



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**Inibição da expressão de CD90 (Thy-1) interfere com
a migração celular em células primárias isoladas do
Tumor de Células Gigantes do Osso**

PATRÍCIA DE ALBUQUERQUE DOS SANTOS

Rio de Janeiro
2017



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

Patrícia de Albuquerque dos Santos

**Inibição da expressão de CD90 (Thy-1) interfere com a
migração celular em células primárias isoladas do
Tumor de Células Gigantes do Osso**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Amanda Cavalcanti

Rio de Janeiro
2017



INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**Inibição da expressão de CD90 (Thy-1) interfere com a
migração celular em células primárias isoladas do
Tumor de Células Gigantes do Osso**

PATRÍCIA DE ALBUQUERQUE DOS SANTOS

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Amanda Cavalcanti

EXAMINADORES:

Dr. Pedro Henrique Mendes (Instituto Fernandes Figueira)

Dra. Paloma Silva de Souza (INCA)

Profa. Dra. Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa (INTO)

Profa. Dra. Ana Carolina Leal (revisora e suplente)

Profa. Dra Maria Eugênia Leite Duarte (suplente)

Agosto / 2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

S237i Santos, Patricia de Albuquerque dos.
Inibição da expressão de CD90 (Thy-1) interfere com a migração celular
em células primárias isoladas do Tumor de Células Gigantes do Osso /
Patrícia de Albuquerque dos Santos. — 2017.
74f.

Orientadora: Amanda dos Santos Cavalcanti.
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema
Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2017.

1. Tumor de células gigantes do osso. 2. TCG. 3. CD90. 4. Células
Estromais. 5. Células Tronco. 6. Ortopedia. I. Cavalcanti, Amanda dos
Santos, orient. II. Título.

NLM WE 258

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial a D. Graça, minha mãe, pelo incentivo e por não me deixar desistir nunca desse sonho.

Aos grandes mestres e tutores, Dr Walter Meohas e Dra Ana Cristina de Sá Lopes, por todo os ensinamentos nesses 10 anos de convivência.

A Prof^a Dr^a Amanda Cavalcanti por toda dedicação a essa dissertação. A todos os componentes do Centro de Oncologia Ortopédica do INTO também deixo meu agradecimento e carinho.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode recomeçar agora e fazer um novo fim.” (Chico Xavier)

RESUMO

SANTOS, Patrícia de Albuquerque. Inibição da expressão de CD90 (Thy-1) interfere com a migração celular em células primárias isoladas do Tumor de Células Gigantes do Osso. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Ministério da Saúde, 2017.

O tumor de células gigantes do osso é uma neoplasia benigna primária do osso que pode cursar com metástase em 2% dos casos. O tratamento dessa patologia consiste principalmente na remoção cirúrgica do tumor. Estudos recentes apontam a proteína de superfície CD90 como uma molécula importante no processo de oncogênese, porém não há relatos na literatura que investiguem seu papel no TCG. Nesse contexto, a compreensão do papel desta molécula na história natural do TCG é importante. O objetivo desse estudo é investigar a expressão de CD90 nesse tumor e explorar sua relação com a proliferação e migração celular. A expressão de CD90 foi acessada em amostras do tumor primário de 23 casos (10 amostras de pacientes com metástase e/ou recidiva e 13 de pacientes sem metástase e/ou recidiva) e avaliada através de imunohistoquímica. Posteriormente, foi classificada de zero (ausente) a três (intensa) considerando a dispersão e a intensidade da marcação no corte histológico, havendo variabilidade na expressão sem diferença entre os grupos ($p=0,595$). A expressão celular do CD90 foi avaliada por citometria de fluxo em células isoladas a partir do tecido tumoral fresco de três pacientes. Nestas 37,3% das células foram CD90⁺. Em seguida, realizamos a análise da expressão de CD90 em células primárias e observamos percentual de 93% a 99% de células CD90⁺. Afim de, investigar sua função no TCG, avaliamos o efeito do silenciamento desta molécula sobre a migração e proliferação das células da cultura primária e como resultado obtivemos redução significativa na expressão desta molécula entre os dias 7 e 12 após a transfecção ($p<0,0001$), com o retorno da expressão acontecendo por volta do dia 14 após a eletroporação. Para avaliar a funcionalidade do CD90 nas células de TCG, foram realizados ensaios de migração celular e análise de proliferação. Na condição controle de eletroporação (SCR) foi observada taxa de migração de 85,4% e na condição em que o CD90 foi silenciado, houve redução na migração para 61,9%. A atividade proliferativa foi analisada através de imunocitoquímica para Ki67. O número médio de células Ki67 positivas nas condições controle, SCR e SiRNA CD90 foi de $18,23\pm3,3$, $12,21\pm3,8$ e $15,82\pm2,0$, respectivamente (Valor $p = 0,412$), indicando que o silenciamento não interfere na proliferação celular. Portanto, os tecidos tumorais primário e de recidiva do TCG expressam CD90 (Thy-1), porém sem relação com a ocorrência de recidiva. *In vitro*, as células isoladas também mostram expressão desta molécula que está relacionada com a migração celular.

Palavras-chave: Tumor de células gigantes do osso, TCG, CD90, células estromais, células tronco.

ABSTRACT

SANTOS, Patrícia de Albuquerque. Inhibition of expression of CD90 (Thy-1) interferes with cell migration in primary cells isolated from Giant Cell Tumor of Bone. Rio de Janeiro, 2017. Master Thesis. (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health, 2017.

The giant cell tumor of the bone is a benign primary neoplasm of bone that can travel with metastasis in 2% of cases. The treatment for this pathology consists mainly in the surgical removal of the tumor. Recent studies point to the CD90 surface protein as an important molecule in the oncogenesis process, but there are no reports in the literature investigating its role in GCT. In this context, understanding the role of this molecule in the natural history of GCT is important. The aim of this study is to investigate the expression of CD90 in this tumor and to explore its relation with cell proliferation and migration. CD90 expression was accessed in primary tumor samples from 23 cases (10 samples from patients with metastasis and / or relapse and 13 from patients without metastasis and / or relapse) and evaluated by immunohistochemistry. Subsequently, it was classified from zero (absent) to three (intense) considering the dispersion and the intensity of the marking in the histological section, with variability in the expression without difference between the groups ($p = 0.595$). Cellular expression of CD90 was evaluated in cells isolated from the tumor tissue of three patients by flow cytometry. In these 37.3% of the cells were CD90 +. Then, we performed the analysis of CD90 expression in primary cells and observed a percentage of 93% to 99% of CD90 + cells. In order to investigate its function in TCG, we evaluated the effect of silencing on the migration and proliferation of primary culture cells and as a result we obtained a significant reduction in expression of this molecule between days 7 and 12 after transfection ($p < 0.0001$), With the return of the expression happening around the 14th day after electroporation. To evaluate the functionality of CD90 in TCG cells, cell migration and proliferation analysis assays were performed. In the SCR condition, a migration rate of 85.4% was observed, and in the condition that CD90 was silenced, there was a reduction in migration to 61.9%. The proliferative activity was analyzed by immunocytochemistry for Ki67. The mean number of Ki67 cells in the control, SCR and CD90 SiRNA conditions was 18.23 ± 3.3 , 12.21 ± 3.8 and 15.82 ± 2.0 , respectively (Value $p = 0.412$), indicating That silencing does not interfere with cell proliferation. Therefore, primary tumor tissue and GCT recurrence express CD90 (Thy-1), but unrelated to the occurrence of recurrence. In vitro, isolated cells also show expression of this molecule that is related to cell migration.

Keywords: Giant cell tumor of bone, GCT, CD90, stromal cell, stem cell.

SUMÁRIO

RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
SUMÁRIO	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE QUADROS E TABELAS	X
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Definição	11
1.2 Epidemiologia	11
1.3 Investigação diagnóstica	12
1.3.1 Características clínicas.....	12
1.3.2 Exames de imagem.....	13
1.3.3 Biópsia.....	14
1.3.4 Aspectos anatomopatológicos.....	15
1.3.5 Classificação do TCG.....	18
1.3.6 Tratamento do TCG.....	20
1.4 Patogênese do TCG.....	22
1.5 Aspectos celulares e moleculares do TCG	24
1.6 CD90	26
1.6.1 Expressão de CD90 em neoplasias	27
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Principal	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Pacientes.....	33

4.2	Imunohistoquímica.....	34
4.3	Isolamento e manutenção das células primárias	35
4.4	Imunocitoquímica	36
4.5	Ensaio de migração celular	37
4.6	Citometria de fluxo	38
4.7	Ensaio de Transfecção por Eletroporação	38
4.8	Análise estatística	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Expressão tissular de CD90 no Tumor de Células Gigantes do Osso.....	40
5.2	Análise da expressão de CD90 em células primárias isoladas a partir de amostras frescas de Tumor de Células Gigantes do Osso	42
5.3	Silenciamento do CD90 por eletroporação	46
5.4	Efeito do silenciamento do CD90 com SiRNA no Tumor de Células Gigantes do Osso.....	48
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
	ANEXOS	65
	APÊNDICES	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Apoio em Patologia Cirúrgica
BSA	Albumina bovina sérica
CD	Cluster de diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFU-M	Unidade formadora de colônia macrófago
CONCO	Centro de Oncologia Ortopédica
CSF-1	Fator Estimulador de Colônia 1
CTC	Centro de Tecnologia Celular
CTT	Célula-tronco tumoral
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
FSC	<i>Forward scatter</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
GPI	Glicofosfatidilinositol
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano - DR
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
M-CSF	Fator de estimulação de colônias de macrófagos
MMP-9	Metaloproteinase 9
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão salina fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PLG	Plasminogênio
PSA	Penicilina, estreptomicina e anfotericina
RANK	Receptor do fator de ativação nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor do fator de ativação nuclear kappa B
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RM	Ressonância magnética
SCR	<i>Scrambled</i>
SDF-1	Fator derivado de célula estromal 1

SFB	Soro fetal bovino
SSC	<i>Side scatter</i>
TC	Tomografia computadorizada
TCG	Tumor de Células Gigantes do Osso
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Thy-1	Antígeno diferenciador de timócito 1
t-PA	Ativador de plasminogênio tecidual
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
siRNA	Pequeno RNA de interferência
UANATO	Unidade de Anatomia Patológica
V-ATPase	ATPase vacuolar
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1 Biópsia incisional de Tumor de Células Gigantes do Osso.	14
Figura 1-2 Instrumental utilizado para realizar biópsia fechada com agulha. ...	15
Figura 1-3 Aspecto macroscópico do TCG.	16
Figura 1-4 Aspecto histológico clássico do TCG.	17
Figura 1-5 Classificação de Campanacci do Tumor de Células Gigantes do Osso..	20
Figura 1-6 Tratamento do Tumor de Células Gigantes do Osso.	22
Figura 1-7 Imagem esquemática da patogênese do Tumor de células gigantes do osso.	24
Figura 4-1 Etapas iniciais do processamento de amostra de Tumor de Células Gigantes do Osso realizado no Centro de Tecnologia Celular do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia.	36
Figura 5-1 Intensidade da imunomarcção de CD90 no Tumor de Células Gigantes do Osso (TCG).	45
Figura 5-2 Expressão de CD90 em tecido tumoral de pacientes com Tumor de Células Gigantes do Osso.	42
Figura 5-3 Células primárias do tumor de células gigantes do osso são CD90 ⁺ CD31 ⁻ CD45 ⁻	45
Figura 5-4 Células primárias do tumor de células gigantes do osso são CD90 ⁺	45
Figura 5-5 Silenciamento do CD90 em células primárias isoladas do Tumor de Células Gigantes do Osso (paciente VaCri) após eletroporação	47
Figura 5-6 Efeito do silenciamento do CD90 sobre a migração de células primárias do Tumor de Células Gigantes do Osso.	49
Figura 5-7 Efeito do silenciamento do CD90 sobre a proliferação de células primárias do Tumor de Células Gigantes do Osso.	50

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1-1 Classificação dos estágios clínicos dos tumores ósseos segundo Enneking, (1986).....	19
Tabela 5-1 Dados dos pacientes portadores de Tumor de Células Gigantes do Osso incluídos no estudo in vitro.....	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição

O Tumor de Células Gigantes (TCG) é uma neoplasia primária do osso que se desenvolve na epífise dos ossos longos, caracterizada por alto potencial de agressividade local que resulta em extensa destruição óssea (CAMPANACCI et al., 1987). Classicamente o TCG se caracteriza pela proliferação de células mononucleares e células gigantes do tipo osteoclastos (ATHANASOU et al., 2013). Apesar de ser classificado como uma neoplasia óssea benigna, o TCG tem um curso clínico imprevisível que não guarda relação nem com o aspecto radiológico nem com as características histopatológicas (JAFFE et al., 1940; CAMPANACCI et al., 1987; MASUI et al., 1998).

1.2 Epidemiologia

O TCG corresponde a 5% dos tumores ósseos primários do osso e a aproximadamente 20% de todos os tumores ósseos benignos (UNI e INWARDS, 2010; ATHANASOU et al., 2013). Esta doença acomete principalmente indivíduos entre 20 e 40 anos de idade sendo ligeiramente mais frequente no gênero feminino (COMPERE, 1953; MCDONALD et al., 1986; SCHAJOWICZ, 2000; OLIVEIRA et al., 2016).

O principal local de ocorrência do TCG é na articulação do joelho, acometendo principalmente o fêmur distal (21,3%), a tíbia proximal (24%), seguida pelo rádio distal (9,15%), fêmur proximal (4,3%), tíbia distal (3%) e sacro (4,34%)

(AMANATULLAH et al., 2014). As epífises dos ossos longos são as regiões acometidas, podendo ocorrer invasão para o compartimento intra-articular (COMPERE, 1953; GOLDENBERG et al., 1970; SZENDRÖI, 2004; AMANATULLAH et al., 2014).

O TCG é raro em crianças e jovens em crescimento e, nesta faixa etária, as lesões se localizam na região metafisária da tíbia (MORGAN, 1999). Raramente o TCG é multifocal e a transformação sarcomatosa espontânea (BRIEN et al., 1997) pode ocorrer, particularmente após radiação (BORIANI et al., 1986). Cerca de 2 a 5% dos pacientes desenvolvem metástases pulmonares, caracterizadas por implantes pulmonares histologicamente benignos, que se desenvolvem por disseminação hematogênica a partir da invasão vascular local (BERTONI et al., 1988; SIEBENROCK et al., 1998; DOMINKUS et al., 2006).

1.3 Investigação diagnóstica

1.3.1 Características clínicas

O quadro clínico do TCG é semelhante ao dos demais tumores ósseos: dor e aumento de volume local (não necessariamente ocorrendo nos primeiros momentos da sintomatologia), restrição do arco de movimento e derrame articular ou dor relacionada com o movimento (SZENDRÖI, 2004; AMANATULLAH et al., 2014). As tendinopatias devem ser consideradas no diagnóstico diferencial das lesões localizadas no rádio distal, principalmente na fase inicial de evolução do tumor (ATHANASOU et al., 2013).

1.3.2 Exames de imagem

Diante da suspeita clínica, a investigação diagnóstica consta de exames de imagem como radiografias simples, tomografia computadorizada e ressonância magnética (RM). O aspecto radiográfico clássico é de uma lesão epifisária excêntrica, lítica, sem halo de esclerose ou trabeculação, com uma pequena zona de transição mal definida e sem evidências de calcificação (SKUBITZ, 2014) (GOLDENBERG et al., 1970).

A imagem do TCG na tomografia computadorizada (TC) é caracterizada por apresentar densidade entre 20-70 unidades Hounsfield. As lesões osteolíticas radiotransparentes com densidade menor do que 20 unidades Hounsfield geralmente correspondem a cisto ósseo aneurismático (SZENDROI, 2004). A tomografia computadorizada do tórax também é utilizada para investigar a presença de metástases pulmonares (SCHAJOWICZ, 2000; VAN DER HEIJDEN et al., 2014). Em geral as características do TCG na RM são inespecíficas. Entretanto ela é utilizada para definir o acometimento das partes moles circunjacentes e do feixe neurovascular. A imagem do TCG na RM possui um sinal baixo a intermediário nas sequências ponderadas em T1 e um sinal intermediário a alto nas sequências ponderadas em T2. A RM também pode ser útil para evidenciar níveis líquidos, presentes em 20% dos pacientes que apresentam associação com cisto ósseo aneurismático (AOKI, 1996).

