implantação do tumor em sítios secundários (WANG *et al.*, 2013). Os membros da família snail induzem a EMT através da regulação negativa da E-caderina que, por sua vez, acarreta no aumento da migração celular, invasão e progressão tumoral (CANO *et al.*, 2000). Particularmente no osteossarcoma, a EMT, através do aumento da expressão de snail e da supressão de E-caderina, favorece a migração e a invasão celulares (CHENG *et al.*, 2015).

Um outro papel atribuído às proteínas snail e slug é um provável efeito protetor sobre as células-tronco tumorais, tornando-as mais resistentes ao estresse celular causado pela quimioterapia. As populações de células-tronco tumorais são responsáveis pelo crescimento tumoral e atividade metastática de diversos tumores sólidos e desempenham um importante papel na resistência aos fármacos, na

recidiva e na instalação das metástases (REYA *et al.*, 2001; BASU-ROY *et al.*, 2013; ZINZI *et al.*, 2014).

Os resultados dos experimentos *ex-vivo* com as amostras pareadas sugerem uma possível ação inibitória da quimioterapia sobre a expressão de snail, não evidenciada nos marcadores slug e  $\beta$ -catenina, que permaneceram inalterados depois da quimioterapia. Este mesmo padrão de resposta dos marcadores snail e  $\beta$ -catenina foram confirmados no experimento *in vitro* na situação que reproduz o protocolo clínico, com a exposição simultânea aos três agentes. O conjunto desses resultados aponta para a possibilidade de que o protocolo poliquimioterápico utilizado no tratamento do osteossarcoma, potencialmente reduza os índices de metástase e de migração celular através da inibição das vias reguladas por esses marcadores.

As proteínas integrais ocludinas como a ZO-1 e as claudinas são os principais componentes das junções oclusivas, responsáveis pelo bloqueio do espaço intercelular, que impede o transporte de moléculas através do epitélio. Por meio deste mecanismo elas regulam a permeabilidade da membrana, controlando a difusão celular de moléculas e de íons (KRAUSE *et al.*, 2008). Por outro lado, o significado biológico exato da alteração na expressão das claudinas, particularmente nos carcinomas, ainda está longe de ser definido. A expressão de claudina-7 foi relacionada com o grau de diferenciação celular, com a ocorrência de metástases e com a coesão celular em câncer de mama (SAUER *et al.*, 2005). Por sua vez, em câncer de ovário, as claudinas 3 e 4 foram relacionadas ao menor crescimento tumoral *in vivo* e ao menor potencial metastático através da sustentação da expressão de E-caderina e, simultaneamente, limitando a via de sinalização da  $\beta$ -catenina (SHANG *et al.*, 2012).

No nosso estudo, a expressão de claudina no experimento *ex-vivo* não foi alterada depois do tratamento quimioterápico. Os resultados da avaliação da expressão de claudina-1 nos experimentos *in vitro* não confirmaram este resultado. A expressão de ZO-1, por sua vez, reduziu nas amostras pareadas depois do tratamento quimioterápico. Estudos mais amplos, que contemplem de forma mais pontual o papel dessas duas proteínas em sarcomas serão necessários para esclarecer a sua real importância no desenvolvimento e evolução do osteossarcoma.

Finalmente, quanto ao potencial de migração celular das células tumorais, nossos resultados mostraram, que sob a influência da ação combinada dos três agentes, houve uma redução significativa da migração em todas as amostras analisadas.

Os resultados do presente estudo não nos permitiram avançar no conhecimento sobre os mecanismos que controlam e regulam a falha da quimioterapia na evolução clínica do osteossarcoma. Acreditamos, contudo, que demos um passo inicial no sentido de definir marcadores, que potencialmente possam ser utilizados na caracterização biológica das diversas variantes do osteossarcoma e, desta forma, atuar com maior precisão no acompanhamento clínico e biológico da doença. Deve ser salientado ainda que, a falta de resultados definitivos sobre a expressão desses marcadores selecionados, certamente está relacionada com a variação inter-indivíduos na expressão de biomarcadores e, particularmente, com a heterogeneidade celular das variantes histológicas do osteossarcoma. Acrescente-se a esses obstáculos a dificuldade para a obtenção de amostras pareadas e a complexidade técnica para o estabelecimento das culturas primárias. Assim sendo, estudos mais robustos, com casuísticas maiores deverão ser realizados pelo Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, justificando

assim o papel da instituição na definição de novas políticas para o tratamento das doenças neoplásicas do sistema musculoesquelético.

