



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

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CXCR4 E DA SECREÇÃO DE CXCL12 EM
CÉLULAS PRIMÁRIAS DE OSTEOSSARCOMA**

GABRIELE DE OLIVEIRA RIBEIRO

Rio de Janeiro
2018



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

**Avaliação da expressão de CXCR4 e da secreção de CXCL12 em células
primárias de osteossarcoma**

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.

Orientadoras: Profa. Dra. Amanda dos Santos Cavalcanti
Profa. Dra. Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa

**RIO DE JANEIRO
2018**



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

**Avaliação da expressão de CXCR4 e da secreção de CXCL12 em células
primárias de osteossarcoma**

GABRIELE DE OLIVEIRA RIBEIRO

Orientadoras: Profa. Dra. Amanda dos Santos Cavalcanti
Profa. Dra. Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa

Banca examinadora

Profa. Dra. Daiana Vieira Lopes (UFRJ)
Dra. Nina Carrossini Bastos (INCA)
Prof. Dra. Priscila Britto Campos Villanova (INTO)

Profa. Dra. Maria Eugenia Leite Duarte (revisora)
Profa. Dra. Danielle Cabral Bonfim (suplente)

Rio de Janeiro
Fevereiro
2018

Agradecimentos

Agradeço a todos os membros da divisão de pesquisa, em especial às minhas orientadoras Amanda e Anneliese, que me apoiaram e me ensinaram muito ao longo dos últimos dois anos. Agradeço também a minha família, que foi meu alicerce não só durante essa jornada, mas em toda a minha vida.

RESUMO

RIBEIRO, Gabriele de Oliveira. Avaliação da expressão de CXCR4 e da secreção de CXCL12 em células primárias de osteossarcoma. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2018.

O osteossarcoma é o câncer ósseo primário mais comum e, apesar do advento da quimioterapia, a taxa de sobrevida global é baixa, principalmente quando os pacientes desenvolvem metástase. Estudos indicam a participação do eixo CXCR4/CXCL12 no desenvolvimento de metástases e na redução da sobrevida global de pacientes com osteossarcoma. Contudo, estudos *in vitro* são necessários para compreender seu papel nos mecanismos de metástase e de quimiorresistência neste tumor. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do receptor CXCR4 e a secreção de seu ligante, CXCL12, em células primárias de osteossarcoma. Foram isoladas duas culturas celulares primárias, denominadas OS1 e OS2, obtidas a partir de amostras de osteossarcoma de pacientes diagnosticados no INTO. As linhagens de osteossarcoma MG-63 e SAOS-2 foram utilizadas no estudo. As células primárias OS1 e OS2 exibiram morfologia semelhante a da linhagem MG-63, em monocamada, e apresentaram, respectivamente, tempo médio de duplicação de 75,70 horas e 29,97 horas. Foi avaliada a sensibilidade das células de osteossarcoma aos quimioterápicos doxorrubicina (DOX), cisplatina (CIS) e metotrexato (MTX) através do ensaio de MTT e do cálculo da IC₅₀. As células OS1 apresentaram os menores valores de IC₅₀ relacionados ao tratamento com DOX, CIS e MTX (concentrações de 0,40, 97,60 e 15,90 µM, respectivamente) sendo, portanto, as mais sensíveis. Por outro lado, as células OS2 apresentaram os maiores valores de IC₅₀ para DOX (97,20 µM) e para MTX (2231 µM). A concentração encontrada para a CIS (257,70 µM) foi um pouco inferior ao maior IC₅₀ (309 µM – SAOS-2). A linhagem MG-63 foi a segunda mais resistente à DOX (4,86 µM) e ao MTX (465,20 µM) e a terceira mais resistente à CIS (228,40 µM). Já a linhagem SAOS-2 foi a mais sensível ao MTX (2,05 µM), a segunda mais sensível à DOX (1,36 µM), porém, a mais resistente à CIS (309 µM). A expressão de mRNA de CXCR4 nas células OS1 foi significativamente menor em relação às células OS2 e em relação à linhagem MG-63, mas não houve diferença significativa em relação à linhagem SAOS-2. Por sua vez, as células OS2 apresentaram expressão de mRNA de CXCR4 semelhante à MG-63 e menor expressão em

*“Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, lembrai-vos de que
as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

relação à SAOS-2 ($p < 0,01$). No ensaio de imunofluorescência, observou-se marcação tênue de CXCR4 nas células OS1 e em SAOS-2, enquanto as células OS2 apresentaram marcação mais intensa, semelhante à MG-63. Por citometria de fluxo, verificou-se que as células OS1 apresentaram percentual de células CXCR4 menor que 1% e, nas células OS2, o percentual variou entre 1,3% e 3%. Por fim, a quantificação da secreção de CXCL12 por ELISA evidenciou baixa secreção autócrina pelas células OS1, OS2, MG-63 e SAOS-2, sem diferença entre os grupos. Em conjunto, os dados sugerem que o perfil de expressão de CXCR4 em células isoladas de osteossarcoma humano e expandidas *in vitro* e de células de linhagens comerciais é heterogêneo e que as células com maior expressão de CXCR4 (OS2 e MG-63) mostraram maior resistência à ação *in vitro* dos agentes quimioterápicos.

Palavras-chave: Osteossarcoma; CXCR4; CXCL12; células primárias; linhagem celular.

ABSTRACT

RIBEIRO, Gabriele de Oliveira. Evaluation of CXCR4 expression and CXCL12 secretion in primary osteosarcoma cells. Rio de Janeiro, 2018. Dissertation (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) - National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2018.

Osteosarcoma is the most common primary bone cancer and, despite the advent of chemotherapy, the overall survival rate is low, especially when patients develop metastasis. Studies indicate the role of the CXCR4/CXCL12 axis in the development of metastases and in the reduction of the overall survival of patients. However, in vitro studies are needed to understand its role in the mechanisms of metastasis and chemoresistance in this tumor. The aim of this study was to evaluate the expression of the CXCR4 receptor and the secretion of its ligand, CXCL12, in primary osteosarcoma cells. We isolated two primary cell cultures, called OS1 and OS2, obtained from osteosarcoma samples from patients diagnosed at INTO. The osteosarcoma lineages MG-63 and SAOS-2 were used in the study. Primary cells OS1 and OS2 exhibited morphology similar to that of the MG-63 line, in monolayer, and presented, respectively, mean duplication time of 75.70 and 29.97 hours. The sensitivity of osteosarcoma cells to the chemotherapy drugs doxorubicin (DOX), cisplatin (CIS) and methotrexate (MTX) were assessed by MTT assay and IC₅₀ calculation. OS1 cells had the lowest IC₅₀ values related to treatment with DOX, CIS, and MTX (concentrations of 0.40, 97.60 and 15.90 μ M, respectively) and were, therefore, the most sensitive. On the other hand, OS2 cells had the highest IC₅₀ values for DOX (97.20 μ M) and for MTX (2231 μ M). The concentration found for CIS (257.70 μ M) was slightly lower than the higher one (309 μ M - SAOS-2). The MG-63 strain was the second most resistant to DOX (4.86 μ M) and MTX (465.20 μ M) and the third most resistant to CIS (228.40 μ M). The SAOS-2 strain was the most sensitive to MTX (2.05 μ M), the second most sensitive to DOX (1.36 μ M), but the most resistant to CIS (309 μ M). The expression of CXCR4 mRNA in OS1 cells was significantly lower in OS2 cells and in relation to the MG-3 lineage, but there was no significant difference in relation to the SAOS-2 lineage. OS2 cells, on the other hand, showed CXCR4 mRNA expression similar to MG-63 and less expression in relation to OS-2 ($p < 0.01$). In the immunofluorescence assay, weak CXCR4 labeling was observed in OS1 and in SAOS-2, whereas OS2 cells showed more intense labeling, similar to MG-63. By flow cytometry, it was found less than 1% of CXCR4 positive cells for OS1 while for OS2 the percentage ranged between 1.3% and 3%. Finally, the quantification of CXCL12 secretion by ELISA showed low autocrine secretion by OS1, OS2, MG-63 and SAOS-2 cells, with no statistic difference. Together, the data suggest that the expression profile of CXCR4 in primary osteosarcoma cells and in commercial lineages is heterogeneous and that the cells with higher expression of CXCR4 (OS2 and MG-63) show higher resistance to the in vitro action of chemotherapeutic drugs.

Keywords: Osteosarcoma; CXCR4; CXCL12; primary cells; cell lineage.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Osteossarcoma	13
1.2 Quimiocinas e câncer	17
1.2.1 Eixo CXCR4/CXCL12 na progressão tumoral	19
1.2.2 CXCR4/CXCL12 e quimiorresistência	22
1.2.3 CXCR4 e CXCL12 no osteossarcoma.....	26
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo Principal	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3 METODOLOGIA	33
3.1 Aspectos éticos	33
3.2 Coleta de amostras	33
3.3 Isolamento e manutenção de células primárias de osteossarcoma	34
3.4 Linhagens celulares.....	35
3.5 Análise do tempo de duplicação populacional.....	36
3.6 Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	37
3.7 Ensaio de imunofluorescência.....	38
3.8 Citometria de fluxo	39
3.9 Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).....	40
3.10 Ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT e cálculo de IC ₅₀	40
3.11 Análise histológica.....	41
3.12 Análise estatística	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Características dos pacientes	43
4.1.1 Células primárias	43

4.1.2	Aspectos radiográficos e histopatológicos dos tumores que originaram as células primárias	44
4.2	Aspectos morfológicos das células primárias de osteossarcoma.....	45
4.3	Ação dos agentes quimioterápicos sobre a viabilidade celular	48
4.4	Análise da expressão gênica de <i>CXCR4</i> nas células primárias de osteossarcoma...	54
4.5	Avaliação da expressão e da localização de <i>CXCR4</i> nas células primárias de osteossarcoma por imunofluorescência.	55
4.6	Avaliação da expressão de <i>CXCR4</i> na superfície das células primárias de osteossarcoma.	57
4.7	Quantificação da secreção de CXCL12 no sobrenadante de culturas de células de osteossarcoma	59
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÕES	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8	ANEXOS	88
	ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INTO .	88
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	91
9	APÊNDICES.....	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium Lysing Buffer</i> (Solução tampão de amônio-potássio)
AKT	<i>Protein Kinase B</i> (Proteína quinase B)
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> (linfoma de células B - extra grande)
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
CAF	<i>Cancer-associated Fibroblasts</i> (fibroblastos associados ao câncer)
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i> (Receptor de quimiocina C-C do tipo 7)
CCR10	<i>C-C chemokine receptor type 10</i> (Receptor de quimiocina C-C do tipo 10)
CPPC	Câncer de pulmão de pequenas células
CTC	Centro de Tecnologia Celular
CIS	Cisplatina
CXCL12	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 12</i> (Quimiocina ligante C-X-C do tipo 12)
CXCR4	<i>C-X-C Chemokine receptor type 4</i> (Receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilidol
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i> (Meio para cultivo celular Dulbecco modificado com mistura de nutrientes F-12)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoadsorção enzimática)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (Quinase regulada por sinal extracelular)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Seleção de células ativada por fluorescência, citometria de fluxo)
FAK	<i>Focal adhesion Kinase</i> (Quinase de adesão focal)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)
GSTP1-1	Glutathione S - transferase P1 (Transferase P1 glutadiona S)
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i> (Fator indutor de hipóxia tipo 1)
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> (concentração que inibe metade da

	resposta máxima inibitória máxima)
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
IP3	<i>Inositol trisphosphate</i> (Trifosfato de inositol)
LMA	Leucemia mielóide aguda
MMP	Metaloproteinase
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i> (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5- Brometo de Difeniltetrazolium)
MTX	Metotrexato
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Solução salina tamponada)
PCC	<i>Pancreatic cancer cell</i> (célula de câncer de pâncreas)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PIK3	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> (Fosfoinosítideo 3-quinase)
PLC/PKC	<i>Phospholipase C</i> (Fosfolipase C) / <i>Protein Kinase C</i> (Proteína quinase C)
PSC	<i>Pancreatic stellate cell</i> (célula pancreática estrelada)
Rb1	Retinoblastoma
Rcf	<i>relative centrifugal force</i> (força centrífuga relativa)
SDF-1	<i>Stromal derived factor 1</i> (fator derivado de células do estroma 1)
SFB	Soro fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TAM	<i>tumor associated macrophage</i> (macrófago associado a tumor)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TD	Tempo de Duplicação
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento endotelial vascular)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência e localização do osteossarcoma.	14
Figura 2. Histologia do osteossarcoma clássico central osteoblástico.....	15
Figura 3. Representação do papel de CXCR4/CXCL12 no processo de formação de metástase.	21
Figura 4. Via de sinalização do CXCR4 na sobrevivência da célula tumoral.....	25
Figura 5. Procedimento de coleta das amostras de tecido tumoral.	34
Figura 6. Aspectos radiográficos e histopatológicos dos tumores que originaram as culturas primárias.....	45
Figura 7. Aspecto morfológico das células primárias e das linhagens de osteossarcoma.	47
Figura 8. Ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT após tratamento com doxorubicina.	49
Figura 9. Ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT após tratamento com cisplatina..	50
Figura 10. Ensaio de viabilidade celular relativa por redução do MTT após tratamento com metotrexato.	52
Figura 11. Expressão de mRNA de CXCR4 por PCR em tempo real em células de osteossarcoma.	54
Figura 12. Caracterização da expressão e da localização de CXCR4 por imunofluorescência. ..	56
Figura 13. Estratégia de análise da expressão de CXCR4 por citometria de fluxo.....	58
Figura 14. Avaliação da expressão de CXCR4 na superfície das células de osteossarcoma por citometria de fluxo.....	59
Figura 15. Quantificação da secreção de CXCL12 por ELISA.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos dos pacientes (linhagens).....	36
Tabela 2. Sequência dos pares de primers para a PCR em tempo real e tamanho do produto.....	37
Tabela 3. Dados demográficos dos pacientes (células primárias).....	43
Tabela 4. Tempo médio de duplicação populacional (PD) das células primárias e das linhagens de osteossarcoma.	48
Tabela 5. Cálculo da IC ₅₀ das células de osteossarcoma incubadas com os agentes quimioterápicos doxorrubicina, cisplatina e metotrexato com os dados obtidos através do ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT.....	53
Tabela 6. Resumo dos resultados de tempo médio de duplicação, IC ₅₀ e expressão de CXCR4.....	60
Tabela 7. Tabela de passagens das culturas durante os experimentos.	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Osteossarcoma

O osteossarcoma é o câncer ósseo primário mais comum do osso (OTTAVIANI e JAFFE, 2009) e a proporção de ocorrência da doença entre mulheres e homens é de 1:1,4 (UNNI e INWARDS, 2013; GIANFERANTE *et al.*, 2017). A forma primária apresenta pico de incidência na segunda década de vida, acometendo principalmente crianças e adolescentes. A forma secundária costuma ocorrer na sexta década de vida a partir de uma lesão preexistente, mais comumente a doença de Paget em 1% dos casos (GRUENER e CAMACHO, 2014). Além disso, o osteossarcoma também pode ser secundário a exposição à radiação ionizante, displasia fibrosa ou infarto ósseo (LONGHI *et al.*, 2008; LIN e PATEL, 2013). A maior parte dos osteossarcomas ocorre na metáfise dos ossos longos, acometendo com mais frequência a porção distal do fêmur e proximal da tíbia (KUNDU, 2014) (**Figura 1**).

A apresentação clínica do osteossarcoma é inespecífica e a investigação diagnóstica é realizada através de exames radiográficos e laboratoriais, porém, a suspeita clínica só é confirmada após avaliação histopatológica (BIELACK *et al.*, 2002; CAMARGO *et al.*, 2012; FLETCHER, 2013; JADÃO *et al.*, 2013).

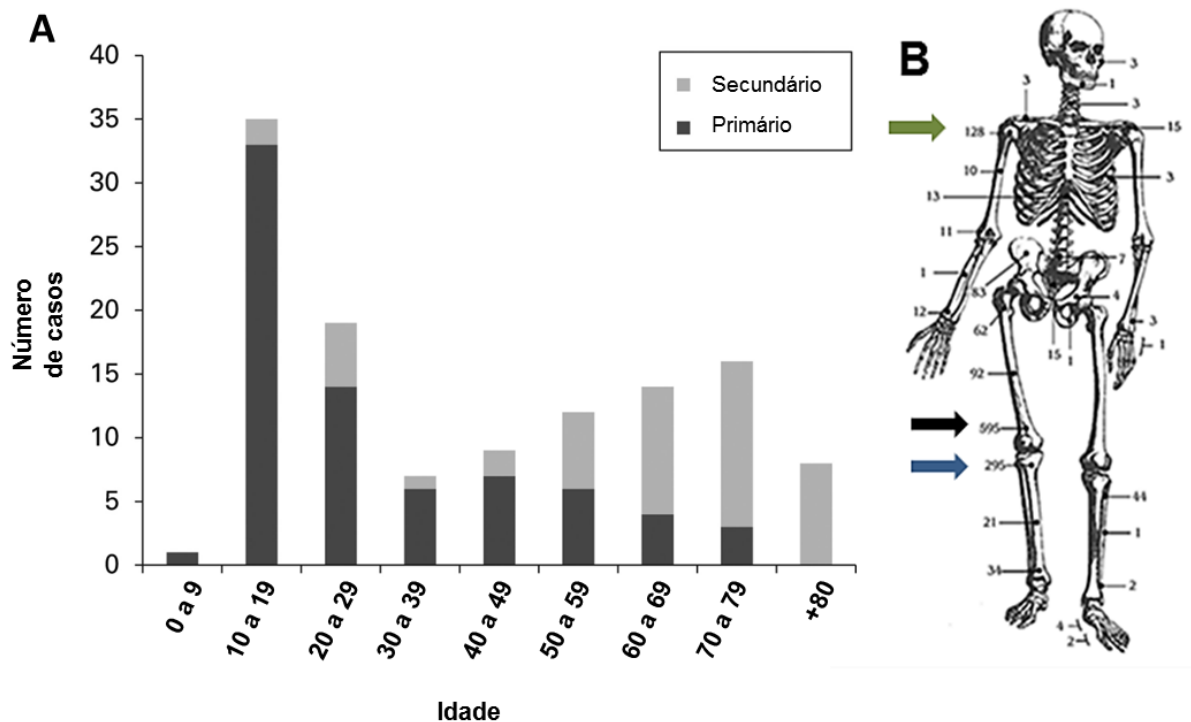


Figura 1. Incidência e localização do osteossarcoma. (A) Gráfico representando número de casos de osteossarcoma primário e secundário de acordo com a idade, evidenciando maior ocorrência de osteossarcoma primário na segunda década de vida e de osteossarcoma secundário a partir da sexta década. O estudo foi realizado no Reino Unido, utilizando dados de 121 pacientes portadores de osteossarcoma tratados no *Royal Orthopaedic Hospital* entre 1983 e 2014. (B) Ilustração dos locais anatômicos mais acometidos pelo osteossarcoma, sendo em primeiro lugar a extremidade distal do fêmur (seta preta), proximal da tíbia (seta azul) e proximal do úmero (seta verde). Imagem adaptada de Parry *et al.*, 2016.

Histologicamente, o osteossarcoma é caracterizado pela presença de células neoplásicas pleomórficas que produzem matriz osteóide (**Figura 2**) (KLEIN e SIEGAL, 2006). Os osteossarcomas são classificados em clássico central, que são de alto grau, onde a conduta terapêutica inclui o tratamento quimioterápico; ou de superfície, que são de baixo grau, onde geralmente a remoção do tumor é adotada como tratamento. O osteossarcoma clássico central (ou convencional) é subdividido de acordo com o tipo de tecido predominante, podendo ser: osteoblástico, que representa 50% dos casos; fibroblástico e condroblástico, que representam igualmente 25% dos casos. O osteossarcoma de superfície é subdividido em parosteal (ou justacortical), periosteal (ou condroblástico justacortical) e de superfície de baixo grau. Os outros tipos de osteossarcoma com menor ocorrência são o

telangiectásico, de pequenas células, central de baixo grau e de superfície de alto grau (SCHAJOWICZ, 2000; FLETCHER *et al.*, 2002; KLEIN e SIEGAL, 2006; FLETCHER, 2013; LIN e PATEL, 2013; KUNDU, 2014). O tratamento dos osteossarcomas de alto grau consiste em quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante), ressecção cirúrgica e quimioterapia pós-operatória (adjuvante) (FLETCHER, 2013).

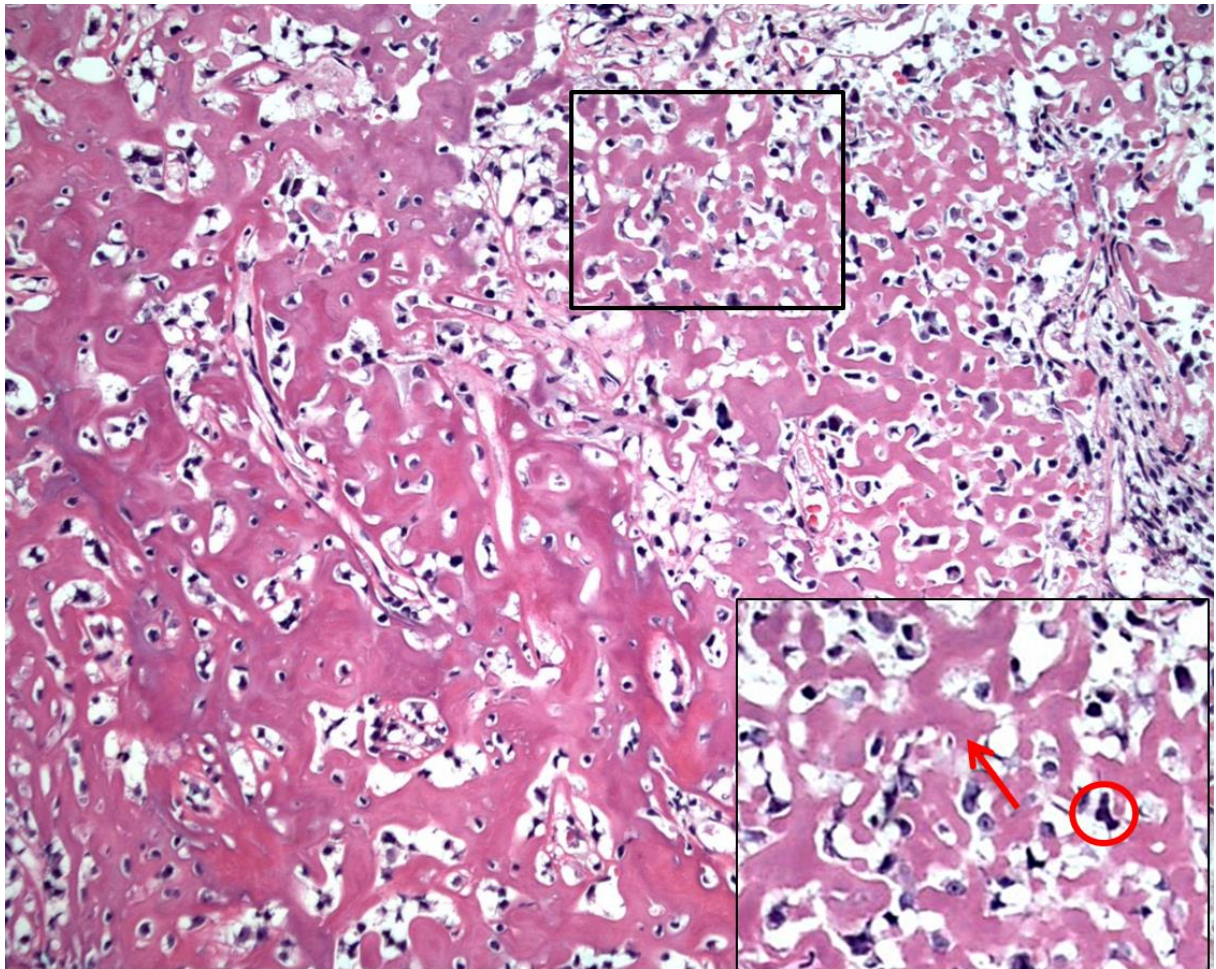


Figura 2. Histologia do osteossarcoma clássico central osteoblástico. O osteossarcoma clássico central, subtipo osteoblástico, caracterizado pela proliferação de osteoblastos neoplásicos com núcleos pleomórficos, hipercromáticos (círculo) em associação com a deposição de matriz osteoide imatura (seta) pelas células neoplásicas. Imagem adaptada: Arquivo pessoal de Valerie Fitzhugh, MD .