1.3.3 Biópsia

A biópsia para confirmação diagnóstica do TCG pode ser cirúrgica (incisional ou excisional) (Figura 1-1) ou percutânea, por aspiração ou por trocater (Figura 1-2). Independente do método utilizado durante a sua realização, o trajeto da biópsia deve ser considerado contaminado e, portanto, posteriormente, no tratamento cirúrgico, deve ser ressecado em bloco com o tumor (HECK, 2006).

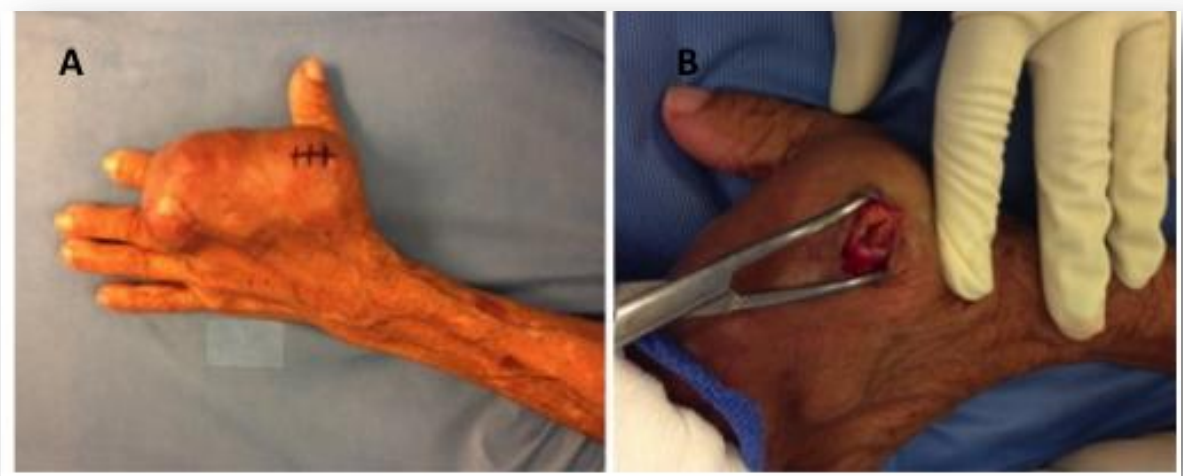


Figura 1-1 Biópsia incisional de Tumor de Células Gigantes do Osso. (A) Tumoração no dorso da mão esquerda acometendo metacarpo. (B) Biópsia incisional de tumoração no dorso da mão esquerda. Arquivo pessoal.

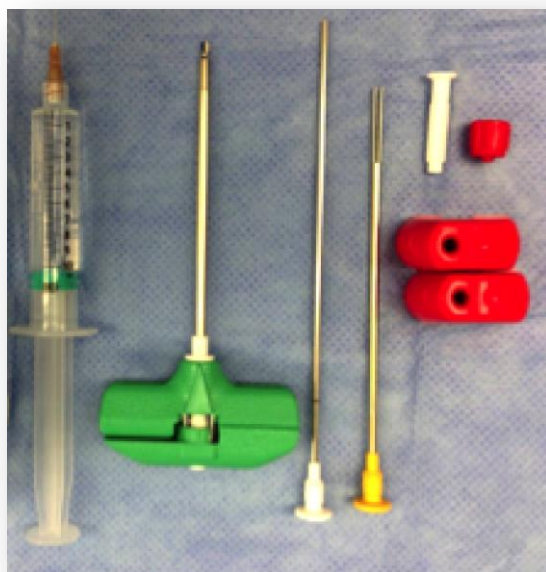


Figura 1-2 Instrumental utilizado para realizar biópsia fechada com agulha. Agulha de Jamishidi com diâmetro interno de 8mm. Arquivo pessoal.

Apesar das biópsias incisionais terem maior potencial de complicações o procedimento permite coletar maior quantidade de tecido tumoral, reduzindo o risco das biópsias não serem representativas da lesão. Além disso, maiores amostras tumorais permitem realizar investigações diagnósticas adicionais como, por exemplo, a citogenética (HECK, 2006). A biópsia por trocater, quando realizada por cirurgião experiente pode proporcionar até 90% de precisão no diagnóstico (COMPERE, 1953; SCHAJOWICZ, 2000).

1.3.4 Aspectos anatomopatológicos

O aspecto macroscópico do TCG é de uma lesão sólida, localizada na região epifisária dos ossos longos com áreas de coloração acastanhada e zonas

hemorrágicas avermelhadas (KLENKE et al., 2011; ATHANASOU et al., 2013). Em 20% dos pacientes são observadas áreas císticas que podem representar associação com cisto ósseo aneurismático. A presença de focos de tecido de coloração amarelada correspondem a alterações xantomatosas. A produção de osso reacional é rara (KLENKE et al., 2011; ATHANASOU et al., 2013). Nas lesões maiores e mais avançadas são frequentes zonas extensas de necrose representadas por cavidades císticas contendo tecido acastanhado amolecido e focos de hemorragia. Nesses casos, em geral a cortical está comprometida resultando em comprometimento tumoral dos tecidos circunjacentes (GOLDENBERG et al., 1970) (Figura 1-3).

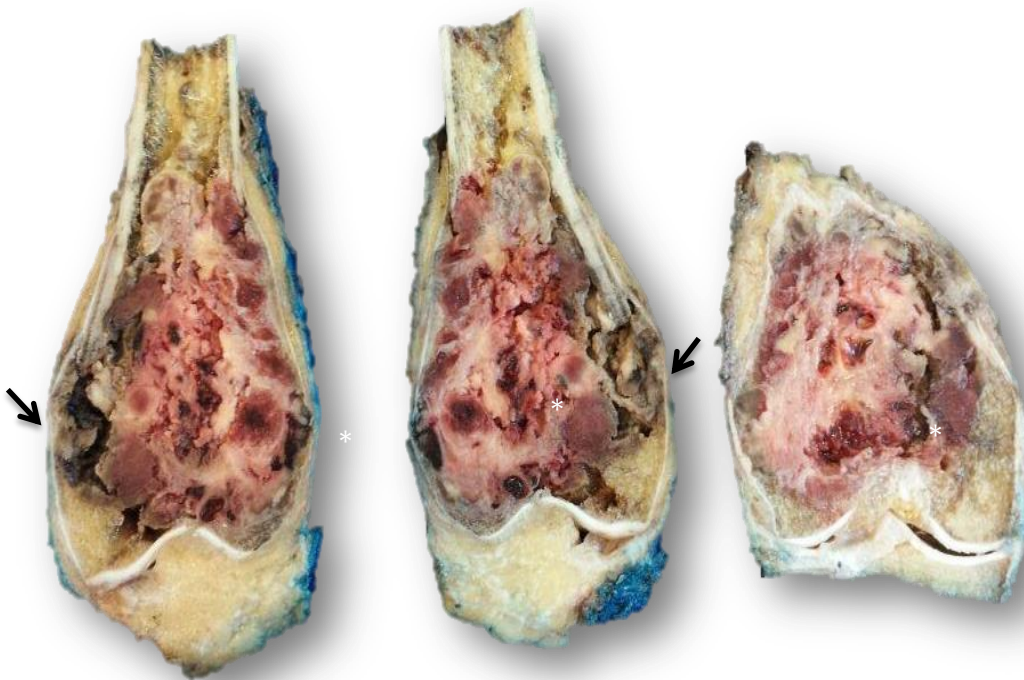


Figura 1-3 Aspecto macroscópico do TCG. Massa tumoral localizada na epífise distal do fêmur, de coloração acastanhada, com áreas císticas e hemorrágicas (*). O limite proximal da lesão é impreciso e o comprometimento da cortical medial e lateral resultou em extensão tumoral para as partes moles circunjacentes (setas). Arquivo pessoal.

A principal característica histológica do TCG são as células gigantes multinucleadas, presentes em grande número e distribuídas uniformemente entre células estromais fusiformes e células mononucleares (ATHANASOU et al., 2013; COWAN e SINGH, 2013) (Figura 1-4).

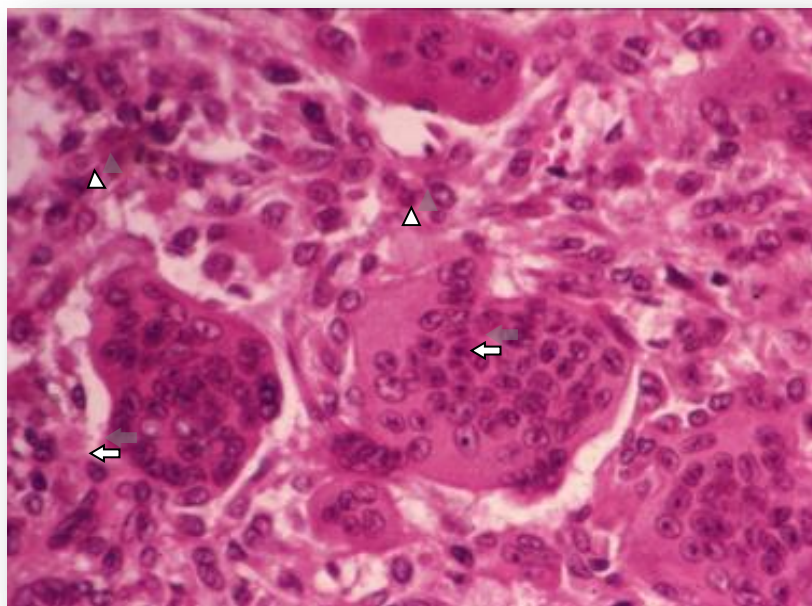


Figura 1-4 Aspecto histológico clássico do TCG. As células gigantes são volumosas, possuem muitos núcleos (setas) e estão distribuídas entre células estromais (cabeças de seta). Arquivo pessoal.

Morfologicamente as células gigantes se assemelham aos osteoclastos, possuindo citoplasma eosinofílico e núcleos vesiculosos com nucléolo proeminente. As células do componente mononuclear são fusiformes, ovais ou arredondadas. O núcleo da maioria dessas células tem cromatina frouxa e contém um ou dois pequenos nucléolos evidentes. Essas características nucleares se assemelham as características dos núcleos dos macrófagos e são similares àquelas das células gigantes do tipo osteoclástico (SCHAJOWICZ, 2000; ATHANASOU et al., 2013). O quadro histológico se completa com uma população de células estromais

mononucleares com citoplasma mal definido e células fusiformes com nucléolo evidente. Essas células apresentam alta atividade mitótica. O estroma tumoral é bem vascularizado, podendo conter septos de tecido conjuntivo fibroso. São frequentes áreas de hemorragia recentes e antigas relacionadas com depósitos de hemosiderina (SCHAJOWICZ, 2000; ATHANASOU et al., 2013). Em tumores com comportamento biológico mais agressivo, quando há comprometimento de partes moles adjacentes ou metástase pulmonar, as características histológicas são idênticas às da lesão primária (CAMPANACCI et al., 1987).

1.3.5 Classificação do TCG

O primeiro sistema de gradação histológica do TCG foi descrito por Jaffe e colaboradores em 1940. Este sistema se baseava na correlação entre o curso e a evolução clínica. Pela falta de correspondência dessa correlação o sistema acabou sendo abandonado. Alguns anos depois, Enneking propôs uma classificação para os tumores benignos e malignos dos ossos e de partes moles, incluindo o TCG, baseada nas características clínicas, radiográficas e anatomopatológicas (ENNEKING, 1986). Esta classificação, ilustrada na Tabela 1-1, estratifica os estágios dos tumores ósseos benignos e malignos em três categorias. A primeira é baseada no grau histológico da lesão, sendo considerado grau 0 (G0) as lesões benignas; grau 1 (G1) as lesões com baixo grau de malignidade ou de malignidade intermediária e grau 2 (G2) as lesões com alto grau de malignidade identificadas por anaplasia celular e pela presença de mitoses atípicas. A segunda parte resulta dos achados da avaliação dos exames de imagem (radiografia simples, tomografia e

ressonância) e é determinada pela extensão da doença sendo considerado como T0 as lesões benignas confinadas em um compartimento; T1 lesões benignas/malignas confinadas em um compartimento e T2 lesões benignas/malignas que ultrapassam o compartimento anatômico de origem. A terceira parte distingue as lesões sem (M0) ou com (M1) metástases.

Tabela 1-1 Classificação dos estágios clínicos dos tumores ósseos segundo Enneking, (1986).

LESÕES BENIGNAS	Latente	G0	T0	M0
	Ativa	G0	T0	M0
	Agressiva	G0	T1/2	M0/1
LESÕES MALIGNAS	IA	G1	T0	M0
	IB	G1	T1	M0
	IIA	G2	T1	M0
	IIB	G2	T2	M0
	III (metastático)	G1/G2	T0/1/2	M1

A classificação de Campanacci descrita em 1987 se baseia no aspecto radiográfico da lesão e tem importante papel na avaliação do risco de recidiva e para a programação cirúrgica. Nesta classificação, os tumores são categorizados como Grau I, quando possuem margens bem definidas, cortical intacta ou levemente afinada, porém sem deformidade; em Grau II, quando o tumor apresenta margens relativamente bem definidas, cortical insuflada porém íntegra; e Grau III, quando o tumor apresenta bordos imprecisos, sugerindo crescimento rápido e permeativo, com invasão das partes moles adjacentes (Figura 1-5).



Figura 1-5 Classificação de Campanacci do Tumor de Células Gigantes do Osso. (A) Grau I, caracterizado por tumor com margens bem definidas e com a cortical intacta levemente adelgada, porém sem deformação. (B) Grau II, caracterizado por tumor com margens relativamente bem definidas com expansão da cortical que, contudo, permanece íntegra. (C) Grau III representado por tumor com bordas imprecisas, sugerindo crescimento rápido e permeativo, com ruptura da cortical e invasão das partes moles circunjacentes. Arquivo pessoal.

1.3.6 Tratamento do TCG

O tratamento do TCG é fundamentalmente cirúrgico e baseado nas características da lesão de acordo com a classificação de Campanacci (Tabela 1-1). Na prática clínica, a escolha do procedimento cirúrgico depende das características da lesão, particularmente aquelas que sugerem agressividade local como ruptura da cortical e comprometimento das partes moles adjacentes, que influenciam nos índices de recidiva. O tratamento do TCG com curetagem e enxertia óssea cursa com índices de recidiva local de 27-65% (CAMPANACCI et al., 1987, BALKE et al., 2008), curetagem associada com adjuvantes como nitrogênio líquido, eletrocauterização, fenol, argônio e metilmetacrilato apresenta taxas de recidiva entre 12-27% (BALKE et al., 2008; BECKER et al., 2008; KIVIOJA et al., 2008), e a

ressecção em bloco da lesão tumoral entre 0-12% (BALKE et al., 2008; ERRANI et al., 2010). Alguns autores consideram que a destruição cortical, o comprometimento das partes moles circunjacentes ao tumor, a ocorrência de fratura patológica, faixa etária baixa e localização da lesão no radio distal são fatores de risco para recidiva local (O'DONNELL et al., 1994; PROSSER et al., 2005; BECKER et al., 2008; BALKE et al., 2008; KIVIOJA et al., 2008; ERRANI et al., 2010; KLENKE et al., 2011). Contudo, essas associações não foram confirmadas em outros estudos (TRIEB et al., 2001; TURCOTTE et al., 2002; SAIZ et al., 2004).