## 7 CONCLUSÕES

---

- A maior parte das metástases que ocorrem em pacientes portadores de osteossarcoma é detectada no curso do tratamento quimioterápico;
- O tratamento quimioterápico realizado em pacientes com osteossarcoma não promove um padrão uniforme da expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquimal nas células primárias isoladas diretamente de amostras tumorais;
- O tratamento *in vitro* de células primárias de osteossarcoma com agentes quimioterápicos não modula de forma significativa a expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquimal;
- A combinação dos quimioterápicos cisplatina, doxorrubicina e metotrexato diminui a capacidade migratória de células primárias de osteossarcoma, no entanto isoladamente esses agentes não têm efeito sobre a migração celular.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ANDO, K.; HEYMANN, M. F.; STRESING, V.; MORI, K.; REDINI, F.; HEYMANN, D. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. **Cancers (Basel)**, 5, (2): 591-616, 2013
- ANNUSSEK, T.; SZUWART, T.; KLEINHEINZ, J.; KOIKY, C.; WERMKER, K. In vitro inhibition of HUVECs by low dose methotrexate - insights into oral adverse events. **Head Face Med**, 10: 19, 2014
- ARCANGELI, G.; ARCANGELI, S.; STRIGARI, L. A systematic review and meta-analysis of clinical trials of bladder-sparing trimodality treatment for muscle-invasive bladder cancer (MIBC). **Crit Rev Oncol Hematol**, 2014
- ARNDT, C. A.; ROSE, P. S.; FOLPE, A. L.; LAACK, N. N. Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. **Mayo Clin Proc**, 87, (5): 475-87, 2012
- AYERZA, M. A.; FARFALLI, G. L.; APONTE-TINAO, L.; MUSCOLO, D. L. Does increased rate of limb-sparing surgery affect survival in osteosarcoma? **Clin Orthop Relat Res**, 468, (11): 2854-9, 2010
- BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. C.; FRANCO, M. **Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos**. 3a. São Paulo: 2005.
- BAGUTTI, C.; SPEIGHT, P. M.; WATT, F. M. Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **J Pathol**, 186, (1): 8-16, 1998
- BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. Cancer: an inflammatory link. **Nature**, 431, (7007): 405-6, 2004
- BASU-ROY, U.; BASILICO, C.; MANSUKHANI, A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. **Cancer Lett**, 338, (1): 158-67, 2013
- BIELACK, S.; JURGENS, H.; JUNDT, G.; KEVRIC, M.; KUHNE, T.; REICHARDT, P.; ZOUBEK, A.; WERNER, M.; WINKELMANN, W.; KOTZ, R. Osteosarcoma: the COSS experience. **Cancer Treat Res**, 152: 289-308, 2009
- BIELACK, S. S.; KEMPF-BIELACK, B.; DELLING, G.; EXNER, G. U.; FLEGE, S.; HELMKE, K.; KOTZ, R.; SALZER-KUNTSCHIK, M.; WERNER, M.; WINKELMANN, W.; ZOUBEK, A.; JURGENS, H.; WINKLER, K. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. **Journal of Clinical Oncology**, 20, (3): 776-90, 2002
- BRENNECKE, P.; ARLT, M. J.; CAMPANILE, C.; HUSMANN, K.; GVOZDENOVIC, A.; APUZZO, T.; THELEN, M.; BORN, W.; FUCHS, B. CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice. **Clin Exp Metastasis**, 31, (3): 339-49, 2014
- BURMESTER, A.; LUTHRINGER, B.; WILLUMEIT, R.; FEYERABEND, F. Comparison of the reaction of bone-derived cells to enhanced MgCl<sub>2</sub>-salt concentrations. **Biomatter**, 4: e967616, 2014
- CALVERT, G. T.; RANDALL, R. L.; JONES, K. B.; CANNON-ALBRIGHT, L.; LESSNICK, S.; SCHIFFMAN, J. D. At-risk populations for osteosarcoma: the syndromes and beyond. **Sarcoma**, 2012: 152382, 2012
- CAMARGO, O. P. Afecções tumorais avaliação, epidemiologia e diagnóstico. In: MANOLE (Ed.). **Clinica ortopédica**. Barueri 2012.

- CANO, A.; PEREZ-MORENO, M. A.; RODRIGO, I.; LOCASCIO, A.; BLANCO, M. J.; DEL BARRIO, M. G.; PORTILLO, F.; NIETO, M. A. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. **Nat Cell Biol**, 2, (2): 76-83, 2000
- CHENG, G.; LIU, C.; SUN, X.; ZHANG, L.; LIU, L.; OUYANG, J.; LI, B. Visfatin promotes osteosarcoma cell migration and invasion via induction of epithelial-mesenchymal transition. **Oncol Rep**, 34, (2): 987-94, 2015
- COTTERILL, S. J.; WRIGHT, C. M.; PEARCE, M. S.; CRAFT, A. W. Stature of young people with malignant bone tumors. **Pediatr Blood Cancer**, 42, (1): 59-63, 2004
- COULOMBE, P. A.; WONG, P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. **Nat Cell Biol**, 6, (8): 699-706, 2004
- D'ARPA, P.; LIU, L. F. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. **Biochim Biophys Acta**, 989, (2): 163-77, 1989
- DAMRON, T. A.; WARD, W. G.; STEWART, A. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma: National Cancer Data Base Report. **Clin Orthop Relat Res**, 459: 40-7, 2007
- DE CRAENE, B.; BERX, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nat Rev Cancer**, 13, (2): 97-110, 2013
- EYRE, R.; FELTBOWER, R. G.; JAMES, P. W.; BLAKEY, K.; MUBWANDARIKWA, E.; FORMAN, D.; MCKINNEY, P. A.; PEARCE, M. S.; MCNALLY, R. J. The epidemiology of bone cancer in 0 - 39 year olds in northern England, 1981 - 2002. **BMC Cancer**, 10: 357, 2010
- FELLENBERG, J.; KUNZ, P.; SAHR, H.; DEPEWEG, D. Overexpression of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II mediates chemoresistance to human osteosarcoma cells. **PLoS One**, 5, (8): e12179, 2010
- FERMAN, S. Protocolo GCBTO: O uso do Metotrexato em altas e baixas doses-aspectos clínicos. II Congresso em Farmácia Hospitalar em Oncologia do INCA, 2010, Rio de Janeiro. Instituto Nacional do Câncer.
- FIGUEIREDO, E. M. A.; CORREIA, M. M.; OLIVEIRA, A. F. **Tratado de Oncologia**. Rio de Janeiro: 2013.
- FLETCHER, S. J.; RAPPOPORT, J. Z. Tight junction regulation through vesicle trafficking: bringing cells together. **Biochem Soc Trans**, 42, (1): 195-200, 2014
- FOX, M. G.; TROTТА, B. M. Osteosarcoma: review of the various types with emphasis on recent advancements in imaging. **Semin Musculoskelet Radiol**, 17, (2): 123-36, 2013
- FUCHS, B.; PRITCHARD, D. J. Etiology of osteosarcoma. **Clin Orthop Relat Res**, (397): 40-52, 2002
- GELBERG, K. H.; FITZGERALD, E. F.; HWANG, S.; DUBROW, R. Growth and development and other risk factors for osteosarcoma in children and young adults. **Int J Epidemiol**, 26, (2): 272-8, 1997
- GILLESPIY, T., 3RD; MANFRINI, M.; RUGGIERI, P.; SPANIER, S. S.; PETERSSON, H.; SPRINGFIELD, D. S. Staging of intraosseous extent of osteosarcoma: correlation of preoperative CT and MR imaging with pathologic macroslices. **Radiology**, 167, (3): 765-7, 1988
- GOGUET-SURMENIAN, E.; RICHARD-FIARDO, P.; GUILLEMOT, E.; BENCHETRIT, M.; GOMEZ-BROUCHET, A.; BUZZO, P.; KARIMDJEE-SOILIH, B.; ALEMANN, P.; MICHIELS, J. F.; SCHMID-ALLIANA, A.; SCHMID-ANTOMARCHI, H. CXCR7-mediated progression of osteosarcoma in the lungs. **Br J Cancer**, 109, (6): 1579-85, 2013