O primeiro estudo relacionado com a resposta ao tratamento do osteossarcoma foi realizado em 1879 por Samuel Gross com 165 pacientes. Gross defendia a amputação como forma de tratamento, com taxa de sobrevida de 30% para pacientes sem metástase e de 5 a 10% para aqueles com metástase na época do diagnóstico. Quando era realizada apenas a ressecção cirúrgica da lesão, a doença progredia com recidiva, metástase e óbito. Apesar da agressividade da cirurgia, a amputação foi considerada como “padrão ouro” de tratamento nas décadas seguintes (JAFPE, 2014).

A busca por agentes quimioterápicos que possam auxiliar no tratamento do osteossarcoma tem sido alvo de diversos estudos ao longo dos últimos anos (EDMONSON *et al.*, 1984; LINK *et al.*, 1986; BACCI *et al.*, 2006; FERRARI e SERRA, 2015; ISAKOFF *et al.*, 2015). Até a década de 1960, os resultados aos diversos tratamentos não era satisfatório, o que levou a rotular o osteossarcoma como um tumor quimiorresistente. Em meados dos anos 70, foi adotado o protocolo de tratamento designado “Conpadri”, que consistia em um combinado de agentes quimioterápicos, dentre eles a doxorrubicina e o metotrexato em altas doses. Posteriormente, outros fármacos como a cisplatina, oxazafosforina, ifosfamida e ciclofosfamida foram adicionados ao protocolo original (revisado de JAFPE, 2014).

Atualmente, a taxa de sobrevida em cinco anos para pacientes com a doença localizada é de 60 a 70% quando a quimioterapia é associada à ressecção cirúrgica (OTTAVIANI e JAFPE, 2009). Já para os pacientes que desenvolvem metástase, a taxa de sobrevida em cinco anos reportada na Europa é de 28%, (BIELACK *et al.*, 2009) sendo que cerca de 16% dos pacientes apresentam metástase na época do diagnóstico (WHELAN *et al.*, 2015). Fatores como idade avançada (60 anos ou mais), localização no esqueleto axial, tamanho do tumor e estado socioeconômico são fatores associados à detecção tardia de metástase (MILLER *et al.*, 2013).

No Brasil a sobrevida de pacientes com osteossarcoma é menor do que nos países desenvolvidos da Europa. Petrilli e colaboradores (2006) demonstraram em estudo com 225 pacientes que a taxa de sobrevida em cinco anos de pacientes com a doença localizada foi de 60,5% e de pacientes com metástase foi de 12,2%.

O baixo índice de sobrevida de pacientes que desenvolvem metástase estimulam a busca para uma melhor compreensão da formação e da progressão da doença e pelo aperfeiçoamento das modalidades terapêuticas disponíveis. Estudos apontam que algumas vias de sinalização celular, bem como citocinas, quimiocinas e seus receptores são fatores relacionados com o processo de formação de metástase e até mesmo com a quimiorresistência de uma gama de tumores malignos (DREESEN e BRIVANLOU, 2007; CHEN *et al.*, 2012; ESQUIVEL-VELÁZQUEZ *et al.*, 2015). Especificamente, a quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 são apontados como participantes da progressão, formação de metástase, diminuição da taxa de sobrevida e resistência ao tratamento nas neoplasias da mama, pâncreas, pulmão, próstata, melanoma e osteossarcoma (MULLER *et al.*, 2001; HARTMANN *et al.*, 2005; LIANG *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2010; DOMANSKA *et al.*, 2012; NAMLOS *et al.*, 2012).

1.2 Quimiocinas e câncer

As quimiocinas são pequenas proteínas constituídas de 70 a 130 aminoácidos e divididas em quatro subfamílias de acordo com a estrutura primária de seus aminoácidos: C, CC, CXC, CX3CR. Essas proteínas ativam os receptores acoplados à proteína G e induzem a migração celular através de um gradiente de concentração (FERNANDEZ e LOLIS, 2002; LAU *et al.*, 2004).

As quimiocinas são divididas quanto à função em quimiocinas inflamatórias, sintetizadas durante o processo inflamatório, e quimiocinas homeostáticas, que são expressas constitutivamente em tecidos e células (LAU et al., 2004; ZLOTNIK et al., 2006). O papel das quimiocinas inflamatórias é induzir a migração de leucócitos para o local da lesão e ativar as células do sistema imune para montar uma resposta e iniciar o processo de reparo (ROSSI e ZLOTNIK, 2000). As quimiocinas homeostáticas possuem diversas funções, atuando principalmente na organogênese linfóide, mas também tem papel na migração de células mesenquimais (ROSSI e ZLOTNIK, 2000; ZLOTNIK *et al.*, 2006; ZLOTNIK *et al.*, 2011).

Estudos tem evidenciado o papel das quimiocinas em diferentes etapas da progressão tumoral como, por exemplo, na coordenação da interação célula-célula, na migração e na quimiorresistência. Esses estudos mostram que o microambiente tumoral mimetiza a resposta inflamatória normal e recruta células do sistema imune inato e adaptativo, por meio de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e proteases. No entanto, o ambiente tumoral mantém um estado inflamatório crônico e promove/induz o desenvolvimento de uma rede vascular para sua manutenção (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; COUSSENS e WERB, 2002).

As células não tumorais presentes no microambiente do tumor, como fibroblastos associados ao câncer (CAF, *cancer associated fibroblast*) e os macrófagos associados ao tumor (TAMs, *tumor associated macrophage*), também produzem quimiocinas que auxiliam no crescimento tumoral, na angiogênese e na metástase (BALKWILL 2004; SARVAIYA *et al.*, 2013; CHOW e LUSTER, 2014).

Além da secreção de quimiocinas, as células tumorais também expressam seus receptores. Estudos mostram que aumento da expressão de receptores de quimiocinas induz a proliferação das células tumorais. Um exemplo é o CXCR4, que normalmente não é

encontrado em células epiteliais do tecido mamário, porém é altamente expresso em células de câncer de mama (LUKER e LUKER, 2006; MISHRA et al., 2011; SARVAIYA et al., 2013).

1.2.1 Eixo CXCR4/CXCL12 na progressão tumoral

O CXCR4 é um receptor do tipo sete voltas na membrana acoplado à proteína G. A interação de CXCR4 e seu ligante CXCL12, também conhecido como fator derivado do estroma da medula óssea (SDF-1, do inglês *stromal derived factor 1*) desencadeia a sinalização através de PI3K/Akt, PLC/IP3, ERK1/2 e PKC, vias responsáveis pela proliferação celular, migração e sobrevivência. Quando CXCR4 acopla-se a proteína-G, ativa a ligação de proteínas à guanina, sendo responsável por diferentes tipos de sinalização, dependendo de sua subunidade (DOMANSKA et al., 2012; DOMANSKA et al., 2013; WÜRTH et al., 2014).

O receptor de quimiocina CXCR4 é expresso em diversos tecidos, tais como sistema nervoso central, linfonodos e intestino delgado e também por alguns tipos celulares como monócitos, linfócitos T e B, neurônios e células progenitoras hematopoiéticas (MEUCCI et al., 1998; WANG et al., 2006; SUN et al., 2010). Dentre as funções do eixo CXCL12/CXCR4, estão a angiogênese, a regulação da proteína do ciclo celular Rb1 (Retinoblastoma), garantindo a sobrevivência celular em eventos mitóticos, a migração de células precursoras neuronais e a neurogênese. Estes efeitos dependem do nível de expressão de CXCR4/CXCL12 nos tecidos, o que está em contraste com a expressão de quimiocinas inflamatórias (STUMM et al., 2003; KHAN et al., 2008; O'HAYRE et al., 2008; REAUX-LE GOAZIGO et al., 2013).

Na célula tumoral, as vias de sinalização podem ser ativadas de acordo com o estresse sofrido, como por exemplo, no processo de sobrevivência, onde as vias ERK/AKT são ativadas, levando à resistência das células a agentes quimioterápicos (SINGH *et al.*, 2010). Já as vias PLC/PKC são ativadas no processo de migração das células tumorais (DOMANSKA *et al.*, 2013), passo inicial para o desenvolvimento de metástases (VALASTYAN e WEINBEG, 2011).

A metástase consiste na formação de uma nova lesão tumoral à distância, a partir do tumor primário. É um processo de múltiplas etapas que inclui o extravasamento local de células, a sua sobrevivência na circulação e a invasão de um órgão secundário, onde ocorre a proliferação e o estabelecimento do tumor secundário (NGUYEN *et al.*, 2009). Desde o início de 1900 sabe-se que as células tumorais tem propensão para estabelecer metástase em órgãos específicos, o que indica que este processo não é aleatório e que envolveria a participação de quimiocinas e de seus receptores (SARVAIYA *et al.*, 2013). As quimiocinas são capazes de promover a migração de células normais e tumorais através de mecanismos que envolvem alterações na estrutura e na dinâmica do citoesqueleto (O'HAYRE *et al.*, 2008).

A primeira evidência da participação do eixo CXCR4/CXCL12 na migração de células tumorais foi relatada em um estudo realizado em câncer de mama por Muller e colaboradores em 2001. Os autores verificaram que as células tumorais expressavam mais CXCR4 do que as células normais e macerados de tecidos com alta expressão de CXCL12 eram capazes de induzir resposta migratória nessas células. O resultados do estudo também mostraram que o bloqueio de CXCL12 *in vitro* e de CXCR4, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, reduzia a resposta migratória das células tumorais de mama (MULLER *et al.*, 2001).

Estudos apontam o eixo CXCR4/CXCL12 como participante fundamental no processo de formação de metástase, onde o CXCR4, localizado na superfície da célula tumoral, é

atraído pelo CXCL12, abundante em diversos tecidos. Essa quimioatração provoca uma reação de ganho de motilidade da célula tumoral que, por sua vez, atinge a corrente sanguínea e migra para colonizar um novo sítio anatômico (**Figura 3**) (PERISSINOTTO *et al.*, 2005; O'HAYRE *et al.*, 2008; NEKLYUDOVA *et al.*, 2016).

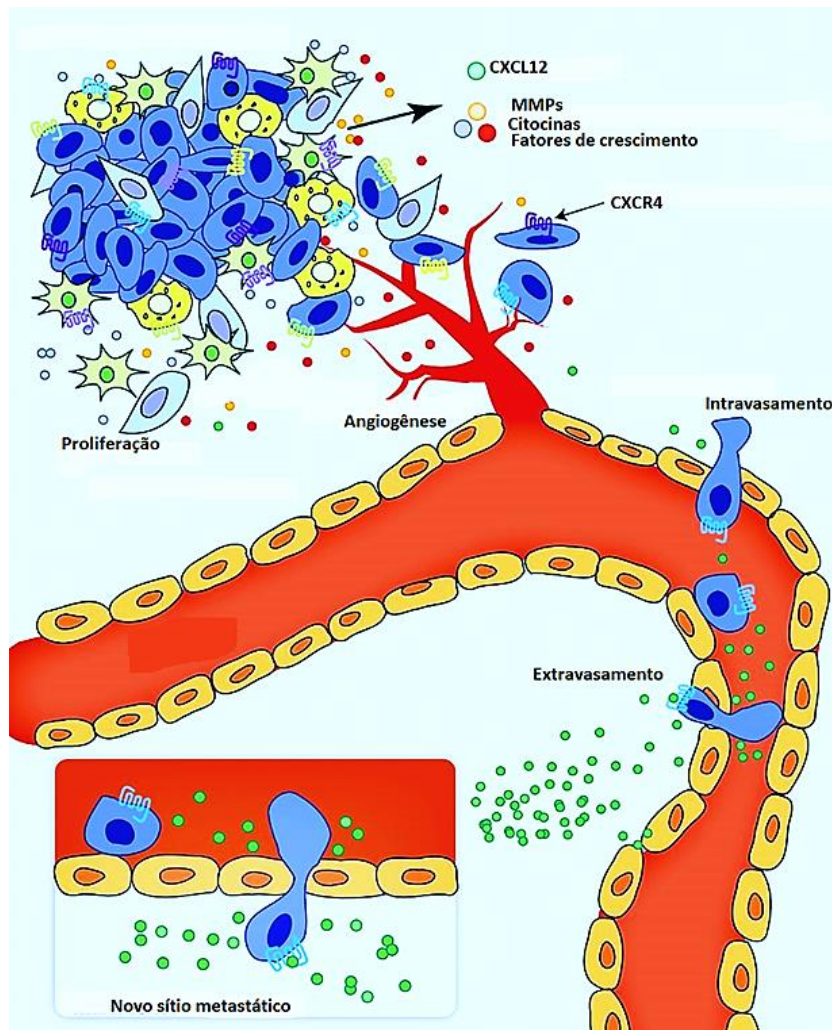


Figura 3. Representação do papel de CXCR4/CXCL12 no processo de formação de metástase. As células tumorais (azul) proliferam no sítio primário; com o estímulo de citocinas, metaloproteinases (MMP) e fatores de crescimento, as células tumorais, que expressam CXCR4 em sua superfície, destacam-se do tumor primário e, atraídas quimiotaticamente pelo CXCL12, intravasam na corrente sanguínea, sobrevivem à resposta imunológica, extravasam e colonizam um novo sítio metastático, cujo tecido alvo é rico em CXCL12. Imagem adaptada: O'Hayre *et al.* 2008.

O eixo CXCR4/CXCL12 promove o desenvolvimento, a invasão e a metástase do câncer de pâncreas e contribui para o prognóstico desfavorável dos pacientes através da alteração do microambiente tumoral e da ativação de vias de sinalização celular relacionadas à migração e proliferação (SLEIGHTHOLM *et al.*, 2017). O CXCR4 também está associado com a regulação da proliferação celular e de mecanismos de invasão em células de câncer de pulmão (DAI *et al.*, 2013).

A expressão de CXCR4 no tecido tumoral foi inversamente correlacionada com menores índices de sobrevida livre de evento e sobrevida global em estudos com neoplasias, como câncer de ovário (LI *et al.*, 2014), carcinoma hepatocelular (NEVE *et al.*, 2015), leucemia mielóide aguda (BAE *et al.*, 2015), câncer de mama, colorretal, esôfago, pulmão, fígado e próstata (ZHAO *et al.*, 2015).

1.2.2 CXCR4/CXCL12 e quimiorresistência

O eixo CXCR4/CXCL12 também já foi associado à quimiorresistência em diferentes tipos de tumores (HARTMANN *et al.*, 2005; ZENG *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2010; HECKMANN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2017), porém, os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente elucidados e variam dependendo do tipo celular.

A cisplatina é um dos quimioterápicos utilizados no tratamento do osteossarcoma (HARRISON *et al.*, 2018). No câncer de pulmão, o CXCR4 medeia a quimioresistência à cisplatina via ativação do gene CYP1B1 que codifica a enzima citocromo P450 1B1, enzima essencial na catalisação da biotransformação oxidativa de drogas (XIE *et al.*, 2017). Em outro estudo, Hartmann e colaboradores (2005) mostraram que a ativação da integrina induzida por CXCL12 resultou em maior adesão de células de câncer de pulmão de pequenas células

(CPPC) à fibronectina e ao colágeno, mediada pelas integrinas 2α , 4α , 5α e 1β , juntamente com a ativação do CXCR4. Essa adesão foi bloqueada ao inibir CXCR4. Os autores observaram também que o co-cultivo de células mesenquimais, que secretam CXCL12, com células CPPC protegeu as células CPPC da apoptose induzida por quimioterapia e o tratamento com antagonista de CXCR4 bloqueou essa proteção.

Outro estudo mostrou que o CXCR4 induz quimiorresistência por diminuição da expressão do microRNAs (miRNAs) let-7a. A análise por *microarray* da linhagem celular de leucemia mielóide aguda (LMA) revelou que o miRNA let-7a, um miRNA associado ao desenvolvimento de tumores agressivos, está inversamente relacionado à expressão do eixo CXCR4/CXCL12. O aumento da expressão de let-7a também está associado à diminuição da expressão do oncogene c-Myc e da proteína anti-apoptótica BCL-XL e com maior quimiossensibilidade. Em células de 50 pacientes portadores de LMA, a expressão elevada de CXCR4 foi associada a níveis baixos de expressão de let-7a. Além disso, camundongos inoculados com as células primárias com maior expressão de let-7a apresentaram maior sensibilidade ao composto citarabina, resultando em maior sobrevida (CHEN *et al.*, 2013). Da mesma forma, na leucemia promielocítica aguda, o tratamento de camundongos leucêmicos com quimioterapia associada ao antagonista de CXCR4 resultou em diminuição da carga tumoral e maior sobrevida global em comparação com camundongos tratados somente com quimioterápico (NERVI *et al.*, 2009).

Xie e colaboradores (2017) avaliaram a expressão de CXCR4 no tecido tumoral de câncer de pulmão em 64 indivíduos e observaram maior expressão de CXCR4 em pacientes com resistência ao tratamento com cisplatina. *In vitro*, o tratamento da linhagem celular A549 com cisplatina aumentou a expressão gênica de CXCR4 e a inibição de CXCR4 aumentou a sensibilidade das células ao tratamento com o quimioterápico. No câncer de ovário, o

tratamento com cisplatina também aumenta significativamente a expressão de CXCR4, resultando em maior proliferação celular, levantando a hipótese de que essas células, quando em contato com o agente quimioterápico, passam a expressar mais CXCR4 como mecanismo de defesa, que por sua vez leva à ativação de vias relacionadas a sobrevivência da célula, tornando-se mais resistentes (CHEN *et al.*, 2016).

Um conjunto de estudos publicados recentemente mostrou que o bloqueio do eixo CXCR4/CXCL12 tem potencial para ser aplicado no tratamento do carcinoma de ovário (GIL *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2017; MAO *et al.*, 2017). O silenciamento do CXCR4 em uma linhagem celular de câncer de ovário reduziu a proliferação celular através da parada do ciclo celular (G1/S), aumentou a apoptose e promoveu maior sensibilidade aos agentes quimioterápicos (LI *et al.*, 2014).

A inibição do CXCR4 com AMD3100, um antagonista de CXCR4, tornou as células de câncer de próstata mais sensíveis ao tratamento com docitaxel, um quimioterápico usado no tratamento desse tumor. Neste estudo, os autores demonstraram maior expressão de CXCR4 nas metástases ósseas do que no tecido tumoral primário ou em linfonodos metastáticos. *In vivo*, o tratamento dos camundongos com docitaxel associado ao AMD3100 reduziu o volume do tumor primário e diminuiu a formação de metástase em comparação ao tratamento apenas com docitaxel (DOMANSKA *et al.*, 2012).

Singh e colaboradores (2010) mostraram que, quando as células de câncer de pâncreas são expostas ao agente quimioterápico, o CXCR4, presente na superfície celular, se acopla à proteína G, ativando as vias ERK/AKT, levando ao aumento dos fatores de transcrição Nf-KB e β -catenina, que por sua vez elevam a transcrição de Bcl2, um fator anti-apoptótico, promovendo a quimiorresistência (**Figura 4**). Li e colaboradores (2016) também mostraram

que o eixo CXCR4/CXCL12 estimula a proliferação celular e quimiorresistência através da ativação de NF- κ B e Bcl-Xl.

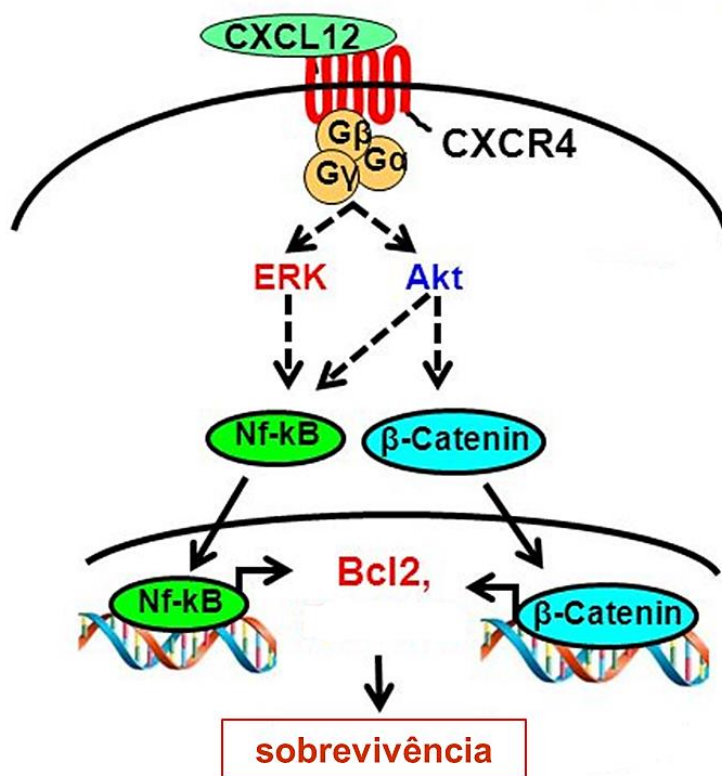


Figura 4. Via de sinalização do CXCR4 na sobrevivência da célula tumoral. No processo de quimiorresistência, quando o CXCR4 se acopla à proteína G, as vias ERK/AKT são ativadas, levando ao aumento de NF- κ B e β -catenina, que elevam a transcrição de Bcl2, promovendo a resistência da célula à ação do quimioterápico. Imagem adaptada: SINGH *et al.*, 2010.

Um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2015) mostrou que as células pancreáticas estreladas (PSCs) expressam CXCL12, enquanto CXCR4 é expresso pelas células do câncer de pâncreas (PCCs) e que o tratamento das PCCs com meio condicionado de PSCs torna as PCC mais resistentes e inibe a citotoxicidade e a apoptose induzidas pelo quimioterápico gencitabina. Além disso, a inibição de CXCL12 nas PSCs bloqueia a apoptose induzida por gencitabina e aumenta a fosforilação de FAK, ERK1/2, AKT e p38. O estudo concluiu que as PSCs promovem a resistência das PCCs à gencitabina e esse efeito é mediado

pela sinalização parácrina CXCL12/CXCR4, que induz a ativação das vias de sinalização intracelular FAK-AKT e ERK1/2, podendo, portanto, ser uma estratégia para o tratamento deste tipo de tumor.

1.2.3 CXCR4 e CXCL12 no osteossarcoma

O papel do CXCR4 e de seu ligante também tem sido bastante investigado no osteossarcoma (MIURA *et al.*, 2005; PERISSINOTTO, E. *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2011; BAUMHOER *et al.*, 2012; BRENNECKE *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2014; GUAN *et al.*, 2015; LIAO *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015a; LU *et al.*, 2015b; FONTANELLA *et al.*, 2016; NEKLYUDOVA *et al.*, 2016). Laverdiere e colaboradores (2005) avaliaram , através de PCR quantitativo, os receptores de quimiocinas CXCR4, CCR7 e CCR10 em amostras do tumor de 47 pacientes portadores de osteossarcoma de alto grau. O CXCR4 foi altamente expresso em 63% das amostras e se correlacionou com a redução da sobrevida global e com a presença de metástases na época do diagnóstico. Namlos e colaboradores (2012) observaram um aumento significativo da expressão gênica de CXCR4 em 23 amostras de osteossarcoma primário e em tecidos metastáticos. Recentemente, um estudo mostrou maior expressão gênica de CXCR4 no osteossarcoma do que no tecido adjacente ao tumor e que o nível de expressão desse receptor está associado à metástase e com a sobrevida do paciente (LU *et al.*, 2015).