As lesões grandes localizadas na articulação do joelho são tratadas com ressecção ampla e reconstrução com endoprótese não convencional, com alongamento ósseo ou com transplante de fíbula (Figura 1-6). Quando há o acometimento neuromuscular com a impossibilidade de manutenção de margem oncológica, é indicada a ressecção radical, como a amputação (LARSSON et al., 1975; SCHAJOWICZ, 2000; BALKE et al., 2010; SKUBITZ, 2014). As opções de tratamento são mais limitadas e as taxas de recidiva são maiores quando a neoplasia surge em um local de difícil acesso cirúrgico como a coluna e o sacro (BLACKLEY et al., 1999; MALEK et al., 2006; BALKE et al., 2008). Na presença de lesões metastáticas, o tratamento mais efetivo é a ressecção do segmento ou do nódulo pulmonar. As lesões de difícil acesso cirúrgico, que não são passíveis de ressecção, podem ser tratadas com radioterapia e/ou quimioterapia (SKUBITZ, 2014). A doença metastática também pode ser controlada através do tratamento com Denosumab, um anticorpo monoclonal anti-RANKL com propriedades anti-reabsortivas (BALKE et al., 2010).

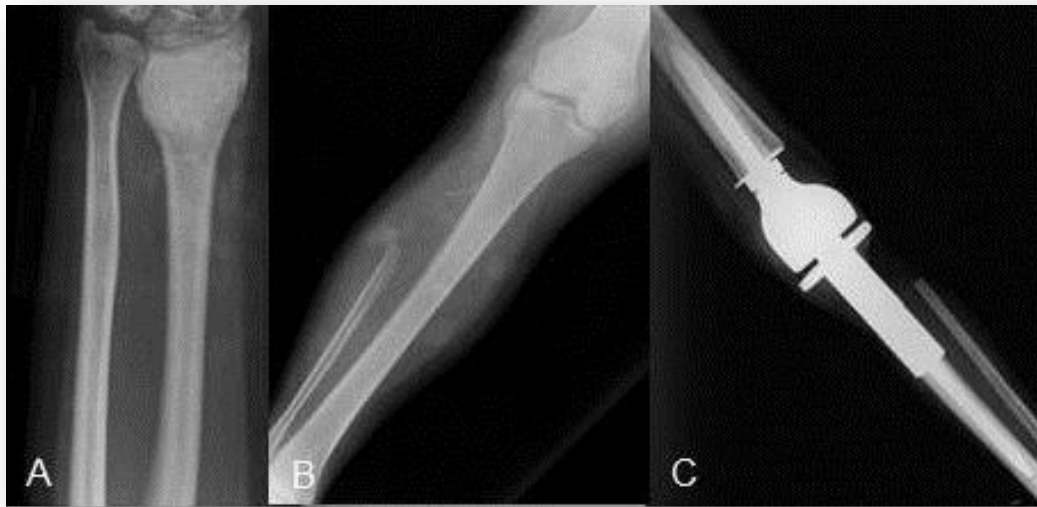


Figura 1-6 Tratamento do Tumor de Células Gigantes do Osso. As margens cirúrgicas são realizadas em função do tamanho da massa tumoral. (A) Ressecção intralesional com curetagem do rádio distal com cimentação. (B) Ressecção ampla sem reconstrução do terço proximal da fíbula. (C) Ressecção ampla com ressecção do fêmur distal e reconstrução com endoprótese não convencional. Arquivo pessoal.

1.4 Patogênese do TCG

Fisiologicamente, a regulação da atividade osteoblástica e osteoclástica garante o equilíbrio entre a síntese e a reabsorção da matriz óssea através de processo denominado de remodelamento ósseo. Nesse processo, a via de sinalização de RANK (receptor do fator de ativação nuclear *kappa* B), do ligante de RANK (RANKL) e da molécula reguladora da atividade de RANKL, a osteoprotegerina (OPG), atuam de forma sincrônica na regulação da diferenciação dos precursores osteoclásticos, na ativação dos osteoclastos e na indução da reabsorção óssea. Os osteoclastos são derivados de células progenitoras do sistema hematopoiético e a sua ativação e diferenciação é induzida pela ligação do RANKL ao RANK, que culmina com a reabsorção óssea (DUFRESNE et al., 2012).

As células estromais representam o componente proliferativo tumoral do TCG e por isso estão diretamente relacionadas com a sua patogênese (KIM, 2012). Essas células secretam várias citocinas, entre elas a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) que promove o recrutamento dos monócitos e estimulam sua migração para o tecido tumoral. Com a migração, os monócitos se fundem dando origem as células gigantes multinucleadas tipo osteoclastos (KIM, 2012; SINGH et al., 2015). Esses monócitos expressam em sua superfície RANK que se liga a RANKL na superfície da célula estromal do TCG. Dessa forma, há a ativação e diferenciação osteoclástica levando ao aumento da reabsorção óssea e consequente osteólise (SINGH et al., 2015; WU et al., 2015) (Figura 1-7).

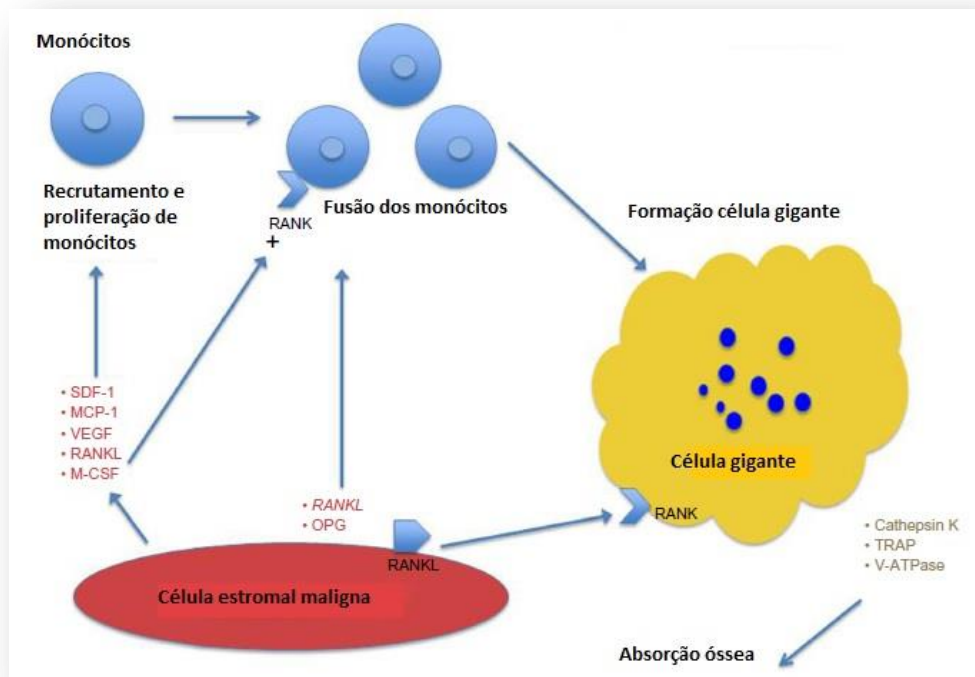


Figura 1-7 Imagem esquemática da patogênese do Tumor de células gigantes do osso.. A célula estromal maligna produz fatores que promovem o recrutamento, proliferação e fusão de monócitos, induzindo a formação da célula gigante multinucleada. A ligação do RANKL expresso na superfície celular da célula estromal maligna ao seu receptor RANK expresso pela célula gigante induz a reabsorção óssea. SDF-1 - fator derivado de célula estromal 1 ; MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos ; VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular ; RANKL – ligante do receptor do fator de ativação nuclear kappa B ; M-CSF – fator de estimulação de colônias de macrófagos ; OPG – osteoprotegerina ; RANK – receptor do fator de ativação nuclear kappa B ; TRAP – fosfatase ácida resistente ao tartarato ; V-ATPASE – ATPase vacuolar (Adaptada de SINGH et al., 2015).

1.5 Aspectos celulares e moleculares do TCG

Os três componentes celulares do TCG são a célula estromal mesenquimal tipo fibroblasto, a célula mononuclear de linhagem mielóide e a célula gigante multinucleada tipo osteoclasto (STEENSMA et al., 2013). A célula estromal possui características como alto potencial proliferativo, sobrevivência em sistemas *in vitro* mesmo após diversas passagens e capacidade de induzir a formação tumoral quando implantadas em camundongos imunocomprometidos, confirmando seu

potencial neoplásico (JOYNER et al., 1992; ZHOU Z et al., 2016). Esse tipo celular, possui importante função no recrutamento de células tumorais de linhagem mielóide e na formação de células gigantes tipo osteoclastos (GHERT et al., 2007; COWAN e SINGH, 2013).

Apesar dos aspectos moleculares do TCG não estarem totalmente esclarecidos, a expressão de alguns marcadores mostra íntima associação com os componentes tumorais. A expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9), enzima proteolítica de matriz extracelular da família das metaloproteinases, está associada com a capacidade de invasão da célula estromal e pode estar relacionada com a agressividade local, com o desenvolvimento de metástase e com a progressão clínica do TCG (ZHOU X et al., 2016; ZHOU Z et al., 2016). A expressão de Anexina A2 (proteína de ligação à membrana regulada por cálcio) pode estar diretamente relacionada com a invasão tumoral e o desenvolvimento de metástase através dos ligantes t-PA (ativador do plasminogênio tecidual) e PLG (plasminogênio), levando a degradação da matriz extracelular e a ativação de alguns tipos de metaloproteinases (ZHOU X et al., 2016). O RANKL é produzido pela célula tumoral estromal e está relacionado com a osteoclastogênese e destruição óssea (WERNER, 2006; ZHOU Z et al., 2016). A osteoprotegerina, um antagonista do RANKL, também é expressa pelos três tipos celulares do TCG (WERNER, 2006). A marcação positiva para o CD68 confirma a origem monocitária das células mononucleares e das células gigantes (WERNER, 2006) e a positividade para CD105 e CD73 identifica os diversos estágios da célula tronco tumoral presentes no compartimento estromal do TCG (WULLING, 2003). O SDF-1 (fator derivado de célula estromal), que atua na

osteoclastogênese em estado fisiológico, é expresso pela célula estromal do TCG (LIAO et al., 2005).

As células gigantes do TCG têm imunofenótipo típico dos osteoclastos, expressando o receptor da vitronectina (CD51), (RANK) e receptores de macrófagos, incluindo CD45, CD33 e CD68, e são negativas para CD14, CD163 ou HLA-DR. As células gigantes também expressam a catepsina K e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (COWAN e SINGH, 2013).

1.6 CD90

O CD90, também conhecido como Thy-1, é uma glicoproteína ancorada à membrana plasmática através de glicofosfatidilinositol (GPI) que está envolvida na interação célula-célula e célula-matriz. Ele foi inicialmente detectado como um antígeno expresso predominantemente nas células cerebrais e do timo de ratos (KUMAR et al., 2016). Posteriormente, foi descrito nos timócitos, células T, neurônios, células-tronco hematopoiéticas, células-tronco tumorais, células endoteliais e fibroblastos (CRAIG, 1993; HAERYFAR, 2004). A alta expressão do CD90 também foi identificada nas células mesenquimais estromais (MORAES et al., 2016).

A função do CD90 varia de acordo com o tipo celular, com o tecido e com a espécie onde ele é expresso, indicando que a sua função biológica depende do contexto em que ele se encontra (LEYTON e HAGOOD, 2014). A expressão de CD90 na superfície de fibroblastos regula a adesão, a organização do citoesqueleto e a migração celular através da ativação da via de sinalização RhoGTPase

(BARKER et al., 2004). As populações de fibroblastos positivas ou negativas para CD90 diferem em relação a proliferação induzida por isoformas do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*). Os autores demonstraram que as populações proliferam na mesma taxa mediante estímulo com PDGF-BB, mas o PDGF-AA estimula apenas a proliferação de células CD90 negativas. Essa atividade diferencial foi correlacionada com a maior expressão do receptor PDGF-alfa nas células CD90 negativas (HAGOOD et al., 1999). Por outro lado, nas células endoteliais da membrana coróide, a transfecção com siRNA de CD90 reduz a migração e a proliferação induzidas por fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) (BARKER et al., 2004).

1.6.1 Expressão de CD90 em neoplasias

A expressão do CD90 em lesões tumorais pode estar relacionada tanto com a sua proliferação e disseminação quanto com a inibição da invasão tumoral e do crescimento neoplásico (PASCAL et al., 2011; LOBBA et al., 2012; KUMAR et al., 2016).

Nos hepatocarcinomas, o percentual de células CD90⁺ está elevado quando comparado com o percentual desse tipo celular em fígados normais ou cirróticos (YANG et al., 2008). Estes autores isolaram células tumorais CD90⁺ do sangue periférico de pacientes com hepatocarcinoma e inocularam em camundongos imunossuprimidos. Todos os animais desenvolveram hepatocarcinoma com alto potencial metastático para os pulmões. Além disso, demonstraram que uma

pequena quantidade de células CD90⁺, mas não as células CD90⁻, são suficientes para promover a indução tumoral em camundongos imunossuprimidos, demonstrando, portanto, o potencial tumorigênico dessas células.

A expressão de CD90 foi observada em 2,5%-10% das células isoladas de pacientes com carcinoma escamoso de esôfago. As células CD90⁺ apresentaram maior capacidade tumorigênica, maior resistência a quimioterapia, maior capacidade de renovação e de diferenciação e apresentaram maior potencial metastático. Os autores também mostraram o valor prognóstico dessa molécula, uma vez que a expressão se correlacionou com a ocorrência de metástase linfonodal e história familiar positiva para a neoplasia (TANG et al., 2013).

Em um estudo com 175 pacientes com câncer de pulmão, a super expressão de CD90 na superfície celular se correlacionou negativamente com a sobrevida (KUMAR et al., 2016 apud CHEN et al., 2005). Em outro estudo, também em câncer de pulmão, foi observada a correlação entre a expressão de CD90 e a presença de células-tronco tumorais (YAN et al., 2013).

Nos gliomas de alto grau (graus III e IV) foi encontrada maior expressão de CD 90 ao contrário do observado em tecido cerebral normal e tumores de baixo grau (graus I e II) que não expressam CD90 (HE et al., 2012). A variação na expressão dessa molécula também foi observada nas leucemias de uma forma geral (KOZIL et al., 1997).

Com relação ao potencial metastático, no câncer de mama a expressão de CD90 é descrita em linhagens tumorais com essa característica, mesmo nos casos raros de câncer de mama em homens (DONNENBERG et al., 2010; JOHANSSON et al., 2013).

A associação entre CD90 e potencial metastático também foi demonstrada no melanoma, onde a expressão aumentada de CD90 foi identificada na célula endotelial linfática e vascular. Nas células do melanoma, há a expressão de um ligante do Thy-1, que media a adesão celular da célula tumoral com o endotélio microvascular, cujas células expressam Thy-1, sugerindo a relação com o potencial metastático e invasor desse tumor (REGE et al., 2006). Nesse tipo de tumor, foi observada diminuição na ocorrência de metástase pulmonar em camundongos com deficiência de CD90 (SCHUBERT et al., 2013). Da mesma forma, a expressão de CD90 foi correlacionada ao potencial metastático do adenocarcinoma pancreático (ZHU et al., 2014).

A expressão de CD90 também está relacionada com a inibição tumoral. Essa associação foi primeiramente descrita no câncer de ovário, no qual foi demonstrado que a super expressão de CD90 promoveu aumento na expressão de moléculas anti-tumorais como a fibronectina e a trombospondina, resultando em supressão do crescimento tumoral (ABEYSINGHE et al., 2003).

De forma similar, um estudo que avaliou por *microarray* a expressão diferencial de 19.000 genes alvo entre células tumorais e não tumorais de carcinoma de nasofaringe, elegeu o Thy1 como um importante alvo nas células tumorais. Os autores demonstraram também que em células transfectadas com Thy-1 ocorreu redução de 90% da capacidade de formação de colônias (LUNG et al., 2005). A perda do potencial tumorigênico durante a super expressão de CD90 foi atribuída à parada no ciclo celular em G0/G1 (FIEGEL et al., 2008).