- GRAVDAL, K.; HALVORSEN, O. J.; HAUKAAS, S. A.; AKSLEN, L. A. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. **Clin Cancer Res**, 13, (23): 7003-11, 2007
- GUAN, G.; ZHANG, Y.; LU, Y.; LIU, L.; SHI, D.; WEN, Y.; YANG, L.; MA, Q.; LIU, T.; ZHU, X.; QIU, X.; ZHOU, Y. The HIF-1alpha/CXCR4 pathway supports hypoxia-induced metastasis of human osteosarcoma cells. **Cancer Lett**, 357, (1): 254-64, 2015
- GUILFORD, W. H.; WARSHAW, D. M. The molecular mechanics of smooth muscle myosin. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, 119, (3): 451-8, 1998
- GUISE, T. A.; O'KEEFE, R.; RANDALL, R. L.; TEREK, R. M. Molecular biology and therapeutics in musculoskeletal oncology. **J Bone Joint Surg Am**, 91, (3): 724-32, 2009
- GUO, M.; CAI, C.; ZHAO, G.; QIU, X.; ZHAO, H.; MA, Q.; TIAN, L.; LI, X.; HU, Y.; LIAO, B.; MA, B.; FAN, Q. Hypoxia promotes migration and induces CXCR4 expression via HIF-1alpha activation in human osteosarcoma. **PLoS One**, 9, (3): e90518, 2014
- HAZAN, R. B.; KANG, L.; WHOOLEY, B. P.; BORGEM, P. I. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. **Cell Adhes Commun**, 4, (6): 399-411, 1997
- HAZAN, R. B.; PHILLIPS, G. R.; QIAO, R. F.; NORTON, L.; AARONSON, S. A. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. **J Cell Biol**, 148, (4): 779-90, 2000
- HINTON, C. V.; AVRAHAM, S.; AVRAHAM, H. K. Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain. **Clin Exp Metastasis**, 27, (2): 97-105, 2010
- HOLSCHER, H. C.; BLOEM, J. L.; VANEL, D.; HERMANS, J.; NOOY, M. A.; TAMINIAU, A. H.; HENRY-AMAR, M. Osteosarcoma: chemotherapy-induced changes at MR imaging. **Radiology**, 182, (3): 839-44, 1992
- HUVOS, A. J. **Bone Tumors**. Philadelphia: Saunders Co., 1991.
- ISHIKAWA, T.; SHIMIZU, T.; UEKI, A.; YAMAGUCHI, S. I.; ONISHI, N.; SUGIHARA, E.; KUNINAKA, S.; MIYAMOTO, T.; MORIOKA, H.; NAKAYAMA, R.; KOBAYASHI, E.; TOYAMA, Y.; MABUCHI, Y.; MATSUZAKI, Y.; YAMAGUCHI, R.; MIYANO, S.; SAYA, H. Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells. **Cancer Sci**, 104, (7): 880-8, 2013
- JADÃO, F. R. D. S.; LIMA, L. D. S.; LOPES, J. A. S.; RIBEIRO, M. B. Avaliação dos fatores prognósticos e sobrevida de pacientes com Osteossarcoma atendidos em um Hospital Filantrópico de Teresina (PI), Brasil. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 48, (1): 87-91, 2013
- JAFFE, N. Osteogenic sarcoma: state of the art with high-dose methotrexate treatment. **Clin Orthop Relat Res**, (120): 95-102, 1976
- JAFFE, N.; PURI, A.; GELDERBLOM, H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms. **Sarcoma**, 2013: 203531, 2013
- JAFFE, N. Historical perspective on the introduction and use of chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. **Adv Exp Med Biol**, 804: 1-30, 2014
- JESUS-GARCIA, R. **Diagnóstico e Tratamento de Tumores Ósseos**. 1. Brasil: ELSEVIER, 2013. 560
- JONES, K. B.; FERGUSON, P. C.; LAM, B.; BIAU, D. J.; HOPYAN, S.; DEHESHI, B.; GRIFFIN, A. M.; WHITE, L. M.; WUNDER, J. S. Effects of neoadjuvant chemotherapy on image-directed