A expressão de CXCR4 nas células de osteossarcoma também pode ser modulada pela expressão e pela secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e está relacionada ao estadiamento clínico do paciente e à progressão metastática (ODA *et al.*, 2006). Um estudo avaliou, por imunohistoquímica,

amostras tumorais de 56 pacientes com osteossarcoma e revelou que a expressão de CXCR4 e VEGF está relacionada à presença de metástases e à menor sobrevida. Em dois anos, a taxa de metástase de pacientes com tumores VEGF e CXCR4 positivos foi de 66,7% e 71,4%, respectivamente. Já em pacientes com tumores VEGF e CXCR4 negativos, a taxa de metástase foi 35,0% e 45,7%, respectivamente (LIN *et al.*, 2011). Esses dados sugerem que o CXCR4 e o VEGF são preditores do potencial metastático, sendo relevantes no desfecho da doença e figurando como possíveis alvos terapêuticos no osteossarcoma. A co-expressão de CXCR4 e metaloproteinase 9 (MMP9) também está correlacionada no osteossarcoma com o desenvolvimento de metástase pulmonar e menor taxa de sobrevida global (REN *et al.*, 2015).

A expressão de receptores de quimiocinas é regulada por processos transcricionais e pós-transcricionais através da estabilidade do RNA e de diversos fatores como proteínas mutantes, o microambiente tumoral ou sinalização alterada na própria célula tumoral (BALKWILL, 2004; SARVAIYA *et al.*, 2013). Condições hipóxicas e ambiente rico em citocinas como interleucina 2 (IL-2), podem alterar a transcrição dos receptores de quimiocinas (LOETSCHER *et al.*, 1996; SHARMA *et al.*, 2012). Um exemplo dessa modulação é a indução da expressão de CXCR4 em células tumorais sob condições hipóxicas. A hipóxia ocorre quando o tumor atinge um tamanho que compromete o suprimento de sangue e oxigenação adequados. Os níveis baixos de oxigênio atuam como um importante regulador na expressão de CXCR4 através da expressão de HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) e o circuito hipóxia-HIF-1-CXCR4 tem participação em vários mecanismos fisiopatológicos, que variam desde a inflamação até a angiogênese tumoral e a metástase (LOETSCHER *et al.*, 1996; BACHELDER *et al.*, 2002; SCHIOPPA *et al.*, 2003).

Um estudo realizado recentemente por Yu e colaboradores (2016) avaliou a expressão de CXCL12 e VEGF em 54 amostras de osteossarcoma com o objetivo de determinar a

associação dos níveis de expressão dessas moléculas com o prognóstico do paciente. Os resultados mostraram que cerca de 40% das amostras apresentaram alta expressão de CXCL12 e VEGF, que se associou à classificação histológica, à presença de metástase e ao estadiamento de *Enneking* (avaliação do paciente de acordo com o grau do tumor, extensão do tumor primário e presença de metástase). O estudo mostrou também associação entre a maior expressão de CXCL12 e VEGF com a menor taxa de sobrevida global e apontou a expressão de CXCL12 como fator prognóstico no Osteossarcoma (YU *et al.*, 2016).

A participação do eixo CXCR4/CXCL12 no processo migratório de células de osteossarcoma através da ativação de AKT e β -catenina foi evidenciada por Lu e colaboradores (2015). Neste estudo, os autores avaliaram, por imunohistoquímica, o tecido tumoral de 21 pacientes e revelaram que a expressão de CXCR4 e β -catenina é maior no tecido tumoral quando comparado ao tecido adjacente não tumoral. *In vitro*, as células de osteossarcoma (linhagem F5M2) apresentaram maior potencial migratório em resposta ao CXCL12 e houve bloqueio da migração quando realizada a inibição específica de CXCR4 com AMD3100. A incubação com CXCL12 juntamente com AMD3100 promoveu migração de β -catenina do núcleo para a superfície celular. Adicionalmente, sob ação dos inibidores de Wnt/ β -catenina, foi possível observar a diminuição da migração das células F5M2, mesmo tratadas com CXCL12, e o aumento dos níveis de AKT e β -catenina fosforilada após a incubação com CXCL12 e ainda, que essa resposta foi dose-dependente (LU *et al.*, 2015b).

Para investigar a relevância biológica do eixo CXCR4/CXCL12 no osteossarcoma, Neklyudova e colaboradores (2016) utilizaram uma linhagem celular de osteossarcoma (143-B) transfectadas com P2G (um antagonista específico de CXCL12), com CXCL12 e com CXCL12-KDEL, que retém CXCR4 no interior da célula. Foi utilizado um modelo xenogênico intravenoso de metástase em camundongos para avaliar o potencial tumorigênico

e metastático das linhagens. As células que produziram CXCL12 constitutivamente causaram metástase pulmonar, sem afetar o crescimento do tumor primário. Porém, quando o eixo foi bloqueado, as células contendo P2G ou CXCL12-KDEL aceleraram o crescimento do tumor primário, diminuíram a ocorrência de metástase pulmonar e aumentaram a expressão de CXCR4, mostrando que o CXCR4 contribui para a retenção local de células tumorais. Além disso, as metástases pulmonares nos animais de todos os grupos tinham mais células CXCR4⁺ do que o tumor primário. O estudo sugere, portanto, que a abordagem terapêutica com alvo no eixo CXCR4/CXCL12 pode ser benéfica no osteossarcoma metastático.

Apesar dos estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* mostrarem a relevância do CXCL12 e do CXCR4 para a migração celular no osteossarcoma (HUANG *et al.*, 2009; BAUMHOER *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2015b; NEKLYUDOVA *et al.*, 2016), um estudo avaliou, por imunohistoquímica, amostras de 223 pacientes e mostrou correlação positiva entre uma maior expressão de CXCL12 e menor prevalência de metástases (BAUMHOER *et al.*, 2012).

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* avaliaram o papel do eixo CXCR4/CXCL12 no osteossarcoma utilizando linhagens de células tumorais como modelo de estudo. Contudo, apesar dessas linhagens serem apontadas como alternativa eficiente no estudo de tumores, alguns problemas são associados ao cultivo celular prolongado, como a contaminação por microorganismos (principalmente micoplasma) e a instabilidade genômica e fenotípica das células depois de algumas passagens (GERAGHTY *et al.*, 2014). Além disso, no osteossarcoma existe um número baixo de linhagens de células humanas disponíveis, o que contrasta com os diversos subtipos de osteossarcoma observados na clínica. Ademais, o fato das linhagens não serem capazes de reproduzir a heterogeneidade desse tumor representa uma barreira para o conhecimento dos mecanismos de formação, progressão e quimiorresistência do osteossarcoma (RUSSINOFF *et al.*, 2011).

As diferenças genéticas entre os indivíduos podem influenciar na resposta à quimioterapia (PEREIRA *et al.*, 2009). Mirabello e colaboradores (2009) demonstraram maior incidência de osteossarcoma em negros e taxa de sobrevida global associada à etnia, sendo maior em asiáticos (MIRABELLO *et al.*, 2009). Entretanto, as linhagens celulares comerciais de osteossarcoma mais utilizadas atualmente em estudos *in vitro* e *in vivo* foram derivadas de pacientes caucasianos (LASCHI *et al.*, 2015), limitadas, portanto, a uma única etnia. Dessa forma, há a necessidade de se realizar mais estudos sobre o osteossarcoma com modelos que sejam mais representativos dos tumores dos pacientes.

Nesse contexto, as culturas primárias geradas a partir de tumores de pacientes com osteossarcoma tem figurado como uma alternativa capaz de reproduzir a variabilidade tumoral entre os pacientes e, conseqüentemente ampliar o conhecimento sobre a biologia desta doença.

São realizadas anualmente pelo Centro de Oncologia Ortopédica do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO) em torno de 20 cirurgias em pacientes com osteossarcoma. Considerando a baixa frequência deste tumor, esta casuística pode ser considerada suficientemente robusta para desenvolver estudos experimentais com células primárias. Esses estudos poderão auxiliar a caracterizar a expressão e a função do eixo CXCR4/CXCL12 em células primárias de osteossarcoma, ampliar o conhecimento sobre as vias de disseminação metastática e avaliar o seu potencial como marcador prognóstico e alvo terapêutico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Caracterizar a expressão de CXCR4 e secreção de CXCL12 em células primárias isoladas a partir de amostras tumorais de pacientes com osteossarcoma e avaliar relação do eixo com a sensibilidade das células primárias e linhagens de osteossarcoma ao tratamento *in vitro* com quimioterápicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer culturas primárias de células humanas de osteossarcoma a partir de amostras tumorais;
- Avaliar o potencial proliferativo *in vitro* das células primárias e das linhagens de osteossarcoma;
- Analisar a sensibilidade *in vitro* das células primárias e de linhagens de osteossarcoma aos quimioterápicos doxorrubicina, cisplatina e metotrexato;
- Quantificar os níveis de expressão de mRNA de CXCR4 nas células de osteossarcoma;
- Avaliar a expressão e localização de CXCR4 em células de osteossarcoma;

- Avaliar a expressão de CXCR4 na superfície das células de osteossarcoma;
- Quantificar a secreção de CXCL12 no meio de cultura de células de osteossarcoma.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (CAAE: 56018516.4.0000.5273, Anexo A). Os participantes foram esclarecidos sobre o objetivo da pesquisa que consistiu em conceder parte do material biológico resultante do procedimento cirúrgico, realizado para o tratamento da lesão tumoral. Os participantes e/ou seus responsáveis legais manifestaram sua concordância através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo B), redigido de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

3.2 Coleta de amostras

As cirurgias e as coletas de material foram realizadas pelos cirurgiões do Centro de Oncologia Ortopédica do INTO. As amostras teciduais foram coletadas de pacientes com suspeita clínica de osteossarcoma durante a realização da biópsia para confirmação diagnóstica ou no procedimento cirúrgico para ressecção da lesão primária (**Figura 5**). O diagnóstico de osteossarcoma foi confirmado por investigação radiográfica e exame histopatológico, realizados no Serviço de Imagem e no Laboratório de Anatomia Patológica do INTO.

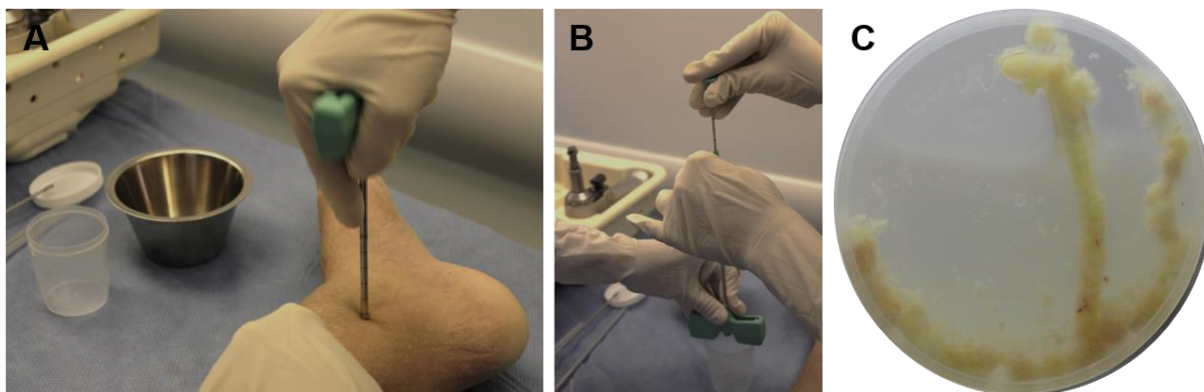


Figura 5. Procedimento de coleta das amostras de tecido tumoral. As amostras foram coletadas por cirurgiões do Centro de Oncologia Ortopédica do INTO durante o procedimento de biópsia ou durante a cirurgia de remissão do tumor. (A) Para a obtenção da amostra, uma agulha de jamshidi foi inserida no tecido tumoral; (B) a amostra obtida foi transferida para um frasco estéril ; (C) imagem da amostra tumoral coletada.

3.3 Isolamento e manutenção de células primárias de osteossarcoma

As amostras de tumor primário coletadas no centro cirúrgico do INTO foram armazenadas em frascos estéreis e imediatamente transportadas para o laboratório do Centro de Tecnologia Celular (CTC/INTO). Em seguida, foram lavadas com solução salina tamponada (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) com glicose a 0,6% para a retirada dos coágulos sanguíneos. A seguir, as amostras foram fragmentadas mecanicamente e digeridas enzimaticamente com collagenase tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 2,5% em de meio de cultura DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* com nutriente F-12, Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, EUA), por 3 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o tempo de incubação com a collagenase II, o material foi fragmentado novamente e a suspensão resultante foi centrifugada a 413 rcf por 5 minutos. A massa celular foi tratada com tampão de lise de hemácias (ACK, *Ammonium-Chloride-Potassium Lysing Buffer*, Gibco) e incubada à temperatura ambiente (TA) por 2 a 3 minutos, lavada com PBS e novamente centrifugada por 5 minutos a 413 rcf. Por fim, a massa celular foi ressuspensa em DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco),

antibiótico e antifúngico (penicilina G sódica 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml e anfotericina 0,25 µg/ml, Sigma-Aldrich) (meio completo) e filtrada em membrana de nylon com poro de 70 µm (*Cell strainer*, BD, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, EUA). A quantidade de $3-5 \times 10^5$ células por frasco foi semeada em frascos de cultura de 25 cm³ (Biogen, Cambridge, MA, EUA) em meio DMEM-F12 completo mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ até atingir 70-80% de confluência. A troca de meio foi realizada duas vezes por semana. Para realização da passagem, as células foram lavadas com PBS e incubadas com tripsina (Sigma-Aldrich) a 0,25% e EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*, Sigma-Aldrich) a 0,04% por 5 minutos a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, foi acrescentado meio de cultivo completo para a inativação da tripsina e todo o conteúdo foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 413 rcf por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e a massa celular foi ressuspensa em DMEM-F12 completo, as células foram contadas e redistribuídas em frascos de cultura de 25 cm³ ou 75 cm³, contendo $3-5 \times 10^5$ ou $5 \times 10^5-10^6$, respectivamente. As células foram criopreservadas a -196°C em solução de congelamento composto 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). As passagens utilizadas em cada experimento estão indicadas no apêndice A.

3.4 Linhagens celulares

As linhagens celulares de osteossarcoma humano, SAOS-2 e MG-63, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio DMEM-F12 completo. A linhagem de adenocarcinoma cervical HeLa foi cedida pelo Laboratório de Biologia Celular Aplicada a Medicina da UFRJ. As passagens e a criopreservação das linhagens foram realizadas da mesma forma que as células primárias, como descrito no item anterior. As características demográficas dos dois pacientes que deram origem as duas linhagens de osteossarcoma estão descritas na **Tabela 1.**

Tabela 1. Dados demográficos dos pacientes (linhagens).

	MG-63	SAOS-2
Idade	14	11
Sexo	Masculino	Feminino
Local da lesão	Fêmur esquerdo	-
Tipo histológico	Osteossarcoma osteoblástico	Osteossarcoma osteoblástico
Procedimento cirúrgico	Biópsia	-
Ano de Isolamento	1977	1973
Referência	HEREMANS <i>et al.</i> (1978)	FOGH e TREMPE (1975) FOGH <i>et al.</i> (1977)

(-) Informações não obtidas.

3.5 Análise do tempo de duplicação populacional

Durante a fase de expansão *in vitro*, o cálculo do tempo médio de duplicação populacional (TD) foi realizado através da fórmula: $TD = \text{Tempo em cultura} \times \log(2) / (\log(\text{número final de células}) - \log(\text{número inicial de células}))$. A concentração inicial representa o número inicial de células semeadas, a concentração final representa o número de células obtidas no final da passagem e o tempo em cultura (representado em horas) é o intervalo de tempo entre o início e o fim da expansão celular, quando a cultura atingiu aproximadamente 80% de confluência. A fórmula supracitada foi obtida no *website* Roth V. 2006 *Doubling Time Computing*, disponível em: <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

3.6 Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total foi extraído de 1×10^6 células durante a manutenção das células em cultivo, com o kit Qiagen® de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação de RNA foi realizada por espectrofotometria (Nanodrop™ 1000, Thermo Fisher). A transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 300 ng de RNA, utilizando o sistema *High Capacity* (Applied Biosystems/ Life Technologies), conforme protocolo do fabricante. A qPCR foi realizada utilizando o sistema de detecção Sybr Green Master MIX® (Thermo Fisher Scientific) no equipamento Line Gene 9660 (BIOER Technology, Hangzhou, Zhejiang, China). Para dados da expressão gênica, cada amostra foi avaliada em triplicata técnica a partir da triplicata biológica (três diferentes passagens) e o software do equipamento calculou a variação do *cycle threshold* (Ct). A fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizada para calcular a amplificação relativa do gene alvo onde $\Delta C_t = C_t$ do gene alvo *CXCR4* - C_t do gene normalizador *GAPDH* e $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ da linhagem MG-63 - ΔC_t de cada uma das células avaliadas (**Tabela 2**). A linhagem HeLa foi utilizada como controle positivo de expressão de mRNA de *CXCR4*.

Tabela 2. Sequência dos pares de *primers* para a PCR em tempo real e tamanho do produto.

Gene		Sequência (5'→3')	Tamanho do produto (pb)
GAPDH	s	CAT GAG TCC TTC CAC GAT ACC A	93
	as	AAG ATC ATC AGC AAT GCC TCC T	
CXCR4	s	ATG CAA TAG CAG GAC AGG ATG A	80
	as	TGG GTG GTT GTG TTC CAG TTT	

pb: pares de bases. S: senso; as: anti senso

3.7 Ensaio de imunofluorescência

Lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro (Perfecta, São Paulo, SP, Brasil) foram dispostas em placas de 24 poços e tratadas com 10 µg/ml de fibronectina diluída em meio de cultivo (Santa Cruz Biotechnology[®], Inc., Dallas, TX, EUA) por 30 minutos e depois lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as células primárias e as células das linhagens de osteossarcoma foram semeadas sobre as lamínulas e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂ até atingirem 70-80% de confluência. As células foram então fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 15 minutos à TA e posteriormente lavadas três vezes com PBS por 10 minutos em cada lavagem e permeabilizadas por 10 minutos com Triton X-100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 0,2% em PBS. A seguir, as células foram incubadas com tampão de bloqueio, composto por albumina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) a 5% em PBS por 1 hora à TA. Após o tempo de incubação, a solução foi removida e as células foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário anti-CXCR4 humano produzido em coelho (Santa Cruz, Clone H-118) diluído em solução de BSA a 1% em PBS na proporção de 1:50. No dia seguinte, as células foram novamente lavadas com PBS por três vezes de 10 minutos cada e incubadas por 1 hora a TA com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor[®] 546 (Invitrogen-Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, EUA) diluído em solução de BSA a 1% em PBS na proporção de 1:400. Após a incubação, as células foram novamente lavadas por três vezes de 10 minutos cada com PBS e incubadas com DAPI na concentração de 1,5µg/ml (4',6-diamidino-2-fenilindol, Santa Cruz) por 15 minutos e novamente lavadas por 3 vezes de 10 minutos com PBS. Por fim, as lamínulas foram dispostas em lâminas com solução de montagem *Fluoromount*[™] (Sigma-Aldrich). O controle negativo foi realizado com a incubação das células apenas com o anticorpo secundário. A linhagem HeLa foi

utilizada como controle positivo de expressão de CXCR4. As imagens das células foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E600, Minato-Ku, Tóquio, Japão) e a análise foi realizada através do programa ImageJ.

3.8 Citometria de fluxo

Após atingirem aproximadamente 70-80% de confluência, as células foram dissociadas com solução de tripsina recombinante (TrypLE express, Gibco) por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Ao fim da incubação, todo o conteúdo foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 413 rcf por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS (do inglês *Fluorescence-activated cell sorting*) composto por PBS com 3% de SFB. Um total de 5x10⁵ células foi incubado por 30 minutos com o anticorpo anti-CXCR4 humano conjugado com biotina (Clone 12G5, Biolegend, San Diego, CA, EUA). Após o período de incubação, as células foram lavadas com tampão de FACS, centrifugadas e incubadas com estreptavidina conjugada com ficoeritrina (SAV-PE) (Biolegend) por 30 minutos a 4°C e protegidas da luz. O controle de marcação inespecífica foi feito com a incubação de células que não receberam o anticorpo primário biotinilado com SAV-PE. Após o período de incubação com SAV-PE, as células foram lavadas com tampão de FACS, centrifugadas a 413 rcf e ressuspensas em tampão de FACS. Em seguida, as amostras foram analisadas no citômetro BD Accuri C6® (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Foram adquiridos 100.000 eventos totais por condição e a análise dos resultados foi feita no software do equipamento (BD Accuri™ C6 Plus). A linhagem HeLa foi utilizada como controle positivo de expressão de CXCR4.

3.9 Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA)

As células foram semeadas em duplicata em placa de 6 poços com meio completo e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Ao atingirem 50% de confluência, o meio foi retirado e os poços foram lavados 3 vezes com meio DMEM-F12. Em seguida foram adicionados 900µL de meio DMEM-F12 e as placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por mais 72 horas. Após o tempo determinado, o sobrenadante das células foi coletado e centrifugado a 823 rcf por 5 minutos, a 4°C e congelado a -80°C até a realização do ensaios. Para quantificação de CXCL12 foi utilizado o kit Quantikine® ELISA (DSA00, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) conforme as orientações do fabricante. Os valores de CXCL12 obtidos das células primárias e das linhagens de osteossarcoma foram normalizados pela quantidade de proteína total de seus respectivos sobrenadantes, a qual foi determinada pelo método de Bradford para quantificação de proteínas (Bio-Rad Laboratories). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.10 Ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT e cálculo de IC₅₀

O total de 5×10^3 células ressuspensas em 100 µL de meio DMEM F12 completo foram semeadas por poço em placa de 96 poços e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após atingirem a confluência de 70-80% (24 a 48 horas), o meio completo foi retirado e as células foram incubadas em DMEM-F12 sem soro contendo os fármacos hidrocloreto de doxorrubicina ou apenas o seu veículo, DMSO, nas concentrações de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 e 100 µM, por 24 horas; cloridrato de cisplatina (Sigma-Aldrich, P4394) ou apenas o seu veículo, NaCl a 0,9% (Equiplex Ind. Cmc. Produtos hospitalares, Distrito Federal, BR), nas concentrações de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 e 1000 µM por 24 horas; e metotrexato (Sigma-Aldrich, M9929) ou apenas o seu veículo, NaOH a 0,1 M (Sigma-Aldrich), nas concentrações

de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 e 1000 μM por 48 e 72 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Não foi realizada a troca do meio durante o período de incubação com os fármacos. As células utilizadas como controle foram mantidas somente em DMEM-F12 sem soro. Ao final do tempo de incubação, o meio foi removido e as células foram incubadas por 2 horas com solução de 5mg/mL de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Brometo de Difeniltetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich), diluído em meio de cultivo. Por fim, a solução de MTT foi removida, foram adicionados 50 μL de DMSO e a placa foi mantida sob agitação por 15 minutos. Em seguida, a absorbância foi mensurada no luminômetro GloMax[®] (Promega, Madison, WI, EUA) com filtro de leitura de 570 nm. O ensaio foi realizado com as amostras primárias e as linhagens de osteossarcoma em triplicata biológica (células da mesma linhagem cultivadas em momentos distintos). Os valores obtidos de cada cultura primária ou linhagem celular, mantidas nas condições supracitadas, foram normalizados pelo seu respectivo grupo controle (células incubadas com DMEM-F12 sem soro), determinando-se, assim, a viabilidade relativa. O cálculo de IC_{50} foi realizado a partir dos valores da viabilidade relativa, utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad software, La Jolla, CA, EUA).

3.11 Análise histológica

Os processamentos histológicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do INTO. Resumidamente, as amostras de tumor primário foram fixadas em solução de formalina a 10% em água destilada por 24h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (80%, 90%, 95% e 100%), clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes histológicos com 5 μm de espessura foram desparafinizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100%, 95%, 70%), lavados em água destilada e corados com hematoxilina e eosina. As imagens das

lâminas foram adquiridas em microscópio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Minato-Ku, Tóquio, Japão).