O potencial de inibição do CD90 também foi comprovado em crianças com neuroblastoma, nas quais a menor expressão de CD90 se associou com menor

sobrevida. A expressão de CD90 foi observada em todos os graus de neuroblastomas (I, II, III) sendo que nas amostras tumorais negativas para CD90, a taxa de recidiva e de mortalidade foi maior. Esses achados confirmam o papel supressor do CD90 no neuroblastoma (FIEGEL et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença extremamente complexa e apesar dos inúmeros estudos acerca desta doença, muitos aspectos da progressão tumoral ainda são pouco compreendidos. Além disso, por se tratar de uma doença heterogênea, muitos dos mecanismos envolvidos na patogênese tumoral podem variar entre os diferentes subtipos de tumor.

Estudos recentes apontam a proteína de superfície CD90 como uma molécula importante no processo de oncogênese, participando e regulando diversas etapas da progressão tumoral. Esta molécula tem sido amplamente estudada em tumores de pâncreas, próstata, gliomas, fígado, esôfago entre outros; entretanto, não há relatos na literatura que investiguem seu papel no TCG. Nesse contexto, apesar da complexidade da função do CD90, a compreensão do papel desta molécula na história natural do TCG, além de ser de relevante para um melhor entendimento do curso desta doença, poderá, futuramente, constituir uma ferramenta para avaliação prognóstica, acompanhamento clínico, além de ser um alvo em potencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Investigar a expressão de CD90 no Tumor de Células Gigantes do Osso e explorar sua relação com a proliferação e migração celular.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a expressão de CD90 em amostras primárias de tecido tumoral de pacientes com TCG;
- 2) Isolar e cultivar células provenientes de amostras frescas de tecido tumoral de pacientes diagnosticados com TCG;
- 3) Quantificar a expressão de CD90 nas células primárias isoladas de TCG;
- 4) Avaliar o efeito do silenciamento do CD90 na proliferação e migração de culturas primárias de TCG.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

O estudo foi dividido em duas fases. Na primeira, foi avaliada a expressão de CD90 no tecido tumoral dos pacientes portadores de TCG atendidos no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO) entre 2000 e 2013. No estudo do nosso grupo intitulado “Recidiva do Tumor Ósseo de Células Gigantes: fatores de risco e incidência” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número 27882414.1.0000.5273, foram identificados 26 pacientes que apresentaram metástase e/ou recidiva e 129 pacientes sem metástase ou recidiva no referido período (Oliveira et al., 2015). A partir desse levantamento, foram acessadas amostras do tumor primário ou provenientes da cirurgia de ressecção da recidiva (emblocadas em parafina) de 23 casos. O material foi obtido na Unidade de Anatomia Patológica do INTO (UANATO/INTO) e utilizado para os ensaios de imunohistoquímica.

A segunda fase do projeto incluiu pacientes com TCG, atendidos no Centro de Oncologia Ortopédica (CONCO/INTO) a partir de setembro de 2014. Este estudo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número 37306114.3.0000.5273 (Anexo A), contemplou a coleta de amostras tumorais de pacientes com TCG e o estabelecimento de culturas primárias a partir deste material.

O critério de inclusão foi o diagnóstico confirmado de TCG por exames

radiológico e histopatológico. Após ser esclarecido sobre a pesquisa, o voluntário foi incluído no projeto mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B). As amostras foram então coletadas após ressecção tumoral realizada no centro cirúrgico do INTO durante o procedimento cirúrgico para diagnóstico ou tratamento dos pacientes. As amostras foram encaminhadas para processamento no Centro de Tecnologia Celular (CTC/INTO).

4.2 Imunohistoquímica

O ensaio de imunohistoquímica foi realizado em parceria com o Laboratório de Apoio em Patologia Cirúrgica (APC Laboratório, São Paulo, SP). Os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização em xilol 100%, seguida de hidratação em banhos de álcool, sendo os dois primeiros banhos em álcool 100%, o terceiro em álcool 90% e o quarto banho em álcool 70%. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 10 minutos em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0. Os cortes foram incubados em solução Triton X-100/TBS (*Tris buffered saline*) 0,5%, durante 5 minutos e lavados com TBS. A inibição da peroxidase foi feita com a adição de Peróxido de Hidrogênio 5% do Kit DAB Detection AR155 (Dako) por 5 minutos, seguida de lavagens com TBS. Para o bloqueio da peroxidase foi utilizada solução de Albumina Bovina Sérica (BSA) a 2,5%. Após o bloqueio, foi feita a incubação com o anticorpo primário anti-CD90 (Abcam) diluído em BSA por 12 horas a 4°C, protegido da luz. Posteriormente, foi utilizado o anticorpo secundário presente no Kit Biotinylated Ig (Dako) por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com Streptavidin-

HRP (Dako) por 20 minutos. Por fim, foi feita a reação com DAB. Para coloração de fundo, foi utilizada a solução de hematoxilina e as lâminas foram seladas com meio de montagem Aquamount (Biomeda). As imagens foram obtidas no digitalizador de lâminas Aperio CS2 (LeicaBiosystems, Wetzlar, Alemanha) e analisadas no *software* Image Scope.

4.3 Isolamento e manutenção das células primárias

As amostras frescas de TCG foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) com 0,6% de glicose e os coágulos sanguíneos e pequenos vasos foram removidos com auxílio de uma pinça cirúrgica. Em seguida, a amostra foi mecanicamente fragmentada e foi realizada a digestão enzimática com collagenase tipo II (Sigma) a 2,5% em meio de cultura DMEM (Dulbecco'smodifiedEaglemedium, Gibco) acrescido de 0,5 mg/ml de antibiótico/antimicótico (PSA – Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina) durante 3 a 12 horas em estufa a 37°C / 5% CO₂ (Figura 4-1). Após o tempo de incubação, o material foi fragmentado novamente e a suspensão resultante centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. A massa celular foi tratada com 2 mL de tampão de lise de hemácias gelado (ACK Lysing Buffer, Gibco), incubada em gelo por 2 a 3 minutos e lavada com 12mL de PBS gelado. Por fim, a massa celular foi filtrada em membrana com poro de 70 µm (Cellstrainer, BD Biosciences) e plaqueada em garrafas para cultivo de células. O isolamento foi acompanhado duas vezes por semana através de observação em microscópio Nikon Eclipse TS100 até que a cultura entrasse em confluência. As células em cultura foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.



Figura 4-1 Etapas iniciais do processamento de amostra de Tumor de Células Gigantes do Osso realizado no Centro de Tecnologia Celular do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia. (A) Aspecto da amostra antes do processamento. (B) Lavagem com solução salina e remoção de coágulos sanguíneos e pequenos vasos com auxílio de uma pinça cirúrgica seguida de fragmentação mecânica com tesoura. (C) Digestão enzimática com collagenase tipo II a 2,5% (Sigma). Fonte: FIGUEIREDO, 2017.

4.4 Imunocitoquímica

As células de TCG (5×10^4) foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 13mm, previamente tratadas com fibronectina (sc-29011, Santa Cruz), e mantidas por 24 h em estufa a 37°C / 5% CO_2 . Após esta incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas três vezes com PBS e então incubadas com Triton (Sigma) 0,2% por 10 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com tampão de bloqueio (PBS contendo 5% de BSA) por 1 hora e então incubadas com o anticorpo primário anti-ki67 na diluição de 1:200 (550609, BD Biosciences) por 12 horas a 4°C . Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo AlexaFluor® 555 na diluição de 1:200 (A21427, Invitrogen-Molecular Probes) por 1 hora a temperatura ambiente protegido da luz. Após a incubação, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com 50 ng de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Santa Cruz) por 15

minutos. Por fim, as lamínulas foram dispostas em lâminas com solução de montagem Fluoromount TM (Sigma) e visualizadas em microscópio de fluorescência (Y-FL 077489, Nikon).

4.5 Ensaio de migração celular

Para o ensaio de migração foram utilizados insertos com microporos de 8 µm de diâmetro, adaptáveis aos poços da placa de 24 poços (Greiner). Aproximadamente 5×10^4 células foram ressuspensas em 100 µl de meio DMEM F12 sem soro e adicionadas na parte superior dos insertos. Em cada poço da placa de 24 poços foram adicionados 600µl de meio DMEM-F12 contendo 10% de SFB em duplicata técnica. A placa, contendo os insertos, foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Ao final desta incubação, os insertos foram fixados, lavados com água e corados com Panótico rápido (Laborclin) de acordo com as indicações do fabricante. As células que permaneceram na face superior do inserto foram gentilmente removidas com o auxílio de haste de algodão. A contagem das células que migraram foi realizada capturando imagens de quatro campos em cada inserto, evitando a área periférica, em microscópio de contraste de fase (Nikon® TS100). Para a leitura dos campos, o inserto foi colocado sobre uma lâmina de vidro com o desenho de uma cruz, que serviu de referência para delimitação dos quatro campos. Ao final foi feita a média das quatro contagens e o resultado foi expresso em percentual em relação a condição controle.

4.6 Citometria de fluxo

As células aderentes foram destacadas com TrypLE (Gibco). Um total de 1×10^5 células foram lavadas em solução de PBS com 3% SFB e, em seguida, incubadas por 30 minutos com 5 μ L de anticorpo anti-CD90 conjugado com PerCP/cy 5.5 (BioLegend, 328118), 20 μ L de anti-CD45 conjugado com PerCP/cy 5.5 (BeckmanCoulter) e 10 μ L de anti-CD31 conjugado com AlexaFluor 488 (BioLegend, 303110). Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas por 5 min a 1500 rpm. As células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS analisadas no citômetro BD Accuri C6® (BD Biosciences, San Jose, CA). Foram adquiridos 20.000 eventos por condição.

4.7 Ensaio de Transfecção por Eletroporação

Os ensaios de eletroporação foram realizados no Laboratório de Carcinogênese Molecular do Instituto Nacional do Câncer através da colaboração com o Dr. Leonardo Chicaybam.

Três sequências de siRNA (Stealth™ SelectRNAi) específicas para CD90 (HSS144274, HSS144275 e HSS144276), bem como uma sequência análoga (StealthRNAi™ siRNA Negative Control Kit) com conteúdo similar dos nucleotídeos citosina e guanina, porém não codificante chamada *scrambled* (SCR) foram adquiridas (ThermoScientific). As sequências liofilizadas foram mantidas a -20°C até o uso. A ressuspensão foi realizada com 1000 μ L da solução tampão (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 20mM NaCl e 1mM de EDTA pH 8,0) (ThermoScientific). Foram

preparadas alíquotas de trabalho de 20 μ M e então armazenadas a -20°C.

A partir da alíquota de trabalho, foram adicionados 2,5 μ L de cada solução (50 μ M) em 5x10⁵ células ressuspendidas em 100 μ L de tampão de transfecção para cada condição: controle negativo (apenas a solução tampão), SCR e siRNA CD90 e as células foram então submetidas a transfecção por eletroporação com o programa U23 no equipamento Nucleofector 2b. Após a eletroporação foram adicionados 1000 μ L de meio de cultura vagarosamente às células e em seguida as mesmas foram semeadas em placas de seis poços e mantidas em estufa 5% CO₂ / 37°C.

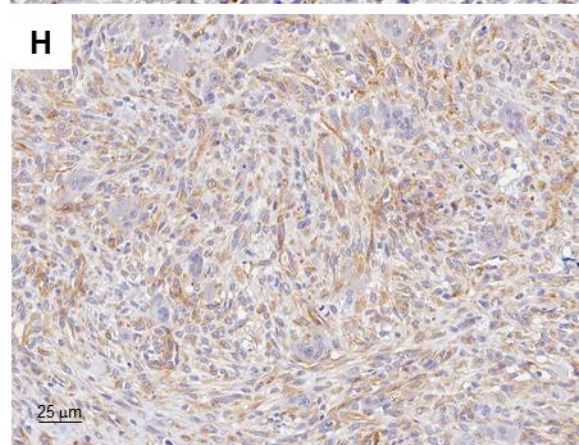
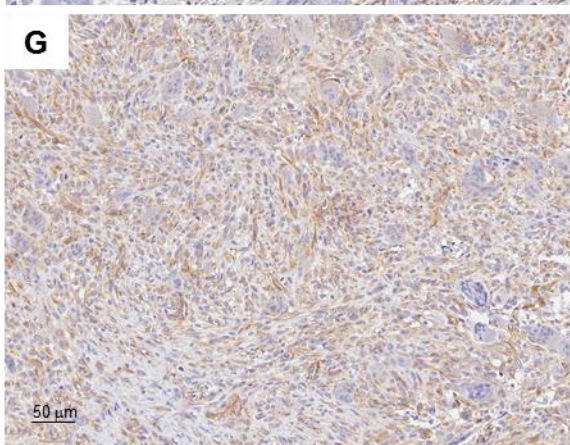
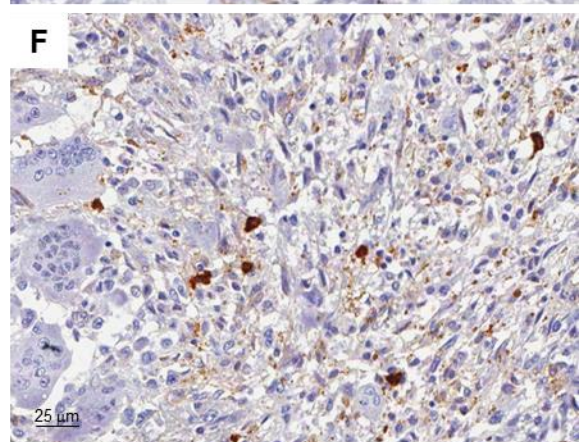
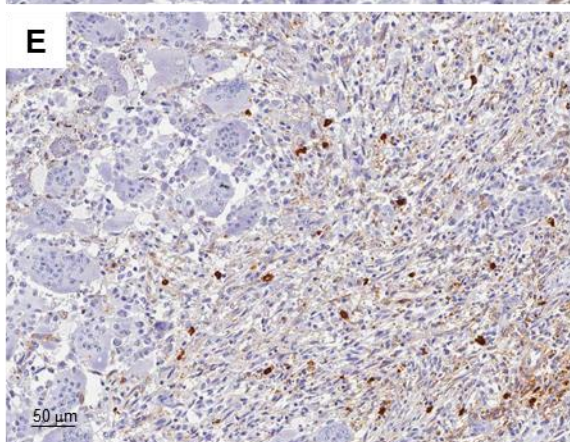
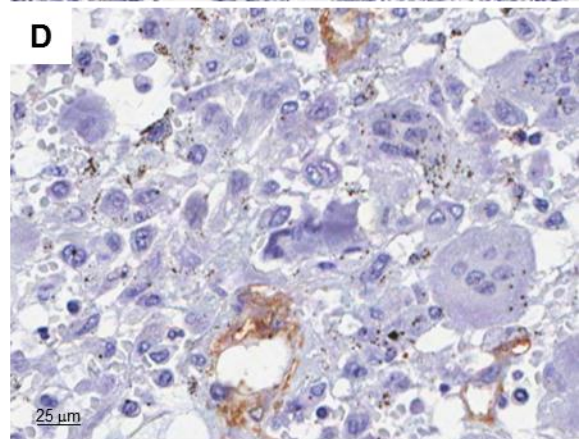
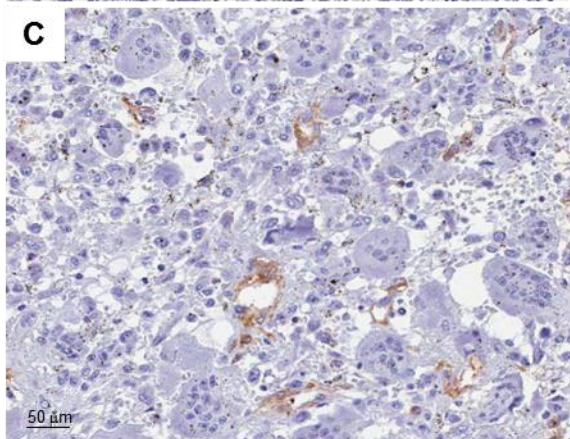
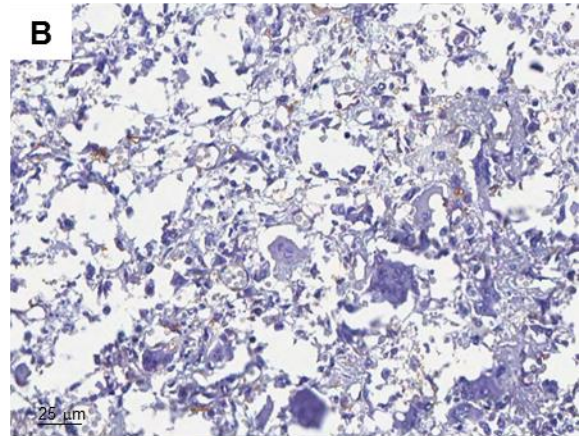
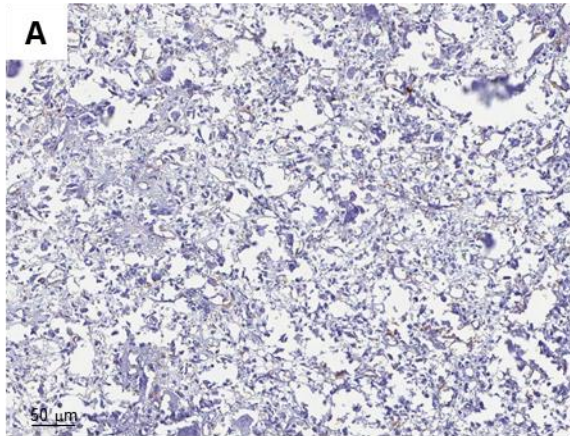
4.8 Análise estatística

Os dados da avaliação imunohistoquímica foram categorizados em baixa e leve expressão (0 e 1) e em moderada e alta (2 e 3) e analisados como variáveis qualitativas. Para a comparação da expressão entre os grupos clínicos foi utilizado o Teste Qui quadrado.