- planning of surgical resection for distal femoral osteosarcoma. **J Bone Joint Surg Am**, 94, (15): 1399-405, 2012
- KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest**, 112, (12): 1776-84, 2003
- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, 119, (6): 1420-8, 2009
- KIESLINGER, M.; FOLBERTH, S.; DOBREVA, G.; DORN, T.; CROCI, L.; ERBEN, R.; CONSALEZ, G. G.; GROSSCHEDL, R. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. **Dev Cell**, 9, (6): 757-67, 2005
- KIM, A.; UEDA, Y.; NAKA, T.; ENOMOTO, T. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. **J Exp Clin Cancer Res**, 31: 14, 2012
- KRAUSE, G.; WINKLER, L.; MUELLER, S. L.; HASELOFF, R. F.; PIONTEK, J.; BLASIG, I. E. Structure and function of claudins. **Biochim Biophys Acta**, 1778, (3): 631-45, 2008
- KUNDU, Z. S. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. **Indian J Orthop**, 48, (3): 238-46, 2014
- KUO, M. T.; CHEN, H. H.; SONG, I. S.; SAVARAJ, N.; ISHIKAWA, T. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. **Cancer Metastasis Rev**, 26, (1): 71-83, 2007
- LAVERDIERE, C.; HOANG, B. H.; YANG, R.; SOWERS, R.; QIN, J.; MEYERS, P. A.; HUVOS, A. G.; HEALEY, J. H.; GORLICK, R. Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma. **Clin Cancer Res**, 11, (7): 2561-7, 2005
- LEE, S. Y.; JEON, D. G.; KIM, S. S.; JANG, J. J.; CHO, K. J. Pathological responses to preoperative high-dose methotrexate chemotherapy in osteosarcoma--experience in Korea cancer hospital. **J Korean Med Sci**, 8, (2): 121-6, 1993
- LEHTINEN, L.; KETOLA, K.; MAKELA, R.; MPINDI, J. P.; VIITALA, M.; KALLIONIEMI, O.; ILJIN, K. High-throughput RNAi screening for novel modulators of vimentin expression identifies MTHFD2 as a regulator of breast cancer cell migration and invasion. **Oncotarget**, 4, (1): 48-63, 2013
- LEWIS, V. O. What's new in musculoskeletal oncology. **J Bone Joint Surg Am**, 91, (6): 1546-56, 2009
- LI, X.; ASHANA, A. O.; MORETTI, V. M.; LACKMAN, R. D. The relation of tumour necrosis and survival in patients with osteosarcoma. **Int Orthop**, 35, (12): 1847-53, 2011
- LI, Y.; FLORES, R.; YU, A.; OKCU, M. F.; MURRAY, J.; CHINTAGUMPALA, M.; HICKS, J.; LAU, C. C.; MAN, T. K. Elevated expression of CXC chemokines in pediatric osteosarcoma patients. **Cancer**, 117, (1): 207-17, 2011
- LIN, P. P.; PANDEY, M. K.; JIN, F.; RAYMOND, A. K.; AKIYAMA, H.; LOZANO, G. Targeted mutation of p53 and Rb in mesenchymal cells of the limb bud produces sarcomas in mice. **Carcinogenesis**, 30, (10): 1789-95, 2009
- LINK, M. E. E., F. Osteosarcoma. . In: PUBLISHERS, R. (Ed.). **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. Philadelphia 2002.
- LINK, M. P.; GOORIN, A. M.; MISER, A. W.; GREEN, A. A.; PRATT, C. B.; BELASCO, J. B.; PRITCHARD, J.; MALPAS, J. S.; BAKER, A. R.; KIRKPATRICK, J. A.; ET AL. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. **N Engl J Med**, 314, (25): 1600-6, 1986

- LIU, W.; QIAO, R. H.; WANG, D. M.; HUANG, X. W.; LI, B.; WANG, D. UHRF1 promotes human osteosarcoma cell invasion by downregulating the expression of Ecadherin in an Rb1dependent manner. **Mol Med Rep**, 2015
- LIU, Z.; LI, Q.; LI, K.; CHEN, L.; LI, W.; HOU, M.; LIU, T.; YANG, J.; LINDVALL, C.; BJORKHOLM, M.; JIA, J.; XU, D. Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. **Oncogene**, 32, (36): 4203-13, 2013
- LONGHI, A.; PASINI, A.; CICOGNANI, A.; BARONIO, F.; PELLACANI, A.; BALDINI, N.; BACCI, G. Height as a risk factor for osteosarcoma. **J Pediatr Hematol Oncol**, 27, (6): 314-8, 2005
- MALAWER, M. M.; SUGARBAKER, P. H.; LOPES, A. **Atlas de Cirurgia para Sarcomas Ósseos e de Partes Moles**. São Paulo, Brasil: 2003. 398
- MARINA, N.; GEBHARDT, M.; TEOT, L.; GORLICK, R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. **Oncologist**, 9, (4): 422-41, 2004
- MARINA, N.; BIELACK, S.; WHELAN, J.; SMELAND, S.; KRAILO, M.; SYDES, M. R.; BUTTERFASS-BAHLOUL, T.; CALAMINUS, G.; BERNSTEIN, M. International collaboration is feasible in trials for rare conditions: the EURAMOS experience. **Cancer Treat Res**, 152: 339-53, 2009
- MARTIN, T. A.; JIANG, W. G. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. **Biochim Biophys Acta**, 1788, (4): 872-91, 2009
- MEOHAS, W. **Abordagem Inicial dos Tumores Ósseos**. Barsil: Instituto Nacional de Câncer, 2004.
- MERCURI, M.; CAPANNA, R.; MANFRINI, M.; BACCI, G.; PICCI, P.; RUGGIERI, P.; FERRUZZI, A.; FERRARO, A.; DONATI, D.; BIAGINI, R.; ET AL. The management of malignant bone tumors in children and adolescents. **Clin Orthop Relat Res**, (264): 156-68, 1991
- MEYERS, P. A.; SCHWARTZ, C. L.; KRAILO, M. D.; HEALEY, J. H.; BERNSTEIN, M. L.; BETCHER, D.; FERGUSON, W. S.; GEBHARDT, M. C.; GOORIN, A. M.; HARRIS, M.; KLEINERMAN, E.; LINK, M. P.; NADEL, H.; NIEDER, M.; SIEGAL, G. P.; WEINER, M. A.; WELLS, R. J.; WOMER, R. B.; GRIER, H. E. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group. **J Clin Oncol**, 26, (4): 633-8, 2008
- MIRABELLO, L.; TROISI, R. J.; SAVAGE, S. A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer**, 115, (7): 1531-43, 2009
- MOHAMET, L.; HAWKINS, K.; WARD, C. M. Loss of function of e-cadherin in embryonic stem cells and the relevance to models of tumorigenesis. **J Oncol**, 2011: 352616, 2011
- MORLEY, N.; OMAR, I. Imaging evaluation of musculoskeletal tumors. **Cancer Treat Res**, 162: 9-29, 2014
- MUHEREMU, A.; NIU, X. Positron emission tomography/computed tomography for bone tumors (Review). **Oncol Lett**, 9, (2): 522-526, 2015
- MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M. E.; MCCLANAHAN, T.; MURPHY, E.; YUAN, W.; WAGNER, S. N.; BARRERA, J. L.; MOHAR, A.; VERASTEGUI, E.; ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, 410, (6824): 50-6, 2001
- MUNOZ-GUERRA, M. F.; FERNANDEZ-CONTRERAS, M. E.; MORENO, A. L.; MARTIN, I. D.; HERRAEZ, B.; GAMALLO, C. Polymorphisms in the hypoxia inducible factor 1-alpha and the impact on the prognosis of early stages of oral cancer. **Ann Surg Oncol**, 16, (8): 2351-8, 2009