3.12 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego California EUA). Resultados de pelo menos três experimentos independentes foram comparados por One Way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni. Os dados foram representados como média $\pm$ desvio padrão ou média $\pm$ erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes

4.1.1 Células primárias

As células primárias foram isoladas de amostras tumorais de dois pacientes diagnosticados com osteossarcoma clássico central durante o procedimento cirúrgico para a ressecção da lesão (OS1) ou durante a realização da biópsia para confirmação diagnóstica (OS2). A caracterização de ambas as culturas primárias foi realizada em estudos paralelos no CTC, onde o primeiro foi publicado por Santos-Cavalcanti e colaboradores (2017) e o segundo encontra-se em andamento. As características demográficas dos dois pacientes estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Dados demográficos dos pacientes (células primárias).

	OS1	OS2
Idade	57	12
Sexo	Feminino	Feminino
Local da lesão	Calcâneo esquerdo	Extremidade distal da tíbia
Tipo histológico	Clássico central	Clássico central
Procedimento cirúrgico	Amputação	Biópsia
Metástase	Não	Não
Tempo de seguimento (meses)	6,3	5,7

4.1.2 Aspectos radiográficos e histopatológicos dos tumores que originaram as células primárias

A paciente OS1 apresentava lesão comprometendo a porção posterior do calcâneo esquerdo com extensão para partes moles (**Figura 6A**). As amostras teciduais que originaram as culturas primárias foram obtidas na peça cirúrgica proveniente de amputação transtibial. Nos cortes histológicos do tumor foram observadas células neoplásicas com aspecto vesiculoso, núcleos pleomórficos e hipercromáticos e com nucléolos evidentes. As células tumorais mostravam relação com depósitos de matriz osteóide, em áreas parcialmente mineralizadas (**Figura 6B**).

A paciente OS2 apresentava lesão lítica excêntrica na metáfise da tíbia esquerda, com destruição cortical e invasão de partes moles (**Figura 6C**). As amostras teciduais que originaram as culturas primárias foram obtidas durante a biópsia para confirmação diagnóstica de osteossarcoma. Nos cortes histológicos do tumor foram observadas células neoplásicas com núcleos volumosos, hipercromáticos e pleomórficos que infiltravam e destruíam as traves de osso esponjoso adjacentes ao tumor (**Figura 6D**). Ambos os pacientes desenvolveram osteossarcoma primário.

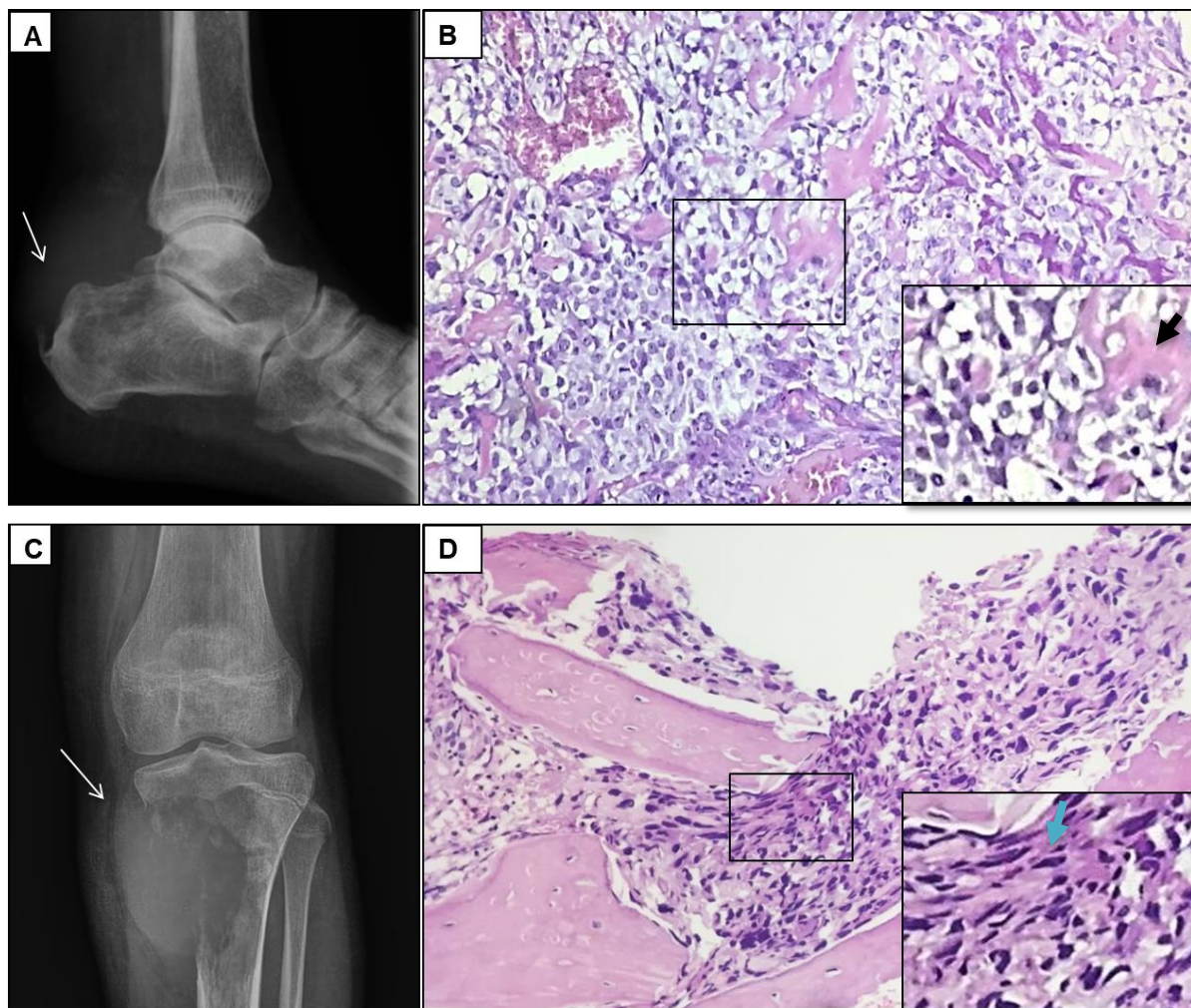


Figura 6. Aspectos radiográficos e histopatológicos dos tumores que originaram as culturas primárias. (A) Osteossarcoma clássico central em paciente de 57 anos de idade (OS1) representado por lesão erosiva acometendo calcâneo esquerdo (seta branca) e as partes moles circunjacentes. (B) No corte histológico são observadas células neoplásicas atípicas, relacionadas com a produção de matriz osteóide parcialmente mineralizada (seta preta, detalhe). (C) Osteossarcoma clássico central em paciente de 12 anos de idade (OS2) representado por lesão lítica excêntrica na metáfise proximal da tíbia esquerda (seta branca) com destruição da cortical e invasão de partes moles. (D) No corte histológico são observadas células neoplásicas com núcleos hipercromáticos, pleomórficos (seta azul, detalhe) que infiltram e destroem o osso circunjacente não tumoral. Radiografia em perfil (A) e anteroposterior (C). (B e D) Cortes histológicos corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H&E). Aumento 20X e 40X (detalhe).

4.2 Aspectos morfológicos das células primárias de osteossarcoma

As células primárias OS1 e OS2 foram cultivadas *in vitro* em monocamada. As células OS1 apresentaram morfologia fibroblastoide, núcleos grandes e ovalados, nucléolos proeminentes com algumas células exibindo projeções de membrana (lamelipódios) (**Figura**

7A-B). As células OS2 apresentaram morfologia fusiforme, núcleos grandes e ovalados, nucléolos proeminentes e foram observados inúmeros lamelipódios (**Figura 7C-D**). Esses aspectos morfológicos foram semelhantes aos observados na linhagem celular de osteossarcoma MG-63 (**Figura 7E-F**). A linhagem SAOS-2, também utilizada nesse estudo, apresentou morfologia triangular, núcleos grandes e ovalados e nucléolos proeminentes (**Figura 7G-H**).

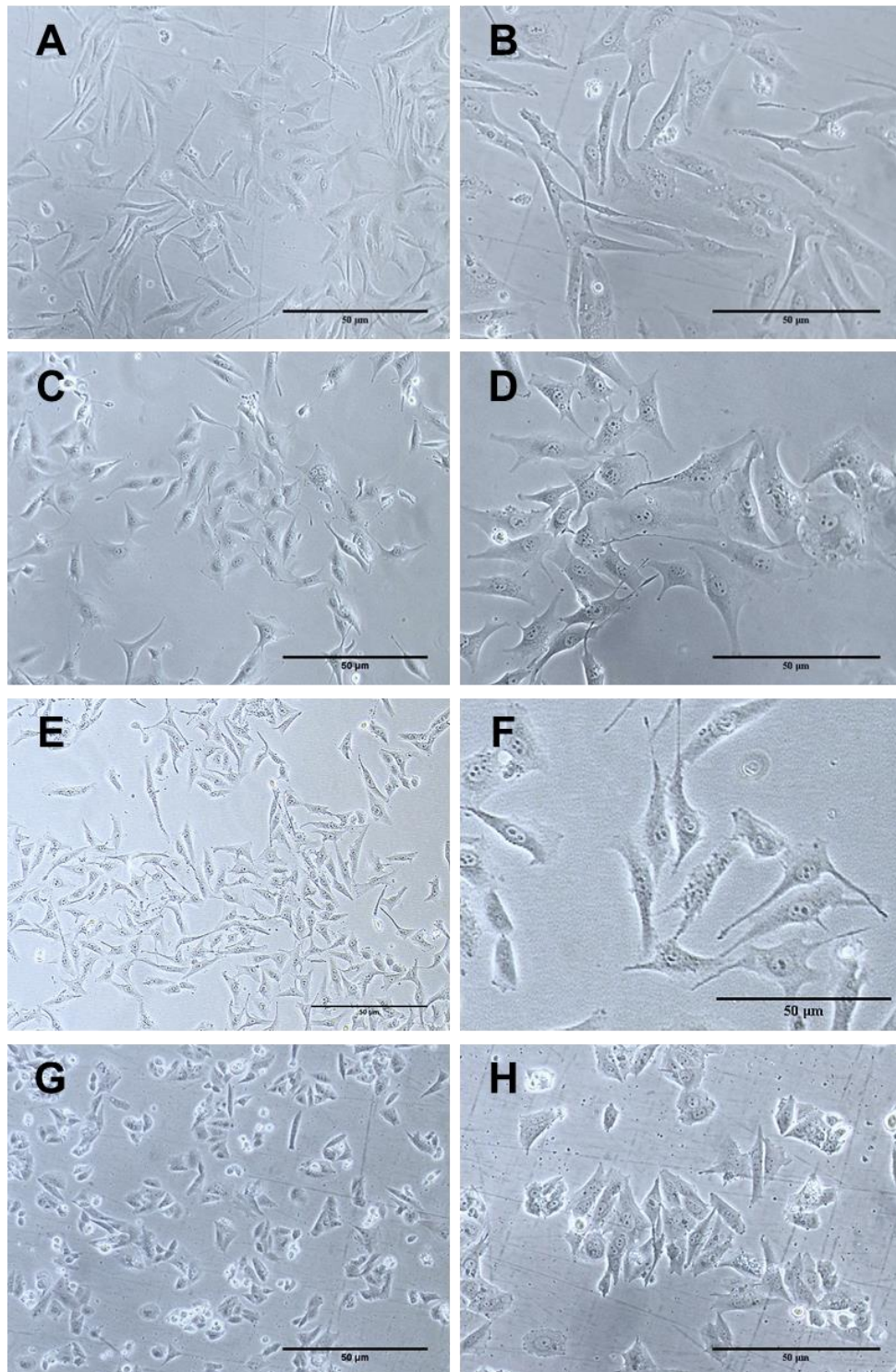


Figura 7. Aspecto morfológico das células primárias e das linhagens de osteossarcoma. (A-B) Células OS1 cultivadas em monocamada exibindo morfologia fibroblastoide/fusiforme, núcleos grandes e ovalados, nucléolos proeminentes com projeções de membrana (lamelipódios) evidentes (seta). (C-D) Células OS2 cultivadas em monocamada com morfologia fusiforme, núcleos grandes e ovalados, nucléolos proeminentes com inúmeros lamelipódios (seta). (E-G) As células provenientes das linhagens MG-63 (E-F) e SAOS-2 (G-H) expandidas em monocamada tem morfologia predominantemente triangular, núcleos grandes e ovalados e nucléolos proeminentes. Microscopia de campo claro. Barra de escala: 50 µm.

O tempo médio de duplicação populacional foi calculado para avaliar a proliferação das células primárias e das linhagens. As células OS1 e OS2 apresentaram, respectivamente, tempo médio de duplicação de 75,70 horas (75,32 a 76,10) e 29,97 horas (26,12 a 33,50). As linhagens MG-63 e SAOS-2 apresentaram tempo médio de duplicação populacional de 34,81 horas (31,82 a 37,14) e 48,92 horas (38,44 a 79,45), respectivamente. Não foram observadas alterações morfológicas das células primárias OS1 e OS2 ao longo da expansão e o tempo médio de duplicação populacional não se modificou (**Tabela 4**).

Tabela 4. Tempo médio de duplicação populacional (PD) das células primárias e das linhagens de osteossarcoma.

Células	Tempo médio de duplicação em horas (mínimo-máximo)	Passagem	Número de experimentos
OS1	75,70 (75,32 - 76,10)	2-8	3
OS2	29,97 (26,12 - 33,50)	8-17	4
MG-63	34,81 (31,82 - 37,14)	2-10*	5
SAOS-2	48,92 (38,44 - 79,45)	1-6*	6

*contagem da passagem a partir do descongelamento.

4.3 Ação dos agentes quimioterápicos sobre a viabilidade celular

Para avaliar a sensibilidade das células de osteossarcoma ao tratamento com os quimioterápicos doxorubicina (DOX), cisplatina (CIS) e metotrexato (MTX) foi realizado o ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT.

O tratamento com DOX acarretou em redução significativa da viabilidade relativa das células OS1 a partir da concentração de 0,1 μ M ($p < 0,05$ vs. veículo). As células OS2 mostraram um perfil mais resistente à ação da DOX, com redução significativa da viabilidade

relativa a partir da concentração de 100 μM ($p < 0,01$ vs. veículo). Para as linhagens MG-63 e SAOS-2, a redução significativa da viabilidade ocorreu a partir da concentração de 1 μM ($p < 0,05$ e 0,001 vs. veículo, respectivamente) (**Figura 8**).

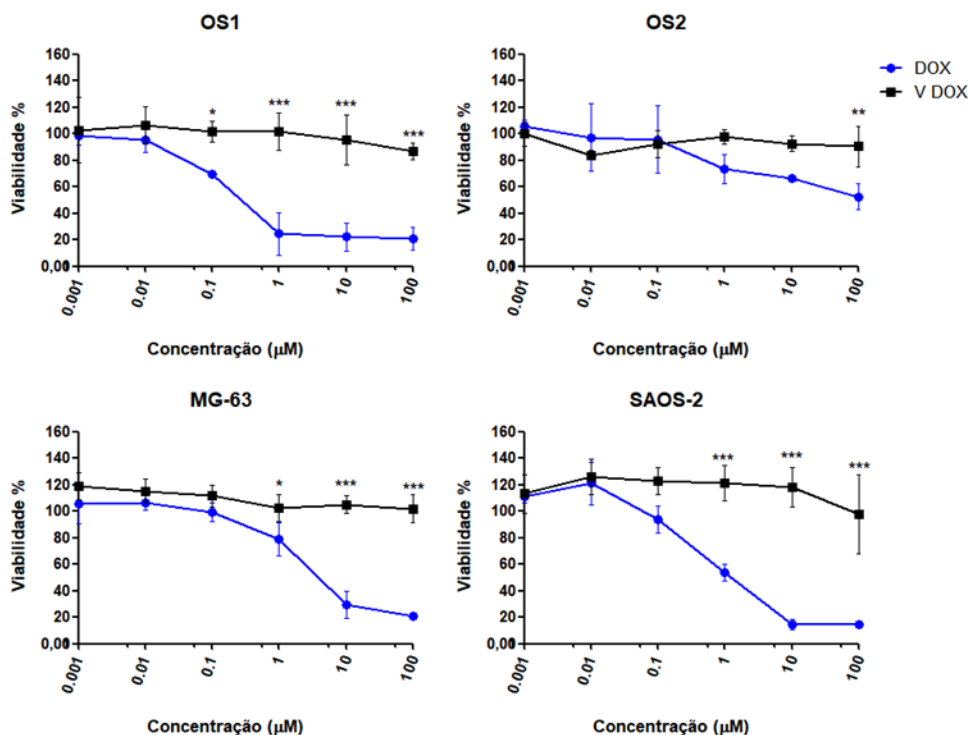


Figura 8. Ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT após tratamento com doxorubicina. As culturas primárias OS1 e OS2 as linhagens MG-63 e SAOS-2 foram tratadas por 24 horas com doxorubicina (DOX) ou com seu veículo (V DOX) nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 100 μM . Viabilidade relativa a condição controle (células cultivadas apenas com meio de cultura). Análise estatística: one-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Resultados referentes a três experimentos independentes

O tratamento com CIS resultou na redução da viabilidade relativa das células OS1 a partir da concentração de 100 μM ($p < 0,001$ vs. veículo). Para as células OS2 e para as linhagens MG-63 e SAOS-2 esse efeito ocorreu a partir de 100 μM , porém só foi significativo em relação ao veículo na concentração de 1000 μM (OS2 $p < 0,05$; MG3 e SAOS-2 $p < 0,001$) (**Figura 9**).

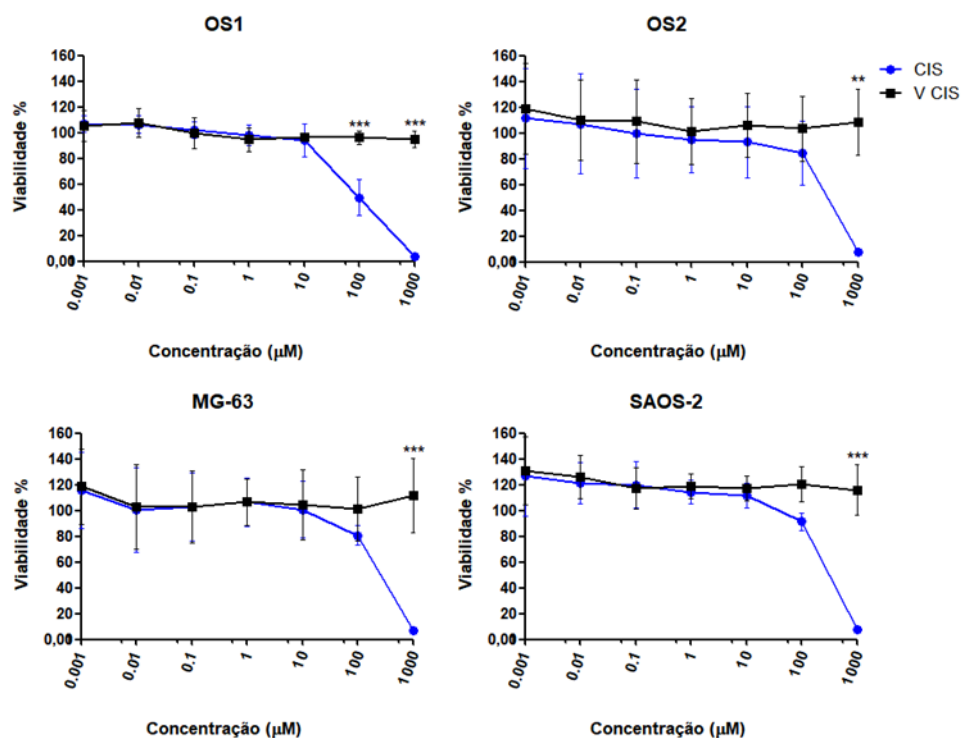


Figura 9. Ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT após tratamento com cisplatina. As culturas primárias OS1 e OS2 as linhagens MG-63 e SAOS-2 foram tratadas por 24 horas com cisplatina (CIS) ou com seu veículo (V CIS) nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 μM. Viabilidade relativa a condição controle (células cultivadas apenas com meio de cultura). Análise estatística: one-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Resultados referentes a três experimentos independentes.

O tratamento com MTX por 48 horas reduziu significativamente a viabilidade relativa das células OS2 a partir da concentração 10 μM (p<0,05 vs. veículo) e da linhagem SAOS-2 a partir da concentração de 0,1 μM (p<0,01 vs. veículo). O tratamento com MTX pelo mesmo período de tempo e nas mesmas concentrações não interferiu com a viabilidade das células primárias OS1 e da linhagem MG-63. Com a ampliação do tempo de tratamento com MTX para 72h, a redução da viabilidade relativa das células OS2 foi observada mais precocemente, a partir da concentração 1 μM (p<0,01 vs. veículo). A redução significativa da viabilidade relativa das células SAOS-2 foi mantida na mesma concentração (0,1 μM; p<0,001 vs. veículo) do tempo de 48h. Após 72h, as células OS1 e MG-63, que foram resistentes à ação

do MTX com 48h de tratamento, exibiram redução significativa da viabilidade relativa nas concentrações entre 10 e 100 μ M para as células OS1 ($p < 0,05$ vs. veículo em ambas) e nas concentrações entre 1 e 10 μ M para as células MG-63 ($p < 0,05$ vs. veículo em ambas) (**Figura 10**).

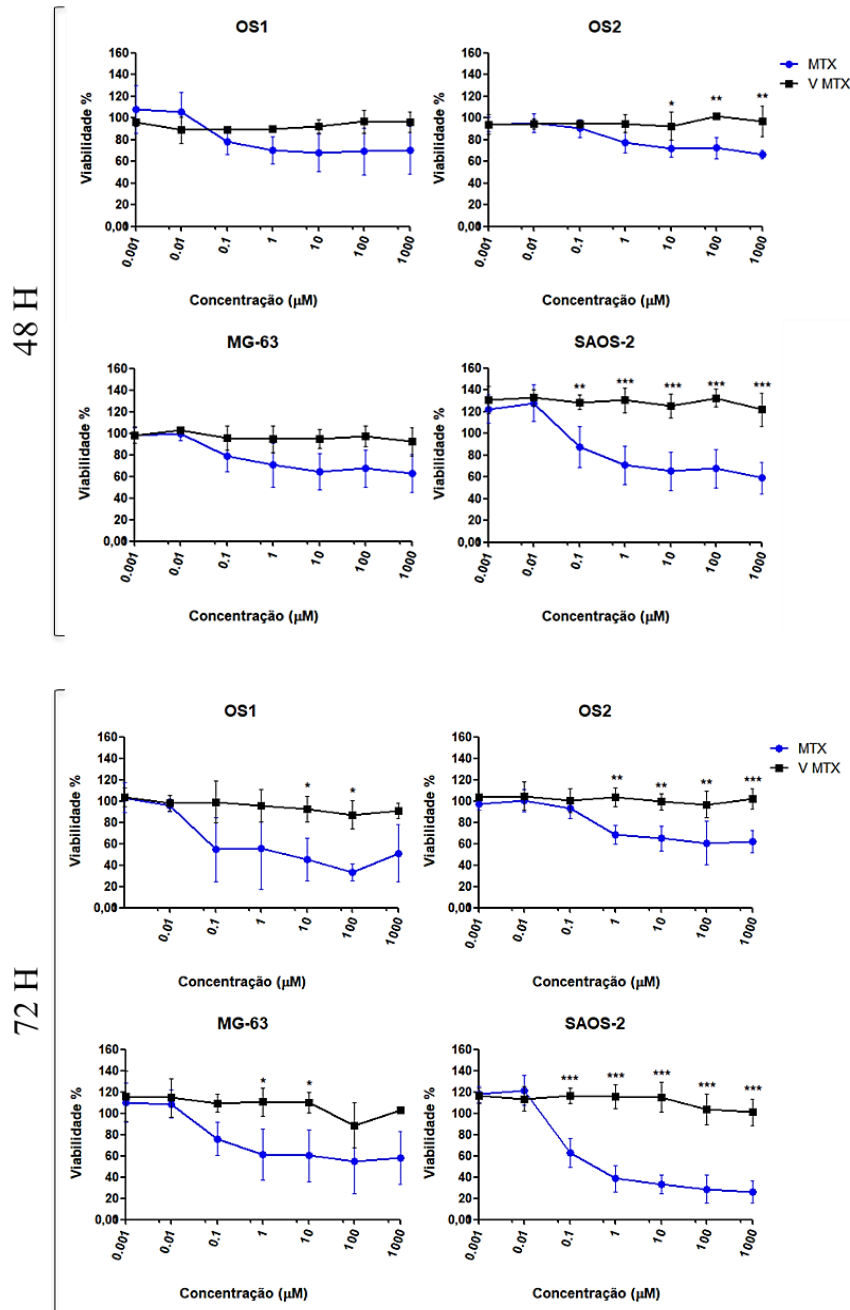


Figura 10. Ensaio de viabilidade celular relativa por redução do MTT após tratamento com metotrexato. As culturas primárias OS1 e OS2 as linhagens MG-63 e SAOS-2 foram tratadas por 48 e 72 horas com metotrexato (MTX) ou com seu veículo (V MTX) nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 μM. Viabilidade relativa a condição controle (células cultivadas apenas com meio de cultura). Análise estatística: one-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Resultados referentes a três experimentos independentes.

