OSTEOSSARCOMA: NOVAS TERAPÊUTICAS

Ana Rita de Jesus Lopes Ferreira[1]

[1] Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Endereço: Bairro Santa Lúzia, lote 20 | 3780-460 Mogofores

Ritah.jlferreira@gmail.com

Trabalho escrito pelo Acordo Ortográfico de Língua Portuguesa de 2009

ÍNDICE

Lista de abreviaturas e acrónimos……5

Metodologia…….6

Resumo……7

Palavras-chave……..7

Abstract……8

Keywords…….8

Introdução……9

Osteossarcoma

I. Definição e subtipos……....12

II. Epidemiologia…….13

III. Etiologia e Genética……15

IV. Apresentação clínica……16

V. Diagnóstico e Diagnóstico Diferencial……17

VI. Terapias correntes……19

- Papéis da Cirurgia e Quimioterapia na terapêutica multimodal……20

- Quimioterapia multimodal……20

- Terapia do OS localizado……..24

- Terapia do OS metastático e recidivante……..25

- Radioterapia……..27

VII. Follow-up……27

VIII. Terapias Emergentes……28

1- Agentes que têm como alvos factores ligados ao osso/fenótipo mesenquimal……..30

1.1- Fármacos que têm como alvo os recetores tirosina-quinase (RTQs)……..30

1.2- Agentes que alteram o microambiente……..37

2- Agentes direcionados para impedir o processo metastático…….41

2.1- Antagonistas da Tirosina-Quinase Scr…….41

2.2- Inibidores do VEGF……43

2.3- Agentes Imunomodeladores…….45

3- Agentes para combater as lesões metastáticas……47

3.1- Inibidores do mROT…….47

4- Agentes para superar a resistência à Quimioterapia……49

4.1- Novos antifolatos……49

4.2- Gemcitabina e Docetaxel……51

4.3- Novos mecanismos de libertação……...52

IX. Conclusão……70

X. Referências Bibliográficas……...72

XI. Anexos……78

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

CAP – proteína ativadora de catabólito (catabolite activator protein)

COG - Children's Oncology Group

DHFR - Dihydrofolate reductase (di-hidrofolato redutase)

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DOX- Doxorrubicina

FA – Fosfatase Alcalina

HER2 - Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 (receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano)

ICAM-1 - Intercellular Adhesion Molecule 1 (molécula 1 de adesão intercelular)

IGF - Insulin-like growth factor (Fator de Crescimento semelhante à Insulina)

IGF-1 - Insulin-like growth factor 1 (Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1)

IGF-1R – Insulin-like growth factor Receptor (Recetor do Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1)

IGFBP - Insulin-like growth factor-binding protein (Proteína de ligação do Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1)

IGFBP-rP - Insulin-like growth factor-binding protein related proteins

LDH - lactato desidrogenase

LFA-1 - leukocyte function-associated antigen-1 (antígeno 1 associado à função leucocitária)

MAPK - Mitogen-activated protein (Proteína Mitogénica Ativada)

MTX – metotrexato

OPG – Osteoprotegerina

OS - Osteossarcoma

PDGF - platelet-derived growth factor (fator de crescimento derivado das plaquetas)

PTPP - Pedriatic Preclinical Testing Program

QT – quimioterapia

RFC – reduced folate carrier (transportador de folato reduzido)

RNA - Ribonucleic acid (Ácido Ribonucleico)

RT – radioterapia

RTQ – Recetor Tirosina Quinase

SARC - Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration

SLE – Sobrevida livre de eventos

TNF-α – tumor necrosis factor α (fator de necrose tumoral α)

TOP2 – Topoisomerase II

TSG - taxa de sobrevida global

TSLE – taxa de sobrevida livre de eventos

VEGF - Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento vascular endotelial)

METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão exaustiva com base na literatura mais recente, disponível na base de dados da PubMed, utilizando os seguintes termos: osteossarcoma, novas terapêuticas, quimioterapia, radioterapia, mifamurtide.