Os dados numéricos obtidos nos ensaios de citometria de fluxo, migração e proliferação celular foram expressos sob a forma de média $\pm$ desvio padrão. Para comparações entre as condições controle negativo, scrambled e SiRNA CD90 foi realizada análise de variância (ANOVA oneway) seguida de pós teste de Bonferroni. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para as análises de expressão de CD90 por citometria de fluxo e para os ensaios de migração e proliferação celular foi considerado valor de $p < 0,1$. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPadPrism, Versão 5.0.

5.1 Expressão tissular de CD90 no Tumor de Células Gigantes do Osso

A expressão de CD90 nos cortes histológicos dos 23 casos analisados foi avaliada através de imunohistoquímica. A expressão de CD90 foi classificada de zero (ausente) a três (intensa) considerando a dispersão e a intensidade da marcação no corte histológico, seguindo critérios previamente estabelecidos (SHOOSHTARIZADEH et al., 2016). Foram obtidos cortes histológicos do tumor primário de 13 pacientes que foram acompanhados por 100,8 meses e não foi observado desenvolvimento de recidiva ou metástase (Grupo Primário). Os pacientes dos quais foram obtidas amostras do tumor primário e que posteriormente desenvolveram recidiva e/ou metástase (Grupo Primário – recidiva/metástase, n=5) foram acompanhados por 79,7 meses. E foram obtidas cinco amostras provenientes da cirurgia de ressecção da recidiva, cujo acompanhamento dos pacientes foi em média de 110,5 meses (Grupo Recidiva). Os dados completos dos pacientes estão apresentados no Apêndice A. Foi observada variabilidade na expressão de CD90 entre os pacientes (Figura 5-1) sem diferença entre os grupos ($p=0,595$) (Figura 5-2).



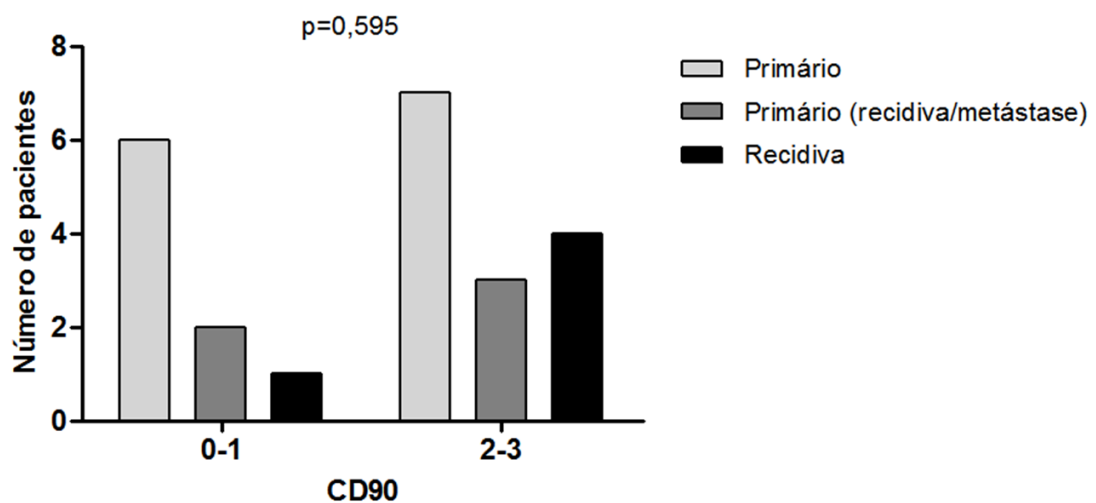


Figura 5-1 Expressão de CD90 em tecido tumoral de pacientes com Tumor de Células Gigantes do Osso. O tecido tumoral primário de pacientes sem (Primário) ou com o desenvolvimento posterior de recidiva e/ou metástase (Primário – recidiva/metástase) e tecido ressecado da recidiva tumoral. Avaliação da expressão por imunohistoquímica. Classificação de acordo com Shooshtarizadeh (2016) em 0- ausente, 1-leve, 2 - moderada e 3 – intensa. $p=0,595$, Teste Qui-quadrado.

5.2 Análise da expressão de CD90 em células primárias isoladas a partir de amostras frescas de Tumor de Células Gigantes do Osso

Considerando o papel do CD90 em outros tumores e sua expressão em amostras de tecido de TCG, foi realizada a coleta de amostras tumorais frescas, provenientes de cirurgia para diagnóstico ou tratamento do TCG. As amostras de três pacientes (Tabela 5-1) foram coletadas e processadas para isolamento de células primárias. Um paciente foi submetido a dois procedimentos cirúrgicos e foram coletadas duas amostras, denominadas, HeSi e HeLi. No protocolo de isolamento utilizado, inicialmente foi realizada a marcação das células recentemente isoladas (passagem zero) a partir da amostra de um paciente. Nestas 37,3% das

células foram CD90 positivas. Para o controle da contaminação de células da linhagem hematopoética e células endoteliais foram utilizados os marcadores CD45 e CD31, respectivamente, não sendo observada marcação significativa para nenhum dos marcadores (Figura 5-3). Em seguida, realizamos a análise da expressão de CD90 em células primárias em primeira passagem e observamos percentual de 93% a 99% de células CD90⁺ (Figura 5-4).

Tabela 5-1 Dados dos pacientes portadores de Tumor de Células Gigantes do Osso incluídos no estudo in vitro.

Parâmetro/Identificação Paciente	<i>HeLi</i>	<i>HeSi</i>	LuMa	VaCri
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino	Feminino
Topografia	Fêmur distal direito	Fêmur distal direito	Fêmur distal esq	Tíbia proximal esq
Tempo de evolução (meses)	4	6,5	6	12
Campanacci	I	I	II	III
Recidiva (meses)	Não há	Não há	Não há	Não há
Abordagem cirúrgica	Biopsia	Curetagem com cimentação	Curetagem com cimentação	Endoprótese não convencional
Metástase	Não há	Não há	Não há	Não há

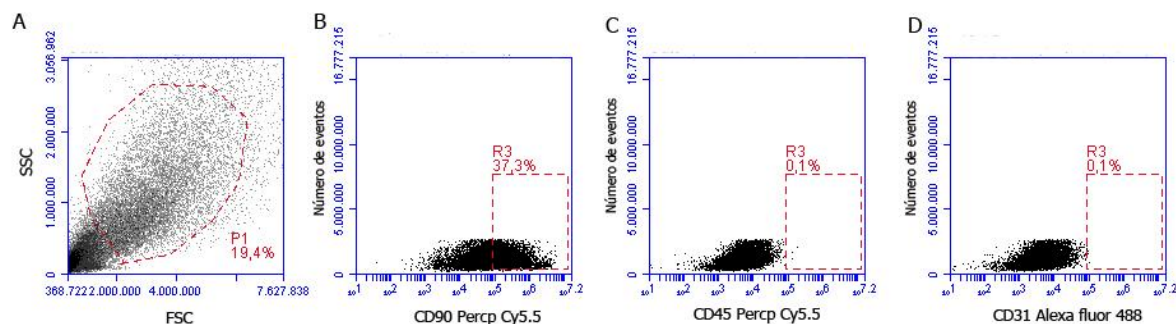


Figura 5-2 Células primárias do tumor de células gigantes do osso são $CD90^+CD31^-CD45^-$. Análise de citometria de fluxo das células primárias em passagem zero de uma amostra de TCG. (A) Gráfico representando side scatter (SSC) e forward scatter (FSC), com gate na população de interesse. (B) Expressão positiva de CD90 e negativa de (C) CD45 e de (D) CD31.

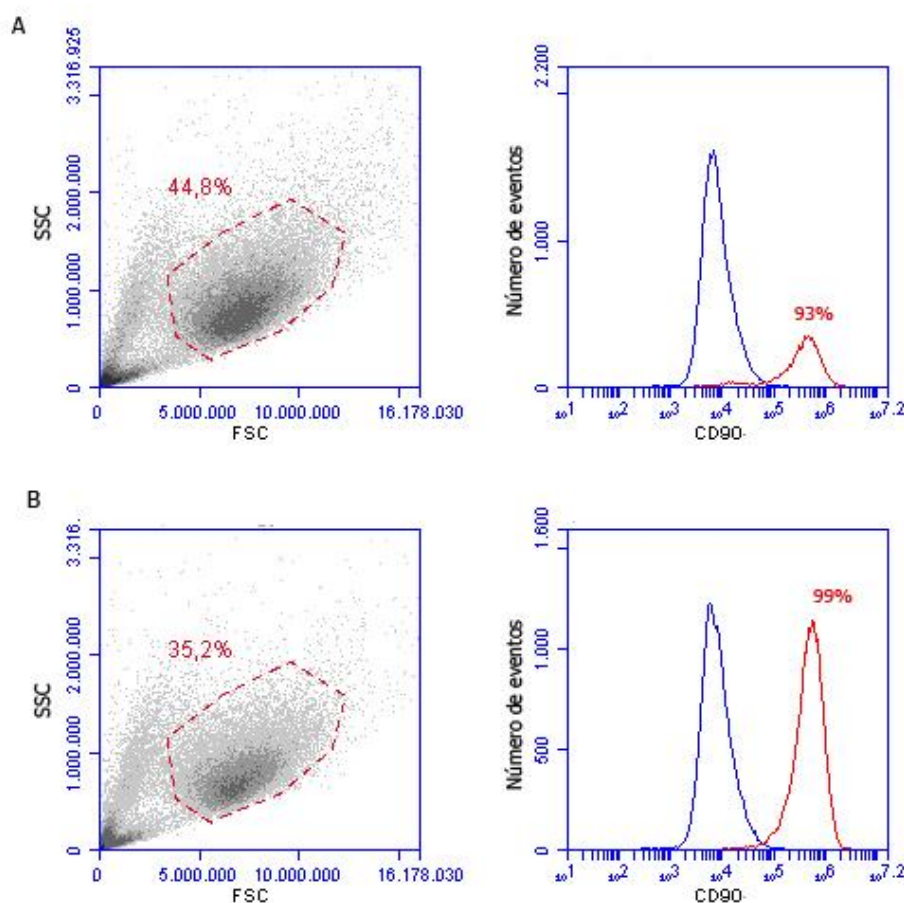


Figura 5-3 Células primárias do tumor de células gigantes do osso são $CD90^+$. Análise de citometria de fluxo das células primárias em primeira passagem de duas amostras (A) HeLi e (B) HeSi SERTAÇÃO de TCG. A primeira coluna do gráfico representa o side scatter (SSC) e forward scatter (FSC) da população de interesse. Na coluna da direita estão representados os histogramas com as células de TCG não marcadas (controle negativo) (linha azul) e as células incubadas com o anticorpo anti-CD90 (linha vermelha).

5.3 Silenciamento do CD90 por eletroporação

Com intuito de investigar a função do CD90 no TCG, avaliamos o efeito do silenciamento dessa molécula sobre a migração e proliferação das células da cultura primária. Para isso, as células do TCG em cultura foram transfectadas com siRNA do CD90 ou com siRNA controle (SCR). Nesses ensaios foram utilizadas as células HeSi e HeLi em quarta passagem, VaCri na sétima passagem e LuMa em oitava passagem.

Para avaliar o silenciamento, as células transfectadas foram avaliadas diariamente, por citometria de fluxo, quanto a expressão de CD90. Como resultado houve redução significativa na expressão desta molécula entre os dias 7 e 12 após a transfecção ($p < 0,0001$), com o retorno da expressão acontecendo por volta do dia 14 após a eletroporação. Entre os dias 7 e 12, foi observado que aproximadamente 95% das células do grupo siRNA CD90 não apresentavam o CD90 na sua superfície, enquanto no grupo SCR e no grupo C neg, esse percentual era desprezível. O valor médio de expressão ($\pm$ erro padrão) no dia 9 após eletroporação nas condições controle, SCR e siRNA CD90 foi de $97,0 \pm 1,2$, $97,9 \pm 0,8$ e $27,1 \pm 7,6$ respectivamente (Figura 5-5).