- MUTSAERS, A. J.; WALKLEY, C. R. Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? **Bone**, 62: 56-63, 2014
- NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUE, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nat Rev Cancer**, 9, (4): 274-84, 2009
- NIINAKA, Y.; HARADA, K.; FUJIMURO, M.; ODA, M.; HAGA, A.; HOSOKI, M.; UZAWA, N.; ARAI, N.; YAMAGUCHI, S.; YAMASHIRO, M.; RAZ, A. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis. **Cancer Res**, 70, (22): 9483-93, 2010
- O'GRADY, S.; FINN, S. P.; CUFFE, S.; RICHARD, D. J.; O'BYRNE, K. J.; BARR, M. P. The role of DNA repair pathways in cisplatin resistant lung cancer. **Cancer Treat Rev**, 40, (10): 1161-1170, 2014
- OPHARDT, C.; LOSEY, G. **Virtual Chembook**: Elmhurst College 2015.
- OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The epidemiology of osteosarcoma. **Cancer Treat Res**, 152: 3-13, 2009
- OZAWA, M.; KEMLER, R. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin.catenin complex. **J Biol Chem**, 273, (11): 6166-70, 1998
- PATANE, S.; AVNET, S.; COLTELLA, N.; COSTA, B.; SPONZA, S.; OLIVERO, M.; VIGNA, E.; NALDINI, L.; BALDINI, N.; FERRACINI, R.; CORSO, S.; GIORDANO, S.; COMOGLIO, P. M.; DI RENZO, M. F. MET overexpression turns human primary osteoblasts into osteosarcomas. **Cancer Res**, 66, (9): 4750-7, 2006
- PAUTKE, C.; SCHIEKER, M.; TISCHER, T.; KOLK, A.; NETH, P.; MUTSCHLER, W.; MILZ, S. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. **Anticancer Res**, 24, (6): 3743-8, 2004
- PENNA, V. **Atlas Cirúrgico dos Tumores Musculoesqueléticos** São Paulo, SP, Brasil: 2010.
- PETRILLI, A. S.; DE CAMARGO, B.; FILHO, V. O.; BRUNIERA, P.; BRUNETTO, A. L.; JESUS-GARCIA, R.; CAMARGO, O. P.; PENA, W.; PERICLES, P.; DAVI, A.; PROSPERO, J. D.; ALVES, M. T.; OLIVEIRA, C. R.; MACEDO, C. R.; MENDES, W. L.; ALMEIDA, M. T.; BORSATO, M. L.; DOS SANTOS, T. M.; ORTEGA, J.; CONSENTINO, E. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. **Journal of Clinical Oncology**, 24, (7): 1161-8, 2006
- RABIK, C. A.; DOLAN, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat Rev**, 33, (1): 9-23, 2007
- REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, 414, (6859): 105-11, 2001
- ROSE, M. C.; KOSTYANOVSKAYA, E.; HUANG, R. S. Pharmacogenomics of Cisplatin Sensitivity in Non-small Cell Lung Cancer. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, 12, (5): 198-209, 2014
- RUBIO, R.; GUTIERREZ-ARANDA, I.; SAEZ-CASTILLO, A. I.; LABARGA, A.; ROSU-MYLES, M.; GONZALEZ-GARCIA, S.; TORIBIO, M. L.; MENENDEZ, P.; RODRIGUEZ, R. The differentiation stage of p53-Rb-deficient bone marrow mesenchymal stem cells imposes the phenotype of in vivo sarcoma development. **Oncogene**, 32, (41): 4970-80, 2013
- SANDERS, R. P.; DRISSI, R.; BILLUPS, C. A.; DAW, N. C.; VALENTINE, M. B.; DOME, J. S. Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma. **J Clin Oncol**, 22, (18): 3790-7, 2004