RESUMO

O osteossarcoma é o tumor ósseo maligno primário mais comum em crianças e adolescentes. É a segunda maior causa de morte relacionada com o cancro nestes grupos etários, principalmente devido ao desenvolvimento de metástases, muitas vezes fatais, geralmente nos pulmões. Apesar de uma gestão terapêutica agressiva, incluindo cirurgias de salvamento de membros e dose intensas de quimioterapia sistémica, 30-40% dos pacientes irá sofrer de doença metastática progressiva no prazo de 5 anos após o diagnóstico. Assim, novas drogas eficazes e outras formas de terapia são necessárias. O objetivo deste artigo de revisão consiste em abordar o tratamento atual do osteossarcoma de alto grau, ou "convencional", e destacar as modalidades terapêuticas emergentes no horizonte. Este artigo incidirá sobre novas abordagens terapêuticas, incluindo agentes que têm como alvos factores ligados ao osso / fenótipo mesenquimal, agentes direccionados para impedir o processo metastático e agentes cujo alvo são as lesões metastáticas já estabelecidas. Num outro grupo, estão incluídos os fármacos que se encontram em desenvolvimento com o objetivo de superar a resistência à quimioterapia atual. Dos fármacos abordados, foi destacado o Mifamurtide por ter sido o primeiro novo agente a ser aprovado para o tratamento do OS em mais de duas décadas. No tratamento de doentes recentemente diagnosticados com osteossarcoma, a adição de mifamurtide foi associada a uma redução do risco de morte em um terço.

PALAVRAS-CHAVE

Osteossarcoma, Novos Agentes, Quimioterapia, Mifamurtide

ABSTRACT

Osteosarcoma is the most common malignant primary bone tumor in children and adolescents. It is the second highest cause of cancer-related death in these age groups, mainly due to development of often fatal metastasis, usually in the lungs. Despite aggressive therapeutic management, including limb-sparing surgeries and dose-intense systemic chemotherapies, 30-40% of patients will experience progressive metastatic disease within 5 years of diagnosis. Thus, new effective drugs and other forms of therapy are needed.

The objective of this review is to cover the current treatment of high-grade, or "conventional", osteosarcoma, and highlight the emerging therapeutic modalities on the horizon. This article will focus on novel therapeutic approaches, including agents that act against factors related to bone / mesenchymal phenotype, agents to preventing the metastatic process and agents that act against established metastatic lesions. In another group, are included drugs that are being developed in order to overcome resistance to current chemotherapy. Of all the drugs covered, Mifamurtide was highlighted because has been the first new agent to be approved for the treatment of OS in more than two decades. In the treatment of newly diagnosed patients with osteosarcoma, adding mifamurtide was associated with a reduced risk of death by one third.

KEYWORDS

Osteosarcoma, New Agents, Chemotherapy, Mifamurtide

INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo primário maligno de origem mesenquimal com origem na linhagem osteoblástica. É um tumor caraterizado pela produção de osso imaturo ou tecido osteóide pelas células neoplásicas [1, 2]. O OS é a neoplasia primária do osso, não-hematopoiética, mais comum diagnosticada em adolescentes, sendo a segunda principal causa de morte relacionada com cancro nesta faixa etária [3].

Os tumores do osso encontram-se entre os mais raros tipos de neoplasias [4]. Por ser uma doença rara, o OS merece a designação de “ultra orphan disease” [5]. Por ano, nos Estados Unidos da América, são diagnosticados cerca de mil novos casos de OS, assim como na Europa [5]. A incidência do OS clássico é de 3 por milhão, por ano, tendo aumentado cerca de 1,4% por ano nos últimos 25 anos [6]. Representa 0,2% de todos os tumores malignos [7].

Na década de 20, um famoso cirurgião de renome internacional resumiu um encontro científico sobre sarcomas ósseos, reconhecendo "Se vocês não operarem, eles morrem; se vocês operarem, morrem na mesma." [8]. Até aos anos 70, foi mantida esta mesma perspetiva, pois a cirurgia era o único tratamento oferecido a estes pacientes. Hoje sabe-se que, para um tratamento eficaz, é requerido um controlo tanto da doença local, como das metástases à distância. Com base nesse conhecimento, a sobrevida a longo prazo dos pacientes com OS localizado aumentou substancialmente de 10-20%, antes da década de 80, tendo atingindo um plateau de 50-60%, de 1985 em diante, devido à introdução de agentes de quimioterapia nos anos 70. No entanto, desde então,

nenhum progresso significativo adicional foi observado no que diz respeito à taxa de sobrevida [3, 9].