Os dados dos ensaios de viabilidade celular relativa foram usados para calcular a concentração necessária para inibir metade da resposta máxima (IC_{50}) ao quimioterápico (**Tabela 5**). As células OS1 apresentaram os menores valores de IC_{50} relacionados ao tratamento com DOX, CIS e MTX (concentrações de 0,40, 97,60 e 15,90 μM , respectivamente) sendo, portanto, as mais sensíveis. As células OS2 apresentaram os maiores valores de IC_{50} para DOX (97,20 μM) e para MTX (2231 μM). A concentração encontrada para a CIS (257,70 μM) foi inferior ao maior IC_{50} encontrado nas células da linhagem SAOS-2 (309 μM). A linhagem MG-63 foi a segunda mais resistente ao MTX (465,20 μM) e a terceira mais resistente à CIS (228,40 μM), porém, apresentou sensibilidade à DOX (4,86 μM). Já a linhagem SAOS-2 foi a mais sensível ao MTX (2,05 μM), a segunda mais sensível à DOX (1,36 μM), porém, a mais resistente à CIS (309 μM).

Tabela 5. Cálculo da IC_{50} das células de osteossarcoma incubadas com os agentes quimioterápicos doxorrubicina, cisplatina e metotrexato com os dados obtidos através do ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT.

Fármaco	Tempo de incubação (horas)	IC_{50} (μM)			
		Células			
		OS1	OS2	MG-63	SAOS-2
DOX	24	0,40	97,20	4,86	1,36
CIS	24	97,60	257,70	228,40	309
MTX	48	-	-	7743	1285
	72	15,90	2231	465,20	2,05

DOX: doxorrubicina; CIS : cisplatina; MTX: metotrexato.

(-) Não foi possível realizar o cálculo de IC_{50} , uma vez que o MTX não reduziu a viabilidade relativa das células.

4.4 Análise da expressão gênica de *CXCR4* nas células primárias de osteossarcoma.

Uma vez estabelecidas as culturas primárias OS1 e OS2 e caracterizado o nível de sensibilidade dessas células aos quimioterápicos, o passo seguinte foi investigar o perfil de expressão de *CXCR4*. A linhagem MG-63 foi utilizada como controle. A expressão gênica de *CXCR4* foi menor na cultura primária OS1 em relação às células OS2 ($p<0,01$) e à linhagem MG-63 ($p<0,001$). A expressão nas células OS2 foi semelhante à da linhagem MG-63 ($p>0,05$). As células da linhagem SAOS-2 apresentaram menor expressão de *CXCR4* em relação às células OS2 ($p<0,01$) e às células da linhagem MG-63 ($p<0,001$) (**Figura 11**).

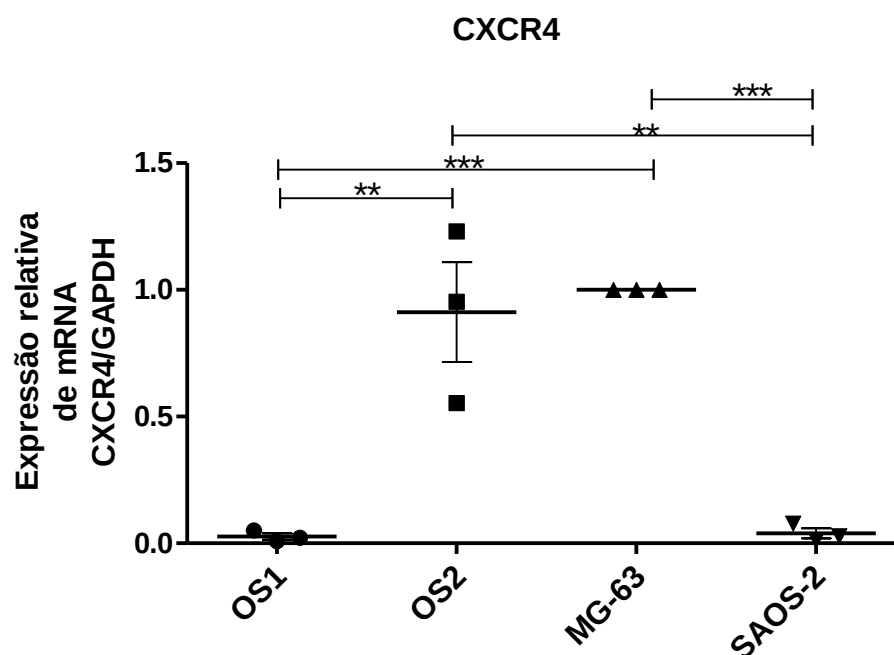
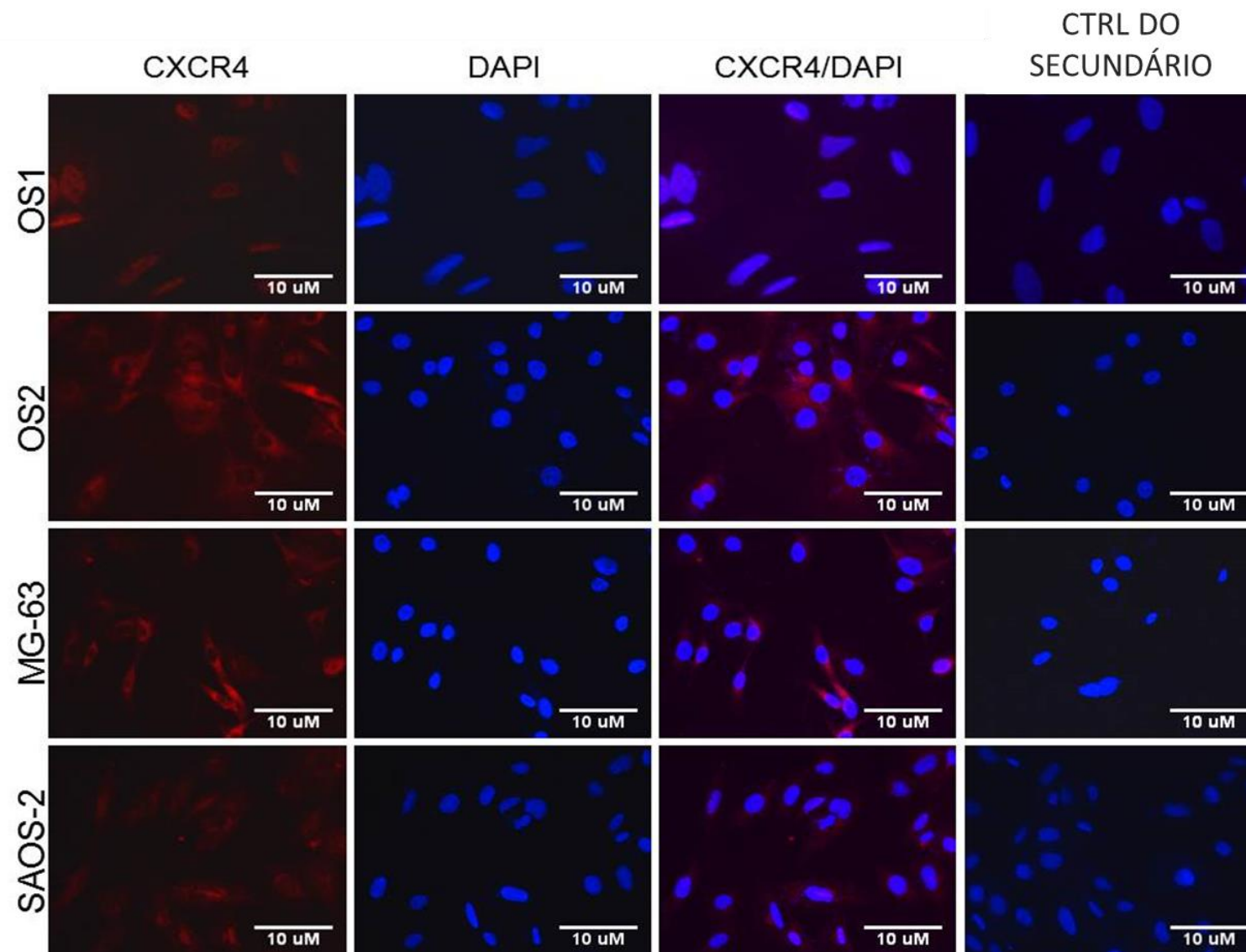


Figura 11. Expressão de mRNA de *CXCR4* por PCR em tempo real em células de osteossarcoma. One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). Resultados referentes a três experimentos independentes.

4.5 Avaliação da expressão e da localização de CXCR4 nas células primárias de osteossarcoma por imunofluorescência.

O ensaio de imunofluorescência foi realizado com o intuito de avaliar a expressão e a localização de CXCR4 nas culturas primárias de osteossarcoma. As células OS1 apresentaram marcação fraca para CXCR4, tanto no núcleo quanto no citoplasma. Nas células OS2 a marcação foi mais intensa do que nas células OS1, também sendo visto um padrão homogêneo de marcação no núcleo e no citoplasma. As células da linhagem MG-63 apresentaram marcação de CXCR4 menos intensa do que as células OS2. Por sua vez, a linhagem SAOS-2 apresentou uma fraca marcação de CXCR4, que exibia aspecto granular e se localizava predominantemente no núcleo na maioria das células (**Figura 12**). A incubação das células apenas com o anticorpo secundário (coluna controle do secundário – **Figura 12**) não evidenciou ligação inespecífica do mesmo.



4.6 Avaliação da expressão de CXCR4 na superfície das células primárias de osteossarcoma.

A avaliação do percentual da expressão de CXCR4 na superfície das células OS1 e OS2 foi feita por citometria de fluxo. Na **figura 13** são mostrados os gráficos de dispersão e os histogramas de um único experimento com as células primárias e as linhagens de osteossarcoma. A população de interesse selecionada (*gate*) e a estratégia de delimitação dos quadrantes são mostradas nesta figura.

Em todos os experimentos realizados, o percentual de expressão de CXCR4 na superfície das células OS1 foi menor do que 1% e variou entre 1,3 e 3,0% nas células OS2. Nas células da linhagem SAOS-2, a expressão de CXCR4 foi observada em 1,5% do total de células. O maior percentual de marcação positiva foi detectado nas células da linhagem MG-63 (5,2-35,2%) (**Figura 14**).

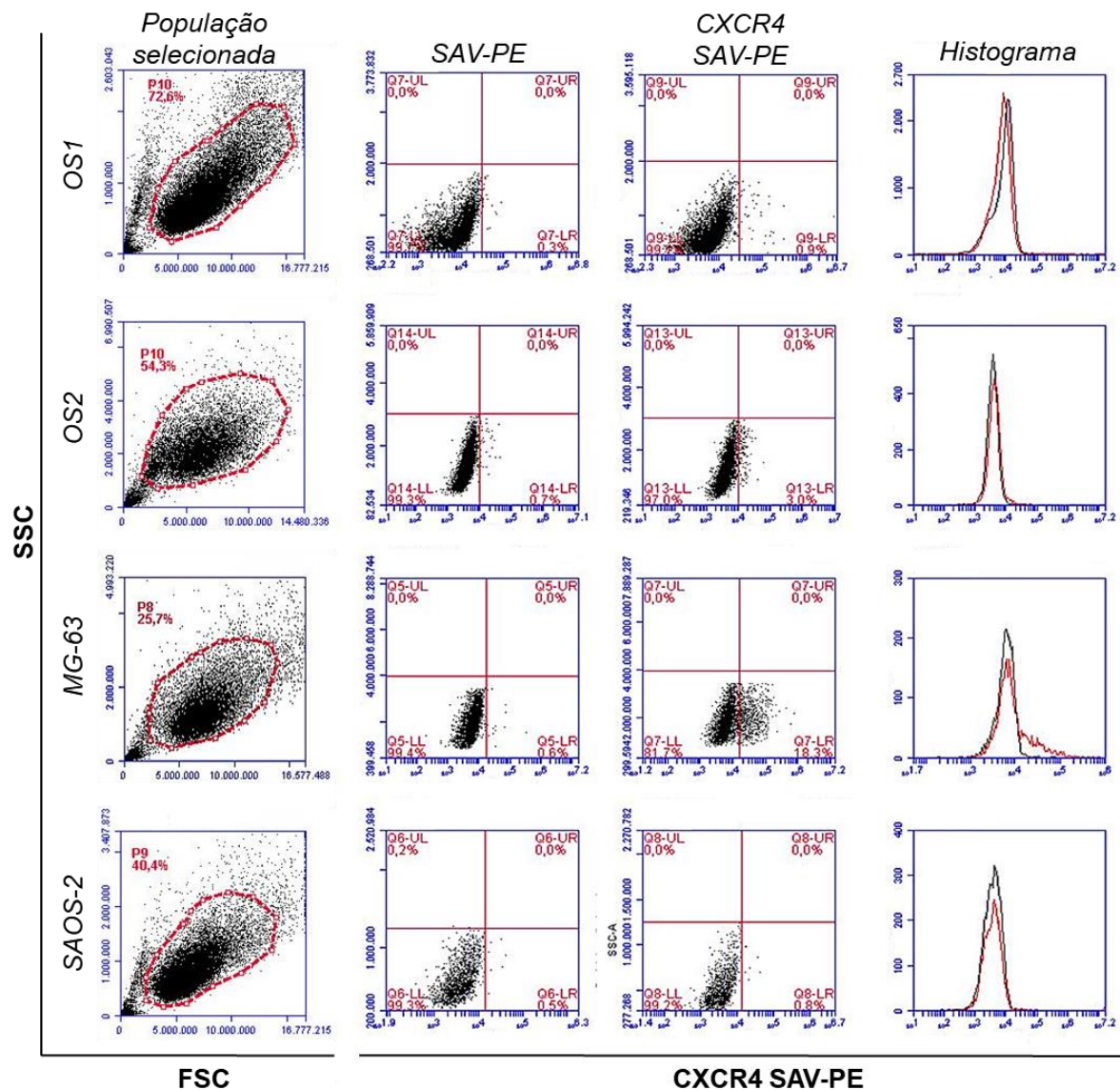


Figura 13. Estratégia de análise da expressão de CXCR4 por citometria de fluxo. Na primeira coluna estão representados os perfis de FSC X SSC (Forward scattering x side scattering) de cada célula. A linha vermelha pontilhada delimita a região da população de interesse e o valor de “P” representa o percentual de eventos contidos nesta região. Na segunda coluna estão representados os dot-plots das células incubadas com estreptavidina (SAV) conjugada com ficoeritrina (PE) e que não receberam o anticorpo primário anti-CXCR4 biotilado. Esses dot-plots foram usados para definir os quadrantes (linhas contínuas vermelhas). Na terceira coluna se encontram os dot-plots das células incubadas com o anticorpo primário anti-CXCR4 e com SAV-PE. As células que se encontram à direita da linha vertical do quadrante expressam CXCR4 em sua superfície (quadrantes direitos - inferior e superior). Por fim, na quarta coluna os dados são apresentados na forma de histograma, onde a linha preta representa as células incubadas apenas com SAV-PE e a linha vermelha representa as células incubadas com o anticorpo primário anti-CXCR4 biotilado e com SAV-PE.

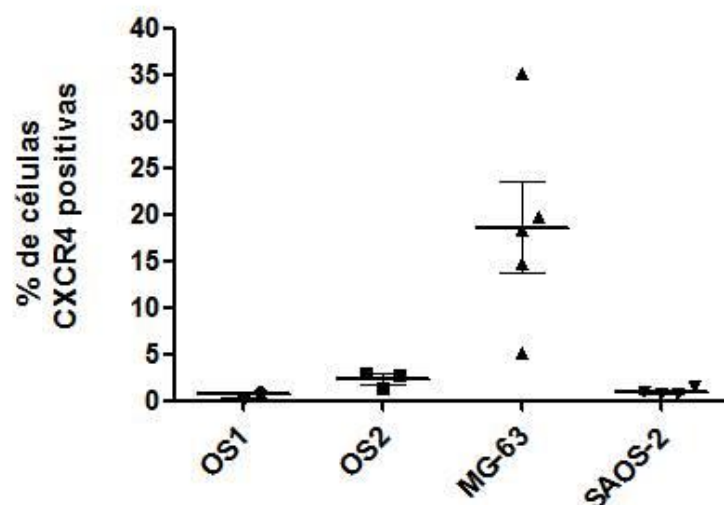


Figura 14. Avaliação da expressão de CXCR4 na superfície das células de osteossarcoma por citometria de fluxo. As células primárias OS1 apresentaram menos de 1% de marcação positiva e nas células OS2 o percentual variou entre 1,3 e 2,7%. A linhagem MG-63 apresentou o maior percentual de marcação positiva para CXCR4 (5,2-35,2%) e as células da linhagem SAOS-2 apresentaram menos de 1,5% de marcação positiva. OS1 n=2, OS2 n=3, MG-63 e SAOS-2 n= 4.

4.7 Quantificação da secreção de CXCL12 no sobrenadante de culturas de células de osteossarcoma

O papel da secreção autócrina de CXCL12 na regulação da expressão de *CXCR4* foi avaliado no meio condicionado das culturas celulares pelo ensaio de ELISA. A secreção de CXCL12 pelas células OS1 foi 5,84 pg/mg (5,21-6,94) e de 8,31 pg/mg (1,66-19,61) pelas células OS2. As células da linhagem MG-63 secretaram em média 2,96 pg/mg (0,87-4,04) de CXCL12 e as células da linhagem SAOS-2 secretaram 8,97 pg/mg (4,45-17,45) (**Figura 15**). Foi observada uma variação expressiva na quantidade de CXCL12 secretada pelas células OS2 e pelas células da linhagem SAOS-2 nos diferentes experimentos. Não foi observada diferença significativa no padrão de secreção de CXCL12 entre os quatro grupos de células.

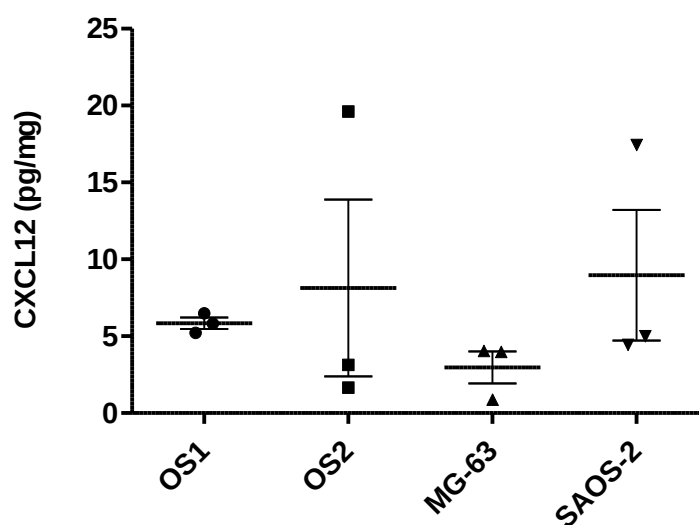


Figura 15. Quantificação da secreção de CXCL12 por ELISA. As concentrações de CXCL12 obtidas nos sobrenadantes das células primárias OS1 e OS2 e nas células das linhagens de osteossarcoma MG-63 e SAOS-2 foram normalizadas pela quantidade de proteína total dos respectivos sobrenadantes. Análise estatística: one-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Resultados referentes a três experimentos independentes.

Tabela 6. Resumo dos resultados de tempo médio de duplicação, IC₅₀ e expressão de CXCR4.

	OS1	OS2	MG-63	SAOS-2
Tempo de duplicação (horas)	75,7	29,97	34,81	48,92
IC₅₀ DOX (24 h)	0,40 µM	97,2 µM	4,86 µM	1,36 µM
IC₅₀ CIS (24 h)	97,6 µM	257,7 µM	228,4 µM	309 µM
IC₅₀ MTX (48 h)	-	-	7743 µM	1285 µM
IC₅₀ MTX (72 h)	15,9 µM	2231 µM	465,2 µM	2,05 µM
Expressão CXCR4 (mRNA)	↓	↑	↑	↓
Imunofluorescência CXCR4	marcação fraca	marcação intensa	marcação intensa	marcação fraca
Citometria CXCR4	<1%	1,3-3%	5,2-35,2%	<1,5%
Secreção CXCL12 (pg/mg)	5,21-6,94	1,66-19,61	0,87-4,04	4,45-17,45

Nos últimos anos, a relação entre o eixo CXCR4/CXCL12 e a menor taxa de sobrevida de pacientes com osteossarcoma e os mecanismos de formação de metástase vem sendo amplamente investigados (LAVERDIERE *et al.*, 2005; PERISSINOTTO *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2009; NAMLOS *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2012; LIAO *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2015b) e a expressão de CXCR4 em células tumorais também tem sido associada com maior resistência aos quimioterápicos (CHEN *et al.*, 2013; BHARDWAJ *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2017). Muitos estudos avaliam a expressão de CXCR4 diretamente no tecido tumoral de pacientes com osteossarcoma (LIN *et al.*, 2011; NAMLOS *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2015a; REN *et al.*, 2015), porém, o tumor contém diversos tipos celulares além das células neoplásicas, como, por exemplo, macrófagos e fibroblastos (BALKWILL, 2004; CHOW e LUSTER, 2014). Visto isso, não é possível afirmar com precisão que a expressão de CXCR4 observada no tecido tumoral é proveniente exclusivamente das células neoplásicas.

Uma alternativa viável para modelo de estudo do osteossarcoma é a utilização de linhagens comerciais, estabelecidas há mais de 45 anos (FOGH e TREMPE, 1975). Porém sua variabilidade ainda é muito baixa em relação a gama de subtipos histológicos de osteossarcoma. As linhagens comerciais de osteossarcoma humano mais utilizadas (SAOS-2, U2OS e MG63) são provenientes de osteossarcoma clássico central, isoladas a partir de amostra tumoral de pacientes caucasianos (FOGH e TREMPE, 1975; HEREMANS *et al.*, 1978., LASCHI *et al.*, 2015). Para atender aos requisitos da medicina personalizada, passou a ser crucial o desenvolvimento de outros modelos de estudos que reproduzissem de forma individualizada as variantes do osteossarcoma. Sendo assim, as culturas primárias surgiram como uma boa alternativa para atender este objetivo. O estabelecimento de culturas primárias

está sendo abordado por diversos grupos na busca de um melhor entendimento dos fatores que podem interferir com o prognóstico, desenvolvimento de metástase e a resposta terapêutica do osteossarcoma (MIRABELLO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2009; RUSSINOFF *et al.*, 2011). Apesar das dificuldades relatadas para o estabelecimento de culturas primárias, no nosso estudo foi possível estabelecer duas culturas primárias de osteossarcoma em aproximadamente três semanas. O fato de os pacientes serem virgens de tratamento quimioterápico pode ter influenciado positivamente no sucesso do estabelecimento das culturas. Os agentes quimioterápicos atuam induzindo a necrose tumoral e, com isso, reduzem significativamente o número de células viáveis no tecido (RICCI e ZONG, 2006). Outro fato que deve ser salientado, que tem relação direta com o sucesso para o estabelecimento de culturas primárias, é a quantidade de tecido tumoral disponível para o isolamento celular. No nosso estudo, apesar das limitações impostas pela fonte de obtenção de tecido tumoral (biópsia em um dos pacientes), mostramos ser possível isolar células e estabelecer a cultura primária, mesmo em condições com restrição do tamanho amostral.