- SATELLI, A.; LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cell Mol Life Sci**, 68, (18): 3033-46, 2011
- SAUER, T.; PEDERSEN, M. K.; EBELTOFT, K.; NAESS, O. Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. **Cytopathology**, 16, (4): 193-8, 2005
- SCHAJOWICZ, F. **Neoplasias Ósseas e Lesões Pseudotumorais**. 2. Brasil: 2000.
- SCHWAB, J. H.; SPRINGFIELD, D. S.; RASKIN, K. A.; MANKIN, H. J.; HORNICEK, F. J. What's new in primary malignant musculoskeletal tumors. **J Bone Joint Surg Am**, 95, (24): 2240-6, 2013
- SHANG, X.; LIN, X.; ALVAREZ, E.; MANOREK, G.; HOWELL, S. B. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. **Neoplasia**, 14, (10): 974-85, 2012
- SHANG, Y.; LI, Z.; LI, H.; XIA, H.; LIN, Z. TIM-3 expression in human osteosarcoma: Correlation with the expression of epithelial-mesenchymal transition-specific biomarkers. **Oncol Lett**, 6, (2): 490-494, 2013
- SINGH, A. B.; SHARMA, A.; DHAWAN, P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. **J Oncol**, 2010: 541957, 2010
- SINHA, B. K.; MIMNAUGH, E. G. Free radicals and anticancer drug resistance: oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors. **Free Radic Biol Med**, 8, (6): 567-81, 1990
- SOTTNIK, J. L.; CAMPBELL, B.; MEHRA, R.; BEHBAHANI-NEJAD, O.; HALL, C. L.; KELLER, E. T. Osteocytes serve as a progenitor cell of osteosarcoma. **J Cell Biochem**, 115, (8): 1420-9, 2014
- SPRINGFIELD, D. S.; SCHMIDT, R.; GRAHAM-POLE, J.; MARCUS, R. B., JR.; SPANIER, S. S.; ENNEKING, W. F. Surgical treatment for osteosarcoma. **J Bone Joint Surg Am**, 70, (8): 1124-30, 1988
- SUN, Y.; WANG, H.; LIU, M.; LIN, F.; HUA, J. Resveratrol abrogates the effects of hypoxia on cell proliferation, invasion and EMT in osteosarcoma cells through downregulation of the HIF-1 $\alpha$  protein. **Mol Med Rep**, 11, (3): 1975-81, 2015
- SUNG, J. Y.; PARK, S. Y.; KIM, J. H.; KANG, H. G.; YOON, J. H.; NA, Y. S.; KIM, Y. N.; PARK, B. K. Interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP) promotes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-like phenomena, cell-motility, and invasion via TGF-beta signaling in U2OS cells. **Cell Death Dis**, 5: e1224, 2014
- THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; MCLEOD, H.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, 21, (7): 440-6, 2011
- TIAN, W.; WANG, G.; YANG, J.; PAN, Y.; MA, Y. Prognostic role of E-cadherin and Vimentin expression in various subtypes of soft tissue leiomyosarcomas. **Med Oncol**, 30, (1): 401, 2013
- UNNI, K. K.; INWARDS, C. Y. **Dahlin's - Tumores Ósseos**. 6a. Brasil: 2013. 410
- VAN ROY, F.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cell Mol Life Sci**, 65, (23): 3756-88, 2008
- VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, 469, (7330): 314-22, 2011
- VOULGARI, A.; PINTZAS, A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. **Biochim Biophys Acta**, 1796, (2): 75-90, 2009

- WANG, J.; YIN, J. Q.; JIA, Q.; SHEN, J. N.; HUANG, G.; XIE, X. B.; ZOU, C. Y. [Bufalin induces apoptosis in osteosarcoma U-2OS and U-2OS methotrexate 300-resistant cell lines in vitro]. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, 32, (10): 734-8, 2010
- WANG, Y.; SHI, J.; CHAI, K.; YING, X.; ZHOU, B. P. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. **Curr Cancer Drug Targets**, 13, (9): 963-72, 2013
- WHITE, B. D.; CHIEN, A. J.; DAWSON, D. W. Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers. **Gastroenterology**, 142, (2): 219-32, 2012
- WHO. **WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone**. 4. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2013. 468
- XIAO, H.; CHEN, L.; LUO, G.; SON, H.; PRECTONI, J. H.; ZHENG, W. Effect of the cytokine levels in serum on osteosarcoma. **Tumour Biol**, 35, (2): 1023-8, 2014
- XIAO, W.; MOHSENY, A. B.; HOGENDOORN, P. C.; CLETON-JANSEN, A. M. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. **Clin Sarcoma Res**, 3, (1): 10, 2013
- YAN, G. N.; LV, Y. F.; GUO, Q. N. Advances in osteosarcoma stem cell research and opportunities for novel therapeutic targets. **Cancer Lett**, 2015
- YANG, G.; YUAN, J.; LI, K. EMT transcription factors: implication in osteosarcoma. **Med Oncol**, 30, (4): 697, 2013
- YIN, K.; LIAO, Q.; HE, H.; ZHONG, D. Prognostic value of Twist and E-cadherin in patients with osteosarcoma. **Med Oncol**, 29, (5): 3449-55, 2012
- YU, L.; LIU, S.; GUO, W.; ZHANG, C.; ZHANG, B.; YAN, H.; WU, Z. hTERT promoter activity identifies osteosarcoma cells with increased EMT characteristics. **Oncol Lett**, 7, (1): 239-244, 2014
- ZHANG, Y.; YANG, C. Q.; GAO, Y.; WANG, C.; ZHANG, C. L.; ZHOU, X. H. Knockdown of CXCR7 inhibits proliferation and invasion of osteosarcoma cells through inhibition of the PI3K/Akt and beta-arrestin pathways. **Oncol Rep**, 32, (3): 965-72, 2014
- ZINZI, L.; CONTINO, M.; CANTORE, M.; CAPPARELLI, E.; LEOPOLDO, M.; COLABUFO, N. A. ABC transporters in CSCs membranes as a novel target for treating tumor relapse. **Front Pharmacol**, 5: 163, 2014

## ANEXOS

---

### Anexo I. Parecer da Comissão de Ética do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

INSTITUTO NACIONAL DE  
TRAUMATO - ORTOPEDIA /  
INTO / SAS/ MS



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito da Quimioterapia na Metástase do Osteossarcoma: Estudo In Vivo

**Pesquisador:** Ana Cristina de Sá Lopes

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 23400713.0.1001.5273

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

**Patrocinador Principal:** Instituto Nacional de Traumatologia - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 444.004

**Data da Relatoria:** 30/10/2013

##### **Apresentação do Projeto:**

De acordo com proposto pela instituição onde o projeto será realizado.