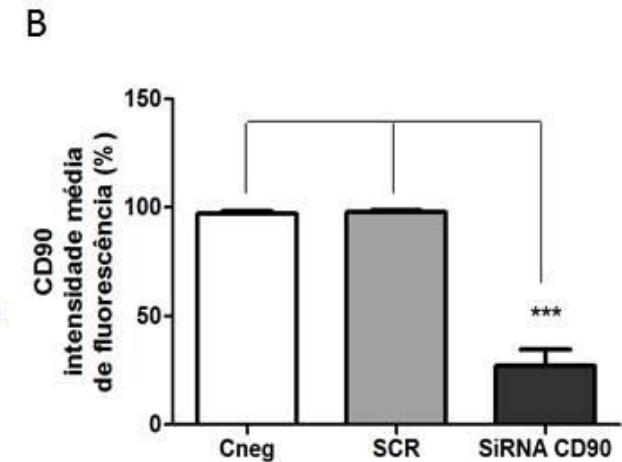
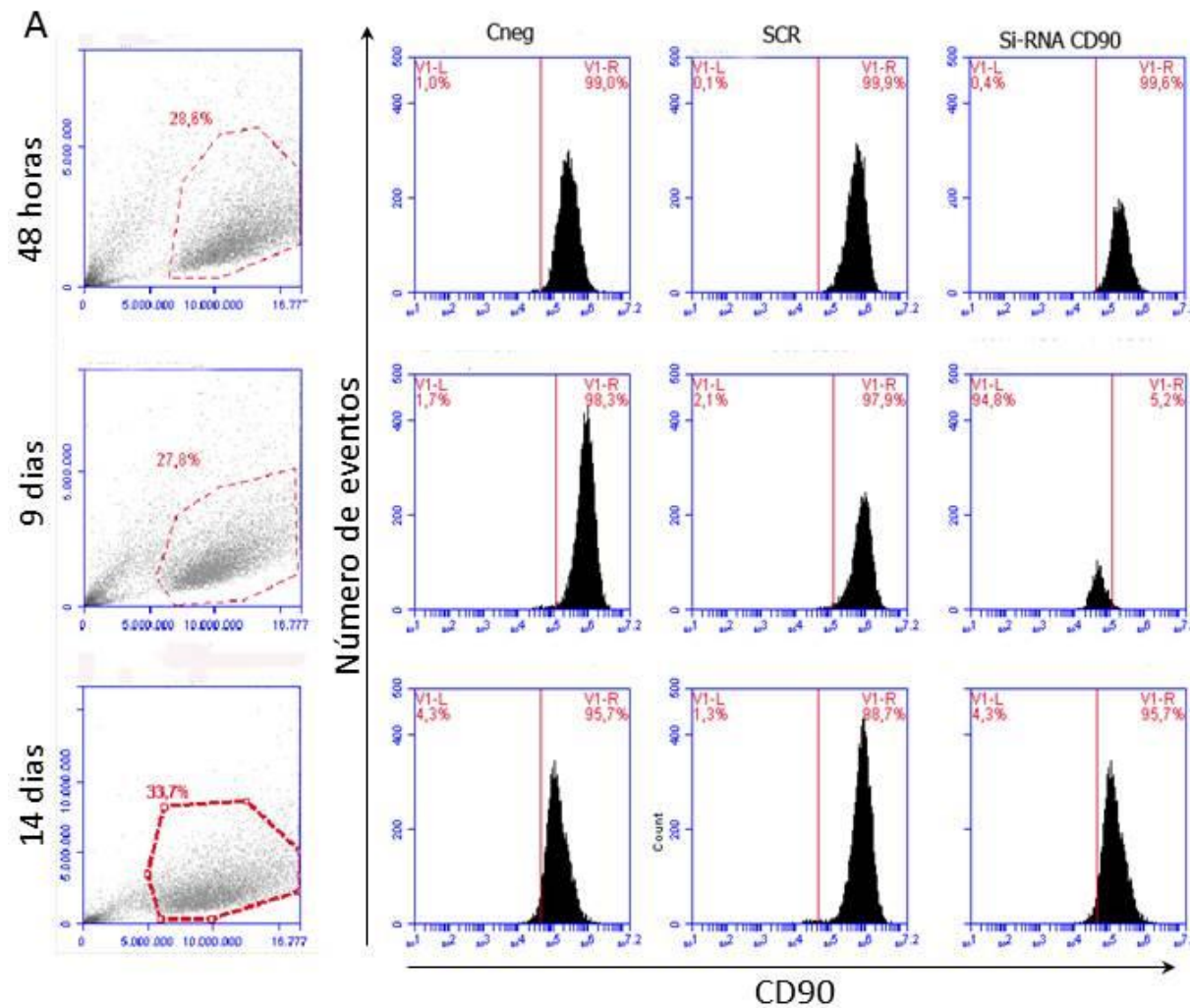


Figura 5-4 Silenciamento do CD90 em células primárias isoladas do Tumor de Células Gigantes do Osso (paciente VaCri) após eletroporação . (A) Dot-plot mostrando perfil SSC x FSC das células e a região delimitada (linha vermelha pontilhada) representativa da população selecionada para avaliação. Histogramas representativos das condições 48 horas, 9 e 14 dias após a eletroporação. (B) Média e desvio padrão da quantificação da expressão de CD90 após 9 dias (cinco experimentos independentes). ***Valor $p < 0,0001$. ANOVA one-way seguido de pós teste de Bonferroni.

5.4 Efeito do silenciamento do CD90 com SiRNA no Tumor de Células Gigantes do Osso

Para avaliar a funcionalidade do CD90 nas células de TCG, foram realizados ensaios de migração celular e análise de proliferação.

O ensaio de migração celular em transwell foi realizado com as quatro células primárias provenientes dos três pacientes em quatro experimentos independentes. Os resultados foram expressos na forma de percentual em relação a condição controle negativo, que foi considerado como 100%. Na condição SCR foi observada taxa de migração de 85,4% e na condição em que o CD90 foi silenciado, houve redução significativa na taxa de migração para 61,9% (Figura 5-6).

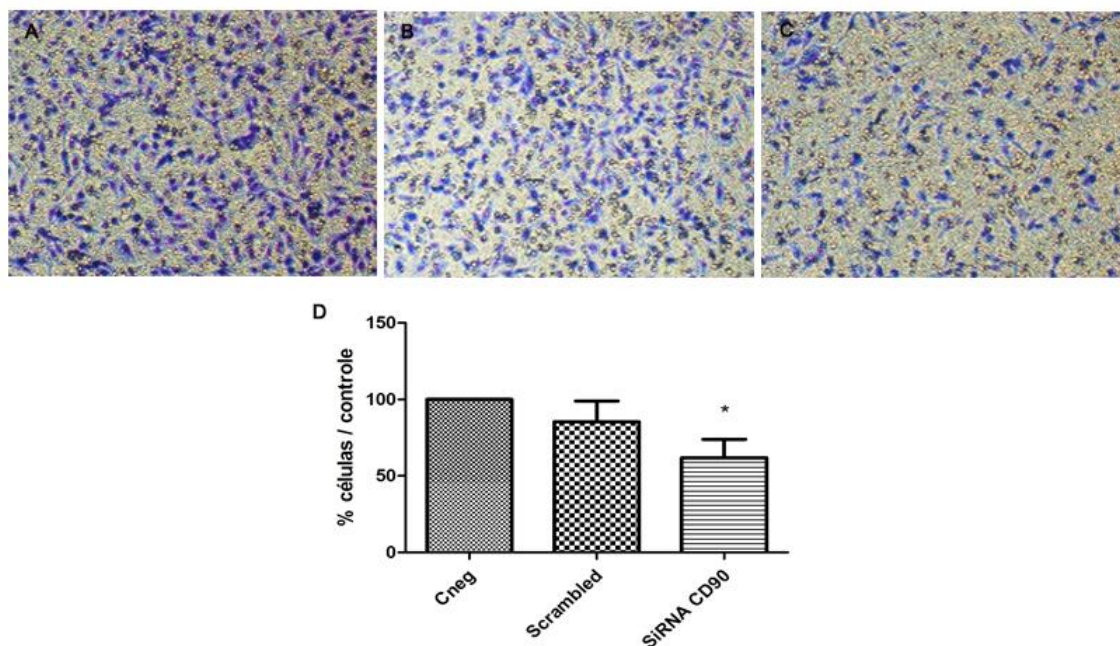


Figura 5-5 Efeito do silenciamento do CD90 sobre a migração de células primárias do Tumor de Células Gigantes do Osso. Foi realizado ensaio de migração em *transwell* 9 dias após eletroporação das células com (A) solução tampão (controle negativo), com a sequência de SiRNA análoga - *Scrambled* (B) e SiRNA específico para CD90 (C). Média e desvio padrão da quantificação da migração celular de quatro experimentos independentes com células primárias provenientes de quatro pacientes (D). *Valor $p < 0,1$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ao nível de significância de 90%, ANOVA com pós teste de Bonferroni.

A atividade proliferativa foi analisada através de imunocitoquímica para Ki67, um marcador de proliferação, em cinco experimentos independentes com células primárias provenientes dos três pacientes. As imagens foram observadas em aumento de 100X e 200X. O número médio ($\pm$ erro padrão) de células Ki67 positivas nas condições controle, SCR e SiRNA CD90 foi de $18,23 \pm 3,3$, $12,21 \pm 3,8$ e $15,82 \pm 2,0$, respectivamente (Valor $p = 0,412$), indicando que o silenciamento não interfere na proliferação celular (Figura 5-7).

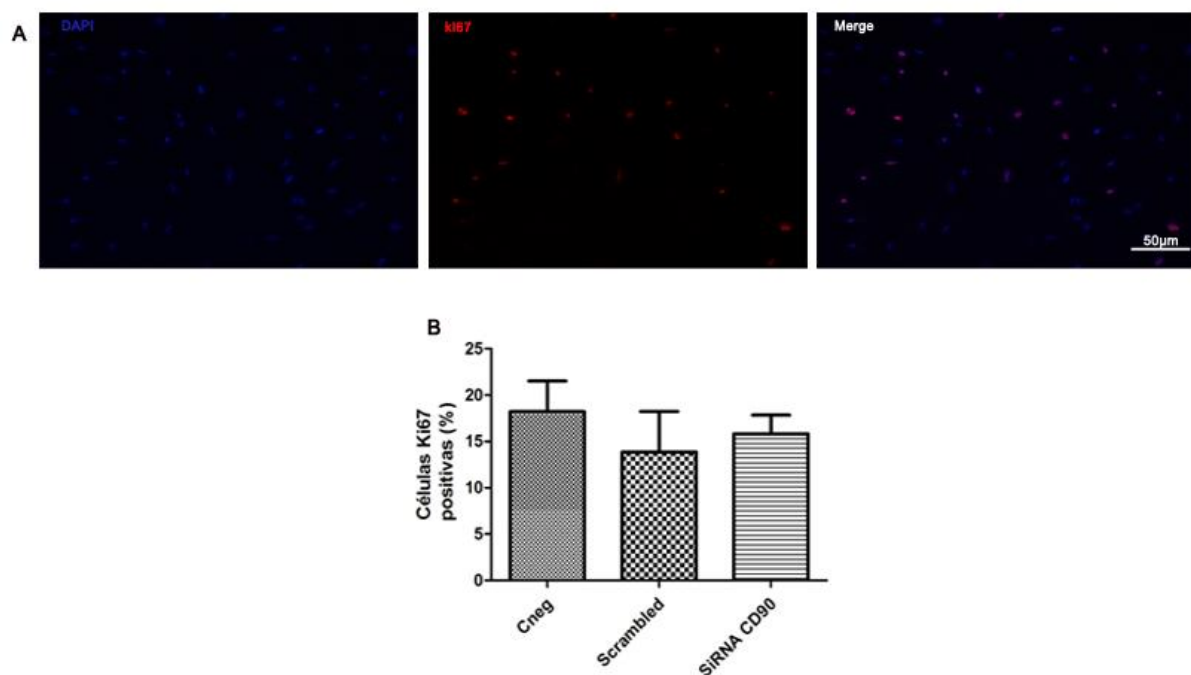


Figura 5-6 Efeito do silenciamento do CD90 sobre a proliferação de células primárias do Tumor de Células Gigantes do Osso. Foi realizado ensaio de imunocitoquímica para Ki67 9 dias após eletroporação das células com solução tampão (Cneg), sequência de SiRNA análoga (Scrambled) e SiRNA específico para CD90 (SiRNA CD90). (A) Núcleos positivamente corados para Ki67 mostrando colocalização com coloração de DAPI. (B) Média e desvio padrão da quantificação da marcação celular de cinco experimentos independentes com células primárias provenientes de quatro pacientes. P valor = 0,412, ANOVA one way, seguido de pós teste de Bonferroni.. Barra de escala representa 50µm. Microscópio de fluorescência 10X.

Este trabalho analisou o papel da proteína de superfície CD90, também conhecida como Thy-1, na proliferação e na migração de células isoladas a partir do Tumor de Células Gigantes do Osso. Até o presente momento, a funcionalidade do CD90 no TCG não foi estudada e diversos estudos apontam sua participação tanto na progressão como na supressão tumoral. Neste estudo, identificamos a expressão do CD90 no tecido tumoral e em células primárias isoladas a partir de amostras tumorais coletadas de pacientes atendidos no INTO. Ainda, mostramos que o silenciamento desta molécula diminuiu a migração celular, sugerindo um papel na progressão do TCG.

A recidiva local é observada em cerca de 39% dos casos de TCG (AMELIO et al., 2016) e o comportamento biológico deste tumor é imprevisível. O potencial tumorigênico de células CD90⁺ já foi demonstrado em outros tumores (YANG et al., 2008; TANG et al., 2013; YAN et al., 2013) bem como a correlação significativa com ocorrência de recidiva local (GUO et al., 2014) e metástase (REGE et al., 2006; DONNENBERG et al., 2010; JOHANSSON et al., 2013; ZHU et al., 2014; SCOGNAMIGLIO et al., 2014). No carcinoma de nasofaringe foi observada supressão da expressão de Thy-1 no tecido metastático. A avaliação por imunohistoquímica de 70 casos mostrou que enquanto no tecido primário 40% (17/43) dos casos mostravam inibição ou perda da expressão de Thy-1, no tecido metastático linfonodal esse percentual foi de 74% (20/27) (LUNG et al., 2005). Nossos resultados demonstraram que o CD90 está expresso de forma variada no TCG, porém sem relação com o desenvolvimento posterior de recidiva local ou

metástases e nem com a expressão no tecido da recidiva (Figura 5-2). As amostras de recidiva local podem representar resquício da ressecção do tumor primário. Um dos fatores de risco para o desenvolvimento de recidiva local é o tipo de cirurgia (ARBEITSGEMEINSCHAFT et al, 2008; ERRANI et al, 2017; OUYANG et al, 2017) e não uso de fatores adjuvantes locais, tais como fenol ou polimetilmetacrilato (ERRANI et al, 2010; GASTON et al, 2011), podendo, portanto, resultar em permanência de tumor residual. Uma limitação do no nosso estudo é que não foi possível avaliar a expressão no tecido metastático, pois não tivemos casos de metastasectomia. Além disso, nós também não avaliamos a expressão de CD90 no tecido não tumoral. Já foi demonstrado que a expressão desse marcador no tumor primário do câncer de próstata e no tecido metastático está elevada em relação ao tecido normal (LIU et al, 2004).

Observamos alguns focos indicativos de marcação endotelial. No entanto, também fica evidente a marcação de células do estroma. No glioblastoma, mas não no tecido cerebelar normal, o CD90 é expresso por células endoteliais e por células da parede dos vasos do tumor, como células do músculo liso, pericitos e fibroblastos. Os mesmos autores mostraram também, em tecido humano e de modelo experimental, células CD90⁺ cercadas por macrófagos, sugerindo que o CD90 pode estar envolvido no recrutamento e na regulação da função de macrófagos associados ao tumor (TAM, *tumor-associated macrophages*) (INOUE et al., 2016). Em nosso estudo não identificamos qual tipo celular expressa o CD90, e possivelmente a co-marcação com α -1 antiqumiotripsina e com antígeno de proliferação nuclear (PNCA) elucidaria se as células que expressam CD90 são as células estromais neoplásicas (SAXENA et al, 2016).

As linhagens celulares já estabelecidas são pouco representativas da diversidade, heterogeneidade celular e da resistência a medicamentos, não mimetizando o cenário clínico. Dessa forma, o uso de células primárias isoladas a partir de tumores sólidos, apesar de ser de curta duração, ganhou importância nos últimos anos no contexto de terapias personalizadas, podendo gerar dados mais refinados para a medicina translacional (MITRA et al, 2013). No nosso estudo, um ponto negativo é que o isolamento foi realizado em modelo de cultivo 2D, que não reproduz a arquitetura tumoral e o microambiente de matriz extracelular (MITRA et al, 2013). No nosso protocolo de isolamento (seção 4.3), embora as hemácias tenham sido eliminadas da massa tumoral, pelo tratamento com tampão de lise, as células do sistema imunológico, células endoteliais e osteoclastos, por exemplo, ainda podem estar presentes na suspensão celular. Inicialmente fizemos uma caracterização para avaliar a expressão de CD31 e CD45 no intuito de confirmar a pureza das células isoladas. O CD45 é um antígeno pan leucocitário (WOODFORD-THOMAS et al, 1993; DELISSER et al, 1994) e o CD31 é um antígeno de superfície endotelial (LERTKIATMONGKOL et al., 2016) e nossa população foi negativa para esses marcadores (Figura 5-4). Além disso, já foi demonstrado que as células gigantes multinucleadas não permanecem em cultura e, após a segunda passagem, apenas as células estromais persistem *in vitro* (FELLENBERG et al, 2010. ZHOU, Z. et al, 2016).