A investigação diagnóstica dos pacientes com suspeita de osteossarcoma é realizada através de exames radiológicos (tomografia computadorizada e radiografia) e laboratoriais (dosagem de fosfatase alcalina e GH), mas a confirmação diagnóstica só é feita através do exame histopatológico (BIELACK *et al.*, 2002; CAMARGO *et al.*, 2012). O osteossarcoma possui características próprias que variam de acordo com o subtipo histológico. O osteossarcoma clássico central osteoblástico, por exemplo, tem como principal característica a deposição de matriz osteóide pelas células neoplásicas, além de apresentarem as características morfológicas gerais comuns às células neoplásicas malignas tais como alteração da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo e hiper cromatismo nuclear e figuras de mitoses atípicas frequentes (KLEIN e SIEGAL, 2006; FLETCHER, 2013). Tais

características foram observadas em ambos os tumores que originaram as culturas primárias OS1 e OS2, confirmando em ambos os pacientes o diagnóstico de osteossarcoma clássico central, variante osteoblástica.

Após o isolamento das células a partir das amostras dos tumores dos dois pacientes, foi realizado o cultivo *in vitro* em monocamada. Ambas as culturas estabelecidas apresentaram morfologia fibroblastoide, núcleos grandes e ovalados, nucléolos proeminentes e presença de lamelipódios, semelhantes à linhagem de osteossarcoma MG-63 (HEREMANS *et al.*, 1978) e a cultura de célula primária de osteossarcoma osteoblástico (OS5) estabelecido por LASCHI e colaboradores (2015). A linhagem SAOS-2 manteve o padrão morfológico anteriormente descrito por (FOGH e TREMPER, 1975; FOGH *et al.*, 1977), com células de aspecto triangular, núcleos grandes e ovalados e nucléolos proeminentes. A cultura primária OS2 apresentou o menor tempo médio de duplicação, semelhante ao da linhagem MG-63. Células de osteossarcoma isoladas em outros estudos apresentaram um tempo médio de duplicação 31,58 e 36 horas (2006; ZOU *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2016). A linhagem SAOS-2 apresentou tempo médio de duplicação maior em relação a MG-63 e OS2, porém de acordo com os dados encontrados em outros estudos (42-53,77 horas) (TIAN *et al.*, 2014; LASCHI *et al.*, 2015). Apesar de a cultura primária OS1 ter apresentado o maior tempo médio de duplicação, esse intervalo foi ainda menor que algumas culturas de osteossarcoma estabelecidas em outros estudos(>80 horas), tais como OSA3-CSCs (GRAAT *et al.*, 2006), OS-5A, OS-6, OS-8, OS-11. OS-11A, OS-12 e OS-12A (PALMINI *et al.*, 2016), e também à cultura de osteoblastos normais (99-167 horas) (YIN *et al.*, 2003; LASCHI *et al.*, 2015). Portanto, as culturas primárias OS1 e OS2 possuem tempo médio de duplicação que está de acordo com culturas primárias e linhagens de osteossarcoma relatadas na literatura.

O tratamento de pacientes com osteossarcoma inclui quimioterapia neoadjuvante, remoção do tumor e quimioterapia adjuvante (JAFFE, 2014). Dentre os quimioterápicos utilizados no tratamento do osteossarcoma, os mais comuns são doxorubicina, cisplatina e metotrexato em altas doses (JAFFE *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2002; FLETCHER, 2013b; JAFFE, 2014). Apesar do advento da quimioterapia no tratamento do osteossarcoma, a taxa de sobrevida de pacientes que desenvolvem a doença ainda é baixa, principalmente em casos de doença metastática, e o índice de pacientes que desenvolve recidiva e/ou metástase é consideravelmente alto (PETRILLI *et al.*, 2006; GELLER e GORLICK, 2010; WHELAN *et al.*, 2015). Estudos vem buscando compreender os mecanismos de resistência ao tratamento quimioterápico no osteossarcoma utilizando linhagens celulares e culturas primárias como modelo de estudo (TRAMMELL *et al.*, 2000; BOURALEXIS *et al.*, 2003; CHOU e GORLICK, 2006; GOMES *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2012). Com o objetivo de investigar a sensibilidade das células primárias e de linhagens celulares aos quimioterápicos utilizados no tratamento de osteossarcoma (doxorubicina, cisplatina e metotrexato), realizamos o ensaio de viabilidade celular relativa por redução de MTT e cálculo de IC₅₀

A doxorubicina é um fármaco antraciclíneo utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, como Leucemia Linfoblástica Aguda, Leucemia Mieloblástica Aguda, mieloma, neuroblastoma, câncer de mama, endométrio, intestino, ovário, útero, bexiga, fígado, rins, tireóide, pulmão, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, além do osteossarcoma (ARCAMONE *et al.*, 1969; THORN, 2012; JAFFE, 2014; RIVANKAR, 2014). Em nosso estudo, a cultura primária OS2 mostrou resistência ao tratamento com doxorubicina por 24 horas, com IC₅₀ de 97,2 µM. Alguns fatores foram relacionados com a resistência de células de osteossarcoma à doxorubicina. Estudos apontam a associação entre a expressão da

glicoproteína-P e a resistência de células de osteossarcoma ao tratamento com doxorubicina (BALDINI *et al.*, 1999; HE *et al.*, 2014). A glicoproteína-P pertence à família de proteínas associadas à resistência a multidroga (GATTI e ZUNINO, 2005). Outras linhagens de osteossarcoma (MNNG/HOS e U2-OS) também revelaram resistência à doxorubicina, sendo levantada a possibilidade dessa resistência estar relacionada à expressão aumentada de MDR1, uma proteína associada à resistência a multidroga (GOMES *et al.*, 2006). Um estudo realizado com linhagem de osteossarcoma murino também evidenciou resistência ao tratamento com doxorubicina, associando com a maior expressão do receptor de quimiocina CXCR4 (ADHIKARI *et al.*, 2010).

Por outro lado, a cultura primária OS1 e as linhagens MG-63 e SAOS-2 foram sensíveis ao tratamento com doxorubicina por 24 horas. Um estudo realizado por Luk e colaboradores (2011) evidenciou a alta sensibilidade de linhagens de osteossarcoma à incubação com doxorubicina, onde o IC₅₀ de MG-63, SAOS-2, SJSA, U2-OS, HOS e 143-B foi menor que 0,1 µM (LUK *et al.*, 2011). A alta sensibilidade de SAOS-2 ao tratamento com doxorubicina também já havia sido demonstrada anteriormente por Pasello e colaboradores (2008), onde o valor de IC₅₀ após 96 horas de incubação foi de 0,09 µM (PASELLO *et al.*, 2008). Fujii e colaboradores (2009) demonstraram que a incubação com apenas 1 µM de doxorubicina por 48 horas é capaz de diminuir mais de 60% da viabilidade da linhagem MG-63 cultivada em monocamada, corroborando a alta sensibilidade dessa linhagem ao fármaco. Em contrapartida, os resultados de Serra e colaboradores (2004) evidenciaram menor sensibilidade de SAOS-2 (IC₅₀=6,5 µM) à doxorubicina, em um tempo maior de incubação (96 horas) do que o que foi utilizado em nosso estudo (24 horas). Este padrão não uniforme de sensibilidade ao tratamento com doxorubicina observado no nosso estudo (células OS2 e células OS1/linhagens) pode estar relacionado com as características individuais de cada

paciente/tumor. Este achado reforça a ideia de que as culturas primárias podem vir a ser utilizadas no contexto da medicina personalizada como ferramentas para o monitoramento da resposta terapêutica individual em pacientes com osteossarcoma.

A cisplatina é um agente alquilante amplamente usado no tratamento de diversas neoplasias malignas, incluindo o osteossarcoma (EDMONSON et al., 1993; ZINSER et al., 1994; FRANCIOSI et al., 1999; BACCI et al., 2003; OZOLS et al., 2003; AKCALI et al., 2008; SILVER et al., 2010; JAYSON et al., 2014). Embora o osteossarcoma responda ao tratamento com a cisplatina, pode ocorrer resistência, o que limita a sua eficácia (CHOU e GORLICK, 2006). Apesar da sua importância no tratamento do osteossarcoma, existem poucos estudos relacionados aos mecanismos de resistência à sua ação (GIACCONE, 2000).

Em nosso estudo, a maior resistência ao tratamento com a cisplatina foi observada nas células da linhagem SAOS-2, que apresentaram sensibilidade proporcional à concentração e ao tempo tratamento. Serra e colaboradores (2004) e Pasello e colaboradores (2008) demonstraram que a sensibilidade das células SAOS-2 à cisplatina aumenta ($IC_{50}=109,9 \mu M$ e $IC_{50}=0,42 \mu M$, respectivamente) quando a incubação é feita por um período de tempo mais longo (96 horas) do que o utilizado no nosso estudo (24 horas). Recentemente, foi relatado que a resistência das células da linhagem SAOS-2 à cisplatina está associada à alta expressão de GSTP1-1 (glutathione S - transferase P1), uma isoenzima envolvida na desintoxicação xenobiótica (HUANG et al., 2007; PASELLO et al., 2008).

Nossos resultados mostraram resistência à cisplatina das células primárias OS2 e da linhagem MG-63 quando tratadas por 24 horas, apresentando IC_{50} de $257,7 \mu M$ e $228,4 \mu M$, respectivamente. Estudos sugerem que a resistência de células de osteossarcoma à cisplatina pode estar relacionada com a sensibilidade reduzida à apoptose induzida pelo fármaco, aumento da extrusão de fármacos, diminuição dos danos ao DNA e aumento de glutathione

(ASADA et al., 1998; PEREGO et al., 1999; MARTELLI et al., 2007). Porém, nenhum desses estudos é conclusivo quanto ao mecanismo(s) de resistência à cisplatina.

O metotrexato é um antimetabólito e antifolato que penetra na célula através do transportador de folato reduzido ou utilizando uma via endocítica ativada por um receptor de folato, e é capaz de inibir a biossíntese de purinas, necessárias para a produção de DNA e RNA (CHABNER e ROBERTS, 2005). Em experimentos *in vitro*, a resistência ao metotrexato pode ocorrer através de diversos mecanismos, tais como transtornos de transporte celular via RFC (transportador de folato reduzido), aumento de dihidrofolato redutase, uma enzima importante no metabolismo intracelular do folato e pela diminuição da retenção intracelular secundária à diminuição da poliglutamilação (BERTINO, 1993). De acordo com Li e Kaminskas (1984), o tratamento com metotrexato leva à morte celular pelo acúmulo letal de quebras de cadeia de DNA e pela ruptura de cadeias de DNA devido ao seu reparo ineficiente que, por sua vez, resulta da inibição da síntese de timidilato e de nucleotídeos de purina. A cultura primária OS1 e as células da linhagem MG-63 foram resistentes ao tratamento com metotrexato após 48 horas de incubação. Por não haver diminuição significativa da viabilidade nas células tratadas com metotrexato em relação às células tratadas somente com o veículo, não foi possível realizar o cálculo de IC₅₀. As células OS2 e as da linhagem SAOS-2 apresentaram sensibilidade à incubação por 48 horas com MTX.

Para avaliar se a resistência das células OS1 e MG-63 à ação do MTX poderia ser influenciada pelo tempo de incubação, ampliamos o tempo de exposição para 72 horas e observamos que ambas, antes resistentes, desenvolveram sensibilidade ao fármaco confirmando uma ação tempo-dependente do MTX sobre as células. Já as células que

mostraram sensibilidade ao MTX após 48 horas (OS2 e SAOS-2), mantiveram o padrão de sensibilidade após 72 horas de exposição.

Pode-se afirmar que a sensibilidade das células utilizadas no presente estudo ao metotrexato é tempo-dependente, como observado no estudo realizado por Pasello e colaboradores (2008), onde células da linhagem SAOS-2 apresentaram IC_{50} de apenas 0,08 μM após 96 horas de incubação com metotrexato. Serra e colaboradores (2004) também demonstraram a alta sensibilidade de SAOS-2 ao tratamento com metotrexato por 96 horas, onde o valor de IC_{50} foi de 13,3 μM .

O conjunto dos nossos resultados revelaram uma diversidade na resposta individual das células à ação dos agentes quimioterápicos utilizados na prática clínica para tratamento de osteossarcoma. As células OS1 foram altamente sensíveis a ação de DOX e CIS e resistentes ao MTX quando expostas a um tempo curto de incubação (48 horas), porém, sua resistência foi atenuada com a ampliação do tempo de exposição ao metotrexato (96 horas). Por outro lado, as células OS2 mostraram um perfil de alta resistência para os mesmos agentes quimioterápicos. As células da linhagem SAOS-2 foram sensíveis a DOX e MTX e resistentes a CIS; as células da linhagem MG-63 apresentaram resistência a CIS e MTX e foram sensíveis a DOX.

É possível que células com maior velocidade de crescimento sejam mais resistentes ao tratamento com metotrexato, devido ao menor acúmulo de quebras de cadeia de DNA (LI e KAMINSKAS, 1984). Em nosso estudo, OS2 e MG-63 foram mais resistentes à ação do metotrexato no tratamento por 72 horas, o que pode ter ocorrido devido ao fato de serem células de crescimento rápido, como pode ser observado no cálculo de tempo médio de duplicação.

A sinalização apoptótica pode ser influenciada por vários mecanismos diferentes, promovendo resistência à ação dos quimioterápicos. Vias de sinalização (IGF, Wnt, ERK, PI3K, mTOR) que desempenham um papel no desenvolvimento do osteossarcoma podem induzir resistência a tratamentos citotóxicos através de alteração na sinalização de sobrevivência. Existem evidências de que a interação entre células tumorais e o microambiente, através de sinalização de quimiocinas e seus receptores na superfície celular, pode levar ao aumento da sinalização de sobrevivência e, assim, conferir resistência ao fármaco (CHOU e GORLICK, 2006; ADHIKARI et al., 2010; LEOW et al., 2010; DIEUDONNE et al., 2012; MARION et al., 2012). Um mecanismo que poderia atuar nesse processo seria através da ligação do CXCL12 ao CXCR4, ao promover a ativação da via NF- κ B através do ERK, induziria a sinalização anti-apoptótica nas células, resultando na quimiorresistência (HUANG et al., 2009; ADHIKARI et al., 2010).

Uma vez estabelecidas as culturas primárias OS1 e OS2 e caracterizada sua sensibilidade aos quimioterápicos, o passo seguinte foi investigar o perfil de expressão de CXCR4 dessas células. A investigação sobre a expressão de mRNA de *CXCR4* em linhagens de osteossarcoma humano já foi descrita na literatura, incluindo a linhagem MG-63 (AKAZAWA et al., 2015; DRYNDA et al., 2017; JIANG et al., 2017). No nosso estudo observamos que as células da linhagem SAOS-2 apresentaram menor expressão de mRNA de *CXCR4* do que as células da linhagem MG-63, o que está de acordo com os resultados de Jiang e colaboradores (2017). Em relação as culturas primárias estabelecidas no presente estudo, observamos que a expressão de mRNA de *CXCR4* foi menor (OS1) ou semelhante (OS2) às células da linhagem MG-63. A heterogeneidade na expressão de mRNA de *CXCR4* em células primárias de osteossarcoma já foi descrita anteriormente (AKAZAWA et al., 2015; XIE et al., 2017). Inúmeros fatores podem contribuir na variação da expressão de

CXCR4. Guo e colaboradores (2014) demonstraram que um importante fator que pode participar dessa resposta é o microambiente hipóxico, modulando a expressão de *CXCR4* através do aumento da expressão de HIF-1 α .

Após a avaliação da expressão de mRNA de CXCR4 nas culturas primárias e linhagens de osteossarcoma, avaliamos sua localização através do ensaio de imunofluorescência. As células OS1, que apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com quimioterápicos e possuem baixa expressão de mRNA de *CXCR4*, apresentaram uma marcação fraca para CXCR4, correspondendo ao mRNA. Nas células OS2 a marcação foi mais evidente do que nas células OS1, o que está de acordo com a expressão de mRNA de *CXCR4*. As células da linhagem MG-63 apresentaram marcação de CXCR4 menos intensa do que nas células OS2. Por sua vez, a linhagem SAOS-2, que possui alta sensibilidade aos quimioterápicos e sua expressão de mRNA de *CXCR4* foi baixa, apresentou uma fraca marcação de CXCR4. Uma limitação do nosso estudo foi a impossibilidade de identificar a localização exata de CXCR4 nas células e a identificação do padrão de granulação, *clusters* ou vesículas intracelulares. Idealmente, para melhor avaliar a localização de CXCR4 nas células, seria necessária a aquisição de imagens em maior aumento, como realizado por Guan e colaboradores (2015), onde foi possível visualizar a alta expressão de CXCR4 em células da linhagem F5M2. O ensaio de imunofluorescência realizado por Akazawa e colaboradores (2015) em linhagens de células mesenquimais evidenciou com clareza uma marcação intensa de CXCR4, bem como sua localização intracelular, mostrando que é possível observar a expressão de CXCR4 através desse ensaio.

Os receptores de quimiocina são funcionais quando se localizam na superfície celular (HOMEY *et al.*, 2002; ZLOTNIK *et al.*, 2006; ZLOTNIK *et al.*, 2011). Contudo, através da técnica de imunofluorescência não é possível avaliar especificamente a marcação de CXCR4

na superfície das células. Em razão disso, utilizamos a técnica de citometria de fluxo para determinar o percentual de células CXCR4 positivas nas culturas OS1 e OS2. Assim, como em outros estudos (PAOLETTI *et al.*, 2001; PERISSINOTTO *et al.*, 2005; LIAO *et al.*, 2015), houve variação na porcentagem de células CXCR4 positivas entre as culturas primárias estabelecidas e as linhagens de osteossarcoma utilizadas em nosso estudo. A linhagem MG-63 apresentou o maior percentual de células CXCR4 positivas e grande variação intra-experimento. A presença de CXCR4 na superfície celular pode variar por conta do nível de confluência das células (PERISSINOTTO *et al.*, 2005), sendo uma possível justificativa para a oscilação na porcentagem de células CXCR4 positivas em MG-63 intra-experimentos.

A expressão de CXCR4 também costuma ser avaliada através de imunohistoquímica, onde geralmente é associada com a taxa de sobrevida do paciente, pior prognóstico e formação de metástase (LAVERDIERE *et al.*, 2005; BAUMHOER *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2014; GUAN *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015a). Como perspectiva, pretendemos avaliar a expressão de CXCR4 nos cortes histológicos de osteossarcoma cujas culturas primárias foram estabelecidas em nosso estudo e comparar com os dados encontrados nos experimentos *in vitro*. Também pretendemos avaliar a modulação da expressão após o tratamento *in vitro* com os quimioterápicos utilizados nesse estudo e analisar a sensibilidade das células primárias e linhagens de osteossarcoma após o silenciamento de CXCR4.

A ligação de CXCL12 ao receptor CXCR4 na superfície celular pode levar à sua internalização (CHENG *et al.*, 2000; WÜRTH *et al.*, 2014). Desta forma, a secreção autócrina elevada de CXCL12 poderia reduzir a expressão de CXCR4 na superfície das células de osteossarcoma. Já foi relatado que células MG-63 realizam alta secreção de CXCL12 (60ng/mL) e tal fato foi relacionado com a baixa expressão de CXCR4 nessas células

(PERISSINOTTO *et al.*, 2005). Jiang e colaboradores (2017) mostraram um perfil heterogêneo de secreção de CXCL12 por células de osteossarcoma, porém, não foi evidenciada diferença significativa de secreção da quimiocina por células MG-63 em comparação à SAOS-2, não havendo correlação entre a variação da expressão de CXCR4 e a secreção de CXCL12. No presente estudo, investigamos a secreção de CXCL12 nas culturas primárias OS1 e OS2 e nas linhagens MG-63 e SAOS-2 e todas apresentaram baixo nível de secreção de CXCL12 em relação ao nível total de proteínas, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Sendo assim, podemos afirmar que a baixa expressão de CXCR4 na superfície das células primárias e linhagens de osteossarcoma utilizadas em nosso estudo não resultou de secreção autócrina de CXCL12. Como segunda perspectiva, pretendemos realizar ensaio de migração via incubação com CXCL12, a fim de avaliar se a quimiocina tem capacidade de modular o potencial migratório das células primárias utilizadas neste estudo.

- O tempo médio de duplicação das culturas estabelecidas é condizente com culturas primárias e linhagens de osteossarcoma;
- As culturas celulares isoladas em nosso estudo a partir de osteossarcoma clássico central do subtipo osteoblástico apresentam, quando cultivadas monocamada, morfologia semelhante à linhagens comerciais de osteossarcoma do mesmo subtipo;
- O perfil de expressão de CXCR4 em células isoladas de osteossarcoma humano e expandidas *in vitro* e de células de linhagens comerciais é heterogêneo e pode resultar da variabilidade do tumor e das características individuais dos pacientes;
- As células neoplásicas que apresentaram maior expressão de CXCR4 mostraram maior resistência à ação *in vitro* dos quimioterápicos doxorrubicina, cisplatina e metotrexato.

ANNINGA, J. K.; GELDERBLOM, H.; FIOCCO, M.; KROEP, J. R.; TAMINIAU, A. H.; HOGENDOORN, P. C.; EGELER, R. M. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? **Eur J Cancer**, v. 47, n. 16, p. 2431-45, 2011.

ADHIKARI, A. S.; AGARWAL, N.; WOOD, B. M.; PORRETTA, C.; RUIZ, B.; POCHAMPALLY, R. R.; IWAKUMA, T. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. **Cancer Res**, v. 70, n. 11, p. 4602-12, 2010.

AKAZAWA, Y.; HASEGAWA, T.; YOSHIMURA, Y.; CHOSA, N.; ASAKAWA, T.; UEDA, K.; SUGIMOTO, A.; KITAMURA, T.; NAKAGAWA, H.; ISHISAKI, A.; IWAMOTO, T. Recruitment of mesenchymal stem cells by stromal cell-derived factor 1alpha in pulp cells from deciduous teeth. **Int J Mol Med**, v. 36, n. 2, p. 442-8, 2015.

AKCALI, Z.; CALIKUSU, Z.; SAKALLI, H.; OZYILKAN, O. Gemcitabine and cisplatin treatment of advanced-stage non-small-cell lung cancer in patients given cisplatin on day 8. **Tumori**, v. 94, n. 4, p. 474-80, 2008.

ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FANTINI, G.; GREIN, A.; OREZZI, P.; POL, C.; SPALLA, C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). **Biotechnology and bioengineering**, v. 67, n. 6, p. 704-13, 20 mar. 2000.

ASADA, N.; TSUCHIYA, H.; UEDA, Y.; TOMITA, K. Establishment and characterization of an acquired cisplatin-resistant subline in a human osteosarcoma cell line. *Anticancer Res*, v. 18, n. 3, p. 1765-8, 1998.

BACCI, G.; LONGHI, A.; VERSARI, M.; MERCURI, M.; BRICCOLI, A.; PICCI, P. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy. **Cancer**, v. 106, n. 5, p. 1154-1161, 2006.

BACHELDER, R. E.; WENDT, M. A.; MERCURIO, A. M. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. **Cancer Res**, v. 62, n. 24, p. 7203-6, 2002.

BAE, M. H.; OH, S. H.; PARK, C. J.; LEE, B. R.; KIM, Y. J.; CHO, Y. U.; JANG, S.; LEE, J. H.; KIM, N.; PARK, S. H.; LIM, J. H.; SEO, E. J.; LEE, K. H. VLA-4 and CXCR4 expression levels show contrasting prognostic impact (favorable and unfavorable, respectively) in acute myeloid leukemia. **Ann Hematol**, v. 94, n. 10, p. 1631-8, 2015.