##### **Objetivo da Pesquisa:**

De acordo com o proposto pelo projeto

##### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Relatado no projeto

##### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Muito interessante a pesquisa.

##### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

OK

##### **Recomendações:**

Que os resultados sejam publicados e apresentados aos profissionais do INTO.

##### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

OK

##### **Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Avenida Brasil, nº 500

**Bairro:** São Cristóvão

**CEP:** 20.940-070

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)2134-5000

**Fax:** (21)2134-5228

**E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br

**Anexo II. Parecer da Comissão de Ética do Instituto Nacional do Câncer.**

**Memo 458/14-CEP-INCA** Rio de Janeiro, 23 de julho de 2014.

A(o): Dra Ana Cristina de Sá Lopes  
Pesquisador(a) Principal

**Registro CEP n° 142/13:** (Este n° deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)  
**Título do estudo:** Efeito da Quimioterapia na Metástase do Osteossarcoma: Estudo In Vivo  
**CAAE:** 23400713.0.1001.5273

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, na condição de CEP da Instituição Coparticipante, **analisou e aprovou** o estudo intitulado: **“Efeito da Quimioterapia na Metástase do Osteossarcoma: Estudo In Vivo”**, em 22 de julho de 2014.

O(a) pesquisador(a) atendeu às pendências listadas no Parecer Consubstanciado CEP-INCA de número 604.787-0, datado de 12 de abril de 2014, - aprovadas anteriormente pelo CEP da Instituição Proponente (Parecer Consubstanciado do CEP-UERJ número 699.727, de 26 de junho de 2014).

Conforme disposto na Resolução CNS 466/2012, cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os **relatórios parciais** (apresentado durante a pesquisa demonstrando fatos relevantes e resultados parciais de seu desenvolvimento) e **final** (apresentado após o encerramento da pesquisa).

Assim, para o acompanhamento do desenvolvimento dos projetos, solicitamos que o(a) pesquisador(a) providencie o mais breve possível os relatórios aqui solicitados.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Henrique D. Silva  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

C/C: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) 1

## APÊNDICES

### Apêndice I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



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

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**Efeito da Quimioterapia na Metástase do Osteossarcoma: Estudo *In Vivo***”. Você foi selecionado porque, de acordo com os resultados de alguns exames que foram realizados, você tem uma lesão no osso que pode ser um osteossarcoma. Esta participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. A sua recusa não trará nenhum prejuízo para você na relação com o médico que o trata ou com este hospital. O tratamento para a doença que você é portador será o mesmo participando ou não deste estudo.

O objetivo desta pesquisa é avaliar um grupo de células que fazem parte da lesão que você pode ser portador (osteossarcoma).

A confirmação do diagnóstico de osteossarcoma é feita por biópsia do osso no local da lesão. A biópsia consiste na retirada de pequenas amostras da lesão, que são encaminhadas para análise no laboratório. A sua participação consistirá em permitir que em uma das amostras que vai ser retirada na hora da biópsia seja feito um estudo das células tumorais. Este estudo não vai interferir no resultado da biópsia, no tratamento ou na forma como a doença vai evoluir. Todas as etapas do tratamento serão as mesmas com ou sem esse exame. Os riscos relacionados com a sua participação são os riscos relacionados com a realização da biópsia da lesão óssea. Não há risco adicional para participar do estudo das células de osteossarcoma.

Os benefícios relacionados com a sua participação são que os resultados deste estudo poderão ajudar a melhorar o tratamento dos osteossarcomas. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a identificá-lo como participante do estudo. Os resultados quando forem divulgados serão identificados com siglas que não permitirão conhecer a sua identidade.

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

- Autorizo a utilização das amostras apenas para este projeto
- Autorizo a utilização das amostras para este projeto e outros relacionados ao osteossarcoma



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

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**Pesquisador responsável:** Ana Cristina de Sá Lopes.

**Contato com o pesquisador responsável:**

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 2º andar – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ  
Telefone: 21 2134-5142  
e-mail: [anacris1966@hotmail.com](mailto:anacris1966@hotmail.com)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

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

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

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

**Participante da pesquisa:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da pesquisa

## Apêndice II. Termo do responsável



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

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)

O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado para participar da pesquisa “Efeito da Quimioterapia na Metástase do Osteossarcoma: Estudo *In Vivo*”. Ele foi selecionado porque, de acordo com os resultados de alguns exames que foram realizados, ele tem uma lesão no osso que pode ser um osteossarcoma. Esta participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir da autorização para ele participar e retirar seu consentimento. A sua recusa não trará nenhum prejuízo para o menor que você representa na relação com o médico que o trata ou com este hospital. O tratamento para a doença que ele é portador será o mesmo ele participando ou não deste estudo.

O objetivo desta pesquisa é avaliar um grupo de células que fazem parte da lesão que você pode ser portador (osteossarcoma).

A confirmação do diagnóstico de osteossarcoma é feita por biópsia do osso no local da lesão. A biópsia consiste na retirada de pequenas amostras da lesão, que são encaminhadas para análise no laboratório. A sua participação consistirá em permitir que em uma das amostras que vai ser retirada na hora da biópsia seja feito um estudo das células tumorais. Este estudo não vai interferir no resultado da biópsia, no tratamento ou na forma como a doença vai evoluir. Todas as etapas do tratamento serão as mesmas com ou sem esse exame. Os riscos relacionados com a sua participação são os riscos relacionados com a realização da biópsia da lesão óssea. Não há risco adicional para participar do estudo das células de osteossarcoma.