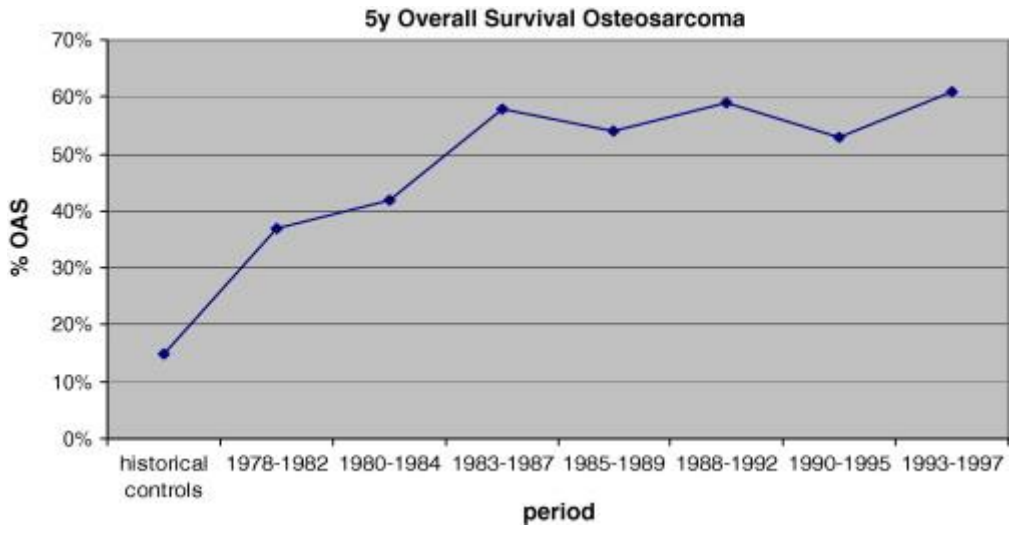

Figura 1 – Dados relativos à sobrevida aos 5 anos (% sobrevida global) durante períodos subsequentes. Dados de Magnani (n = 3502) e Stiller (n = 1324). Sobrevida global desde 1970, quando foi introduzida a quimioterapia, adicionada às cirurgias (controlos históricos).

Os protocolos *standard* utilizados no tratamento do osteossarcoma, baseiam-se numa terapia multidisciplinar que inclui quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante), seguida de cirurgia de ressecção do tumor, sendo esta última a forma predileta para controlar localmente o tumor, e quimioterapia pós-operatória (adjuvante) [5]. Considerando que as amputações eram, no passado, a forma usual de alcançar o controlo local, os avanços nas técnicas cirúrgicas e as melhorias feitas na tecnologia de

articulações artificiais e substituições ósseas, têm permitido à maioria dos pacientes uma resseção de salvamento do membro afectado [10].

A doxorrubicina, cisplatina, metotrexato em altas doses e a ifosfamida são os agentes de quimioterapia mais utilizados, e com maior eficácia, atualmente. A combinação de duas, ou mais, destas drogas citotóxicas (em associação com cirurgia) alcança taxas de sobrevida livre de eventos aos 3 e 5 anos de 60-70% em pacientes que apresentam doença localizada, e 20-30% em pacientes que se apresentam com doença metastática [11].

A doença metastática clinicamente detetável no momento do diagnóstico, em pacientes com osteossarcoma de alto grau, prevê um pobre resultado, com taxas de sobrevivência a longo prazo, entre 10% e 40%. Estes dados sugerem que a potente quimioterapia convencional é inadequada para combater todas as metástases. Portanto, para melhorar a sobrevida destes pacientes com osteossarcoma, torna-se imperativo desenvolver novas terapias contra este tumor.

Neste sentido, o presente artigo resume os novos alvos terapêuticos em desenvolvimento para o osteossarcoma, que se encontram atualmente em ensaios clínicos.

Os novos agentes terapêuticos que serão revistos neste artigo, encontram-se agrupados em três categorias consoante os alvos a atingir e a fase de evolução tumoral, ou seja: agentes que têm como alvos factores ligados ao osso / fenótipo mesenquimal, agentes direccionados para impedir o processo metastático, agentes cujo alvo são as lesões metastáticas já estabelecidas e agentes para superar a resistência à Quimioterapia.

OSTEOSSARCOMA

I. DEFINIÇÃO E SUBTIPOS

O osteossarcoma (OS) é um tumor maligno primário do osso que deriva do mesenquima primitivo formador de osso e que se caracteriza pela produção de tecido osteóide ou osso imaturo pelo estroma de células malignas proliferativas [2, 8]. Mais raramente o OS pode surgir dos tecidos moles [2].

A classificação histológica da Organização Mundial de Saúde de tumores ósseos separa os osteossarcomas em central (medular) e de superfície (periférico) e reconhece um número de subtipos em cada grupo (Tabela 1) [12].