BALDINI, N.; SCOTLANDI, K.; SERRA, M.; PICCI, P.; BACCI, G.; SOTTILI, S.; CAMPANACCI, M. P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy. **J Orthop Res**, v. 17, n. 5, p. 629-32, 1999.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-45, 2001.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 7, p. 540-50, 2004.

BAUMHOER, D.; SMIDA, J.; ZILLMER, S.; ROSEMAN, M.; ATKINSON, M. J.; NELSON, P. J.; JUNDT, G.; VON LUETTICHAU, I.; NATHRATH, M. Strong expression of CXCL12 is associated with a favorable outcome in osteosarcoma. **Mod Pathol**, v. 25, n. 4, p. 522-8, 2012.

BERTINO, JR. Karnofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. **Journal of Clinical Oncology**. v. 11, n. 1, p. 5-14. 1993.

BHARDWAJ, A.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, S.; ARORA, S.; TYAGI, N.; ANDREWS, J.; MCCLELLAN, S.; CARTER, J. E.; SINGH, A. P. CXCL12/CXCR4 signaling counteracts docetaxel-induced microtubule stabilization via p21-activated kinase 4-dependent activation of LIM domain kinase 1. **Oncotarget**, v. 5, n. 22, p. 11490-500, 2014.

BIELACK, S.; JURGENS, H.; JUNDT, G.; KEVRIC, M.; KUHNE, T.; REICHARDT, P.; ZOUBEK, A.; WERNER, M.; WINKELMANN, W.; KOTZ, R. Osteosarcoma: the COSS experience. **Cancer Treat Res**, v. 152, p. 289-308, 2009.

BIELACK, S. S.; KEMPF-BIELACK, B.; DELLING, G.; EXNER, G. U.; FLEGE, S.; HELMKE, K.; KOTZ, R.; SALZER-KUNTSCHIK, M.; WERNER, M.; WINKELMANN, W.; ZOUBEK, A.; JURGENS, H.; WINKLER, K. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 3, p. 776-90, 2002.

BOURALEXIS, S.; FINDLAY, D. M.; ATKINS, G. J.; LABRINIDIS, A.; HAY, S.; EVDOKIOU, A. Progressive resistance of BTK-143 osteosarcoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis is mediated by acquisition of DcR2/TRAIL-R4 expression: resensitisation with chemotherapy. **British Journal Of Cancer**, v. 89, p. 206, 2003.

BRENNECKE, P.; ARLT, M. J.; CAMPANILE, C.; HUSMANN, K.; GVOZDENOVIC, A.; APUZZO, T.; THELEN, M.; BORN, W.; FUCHS, B. CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice. **Clin Exp Metastasis**, v. 31, n. 3, p. 339-49, 2014.

CAMARGO, O.; BAPTISTA, A.; CAIERO, M.; CAMARGO, A. **Afecções tumorais: avaliação, epidemiologia e diagnóstico**. Clínica ortopédica - Medicina USP: Barueri: Manole, p. 506-10, 2012.

CHABNER, BA ; ROBERTS TG JR. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer**. V.5, n. , p. 65-72, 2005.

CHEN, H. J.; EDWARDS, R.; TUCCI, S.; BU, P.; MILSOM, J.; LEE, S.; EDELMANN, W.; GÜMÜS, Z. H.; SHEN, X.; LIPKIN, S. Chemokine 25-induced signaling suppresses colon cancer invasion and metastasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3184-3196, 2012.

CHEN, Y.; JACAMO, R.; KONOPLEVA, M.; GARZON, R.; CROCE, C.; ANDREEFF, M. CXCR4 downregulation of let-7a drives chemoresistance in acute myeloid leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 6, p. 2395-2407, 2013.

CHEN, Y.; WANG, S.; BU, S.; XU, M.; LAI, D. Low-dose cisplatin-induced CXCR4 expression promotes proliferation of ovarian cancer stem-like cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 3, p. 282-289, 2016.

CHENG, Z. J.; ZHAO, J.; SUN, Y.; HU, W.; WU, Y. L.; CEN, B.; WU, G. X.; PEI, G. beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. **J Biol Chem**, v. 275, n. 4, p. 2479-85, 2000.

CHOU, A. J.; GORLICK, R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 6, n. 7, p. 1075-85, 2006.

CHOW, M. T.; LUSTER, A. D. Chemokines in Cancer. **Cancer immunology research**, v. 2, n. 12, p. 1125-1131, 2014.

COUSSENS, M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

DAI, X.; MAO, Z.; HUANG, J.; XIE, S.; ZHANG, H. The CXCL12/CXCR4 autocrine loop increases the metastatic potential of non-small cell lung cancer in vitro. **Oncology Letters**, v. 5, n. 1, p. 277-282, 2013.

DIEUDONNE, F. X.; MARION, A.; MARIE, P. J.; MODROWSKI, D. Targeted inhibition of T-cell factor activity promotes syndecan-2 expression and sensitization to doxorubicin in osteosarcoma cells and bone tumors in mice. **J Bone Miner Res**, v. 27, n. 10, p. 2118-29, 2012.

DOMANSKA, U. M.; TIMMER-BOSSCHA, H.; NAGENGAST, W. B.; OUDE MUNNINK, T. H.; KRUIZINGA, R. C.; ANANIAS, H. J.; KLIPHUIS, N. M.; HULS, G.; DE VRIES, E. G.; DE JONG, I. J.; WALENKAMP, A. M. CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. **Neoplasia**, v. 14, n. 8, p. 709-18, 2012.

DOMANSKA, U. M.; KRUIZINGA, R. C.; NAGENGAST, W. B.; TIMMER-BOSSCHA, H.; HULS, G.; DE VRIES, E. G.; WALENKAMP, A. M. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. **Eur J Cancer**, v. 49, n. 1, p. 219-30, 2013.

DORFMAN, H. D.; CZERNIAK, B.; KOTZ, R.; VANEL, D.; UNNI, K. K.; PARK, Y. K. **WHO classification of tumours of bone: introduction. In: Fletcher CD, Unni K, Mertens F, eds. WHO classification of tumors. Pathology & genetics of tumors of soft tissue and bone.** Lyon: IARC Press, p. 9–18, 2002.

DREESEN, O.; BRIVANLOU, A. H. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. **Stem Cell Rev**, v. 3, n. 1, p. 7-17, 2007.

DRYNDA, A.; REN, Q.; BUCHHORN, G. H.; LOHMANN, C. H. The induction of CXCR4 expression in human osteoblast-like cells (MG63) by CoCr particles is regulated by the PLC-DAG-PKC pathway. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 105, n. 8, p. 2326-2332, 2017.

EDMONSON, J. H.; GREEN, S. J.; IVINS, J. C.; GILCHRIST, G. S.; CREAGAN, E. T.; PRITCHARD, D. J.; SMITHSON, W. A.; DAHLIN, D. C.; TAYLOR, W. F. A controlled pilot study of high-dose methotrexate as postsurgical adjuvant treatment for primary osteosarcoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 2, n. 3, p. 152-156, 1984.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M.; OSTOA-SALOMA, P.; PALACIOS-ARREOLA, M. I.; NAVA-CASTRO, K. E.; CASTRO, J. I.; MORALES-MONTOR, J. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 1, p. 1-16, 2015.

FERNANDEZ, E. J.; LOLIS, E. Structure, function, and inhibition of chemokines. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 42, p. 469-99, 2002.

FERRARI, S.; SERRA, M. An update on chemotherapy for osteosarcoma. **Expert Opin Pharmacother**, v. 16, n. 18, p. 2727-36, 2015.

FLETCHER, C. D. M.; UNNI, K. K.; MERTENS, F.; ORGANIZATION, W. H.; PATHOLOGY, I. A. O. **WHO Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone**. 4. IARC Press, 2002.

FLETCHER, C. D. M. **WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone**. IARC Press, 468, 2013.

FOGH, J.; TREMPER, G. New Human Tumor Cell Lines. In: FOGH, J. (Ed.). **Human Tumor Cells in Vitro**. Boston, MA: Springer US, p.115-159. ISBN 978-1-4757-1647-4, 1975.

FOGH, J.; WRIGHT, W. C.; LOVELESS, J. D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. **J Natl Cancer Inst**, v. 58, n. 2, p. 209-14, 1977.

FONTANELLA, R.; PELAGALLI, A.; NARDELLI, A.; D'ALTERIO, C.; IERANO, C.; CERCHIA, L.; LUCARELLI, E.; SCALA, S.; ZANNETTI, A. A novel antagonist of CXCR4 prevents bone marrow-derived mesenchymal stem cell-mediated osteosarcoma and hepatocellular carcinoma cell migration and invasion. **Cancer Lett**, v. 370, n. 1, p. 100-7, 2016.

FRANCIOSI, V.; COCCONI, G.; MICHIARA, M.; DI COSTANZO, F.; FOSSER, V.; TONATO, M.; CARLINI, P.; BONI, C.; DI SARRA, S. Front-line chemotherapy with cisplatin and etoposide for patients with brain metastases from breast carcinoma, nonsmall cell lung carcinoma, or malignant melanoma: a prospective study. **Cancer**, v. 85, n. 7, p. 1599-605, 1999.

FUJII, H.; HONOKI, K.; TSUJIUCHI, T.; KIDO, A.; YOSHITANI, K.; TAKAKURA, Y. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. **Int J Oncol**, v. 34, n. 5, p. 1381-6, 2009.

GATTI, L.; ZUNINO, F. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. **Methods Mol Med**, v. 111, p. 127-48, 2005.

GELLER, D. S.; GORLICK, R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. **Clinical advances in hematology & oncology : H&O**, v. 8, n. 10, p. 705-718, 2010.

GERAGHTY, R. J.; CAPES-DAVIS, A.; DAVIS, J. M.; DOWNWARD, J.; FRESHNEY, R. I.; KNEZEVIC, I.; LOVELL-BADGE, R.; MASTERS, J. R. W.; MEREDITH, J.; STACEY, G. N.; THRAVES, P.; VIAS, M. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 6, p. 1021-1046, 2014.

GIACCONE, G. Clinical Perspectives on Platinum Resistance. **Drugs**, v. 59, n. 4, p. 9-17, 2000.

GIANFERANTE, D. M.; MIRABELLO, L.; SAVAGE, S. A. Germline and somatic genetics of osteosarcoma - connecting aetiology, biology and therapy. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 8, p. 480-491, 2017.

GIL, M.; KOMOROWSKI, M. P.; SESHADRI, M.; ROKITA, H.; MCGRAY, A. J.; OPYRCHAL, M.; ODUNSI, K. O.; KOZBOR, D. CXCL12/CXCR4 blockade by oncolytic virotherapy inhibits ovarian cancer growth by decreasing immunosuppression and targeting cancer-initiating cells. **J Immunol**, v. 193, n. 10, p. 5327-37, 2014.

- GOMES, C. M.; VAN PAASSEN, H.; ROMEO, S.; WELLING, M. M.; FEITSMA, R. I.; ABRUNHOSA, A. J.; BOTELHO, M. F.; HOGENDOORN, P. C.; PAUWELS, E.; CLETON-JANSEN, A. M. Multidrug resistance mediated by ABC transporters in osteosarcoma cell lines: mRNA analysis and functional radiotracer studies. **Nucl Med Biol**, v. 33, n. 7, p. 831-40, 2006.
- GRAAT, H. C. A.; WITLOX, M. A.; SCHAGEN, F. H. E.; KASPERS, G. J. L.; HELDER, M. N.; BRAS, J.; SCHAAP, G. R.; GERRITSEN, W. R.; WUISMAN, P. I. J. M.; VAN BEUSECHEM, V. W. Different susceptibility of osteosarcoma cell lines and primary cells to treatment with oncolytic adenovirus and doxorubicin or cisplatin. **British Journal of Cancer**, v. 94, n.12, p. 1837-1844, 2006.
- GRUENER, G.; CAMACHO, P. Paget's disease of bone. **Handb Clin Neurol**, v. 119, p. 529-40, 2014.
- GUAN, G.; ZHANG, Y.; LU, Y.; LIU, L.; SHI, D.; WEN, Y.; YANG, L.; MA, Q.; LIU, T.; ZHU, X.; QIU, X.; ZHOU, Y. The HIF-1alpha/CXCR4 pathway supports hypoxia-induced metastasis of human osteosarcoma cells. **Cancer Lett**, v. 357, n. 1, p. 254-64, 2015.
- GUO, M.; CAI, C.; ZHAO, G.; QIU, X.; ZHAO, H.; MA, Q.; TIAN, L.; LI, X.; HU, Y.; LIAO, B.; MA, B.; FAN, Q. Hypoxia promotes migration and induces CXCR4 expression via HIF-1alpha activation in human osteosarcoma. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90518, 2014.
- HARRISON, DJ; GELLER DS, GILL; JD; LEWIS,VO; GORLICK, R. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 18, n. 1, p. 39-50. 2018.
- HARTMANN, T. N.; BURGER, J. A.; GLODEK, A.; FUJII, N.; BURGER, M. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. **Oncogene**, v. 24, n. 27, p. 4462-71, 2005.
- HE, H.; NI, J.; HUANG, J. U. N. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review). **Oncology Letters**, v. 7, n. 5, p. 1352-1362, 2014.
- HE, L.; ZHANG, L.; WANG, M.; WANG, W. miR-9 functions as a tumor inhibitor of cell proliferation in epithelial ovarian cancer through targeting the SDF-1/CXCR4 pathway. **Exp Ther Med**, v. 13, n. 4, p. 1203-1208, 2017.
- HECKMANN, D.; MAIER, P.; LAUFS, S.; WENZ, F.; ZELLER, W. J.; FRUEHAUF, S.; ALLGAYER, H. CXCR4 Expression and Treatment with SDF-1 α or Plerixafor Modulate Proliferation and Chemosensitivity of Colon Cancer Cells. **Translational Oncology**, v. 6, n. 2, p. 124-132, 2013.
- HEREMANS, H.; BILLIAU, A.; CASSIMAN, J. J.; MULIER, J. C.; DE SOMER, P. In Vitro Cultivation of Human Tumor Tissues II. Morphological and Virological Characterization of Three Cell Lines. **Oncology**, v. 35, n. 6, p. 246-252, 1978.
- HOMEY, B.; MULLER, A.; ZLOTNIK, A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? **Nat Rev Immunol**, v. 2, 2002.
- HUANG, C. Y.; LEE, C. Y.; CHEN, M. Y.; YANG, W. H.; CHEN, Y. H.; CHANG, C. H.; HSU, H. C.; FONG, Y. C.; TANG, C. H. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 enhanced motility of human osteosarcoma cells involves MEK1/2, ERK and NF-kappaB-dependent pathways. **J Cell Physiol**, v. 221, n. 1, p. 204-12, 2009.

HUANG T, GONG WH, LI XC, ZOU CP, JIANG GJ, LI XH, FENG DP. Synergistic increase in the sensitivity of osteosarcoma cells to thermochemotherapy with combination of paclitaxel and etoposide. **Mol Med Rep.** v. 6, n. 5, p.1013-7, 2012.

ISAKOFF, M. S.; BIELACK, S. S.; MELTZER, P.; GORLICK, R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 27, p. 3029-35, 2015.

JADÃO, F. R. D. S.; LIMA, L. D. S.; LOPES, J. A. S.; RIBEIRO, M. B. Avaliação dos fatores prognósticos e sobrevida de pacientes com Osteossarcoma atendidos em um Hospital Filantrópico de Teresina (PI), Brasil. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 48, n. 1, p. 87-91, 2013.

JAFFE, N.; CARRASCO, H.; RAYMOND, K.; AYALA, A.; EFTEKHARI, F. Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? **Cancer**, v. 95, n. 10, p. 2202-10, 2002.

JAFFE, N. Historical perspective on the introduction and use of chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. **Adv Exp Med Biol**, v. 804, p. 1-30, 2014.

JAYSON, G. C.; KOHN, E. C.; KITCHENER, H. C.; LEDERMANN, J. A. Ovarian cancer. **Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1376-88, 2014.

JIANG, C.; FANG, X.; ZHANG, H.; WANG, X.; LI, M.; JIANG, W.; TIAN, F.; ZHU, L.; BIAN, Z. AMD3100 combined with triptolide inhibit proliferation, invasion and metastasis and induce apoptosis of human U2OS osteosarcoma cells. **Biomed Pharmacother**, v. 86, p. 677-685, 2017.

KHAN, M. Z.; BRANDIMARTI, R.; SHIMIZU, S.; NICOLAI, J.; CROWE, E.; MEUCCI, O. The chemokine CXCL12 promotes survival of postmitotic neurons by regulating Rb protein. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 10, p. 1663-72, 2008.

KIM, M.; KOH, Y. J.; KIM, K. E.; KOH, B. I.; NAM, D. H.; ALITALO, K.; KIM, I.; KOH, G. Y. CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche. **Cancer Res**, v. 70, n. 24, p. 10411-21, 2010.

KLEIN, M. J.; SIEGAL, G. P. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. **Am J Clin Pathol**, v. 125, n. 4, p. 555-81, 2006.

KUNDU, Z. S. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. **Indian J Orthop**, v. 48, n. 3, p. 238-46, 2014.

LASCHI, M.; BERNARDINI, G.; GEMINIANI, M.; GHEZZI, L.; AMATO, L.; BRACONI, D.; MILLUCCI, L.; FREDIANI, B.; SPREAFICO, A.; FRANCHI, A.; CAMPANACCI, D.; CAPANNA, R.; SANTUCCI, A. Establishment of Four New Human Primary Cell Cultures from Chemo-Naive Italian Osteosarcoma Patients. **J Cell Physiol**, v. 230, n. 11, p. 2718-27, 2015.

LAU, E. K.; ALLEN, S.; HSU, A. R.; HANDEL, T. M. Chemokine-receptor interactions: GPCRs, glycosaminoglycans and viral chemokine binding proteins. **Adv Protein Chem**, v. 68, p. 351-91, 2004.

LAVERDIERE, C.; HOANG, B. H.; YANG, R.; SOWERS, R.; QIN, J.; MEYERS, P. A.; HUVOS, A. G.; HEALEY, J. H.; GORLICK, R. Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma. **Clin Cancer Res**, v. 11, 2005.

LEOW, P. C.; TIAN, Q.; ONG, Z. Y.; YANG, Z.; EE, P. L. Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/beta-catenin antagonists against human osteosarcoma cells. **Invest New Drugs**, v. 28, n. 6, p. 766-82, 2010.

LI, J. C.; KAMINSKAS, E. Accumulation of DNA strand breaks and methotrexate cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 18, p. 5694-8, 1984.

LI, J.; JIANG, K.; QIU, X.; LI, M.; HAO, Q.; WEI, L.; ZHANG, W.; CHEN, B. L.; XIN, X. Overexpression of CXCR4 is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer. **BMB Reports**, v. 47, n. 1, p. 33-38, jan. 2014.

LI, X.; GUO, H.; DUAN, H.; YANG, Y.; MENG, J.; LIU, J.; WANG, C.; XU, H. Improving chemotherapeutic efficiency in acute myeloid leukemia treatments by chemically synthesized peptide interfering with CXCR4/CXCL12 axis. **Sci Rep**, v. 5, p. 16228, 2015.

LI, J.; GUAN, J.; LONG, X.; WANG, Y.; XIANG, X. mir-1-mediated paracrine effect of cancer-associated fibroblasts on lung cancer cell proliferation and chemoresistance. **Oncol Rep**, v. 35, n. 6, p. 3523-31, 2016.

LIANG, Z.; YOON, Y.; VOTAW, J.; GOODMAN, M. M.; WILLIAMS, L.; SHIM, H. Silencing of CXCR4 Blocks Breast Cancer Metastasis. **Cancer research**, v. 65, n. 3, p. 967-971, 2005.

LIAO, Y. X.; ZHOU, C. H.; ZENG, H.; ZUO, D. Q.; WANG, Z. Y.; YIN, F.; HUA, Y. Q.; CAI, Z. D. The role of the CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in the progression and metastasis of bone sarcomas (Review). **Int J Mol Med**, v. 32, n. 6, p. 1239-46, 2013.

LIAO, Y. X.; FU, Z. Z.; ZHOU, C. H.; SHAN, L. C.; WANG, Z. Y.; YIN, F.; ZHENG, L. P.; HUA, Y. Q.; CAI, Z. D. AMD3100 reduces CXCR4-mediated survival and metastasis of osteosarcoma by inhibiting JNK and Akt, but not p38 or Erk1/2, pathways in in vitro and mouse experiments. **Oncol Rep**, v. 34, n. 1, p. 33-42, 2015.

LIN, F.; ZHENG, S. E.; SHEN, Z.; TANG, L. N.; CHEN, P.; SUN, Y. J.; ZHAO, H.; YAO, Y. Relationships between levels of CXCR4 and VEGF and blood-borne metastasis and survival in patients with osteosarcoma. **Med Oncol**, v. 28, n. 2, p. 649-53, 2011.

LIN, P. P.; PATEL, S. **Bone Sarcoma**. Houston, **Texas Springer US**, p. 215-233, 2013.

LINK, M. P.; GOORIN, A. M.; MISER, A. W.; GREEN, A. A.; PRATT, C. B.; BELASCO, J. B.; PRITCHARD, J.; MALPAS, J. S.; BAKER, A. R.; KIRKPATRICK, J. A.; AYALA, A. G.; SHUSTER, J. J.; ABELSON, H. T.; SIMONE, J. V.; VIETTI, T. J. The Effect of Adjuvant Chemotherapy on Relapse-Free Survival in Patients with Osteosarcoma of the Extremity. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 25, p. 1600-1606, 1986.

LIU, Y.; FENG, X.; ZHANG, Y.; JIANG, H.; CAI, X.; YAN, X.; HUANG, Z.; MO, F.; YANG, W.; YANG, C.; YANG, S.; LIU, X. Establishment and characterization of a novel osteosarcoma cell line: CHOS. **J Orthop Res**, v. 34, n. 12, p. 2116-2125, 2016.

- LOETSCHER, P.; SEITZ, M.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 2, p. 569-577, 1996.
- LONGHI, A.; ERRANI, C.; GONZALES-ARABIO, D.; FERRARI, C.; MERCURI, M. Osteosarcoma in Patients Older Than 65 Years. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 33, p. 5368-5373, 2008.
- LU, Y.; GUAN, G. F.; CHEN, J.; HU, B.; SUN, C.; MA, Q.; WEN, Y. H.; QIU, X. C.; ZHOU, Y. Aberrant CXCR4 and beta-catenin expression in osteosarcoma correlates with patient survival. **Oncol Lett**, v. 10, n. 4, p. 2123-2129, 2015a.
- LU, Y.; HU, B.; GUAN, G. F.; CHEN, J.; WANG, C. Q.; MA, Q.; WEN, Y. H.; QIU, X. C.; ZHANG, X. P.; ZHOU, Y. SDF-1/CXCR4 promotes F5M2 osteosarcoma cell migration by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Med Oncol**, v. 32, n. 7, p. 194, 2015b.
- LUK, F.; YU, Y.; WALSH, W. R.; YANG, J. L. IGF1R-targeted therapy and its enhancement of doxorubicin chemosensitivity in human osteosarcoma cell lines. **Cancer Invest**, v. 29, n. 8, p. 521-32, 2011.
- LUKER, K. E.; LUKER, G. D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. **Cancer Lett**, v. 238, n. 1, p. 30-41, 2006.
- MA, Q.; ZHOU, Y.; MA, B.; CHEN, X.; WEN, Y.; LIU, Y. QIU, X. The clinical value of CXCR4, HER2 and CD44 in human osteosarcoma: A pilot study. **Oncology Letters**, v. 3, p. 797-801, 2012.
- MAO, T. L.; FAN, K. F.; LIU, C. L. Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in treating epithelial ovarian cancer. **Gene Ther**, 2017.
- MARION, A.; DIEUDONNE, F. X.; PATINO-GARCIA, A.; LECANDA, F.; MARIE, P. J.; MODROWSKI, D. Calpain-6 is an endothelin-1 signaling dependent protective factor in chemoresistant osteosarcoma. **Int J Cancer**, v. 130, n. 11, p. 2514-25, 2012.
- MARTELLI, L.; DI MARIO, F.; BOTTI, P.; RAGAZZI, E.; MARTELLI, M.; KELLAND, L. Accumulation, platinum-DNA adduct formation and cytotoxicity of cisplatin, oxaliplatin and satraplatin in sensitive and resistant human osteosarcoma cell lines, characterized by p53 wild-type status. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 1, p. 20-7, 2007.
- MEUCCI, O.; FATATIS, A.; SIMEN, A. A.; BUSHELL, T. J.; GRAY, P. W.; MILLER, R. J. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 24, p. 14500-5, 1998.
- MILLER, B. J.; CRAM, P.; LYNCH, C. F.; BUCKWALTER, J. A. Risk factors for metastatic disease at presentation with osteosarcoma: an analysis of the SEER database. **J Bone Joint Surg Am**, v. 95, n. 13, p. e89, 2013.
- MIRABELLO, L.; TROISI, R. J.; SAVAGE, S. A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer**, v. 115, n. 7, p. 1531-1543, 2009.
- MISHRA, P.; BANERJEE, D.; BEN-BARUCH, A. Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 1, p. 31-9, 2011.