Os benefícios relacionados com a sua participação são que os resultados deste estudo poderão ajudar a melhorar o tratamento dos osteossarcomas. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a identificá-lo como participante do estudo. Os resultados quando forem divulgados serão identificados com siglas que não permitirão conhecer a sua identidade.

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

- Autorizo a utilização das amostras apenas para este projeto
- Autorizo a utilização das amostras para este projeto e outros relacionados ao osteossarcoma



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

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**Pesquisador responsável:** Ana Cristina de Sá Lopes.

**Contato com o pesquisador responsável:**

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 2º andar – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ

Telefone: 21 2134-5142

e-mail: [anacris1966@hotmail.com](mailto:anacris1966@hotmail.com)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

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

Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ – CEP: 20940-070

Telefone: 21 2134-5000

e-mail: [cep.into@into.saude.gov.br](mailto:cep.into@into.saude.gov.br)

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

**Participante da pesquisa:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da pesquisa

### Apêndice III. Características clínicas dos pacientes portadores de osteossarcoma.

Sigla do paciente	Idade ao diagnóstico	Tempo de evolução (meses)	Topografia	Diagnóstico histopatológico	Metástase	Metástase após diagnóstico (meses)	Tempo entre diagnóstico e início QT (semanas)	Metástase em relação a QT (dias)	Tempo entre QT e metástase (meses)	Recidiva	Óbito	Seguimento (meses)
OS01	14	6,5	ulna distal direita	OS telangectásico	sim	4,7	5,2	depois	3,4	não	não	31,2
OS02	6	0,5	femur distal direito	OS clássico central	sim	20,4	3,2	depois	19,6	não	sim	26,7
OS03	9	0,5	femur distal esquerdo	OS clássico central	sim	13,5	5,2	depois	12,1	não	não	23,2
OS04	13	2	tibia proximal direita	OS clássico central	sim	0,9	4,8	antes	-	não	não	18,0
OS05	14	6	femur proximal esquerdo	OS clássico central	não	-	5,6	-	-	não	não	6,0
OS06	10	3	tibia proximal esquerda	OS clássico central	sim	14,0	5,6	depois	-	não	não	14,0
OS07	14	2	femur distal direito	OS clássico central	sim	0,9	QT não realizada	-	-	não	sim	1,3
OS08	16	3	tibia proximal esquerda	OS clássico central	sim	8,6	11,2	depois	5,8	não	sim	12,3
OS09	15	6	femur distal direito	OS clássico central	sim	18,0	4,4	depois	16,9	não	não	32,1
OS10	15	2	femur distal esquerdo	OS clássico central	sim	11,0	4,8	antes	-	não	não	14,9
OS11	25	6	úmero proximal direito	OS clássico central	sim	NO	4	NO	-	não	não	27,4
OS12	16	NO	Tibia proximal direita	OS telangectásico	não	-	0,8	-	-	não	sim	16,6
OS13	11	1	femur distal direito	OS condroblástico	sim	8,9	8,4	depois	6,8	não	não	28,9
OS14	22	NO	fêmur distal direito	OS condroblástico	não	-	2,8	-	-	não	não	19,2
OS15	14	3	femur distal direito	OS clássico central	sim	NO	4,8	antes	-	não	não	33,4
OS16	19	5	úmero proximal direito	OS clássico central	sim	12,1	5,6	depois	10,7	não	sim	14,5
OS17	14	NO	tibia proximal direita	OS clássico central	não	-	5,2	-	-	não	não	23,0
OS18	12	3	tibia proximal direita	OS clássico central	não	-	2,8	-	-	não	não	29,4
OS19	9	3	úmero proximal esquerdo	OS clássico central	não	-	1,6	-	-	não	não	18,5
OS20	33	8	tibia distal esquerda	OS clássico central	sim	24,6	10	depois	22,1	não	não	32,0
OS21	7	NO	femur distal direito	OS condroblástico	sim	7,8	2,4	depois	7,2	não	não	37,8
OS22	14	5	tibia proximal esquerda	OS pequenas células	não	-	2	-	-	não	não	29,5
OS23	12	3	tibia proximal esquerda	OS periosteal	não	-	9,2	-	-	não	não	27,2

OS24	15	2	femur distal direito	OS clássico central	não	-	5,2	-	-	não	não	18,3
OS25	17	5	femur distal esquerdo	OS clássico central	não	-	4	-	-	não	não	22,2
OS26	13		tíbia proximal esquerda	OS clássico central	não	-	5,2	-	-	não	sim	11,5
OS27	16		tíbia proximal direita	OS clássico central	sim	9,0	5,2	depois	7,7	não	não	17,6
OS28	5	NO	femur distal esquerdo	OS clássico central	sim	11,4	2,8	depois	10,7	não	sim	18,9
OS29	12	0,7	tíbia proximal direita	OS clássico central	não	-	6,8	-	-	não	sim	4,7
OS30	16	NO	tíbia esquerda	OS clássico central	não	-	3,6	-	-	não	não	9,0
OS31	19	2	tíbia distal esquerda	OS condroblástico	sim	22,9	6,8	depois	21,2	sim	não	23,3
OS32	12	3,5	femur distal esquerdo	OS clássico central	não	-	3,6	-	-	não	sim	7,3
OS33	12	6	membro inferior	OS clássico central	não	-	6,4	-	-	não	não	16,0
OS34	16	4	femur distal esquerdo	OS telangectásico	sim	7,2	5,6	depois	5,8	não	não	37,6
OS35	56	NO	femur distal direito	OS clássico central	não	-	16	-	-	não	não	6,3

Tempo de evolução: considerado como tempo do início dos sintomas até a biópsia. OS: osteossarcoma. NO: dado não obtido; QT: quimioterapia