O subtipo patológico mais comum é o osteossarcoma convencional de alto grau. É responsável por 80-90% de todos os osteossarcomas e caracteriza-se por áreas de necrose, mitoses atípicas e cartilagem maligna [2]. E os seus subtipos mais frequentes são o osteossarcoma osteoblástico, condroblástico e fibroblástico [6]. E será sobre este subtipo, o osteossarcoma convencional de alto grau, que este artigo se irá debruçar.

Tabela 1 - Classificação histológica dos Osteossarcomas da Organização Mundial de Saúde de tumores ósseos [12].

Central (Medular)
1. Osteossarcoma convencional de alto grau **2. Osteossarcoma telangiectásico** **3. Osteossarcoma intraósseo bem-diferenciado (de baixo grau)** **4. Osteossarcoma de pequenas células**
De Superfície (Periférico)
1. Osteossarcoma parosteal (justacortical) bem diferenciado (baixo grau) **2. Osteossarcoma periosteal de baixo/intermédio grau** **3. Ostessarcoma superficial de alto-grau**

II. EPIDEMIOLOGIA

O OS clássico ou convencional representa aproximadamente 15% de todas as biópsias analisadas de tumores ósseos primários. Entre os tumores ósseos malignos primários, ocupa o segundo lugar em frequência após o mieloma múltiplo [2]. A incidência do OS clássico é de 3 por milhão, por ano, tendo aumentado cerca de 1,4% por ano nos últimos 25 anos [6, 13]. Representa 0,2% de todos os tumores malignos [7].

Em cerca de 75% dos casos, os pacientes com osteossarcoma têm entre 15 e 25 anos de idade. O sexo masculino é o mais frequentemente afetado do que o feminino (razão 1,5:1) [2]. As taxas de osteossarcoma em meninas até aos 13 anos são superiores

em cerca de 30% em relação aos rapazes. No grupo entre os 15 e 24 anos de idade, a taxa masculina supera a taxa feminina em cerca de 140% [6]. O osteossarcoma raramente ocorre em pacientes com menos de 6 anos ou mais de 60. Os tumores observados em idades avançadas desenvolvem-se, geralmente, secundariamente a radiação, doença de Paget ou condrossarcomas desdiferenciados [2].

O OS ocorre em qualquer osso do corpo. Entre os pacientes jovens, o local mais comum é a metáfise dos ossos longos. Cerca de metade de todos os osteossarcomas têm origem na região em torno do joelho [6]. O local mais frequente primário é o fémur distal, seguido da tíbia proximal e úmero proximal [2, 8]. Outros sítios primários em ordem decrescente de frequência são a pélvis, a mandíbula, a fíbula e as costelas. O osteossarcoma da cabeça e do pescoço é mais provável que seja de baixo grau, enquanto o do esqueleto apendicular ocorre mais em pacientes mais idosos [6].

O pico de incidência do osteossarcoma ocorre na segunda década de vida durante o surto de crescimento da adolescência, um fato que sugere uma relação entre o crescimento ósseo rápido e o desenvolvimento desta neoplasia. Diversas linhas de evidência têm sido citadas para apoiar esta relação [8]. Primeiro, os pacientes com OS são mais altos do que os indivíduos da sua idade [14]. Segundo, como já referido, os osteossarcomas ocorrem numa idade mais precoce em meninas do que em meninos, o que corresponde à idade mais avançada do esqueleto e a um surto de crescimento mais precoce nas meninas [8]. Terceiro, o osteossarcoma tem uma predileção pelas metáfises dos ossos que crescem mais rapidamente em adolescentes (fémur, tíbia e úmero), e os tumores do úmero tendem a ocorrer numa idade mais jovem do que os tumores do fémur e da tíbia, o que corresponde a um surto de crescimento mais precoce do úmero

[14]. Assim, o tumor parece ocorrer mais frequentemente nos locais de maior crescimento do osso. Isto levou à especulação de que os tumores ósseos surgem de uma aberração do processo normal de crescimento do osso em comprimento e remodelação [14]; células de rápida proliferação podem ser particularmente susceptíveis a agentes oncogénicos, erros mitóticos ou outros eventos que conduzem à transformação neoplásica [8].

III. ETIOLOGIA E GENÉTICA

A etiologia do osteossarcoma é desconhecida. A origem viral foi sugerida pela evidência de que os sarcomas ósseos podem ser induzidos, em animais seleccionados, por vírus ou extractos livres de células de osteossarcomas humanos [2]. O único agente ambiental conhecido que causa osteossarcoma humano é a radiação ionizante. A radiação está implícita em aproximadamente 3% dos osteossarcomas [8]. O aumento da incidência de OS induzido por radiação está relacionado com uma maior sobrevida após a irradiação primária.