MIURA, K.; UNİYAL, S.; LEABU, M.; ORAVECZ, T.; CHAKRABARTI, S.; MORRIS, V. L.; CHAN, B. M. Chemokine receptor CXCR4-beta1 integrin axis mediates tumorigenesis of osteosarcoma HOS cells. **Biochem Cell Biol**, v. 83, n. 1, p. 36-48, 2005.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M. E.; MCCLANAHAN, T.; MURPHY, E.; YUAN, W.; WAGNER, S. N.; BARRERA, J. L.; MOHAR, A.; VERASTEGUI, E.; ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50-6, 2001.

NAMLOS, H. M.; KRESSE, S. H.; MULLER, C. R.; HENRIKSEN, J.; HOLDHUS, R.; SAETER, G.; BRULAND, O. S.; BJERKEHAGEN, B.; STEEN, V. M.; MYKLEBOST, O. Global gene expression profiling of human osteosarcomas reveals metastasis-associated chemokine pattern. **Sarcoma**, v. 2012, p. 639038, 2012.

NEKLYUDOVA, O.; ARLT, M. J.; BRENNECKE, P.; THELEN, M.; GVOZDENOVIC, A.; KUZMANOV, A.; ROBL, B.; BOTTER, S. M.; BORN, W.; FUCHS, B. Altered CXCL12 expression reveals a dual role of CXCR4 in osteosarcoma primary tumor growth and metastasis. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 142, n. 8, p. 1739-50, 2016.

NERVI, B.; RAMIREZ, P.; RETTIG, M. P.; UY, G. L.; HOLT, M. S.; RITCHEY, J. K.; PRIOR, J. L.; PIWNICA-WORMS, D.; BRIDGER, G.; LEY, T. J.; DIPERSIO, J. F. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. **Blood**, v. 113, n. 24, p. 6206-6214, 2009.

NEVE POLIMENO, M.; IERANO, C.; D'ALTERIO, C.; SIMONA LOSITO, N.; NAPOLITANO, M.; PORTELLA, L.; SCOGNAMIGLIO, G.; TATANGELO, F.; MARIA TROTTA, A.; CURLEY, S.; COSTANTINI, S.; LIUZZI, R.; IZZO, F.; SCALA, S. CXCR4 expression affects overall survival of HCC patients whereas CXCR7 expression does not. **Cell Mol Immunol**, v. 12, n. 4, p. 474-82, 2015.

NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUE, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274-84, 2009.

O'HAYRE, M.; SALANGA, CATHERINA L.; HANDEL, TRACY M.; ALLEN, SAMANTHA J. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. **Biochemical Journal**, v. 409, n. 3, p. 635-649, 2008.

ODA, Y.; YAMAMOTO, H.; TAMIYA, S.; MATSUDA, S.; TANAKA, K.; YOKOYAMA, R.; IWAMOTO, Y.; TSUNEYOSHI, M. CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis. **Mod Pathol**, v. 19, n. 5, p. 738-45, 2006.

OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The epidemiology of osteosarcoma. **Cancer Treat Res**, v. 152, p. 3-13, 2009.

OZOLS, R. F.; BUNDY, B. N.; GREER, B. E.; FOWLER, J. M.; CLARKE-PEARSON, D.; BURGER, R. A.; MANNEL, R. S.; DEGEEST, K.; HARTENBACH, E. M.; BAERGEN, R. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 17, p. 3194-200, 2003.

PALMINI, G.; ZONEFRATI, R.; ROMAGNOLI, C.; ALDINUCCI, A.; MAVILIA, C.; LEONCINI, G.; FRANCHI, A.; CAPANNA, R.; BRANDI, M. L. Establishment and Characterization of a Human

Small Cell Osteosarcoma Cancer Stem Cell Line: A New Possible In Vitro Model for Discovering Small Cell Osteosarcoma Biology. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 304-2198, 2016.

PAOLETTI, S.; BORZI, R.; MAZZETTI, I.; MAGAGNOLI, G.; MACOR, S.; CATTINI, L.; & FACCHINI, A. Human osteosarcoma cells release matrix degrading enzymes in response to chemokine activation. **International Journal of Oncology**, n.18, p. 11-17, 2001.

PARK, H.-R.; SEO, J.; BACCHINI, P.; BERTONI, F.; PARK, Y. Differential Expression of CXCR4 in Conventional High-grade and Low-grade Central Osteosarcoma and Its Prognostic Implications. **J Korean Bone Joint Tumor Soc.** v. 18, n. 1, p. 20-27, 2012.

PARRY, M. C.; LAITINEN, M.; ALBERGO, J.; JEYS, L.; CARTER, S.; GASTON, C. L.; SUMATHI, V.; GRIMER, R. J. Osteosarcoma of the pelvis. **Bone & Joint Journal**, v. 98-B, n. 4, p. 555-563, 2016.

PASELLO, M.; MICHELACCI, F.; SCIONTI, I.; HATTINGER, C. M.; ZUNTINI, M.; CACCURI, A. M.; SCOTLANDI, K.; PICCI, P.; SERRA, M. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. **Cancer Research**, v. 68, n. 16, p. 6661-6668, 2008.

PEREGO, P.; CASERINI, C.; GATTI, L.; CARENINI, N.; ROMANELLI, S.; SUPINO, R.; COLANGELO, D.; VIANO, I.; LEONE, R.; SPINELLI, S.; PEZZONI, G.; MANZOTTI, C.; FARRELL, N.; ZUNINO, F. A Novel Trinuclear Platinum Complex Overcomes Cisplatin Resistance in an Osteosarcoma Cell System. **Molecular Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 528-534, 1999.

PEREIRA, B. P.; ZHOU, Y.; GUPTA, A.; LEONG, D. T.; AUNG, K. Z.; LING, L.; PHO, R. W.; GALINDO, M.; SALTO-TELLEZ, M.; STEIN, G. S.; COOL, S. M.; VAN WIJNEN, A. J.; NATHAN, S. S. Runx2, p53, and pRB status as diagnostic parameters for deregulation of osteoblast growth and differentiation in a new pre-chemotherapeutic osteosarcoma cell line (OS1). **J Cell Physiol**, v. 221, n. 3, p. 778-88, 2009.

PERISSINOTTO, E.; CAVALLONI, G.; LEONE, F.; FONSATO, V.; MITOLA, S.; GRIGNANI, G.; SURRENTI, N.; SANGIOLO, D.; BUSSOLINO, F.; PIACIBELLO, W.; AGLIETTA, M. Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 2 Pt 1, p. 490-7, 2005.

PETRILLI, A. S.; DE CAMARGO, B.; FILHO, V. O.; BRUNIERA, P.; BRUNETTO, A. L.; JESUS-GARCIA, R.; CAMARGO, O. P.; PENA, W.; PERICLES, P.; DAVI, A.; PROSPERO, J. D.; ALVES, M. T.; OLIVEIRA, C. R.; MACEDO, C. R.; MENDES, W. L.; ALMEIDA, M. T.; BORSATO, M. L.; DOS SANTOS, T. M.; ORTEGA, J.; CONSENTINO, E. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 7, p. 1161-8, 2006.

REAUX-LE GOAZIGO, A.; VAN STEENWINCKEL, J.; ROSTENE, W.; MELIK PARSADANIAN, S. Current status of chemokines in the adult CNS. **Prog Neurobiol**, v. 104, p. 67-92, 2013.

REN, Z.; LIANG, S.; YANG, J.; HAN, X.; SHAN, L.; WANG, B.; MU, T.; ZHANG, Y.; YANG, X.; XIONG, S.; WANG, G. Coexpression of CXCR4 and MMP9 predicts lung metastasis and poor prognosis in resected osteosarcoma. **Tumour Biol**, 2015.

RICCI, M. S.; ZONG, W.-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **The oncologist**, v. 11, n. 4, p. 342-57, 1 abr. 2006.

RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **J Cancer Res Ther**, v. 10, n. 4, p. 853-8, 2014.

RODRIGUEZ-GALINDO, C.; DAW, N. C.; KASTE, S. C.; MEYER, W. H.; DOME, J. S.; PAPPO, A. S.; RAO, B. N.; PRATT, C. B. Treatment of refractory osteosarcoma with fractionated cyclophosphamide and etoposide. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 24, n. 4, p. 250-5, 2002.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The Biology of Chemokines and their Receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 217-242, 2000.

RUSSINOFF, S.; MIRAN, S.; GOWDA, A. L.; LUCAS, P. A. Osteosarcoma cells differentiate into phenotypes from all three dermal layers. **Clin Orthop Relat Res**, v. 469, n. 10, p. 2895-904, 2011.

SANTOS CAVALCANTI, A.; MEOHAS, W.; RIBEIRO, G. DE O.; DE SA LOPES, A. C.; GHOLAMIN, S.; RAZAVI, M.; HANAE KASAI BRUNSWICK, T.; AVAN, A.; MATHEUS GUIMARAES, J. A.; LEITE DUARTE, M. E.; KAHN, S. A. Patient-derived osteosarcoma cells are resistant to methotrexate. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184891, 2017.

SARVAIYA, P. J.; GUO, D.; ULASOV, I.; GABIKIAN, P.; LESNIAK, M. S. Chemokines in tumor progression and metastasis. **Oncotarget**, v. 4, n. 12, p. 2171-85, 2013.

SCHAJOWICZ. **Neoplasias Ósseas e Lesões Pseudotumorais**. Springer. ISBN: 9788573094095, p. 650, 2000.

SCHIOPPA, T.; URANCHIMEG, B.; SACCANI, A.; BISWAS, S. K.; DONI, A.; RAPISARDA, A.; BERNASCONI, S.; SACCANI, S.; NEBULONI, M.; VAGO, L.; MANTOVANI, A.; MELILLO, G.; SICA, A. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. **J Exp Med**, v. 198, n. 9, p. 1391-402, 2003.

SERRA, M.; REVERTER-BRANCHAT, G.; MAURICI, D.; BENINI, S.; SHEN, J. N.; CHANO, T.; HATTINGER, C. M.; MANARA, M. C.; PASELLO, M.; SCOTLANDI, K.; PICCI, P. Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells. **Ann Oncol**, v. 15, n. 1, p. 151-60, 2004.

SHARMA, R.; SUNG, S.-S. J.; GASKIN, F.; FU, S. M.; JU, S.-T. A Novel Function of IL-2: Chemokine/Chemoattractant/Retention Receptor Genes Induction in Th Subsets for Skin and Lung Inflammation. **Journal of Autoimmunity**, v. 38, n. 4, p. 322-331, 2012.

SHAW, R. J.; CANTLEY, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. **Nature**, v. 441, p. 424, 2006.

SHIELS, M. S.; KATKI, H. A.; FREEDMAN, N. D.; PURDUE, M. P.; WENTZENSEN, N.; TRABERT, B.; KITAHARA, C. M.; FURR, M.; LI, Y.; KEMP, T. J.; GOEDERT, J. J.; CHANG, C. M.; ENGELS, E. A.; CAPORASO, N. E.; PINTO, L. A.; HILDESHEIM, A.; CHATURVEDI, A. K. Cigarette smoking and variations in systemic immune and inflammation markers. **J Natl Cancer Inst**, v. 106, n. 11, 2014.

SINGH, S.; SRIVASTAVA, S. K.; BHARDWAJ, A.; OWEN, L. B.; SINGH, A. P. CXCL12-CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells: a novel target for therapy. **Br J Cancer**, v. 103, n. 11, p. 1671-9, 2010.

SILVER, D. P.; RICHARDSON, A. L.; EKLUND, A. C.; WANG, Z. C.; SZALLASI, Z.; LI, Q.; JUUL, N.; LEONG, C.-O.; CALOGRIAS, D.; BURAIMOH, A.; FATIMA, A.; GELMAN, R. S.; RYAN, P. D.; TUNG, N. M.; DE NICOLO, A.; GANESAN, S.; MIRON, A.; COLIN, C.; SGROI, D. C.; ELLISEN, L. W.; WINER, E. P.; GARBER, J. E. Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 7, p. 1145-1153, 2010.

SLEIGHTHOLM, R. L.; NEILSEN, B. K.; LI, J.; STEELE, M. M.; SINGH, R. K.; HOLLINGSWORTH, M. A.; OUPICKY, D. Emerging roles of the CXCL12/CXCR4 axis in pancreatic cancer progression and therapy. **Pharmacol Ther**, 2017.

SOTTNIK, J. L.; CAMPBELL, B.; MEHRA, R.; BEHBAHANI-NEJAD, O.; HALL, C. L.; KELLER, E. T. Osteocytes serve as a progenitor cell of osteosarcoma. **J Cell Biochem**, v. 115, n. 8, p. 1420-9, 2014.

STUMM, R. K.; ZHOU, C.; ARA, T.; LAZARINI, F.; DUBOIS-DALCQ, M.; NAGASAWA, T.; HOLLT, V.; SCHULZ, S. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. **J Neurosci**, v. 23, n. 12, p. 5123-30, 2003.

SUN, X.; CHENG, G.; HAO, M.; ZHENG, J.; ZHOU, X.; ZHANG, J.; TAICHMAN, R. S.; PIENTA, K. J.; WANG, J. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 4, p. 709-22, 2010.

TIAN, J.; LI, X.; SI, M.; LIU, T.; LI, J. CD271+ Osteosarcoma Cells Display Stem-Like Properties. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e98549, 2014.

THORN, CO; MARSH, S; HERNANDEZ-BOUSSARD, T; MCLEOD, H; KLEIN, T; ALTMANA, R. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, 2012.

TRAMMELL, R. A.; JOHNSON, C. B.; BARKER, J. R.; BELL, R. S.; ALLAN, D. G. Multidrug resistance-1 gene expression does not increase during tumor progression in the MGH-OGS murine osteosarcoma tumor model. **J Orthop Res**, v. 18, n. 3, p. 449-55, 2000.

UNNI, K. K.; INWARDS, C. Y. **Dahlin's bone tumors**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 410, 2013.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, ROBERT A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-292, 2011.

WANG, J.; LOBERG, R.; TAICHMAN, R. S. The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, n. 4, p. 573-87, 2006.

WHELAN, J. S.; BIELACK, S. S.; MARINA, N.; SMELAND, S.; JOVIC, G.; HOOK, J. M.; KRAILO, M.; ANNINGA, J.; BUTTERFASS-BAHLOUL, T.; BOHLING, T.; CALAMINUS, G.; CAPRA, M.; DEFFENBAUGH, C.; DHOOGE, C.; ERIKSSON, M.; FLANAGAN, A. M.; GELDERBLUM, H.; GOORIN, A.; GORLICK, R.; GOSHEGER, G.; GRIMER, R. J.; HALL, K. S.; HELMKE, K.; HOGENDOORN, P. C.; JUNDT, G.; KAGER, L.; KUEHNE, T.; LAU, C. C.; LETSON, G. D.; MEYER, J.; MEYERS, P. A.; MORRIS, C.; MOTTIL, H.; NADEL, H.; NAGARAJAN, R.; RANDALL, R. L.; SCHOMBERG, P.; SCHWARTZ, R.; TEOT, L. A.; SYDES, M. R.; BERNSTEIN, M. EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. **Ann Oncol**, v. 26, n. 2, p. 407-14, 2015.

WÜRTH, R.; BAJETTO, A.; HARRISON, J. K.; BARBIERI, F.; FLORIO, T. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 144, 2014.

XIE, S.; TU, Z.; XIONG, J.; KANG, G.; ZHAO, L.; HU, W.; TAN, H.; TEMBO, K. M.; DING, Q.; DENG, X.; HUANG, J.; ZHANG, Q. CXCR4 promotes cisplatin-resistance of non-small cell lung cancer in a CYP1B1-dependent manner. **Oncol Rep**, v. 37, n. 2, p. 921-928, 2017.

YIN, X. X.; CHEN, Z. Q.; DANG, G. T.; GUO, Z. Q.; MA, Q. J. Biological characteristics of human immortalized osteoblast cell line induced by human telomerase reverse transcriptase gene. 3550-3551, 2003.

YU, D.; LV, F.; ZHANG, J.; LI, H. SDF-1 Expression is Associated with Poor Prognosis in Osteosarcoma. **Ann Clin Lab Sci**, v. 46, n. 5, p. 508-14, 2016.

ZENG, Z.; XI SHI, Y.; SAMUDIO, I. J.; WANG, R.-Y.; LING, X.; FROLOVA, O.; LEVIS, M.; RUBIN, J. B.; NEGRIN, R. R.; ESTEY, E. H.; KONOPLEV, S.; ANDREEFF, M.; KONOPLEVA, M. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. **Blood**, v. 113, n. 24, p. 6215-6224, 2009.

ZHANG, H.; WU, H.; GUAN, J.; WANG, L.; REN, X.; SHI, X.; LIANG, Z.; LIU, T. Paracrine SDF-1 α signaling mediates the effects of PSCs on GEM chemoresistance through an IL-6 autocrine loop in pancreatic cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 5, p. 3085-3097, 2015.

ZHAO, H.; GUO, L.; ZHAO, H.; ZHAO, J.; WENG, H.; ZHAO, B. CXCR4 over-expression and survival in cancer: A system review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 6, n. 7, p. 5022-5040, 2015.

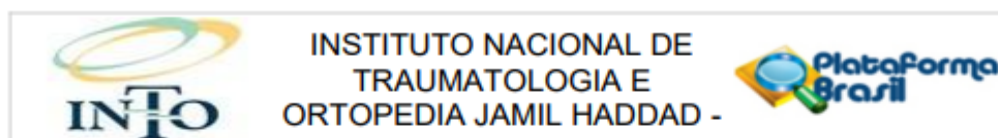
ZINSER, J. W.; CASTAÑEDA, N.; ALFEIRÁN, A.; MAAFS, E.; DURÁN, M.; FLORES, G.; GAONA, R.; VICENCIO, L. Treatment of osteosarcoma with Cisplatin and Doxorubicin either as Adjuvant or Neo-Adjuvant chemotherapy. In: BANZET, P.; HOLLAND, J. F.; et al (Ed.). **Cancer Treatment An Update. Springer Paris**, p.565-567, 1994.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O.; NOMIYAMA, H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. **Genome Biol**, v. 7, n. 12, p. 243, 2006.

ZLOTNIK, A.; BURKHARDT, A. M.; HOMEY, B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 597, 2011.

ZOU, C.; WANG, J.; SHEN, J.; HUANG, G.; JIN, S.; YIN, J.-q; GUO, Q.; LI, H.; LUO, L; ZHANG, M. and ZHANG, L. Establishment and characteristics of two syngeneic human osteosarcoma cell lines from primary tumor and skip metastases1. **Acta Pharmacologica Sinica**, n. 29, p. 325–332, 2008.

ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INTO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O PAPEL DE CXCR4 E CD90 NA PROGRESSÃO DO OSTEOSSARCOMA E NA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA

Pesquisador: Gabriele de Oliveira Ribeiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56018516.4.0000.5273

Instituição Proponente: MINISTERIO DA SAUDE

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA SAUDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.560.535

Apresentação do Projeto:

Vários trabalhos já evidenciaram algumas moléculas atuantes no processo de metástase de vários tipos de câncer, incluindo o osteossarcoma, como a quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4. Além disso, recentemente foi apontado que CD90 pode ser considerado um potencial marcador de células-tronco tumorais em diversas neoplasias, entretanto, pouco ainda se sabe sobre a ligação de CD90 com o osteossarcoma. O presente estudo tem como objetivo avaliar o papel do CXCR4 e do CD90 na progressão do osteossarcoma e na resposta ao tratamento com quimioterápicos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o papel do CXCR4 e do CD90 na progressão do osteossarcoma, bem como na resposta ao tratamento com quimioterápicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto obedece aos critérios éticos e técnicos exigidos pelo CEP e pela instituição proponente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão de acordo com as exigências.

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



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -



Continuação do Parecer: 1.560.535

Recomendações:

Seguir com ética na coleta das amostras e dos dados demográficos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto excelente. Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_699996.pdf	03/05/2016 21:30:57		Aceito
Declaração de Pesquisadores	201604261514.pdf	03/05/2016 21:30:07	Gabriele de Oliveira Ribeiro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	201604261513.pdf	03/05/2016 21:29:51	Gabriele de Oliveira Ribeiro	Aceito
Outros	201604261512.pdf	03/05/2016 21:29:26	Gabriele de Oliveira Ribeiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoGabrieleRibeiro.doc	03/05/2016 21:27:49	Gabriele de Oliveira Ribeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeAssentimentodomenor.doc	03/05/2016 21:23:26	Gabriele de Oliveira Ribeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmenoridadeCXCR4.doc	03/05/2016 21:22:55	Gabriele de Oliveira Ribeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLECXCR4.doc	03/05/2016 21:22:36	Gabriele de Oliveira Ribeiro	Aceito

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.int@info.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -



Continuação do Parecer: 1.560.535

Justificativa de Ausência	TCLECXCR4.doc	03/05/2016 21:22:36	Gabriele de Oliveira Ribeiro	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostocep.pdf	03/05/2016 21:22:00	Gabriele de Oliveira Ribeiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 25 de Maio de 2016

Assinado por:
Eduardo Branco de Sousa
(Coordenador)

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

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Você está sendo convidado para participar da pesquisa O Papel de CXCR4 e CD90 na Progressão do Osteossarcoma e na Resposta à Quimioterapia. Você foi selecionado porque, de acordo com os resultados de alguns exames que foram realizados, você tem uma lesão no osso que pode ser um Osteossarcoma (OS). A confirmação do diagnóstico de OS 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. Se você autorizar, uma das amostras retiradas no momento da biópsia e/ou da cirurgia será utilizada na pesquisa. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O objetivo deste estudo é estudar o tumor que você pode ser portador (Osteossarcoma).

Esta pesquisa não vai interferir no resultado da sua biópsia ou no seu tratamento. 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. Não há risco adicional se você participar desta pesquisa.

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 Osteossarcoma.

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 Câncer

(CEP-INCA), pelo comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (CEP-INTO) e pela equipe de pesquisadores envolvidos.

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

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Pesquisador responsável: nome do pesquisador

Contato com o pesquisador responsável:

Endereço: Divisão de Pesquisa, Anexo IV, INTO. Avenida Brasil, 500, São Cristóvão, Rio de Janeiro, RJ. Telefone: (21) 2134-5300 / (21) 98662-3174.

e-mail: gabrielribeiro.biologa@gmail.com

Responsável pela aplicação do termo

Assinatura e carimbo

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

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

cep.into@into.saude.gov.br

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

Participante da pesquisa: _____

Assinatura do participante da pesquisa

Apêndice A – Passagens das culturas de células usadas no estudo

Tabela 7. Tabela de passagens das culturas durante os experimentos.

Experimento	OS1	OS2	MG-63*	SAOS-2*
Análise de duplicação populacional	2-8	9-17	2-10	1-6
MTT	4-13	9-21	9-12	3-6
Rt-qPCR	6-13	11-17	5-9	2-6
Imunofluorescência	12	17	1	3
Citometria de Fluxo	12-13	11-14	2-11	2-6
ELISA	12-14	17-25	1-5	3-6

**Contagens de passagens das linhagens realizadas a partir do descongelamento*