Trabalhos anteriores mostraram a presença de células CD90 positivas em diversos tumores (PASCAL et al, 2011; LOBA et al, 2012; KUMAR et al, 2016). *In vitro*, 37,3% das células isoladas em passagem zero (Figura 5-4) mostraram expressão de CD90 e células em maior passagem a expressão variou de 93% a

99% (Figura 5-3). Células indiferenciadas expressam CD90, porém essas células representam uma pequena parcela do tecido e no nosso estudo, o padrão de expressão de CD90 no TCG não suporta a hipótese de que sejam representativas da população de células-tronco tumorais. A expressão de CD90 identifica o nicho de células-tronco tumorais de câncer de mama (LU et al, 2014) que representam uma minoria das células, de 0,1% a 5% (AL-HAJJ et al, 2003).

No carcinoma escamoso de esôfago essa população representa 2,5%-10% das células isoladas de pacientes e estão relacionadas às características de células-tronco tumorais (TANG et al, 2013). O CD90 é também um marcador para células-tronco tumorais no carcinoma hepatocelular. As análises através de citometria de fluxo revelam que apenas 0% a 0,03% das células hepáticas não tumorais são CD45⁻CD90⁺, ao passo que no tecido tumoral, esse percentual variou de 0,03% a 6,2% indicando o potencial tumorigênico dessas células (YANG et al, 2008).

É possível que as células estromais tumorais estejam expressando CD90, porém não podemos descartar o possível papel de outras células que compõem o heterogêneo microambiente tumoral, como as células estromais associadas ao câncer, conhecido como “estroma reativo” (CUNHA et al, 2003). No carcinoma hepatocelular a expressão de CD90 foi relacionada principalmente aos fibroblastos associados ao tumor (CAF, *cancerassociatedfibroblasts*). Um estudo que aborde extensivamente o papel de cada tipo celular, incluindo células do sistema imune como os macrófagos associados a tumores, células dendríticas, fibroblastos, células mesenquimais, células endoteliais, que compõem o microambiente tumoral (TME, *tumor microenvironment*) auxiliaria no entendimento do desenvolvimento tumoral e na resposta a possíveis novas terapias. Além disso, os avanços recentes em

tecnologias de *single cell* abriram novos caminhos para caracterizar a heterogeneidade celular intra-tumoral e, finalmente, orientar o diagnóstico e o tratamento.

O silenciamento do CD90 nas células primárias isoladas do TCG inibiu significativamente a migração celular (Figura 5-9). É possível que esta molécula module a secreção de fatores de crescimento ou mesmo de quimiocinas, como o CXCR4, envolvidos com a migração celular. ZHAO et al, 2009) isolaram CAF a partir de adenocarcinoma humano de próstata e distinguiram duas populações, uma com alta expressão de CD90 (CD90^{hi}) e outra com baixa expressão (CD90^{low}). Os autores mostraram que as células CD90^{hi} apresentam maior expressão de gênica de CXCL12, TGFβ₁ e TGFβ₂ e CTGF. Além disso, o percentual de células epiteliais de hiperplasia prostática (BPH-1) expressando altos níveis de CXCR4 aumentou após exposição dessas células ao meio condicionado de células CD90^{hi} e também quando foi realizado o co-cultivo com células CD90^{hi} em relação às células CD90^{low}.

As vias de sinalização do Thy-1 (CD90) foram abordadas em uma revisão de Baker e Hagood (2010). Segundo levantamento dos autores há evidências da ligação do Thy-1 com integrinas com consequente regulação da sinalização e organização do citoesqueleto celular que implicam na ocorrência de eventos celulares importantes, como mobilidade, mitose e na transição epitélio mensênquimal. O mecanismo de ação pelo qual a supressão do CD90 interfere com a migração celular no TCG não foi investigado no presente estudo e ainda deve ser elucidado.

7 CONCLUSÃO

Os tecidos tumorais primário e de recidiva do Tumor de Células Gigantes do Osso expressam CD90 (Thy-1), porém sem relação com a ocorrência de recidiva. *In vitro*, as células isoladas do TCG também mostram expressão desta molécula que está relacionada com a migração celular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYSINGHE HR, CAO Q, XU J, POLLOCK S, VEYBERMAN Y, GUCKERT NL, KENG P, WANG N. THY1 expression is associated with tumor suppression of human ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;143(2):125–32.

AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A, MORRISON SJ, CLARKE MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *ProcNatlAcadSci U S A*. 2003;100(7):3983-8.

AMANATULLAH DF, CLARK TR, LOPEZ MJ, BORYS D, TAMURIAN RM. Giant cell tumor of bone. *Orthopedics*. 2014;37(2):112-20.

AMELIO JM, ROCKBERG J, HERNANDEZ RK, SOBOCKI P, STRYKER S, BACH BA, ENGELLAU J, LIEDE A. Population-based study of giant cell tumor of bone in Sweden (1983-2011). *Cancer Epidemiol*. 2016;42:82-9.

AOKI J, TANIKAWA H, ISHII K, SEO GS, KARAKIDA O, SONE S, ICHIKAWA T, KACHI K. MR findings indicative of hemosiderin in giant-cell tumor of bone: frequency, cause, and diagnostic significance. *Am J Roentgenol*. 1996;166(1):145-48.

ARBEITSGEMEINSCHAFT KNOCHENTUMOREN, BECKER WT, DOHLE J, BERND L, BRAUN A, CSERHATI M, ENDERLE A, HOVY L, MATEJOVSKY Z, SZENDROI M, TRIEB K, TUNN PU. Local recurrence of giant cell tumor of bone after intralesional treatment with and without adjuvant therapy. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(5):1060-7.

ATHANASOU NA, BANSAL M, FORSYTH R, REID RP, SAPI Z: Giant cell tumour of bone. In WHO classification of tumours of soft tissue and bone. 4th edition. Edited by Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2013:321–24.

BALKE M, CAMPANACCI L, GEBERT C, PICCI P, GIBBONS M, TAYLOR R, HOGENDOORN P, KROEP J, WASS J, ATHANASOU N. Bisphosphonate treatment of aggressive primary, recurrent and metastatic Giant Cell Tumour of Bone. *BMC Cancer*. 2010;10:462.

BALKE M, SCHREMPER L, GEBERT C, AHRENS H, STREITBUERGER A, KOEHLER G, HARDES J, GOSHEGER G. Giant cell tumor of bone: treatment and outcome of 214 cases. *J Cancer Res ClinOncol*. 2008;134(9):969-78.

BARKER, TH, GRENETT HE, MacEWEN MW, TILDEN SG, FULLER GM, SETTLEMAN J, WOODS A, MURPHY-ULLRICH J, HAGOOD JS. Thy-1 regulates

fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity. *Exp Cell Res.* 2004;295(2):488–96.

BECKER WT, DOHLE J, BERND L, BRAUN A, CSERHATI M, ENDERLE A, HOVY L, MATEJOVSKY Z, SZENDROI M, TRIEB K, TUNN PU. Local recurrence of giant cell tumor of bone after intralesional treatment with and without adjuvant therapy. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2008;90(5):1060-7.

BERTONI F, PRESENT D, SUDANESE A, BALDINI N, BACCHINI P, CAMPANACCI M. Giant-cell tumor of bone with pulmonary metastases: six case reports and a review of the literature. *ClinOrthopRelat Res.* 1988;237:275–85.

BLACKLEY HR, WUNDER JS, DAVIS AM, WHITE LM, KANDEL R, BELL RS. Treatment of giant-cell tumors of long bones with curettage and bone-grafting. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81(6):811-20.

BORIANI S, SUDANESE A, BALDINI N, PICCI P. Sarcomatous evolution of giant cell tumor. *Ital J OrthopTraumatol.* 1986;12:203–11.

BRIEN EW, MIRRA JM, KESSLER S, SUEN M, HO JK, YANG WT. Benign giant cell tumor of bone with osteosarcomatous transformation ('dedifferentiated' primary malignant GCT): report of two cases. *Skeletal Radiol.* 1997;26(4):246–55.

CAMPANACCI M, BALDINI N, BORIANI S, SUDANESE A. Giant-cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg Am.* 1987;69(1):106–14.

COMPERE EL. The diagnosis and treatment of giant-cell tumors of bone. *J Bone J Surg Am.* 1953;35A(4):822-30.

COWAN RW, SINGH G. Giant cell tumor of bone: a basic science perspective. *Bone.* 2013;52(1):238-46.

CRAIG W, KAY R, CUTLER RL, LANSDORP PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med.* 1993;177(5):1331-42.

CUNHA GR, HAYWARD SW, WANG YZ, RICKE WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer.* 2003;107(1):1-10.

DELISSER HM, NEWMAN PJ, ALBELDA SM. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today.* 1994;15(10):490-5.

DOMINKUS M, RUGGIERI P, BERTONI F, BRICCOLI A, PICCI P, ROCCA M, MERCURI M: Histologically verified lung metastases in benign giant cell tumours-14 cases from a single institution. *Int Orthop.* 2006;30(6):499-504.

DONNENBERG VS, DONNENBERG AD, ZIMMERLIN L, LANDRENEAU RJ, BHARGAVA R, WETZEL RA, BASSE P, BRUFISKY AM. Localization of CD44 and

CD90 positive cells to the invasive front of breast tumors. *Cytometry B ClinCytom.* 2010;78(5):287-301.

DUFRESNE A, DERBEL O, CASSIER P, VAZ G, DECOUVELAERE AV, BLAY JY. Giant-cell tumor of bone, anti-RANKL therapy. *Bonekey Rep.* 2012;1:149.

ENNEKING WF. A system of staging musculoskeletal neoplasms. *ClinOrthopRelat Res.*1986;(204):9–24.

ERRANI C, RUGGIERI P, ASENZIO M A, TOSCANO A, COLANGELI S, RIMONDI E, ROSSI G, LONGHI A, MERCURI M. Giant cell tumor of the extremity: A review of 349 cases from a single institution. *Cancer Treat Rev.* 2010;36(1):1-7.

ERRANI C, TSU, LEONE G, AKAHANE M, CEVOLANI L, TANZI P, KIDO A, HONOKI K, TANAKA Y, DONATI DM. Higher local recurrence rates after intralesional surgery for giant cell tumor of the proximal femur compared to other sites. 2017;27(6):813-819.

FELLENBERG J, LEHNER B, WITTE D. Silencing of the UCHL1 gene in giant cell tumors of bone. *Int J Cancer.* 2010 Oct 15;127(8):1804-12.

FIEGEL HC, KAIFI JT, QUAAS A, VAROL E, KRICKHAHN A, METZGER R, SAUTER G, TILL H, IZBICKI JR, ERTTMANN R, KLUTH D. Lack of Thy1 (CD90) expression in neuroblastomas is correlated with impaired survival. *PediatrSurg Int.* 2008;24(1):101-5.

GASTON CL, BHUMBRA R, WATANUKI M, ABUDU A T, CARTER S R, JEYS L M, TILLMAN R M, GRIMER R J. Does the addition of cement improve the rate of local recurrence after curettage of giant cell tumours in bone? *J Bone Joint Surg Br* 2011;93:1665–1669.

GHERT M, SIMUNOVIC N, COWAN RW, COLTERJOHN N, SINGH G. Properties of the stromal cell in giant cell tumor of bone. *ClinOrthopRelat Res.* 2007;459:8-13.

GOLDENBERG RR, CAMPBELL CJ, BONFIGLIO M. Giant cell tumor of bone: an analysis of two hundred and eighteen cases. *J Bone Joint Surg Am.* 1970;52(4):619-64.

GUO Z, LI LQ, JIANG JH, OU C, ZENG LX, XIANG BD. Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(8):2098-106.

HAERYFAR SM, HOSKIN DW. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol.* 2004;173(6):3581-8.

HE J, LIU Y, ZHU T, ZHU J, DIMECO F, VESCOVI AL, HETH JA, MURASZKO KM, FAN X, LUBMAN DM. CD90 is identified as a marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol CellProteomics.* 2012;11(6):M111.010744.

HECK R. Tumores benignos (ocasionalmente agressivos) do osso. In Cirurgia Ortopédica de Campbell. Editado por Canale ST, Campbell WC. São Paulo: Manole;2006:Vol. 1, pp 813-17. 10th ed.

INOUE A, TANAKA J, TAKAHASHI H, KOHNO S, OHUE S, UMAKOSHI A, GOTOH K, OHNISHI T. Blood vessels expressing CD90 in human and rat brain tumors. Neuropathology. 2016;36(2):168-80.

JAFFE, HL, LICHTENSTEIN, L, PORTIS, RB. Giant cell tumor of bone, its pathologic appearance, grading, supposed variant and treatment. Arch Pathol. 1940;30:993–1031.

JOHANSSON I, RINGNÉR M, HEDENFALK I. The landscape of candidate driver genes differs between male and female breast cancer. PLOS One. 2013;8(10):e78299.

JOYNER CJ, QUINN JM, TRIFFITT JT, OWEN ME, ATHANASOU NA. Phenotypic characterisation of mononuclear and multinucleated cells of giant cell tumour of bone. Bone Miner. 1992;16(1):37-48.

KIM Y, NIZAMI S, GOTO H, LEE FY. Modern interpretation of giant cell tumor of bone: predominantly osteoclastogenic stromal tumor. ClinOrthop Surg. 2012;4(2):107-16.

KIVIOJA A H, BLOMQVIST C, HIETANIEMI K, TROVIK C, WALLOE A, BAUER H C, JORGENSEN P H, BERGH P, FOLLERAS G. Cement is recommended in intra-lesional surgery of giant cell tumors: a Scandinavian Sarcoma Group study of 294 patients followed for a median time of 5 years. ActaOrthop. 2008;79(1):86-93.

KLENKE FM, WENGER DE, INWARDS CY, ROSE PS, SIM FH. Giant Cell Tumor of Bone: risk factors for recurrence. ClinOrthop. 2011;469(2):591-9.

KOZII R, WILSON J, PERSICHETTI J, PHELPS V, BALL SE, BALL ED. Thy-1 expression on blast cells from adult patients with acute myeloid leukemia. Leuk Res. 1997;21(5):381-5.

KUMAR A, BHANJA A, BHATTACHARYYA J, JAGANATHAN BG. Multiple roles of CD90 in cancer. Tumour Biol. 2016;37(9):11611-22.

LARSSON SE, LORENTZON R, BOQUIST L. Giant-cell tumor of bone. A demographic, clinical, and histopathological study of all cases recorded in the Swedish Cancer Registry for the years 1958 through 1968. J Bone Joint Surg Am. 1975;57(2):167-73.

LERTKIATMONGKOL P, LIAO D, MEI H, HU Y, NEWMAN PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31).Curr Opin Hematol. 2016;23(3):253-9.

LEYTON L, HAGOOD JS. Thy-1 modulates neurological cell-cell and cell-matrix interactions through multiple molecular interactions. *AdvNeurobiol*. 2014;8:3-20.

LIAO TS, YURGELUN MB, CHANG SS, ZHANG HZ, MURAKAMI K, BLAINE TA, PARISIEN MV, KIM W, WINCHESTER RJ, LEE FY. Recruitment of osteoclast precursors by stromal cell derived factor-1 (SDF-1) in giant cell tumor of bone. *J Orthop Res*. 2005;23(1):203-9.

LIU AY, ROUDIER MP, TRUE LD. Heterogeneity in primary and metastatic prostate cancer as defined by cell surface CD profile. *Am J Pathol*. 2004;165(5):1543-56.

LOBBA AR, FORNI MF, CARREIRA AC, SOGAYAR MC. Differential expression of CD90 and CD14 stem cell markers in malignant breast cancer cell lines. *Cytometry A*. 2012;81(12):1084-91.

LU H, CLAUSER KR, TAM WL, FRÖSE J, YE X, EATON EN, REINHARDT F, DONNENBERG VS, BHARGAVA R, CARR SA, WEINBERG RA. A breast cancer stem cell niche supported by juxtacrine signalling from monocytes and macrophages. *Nat Cell Biol*. 2014;16(11):1105-17.

LUNG HL, BANGARUSAMY DK, XIE D, CHEUNG AK, CHENG Y, KUMARAN MK, MILLER L, LIU ET, GUAN XY, SHAM JS, FANG Y, LI L, WANG N, PROTOPOPOV AI, ZABAROVSKY ER, TSAO SW, STANBRIDGE EJ, LUNG ML. THY1 is a candidate tumour suppressor gene with decreased expression in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*. 2005;24(43):6525-32

MALEK F, KRUEGER P, HATMI ZN, MALAYERI AA, FAEZIPOUR H, O'DONNELL RJ. Local control of long bone giant cell tumour using curettage, burring and bone grafting without adjuvant therapy. *IntOrthop*. 2006;30(6):495-8.

MASUI F, USHIGOME S, FUJII K. Giant cell tumor of bone: a clinicopathologic study of prognostic factors. *Pathol Int*. 1998;48(9):723-9.

MCDONALD, D J, SIM, F H, MCLEOD, R A, DAHLIN, D C. Giant-cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg Am*. 1986;68(2):313-14.

MITRA A, MISHRA L, LI S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *TrendsBiotechnol*. 2013;31(6):347-54.

MORAES DA, SIBOV TT, PAVON LF, ALVIM PQ, BONADIO RS, DA SILVA JR, PIC-TAYLOR A, TOLEDO OA, MARTI LC, AZEVEDO RB, OLIVEIRA DM. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):97.

MORGAN JD, EADY JL. Giant cell tumor and the skeletally immature patient. *J South Orthop Assoc*. 1999;8(4):275-84.

O'DONNELL RJ, SPRINGFIELD DS, MOTWANI HK, READY JE, GEBHARDT MC, MANKIN HJ. Recurrence of giant-cell tumors of the long bones after curettage and packing with cement. *J Bone Joint Surg (Am)*. 1994;76(12):1827-33.

OLIVEIRA RCLJ, PEREIRA MGSP, GARCIA PBL, SANTOS PA, CAVALCANTI AS, MEOHAS W. Estudo epidemiológico de recidiva de tumor de células gigantes no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia. *RevBras Ortop*. 2016;51(4):459-65.

OUYANG HQ, JIANG L, LIU XG, WEI F, YANG SM, MENG N, JIANG P, YU M, WU FL, DANG L, ZHOU H, ZHANG H, LIU ZJ. Recurrence Factors in Giant Cell Tumors of the Spine. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(13):1557-1563.

PASCAL LE, AI J, VÊNCIO RZ, VÊNCIO EF, ZHOU Y, PAGE LS, TRUE LD, WANG Z, LIU AY. Differential inductive signaling of CD90+ prostate cancer-associated fibroblasts compared to normal tissue stromal mesenchyme cells. *Cancer Microenviron*. 2011;4(1):51-9.

PROSSER GH, BALOCH KG, TILLMAN RM, CARTER SR, GRIMER RJ. Does curettage without adjuvant therapy provide low recurrence rates in giant-cell tumors of bone? *ClinOrthop*. 2005;(435):211-8.

REGE TA, HAGOOD JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*. 2006;20(8):1045-54.

SAIZ P, VIRKUS W, PIASECKI P, TEMPLETON A, SHOTT S, GITELIS S. Results of giant cell tumor of bone treated with intralesional excision. *ClinOrthop*. 2004;(424):221-6.

SAXENA CC, SAFAYA R, KAWATRA MADAN N, KHAN SA, IYER VK. Histopathological, immunohistochemical, and image analytic parameters characterizing the stromal component in primary and recurrent giant cell tumor of bone. *J ClinOrthop Trauma*. 2016;7(2):109-14.

SCHAJOWICZ F. Neoplasias ósseas e lesões pseudotumorais. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

SCHUBERT K, GUTKNECHT D, KÖBERLE M, ANDEREGG U, SAALBACH A. Melanoma cells use thy-1 (CD90) on endothelial cells for metastasis formation. *Am J Pathol*. 2013;182(1):266-76.

SCOGNAMIGLIO G, D'ANTONIO A, ROSSI G, CAVAZZA A, CAMERLINGO R, PIROZZI G, LA MANTIA E, ANNICIELLO AM, MORABITO A, CANTILE M, BOSCAINO A, SPARANO L, BOTTI G, ROCCO G, FRANCO R CD90 expression in atypical meningiomas and meningioma metastasis. *Am J ClinPathol*. 2014;141(6):841-9.

SIEBENROCK KA, UNNI KK, ROCK MG: Giant-cell tumour of bone metastasing to the lungs. A long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Br*. 1998;80(1):43-SINGH

AS, CHAWLA NS, CHAWLA SP. Giant-cell tumor of bone: treatment options and role of denosumab. *Biologics*. 2015;9:69-74.

SKUBITZ KM. Giant cell tumor of bone: current treatment options. *Curr Treat Options Oncol*. 2014;15(3):507-18.

STEENSMA MR, TYLER WK, SHABER AG, GOLDRING SR, ROSS FP, WILLIAMS BO, HEALEY JH, PURDUE PE. Targeting the giant cell tumor stromal cell: functional characterization and a novel therapeutic strategy. *PLOS One*. 2013;8(7):e69101.

SZENDRÖI M. Giant-cell tumour of bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(1):5-12.

TANG KH, DAI YD, TONG M, CHAN YP, KWAN PS, FU L, QIN YR, TSAO SW, LUNG HL, LUNG ML, TONG DK, LAW S, CHAN KW, MA S, GUAN XY. A CD90+ tumor-initiating cell population with an aggressive signature and metastatic capacity in esophageal cancer. *Cancer Res*. 2013;73(7):2322-32.

TRIEB K, BITZAN P, LANG S, DOMINKUS M, KOTZ R. Recurrence of curetted and bone-grafted giant-cell tumours with and without adjuvant phenol therapy. *Eur J Surg Oncol*. 2001;27(2):200-2.

TURCOTTE RE, WUNDER JS, ISLER MH, BELL RS, SCHACHAR N, MASRI BA, MOREAU G, DAVIS AM. Giant cell tumor of long bone: a Canadian Sarcoma Group study. *Clin Orthop*. 2002;(397):248-58.

UNNI KK, INWARDS CY. Giant cell tumor (osteoclastoma). *Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 10,165 cases*. New York: Lippincott-Williams & Wilkins; 2010. P.225-42.

VAN DER HEIJDEN L, DIJKSTRA PD, VAN DE SANDE MA, KROEP JR, NOUT RA, VAN RIJSWIJK CS, BOVÉE JV, HOGENDOORN PC, GELDERBLOM H. The clinical approach toward giant cell tumor of bone. *Oncologist*. 2014;19(5):550-61.

WERNER M. Giant cell tumour of bone: morphological, biological and histogenetical aspects. *Int Orthop*. 2006;30(6):484-9.

WOODFORD-THOMAS T, THOMAS ML. The leukocyte common antigen, CD45 and other protein tyrosine phosphatases in hematopoietic cells. *Semin Cell Biol*. 1993;4(6):409-18.

WU PF, TANG JY, LI KH. RANK pathway in giant cell tumor of bone: pathogenesis and therapeutic aspects. *Tumour Biol*. 2015;36(2):495-501.

WÜLLING M, DELLING G, KAISER E. The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone. *Hum Pathol*. 2003;34(10):983-93.

YAN X, LUO H, ZHOU X, ZHU B, WANG Y, BIAN X. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines. *Oncol Rep*. 2013;30(6):2733-40.

YANG ZF, HO DW, NG MN, LAU CK, YU WC, NGAI P, CHU PW, LAM CT, POON RT, FAN ST. Significance of CD90+ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(2):153-66.

ZHAO H, PEEHL DM. Tumor-promoting phenotype of CD90hi prostate cancer-associated fibroblasts. *Prostate*. 2009;69(9):991-1000.

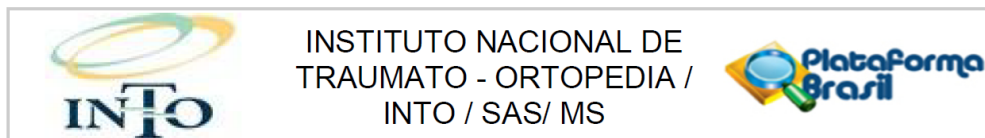
ZHOU X, LIU XZ, FAN GT, WU SJ, ZHAO JN, SHI X. Expression of Metalloproteinase-9 and CD34 in Giant Cell Tumor of Bone. *Orthop Surg*. 2016;8(2):220-5.

ZHOU Z, LI Y, XU L, WANG X, CHEN S, YANG C, XIAO J. Biological characteristic of a novel giant cell tumor cell line derived from spine. *Tumour Biol*. 2016;37(7):9681-9.

ZHU J, THAKOLWIBOON S, LIU X, ZHANG M, LUBMAN DM. Overexpression of CD90 (thy-1) in pancreatic adenocarcinoma present in the tumor microenvironment.

ANEXOS

Anexo A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Tumor de células gigantes do osso: identificação de marcadores prognósticos e alvos terapêuticos.

Pesquisador: PATRÍCIA DE ALBUQUERQUE DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37306114.3.0000.5273

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

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 843.749

Data da Relatoria: 21/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de aluna do Mestrado Profissional do INTO envolvendo pacientes com Tumor de Células Gigantes, buscando identificar marcadores prognósticos.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar marcadores prognósticos e alvos terapêuticos em Tumores de Células Gigantes do Osso.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa permitirá identificar marcadores para estabelecimento de alvos para o tratamento, além do estabelecimento do prognóstico para recidiva e metástases.

O benefício da pesquisa é indireto, promovendo melhor tratamento para os pacientes no futuro.

Os riscos são os mesmos já inerentes ao tratamento, já que não será incluído nenhum procedimento novo na rotina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será realizado em duas etapas: a primeira envolvendo apenas o material coletado das lesões dos pacientes com TCG e a segunda etapa envolvendo diretamente os pacientes em si.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nada a acrescentar.

Endereço: Avenida Brasil, n° 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

Continuação do Parecer: 843.749

Recomendações:

Nada a acrescentar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a acrescentar.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 23 de Outubro de 2014

Assinado por:
Marisa Peter Silva
(Coordenador)

Anexo B - 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 **“Tumor de Células Gigantes do Osso: Identificação de Marcadores Prognósticos e Alvos Terapêuticos”**. 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 Tumor de Células Gigantes (TCG). A confirmação do diagnóstico do TCG 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. Após a confirmação o tratamento é feito com cirurgia para retirar o tumor. Se você autorizar uma parte do tumor retirado no momento da operação (cirurgia) será utilizada na pesquisa.

Pacientes portadores de TCG que estejam sendo acompanhados pelo Centro de Oncologia Ortopédica do INTO, poderão participar deste estudo.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

JUSTIFICATIVA

O TCG é um tumor ósseo benigno, mas pode se espalhar para outros locais do corpo. Com a pesquisa queremos avaliar porque se espalha.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo desta pesquisa é estudar o tumor que você pode ser portador (Tumor de Células Gigantes).

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

A retirada do tumor do osso será feita durante a sua operação (cirurgia) para seu tratamento. Após o seu tratamento, caso o tumor volte (recidiva), e você tenha que operar de novo será retirado um novo fragmento.

Uma parte do tumor retirado será enviado ao laboratório de pesquisa e a outra parte para o laboratório de diagnóstico (Anatomia Patológica).

Após a cirurgia de retirada do tumor você ficará internado até que o seu médico dê alta hospitalar.

RISCOS

Esta pesquisa não vai interferir no resultado da sua biópsia, no seu tratamento ou na forma como a sua doença vai evoluir. Todas as etapas do tratamento serão as mesmas com ou sem a sua participação na pesquisa. Os riscos relacionados com a sua participação são os riscos relacionados com a realização da biópsia da lesão óssea e da sua cirurgia. Não há risco adicional se você participar desta pesquisa.

BENEFÍCIOS

Esta pesquisa não oferece benefícios diretos a você. O benefício principal da sua participação é que no futuro você poderá ajudar a melhorar o tratamento de outras pessoas com o TCG.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O seu tratamento será feito no INTO pelo Centro de Oncologia Ortopédica.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

As informações obtidas nessa pesquisa serão **confidenciais** e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação. Os resultados quando forem divulgados serão identificados com siglas que não permitirão conhecer a sua identidade.

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos (prontuário) poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (CEP-INTO) e pela equipe de pesquisadores envolvidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição em que foi realizado o procedimento. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação nesta pesquisa.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação na pesquisa.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que você **não é obrigado** a participar desta pesquisa. Você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação na pesquisa, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos a pesquisa não será realizada.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação na pesquisa a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Dra. Patrícia de Albuquerque no telefone (21) **2134-5142**. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO, situado à 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.

Autorizo a utilização das amostras de TCG para este projeto e outros projetos relacionados ao estudo do Tumor de Células Gigantes que estejam aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INTO.

Li as informações acima e entendi o propósito desta pesquisa assim como os benefícios e riscos potenciais da participação na mesma. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido à biopsia óssea, necessária para o diagnóstico de minha doença e não receberei compensação monetária por minha participação nesta pesquisa.

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.

_____/_____/_____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____/_____/_____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____

Pesquisador responsável: Patricia de Albuquerque dos Santos

Contato com o pesquisador responsável:

Endereço: Avenida Brasil, 500, 2º andar

Telefone: 2134-5142

e-mail: patdealbuquerque@yahoo.com.br

Assinatura do pesquisador responsável

APÊNDICES

Apêndice A - Tabela com o perfil dos pacientes que tiveram avaliação do tecido tumoral por imunohistoquímica

Identificação o paciente	Gênero	Idade	Tempo de evolução (meses)	Fratura patológica	Recidiva	Tempo recidiva após o diagnóstico (meses)	Metástase	Tecido utilizado IHC (cirurgia primário/recidiva)	Expressão de CD90	Lâminas
TCG1	F	30	3	N	N	X	N	PRIMÁRIO	0	I09-0135
TCG2	F	61	6	N	N	X	N	PRIMÁRIO	1	I07-1147
TCG3	M	50	11	S	N	X	N	PRIMÁRIO	3	I10-0063
TCG4	F	59	12	N	N	X	N	PRIMÁRIO	2	I10-0625
TCG5	F	46	3	N	N	X	N	PRIMÁRIO	2	I09-0717
TCG6	F	32	24	N	N	X	N	PRIMÁRIO	2	I12-0239
TCG7	F	34	4	N	N	X	S	PRIMÁRIO	1	I09-0767
TCG8	M	77	36	N	N	X	N	PRIMÁRIO	2	I11-0018
TCG9	F	34	3	N	N	X	S	PRIMÁRIO	1	I08-0254
TCG10	M	44	1	S	N	X	N	PRIMÁRIO	1	I08-0516
TCG11	F	29	3	N	N	X	N	PRIMÁRIO	1	I08-0373
TCG12	M	49	2	N	N	X	N	PRIMÁRIO	1	I11-0185
TCG13	M	70	6	N	N	X	N	PRIMÁRIO	1	I11-0126
TCG14	F	74	24	N	S	18	N	RECIDIVA	2	I08-0129
TCG15	M	28	6	N	S	12	N	RECIDIVA	3	I08-0461
TCG16	M	45	2	N	N	X	N	PRIMÁRIO	3	I11-0086
TCG17	F	79	24	N	S	24	N	RECIDIVA	3	I09-0274
TCG18	F	32	36	N	S	28	N	RECIDIVA	2	I12-1010
TCG19	F	28	8	N	S	6	N	PRIMÁRIO	2	I10-0303
TCG20	F	15	2	N	S	12	S	PRIMÁRIO	3	I13-1146
TCG21	F	39	84	N	S	36	N	RECIDIVA	0	I12-0413
TCG22	M	18	3	N	N	X	N	PRIMÁRIO	3	I13-1041
TCG23	F	54	6	N	S	7	S	PRIMÁRIO	3	I13-0572