Várias famílias foram descritas com vários membros que desenvolveram osteossarcoma, sugerindo uma predisposição genética para este tumor [15]. Até agora, a predisposição genética mais forte é encontrada em pacientes com retinoblastoma hereditário. Nos pacientes com retinoblastoma, a incidência do OS é 500 vezes maior do que na população em geral [7]. Uma série de rastreios de crianças com osteossarcoma revelou que cerca de 3% a 4% possuem uma mutação germinativa contitutional em p53.

A maioria dos casos de mutações germinativas do gene p53 representa pacientes com história familiar sugestiva de síndrome de Li-Fraumeni [15].

IV. APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A maioria dos pacientes que apresenta um sarcoma osteogénico das extremidades queixa-se de dor, antes do aparecimento da tumefacção dos tecidos moles. Isto é verdade para qualquer tumor ósseo primário, porque o estiramento do periósteo geralmente provoca dor antes que o tumor se torne percetível [15]. A dor também pode resultar do enfraquecimento do osso, com o desenvolvimento de fraturas de stresse. A dor que ocorre durante a noite ou que não está relacionada com a atividade deve alertar o médico para a possibilidade de um problema subjacente [16]. O desenvolvimento de dor severa súbita anuncia uma fratura patológica, que é um achado raro em pacientes adultos. Até 15% dos pacientes pediátricos apresentam uma fractura patológica [2].

A segunda queixa mais comum é o inchaço ou uma massa palpável, que se relaciona com a massa dos tecidos moles. Embora cerca de 90% dos osteossarcomas revelem extensão dos tecidos moles, apenas alguns se queixam de inchaço. Ao exame físico podemos encontrar aumento do volume local, dor, calor local e limitação na movimentação da articulação comprometida.

Sintomas sistémicos como perda de peso, palidez, febre e anorexia são muito raros. Aproximadamente 15-20% dos pacientes com osteossarcoma apresentam doença macrometastática visível. A maior parte destas lesões metastáticas são encontradas nos

pulmões, embora uma pequena fração de pacientes apresente metástases ósseas, com ou sem metástases pulmonares concomitantes.

Os exames laboratoriais são, usualmente, normais, com a exceção de uma elevação da LDH sérica ou da FA, ou ambas [16].

V. DIAGNÓSTICO E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O primeiro exame complementar de diagnóstico a realizar deve ser uma radiografia simples que revela uma lesão destrutiva com bordos indistintos, que gradualmente destrói a cortical óssea e apresenta invasão extra-óssea. A reação periosteal está frequentemente presente e tem uma aparência de "raios de sol". Pode haver também o conhecido "triângulo de Codman", que representa o levantamento do periósteo, ocasionado pelo crescimento do tumor. No triângulo há osso neoformado normal [2, 8]. Radiograficamente, os osteossarcomas podem ser osteoescleróticos em aproximadamente 45% dos casos, puramente osteolíticos em 30% e uma mistura de esclerótico e lítico nos restantes 25%. Tais alterações radiográficas refletem o grau de mineralização e ossificação em vez de a quantidade de osteóide encontrada no tumor, porque substâncias osteóides não calcificadas não produzem radiopacidade mesmo quando presentes em grandes quantidades [8].

A ressonância magnética do local primário é geralmente o próximo estudo radiográfico a ser realizado. A RM é óptima para a avaliação da extensão intramedular e extraóssea do tumor e a sua relação com as estruturas neurovasculares. A avaliação dessas relações é importante no planeamento de uma biópsia e potencial cirurgia de

salvamento de membro. A tomografia computadorizada torácica é um estudo importante para avaliar as metástases pulmonares, o local mais comum de metástases [8].

A cintigrafia óssea de radionuclídeos também é indicada na avaliação diagnóstica inicial para definir a extensão do tumor primário e para avaliar a existência de metástases ósseas, o segundo local mais comum de metástases [2]. A tomografia por emissão de positrões (PET) está a ser avaliada para a resposta ao tratamento e no acompanhamento de recidivas suspeitas.

O diagnóstico definitivo e plano de tratamento devem ser sempre baseados numa biópsia. A biópsia pode ser feita tanto com uma agulha, ou como uma biópsia incisional. É importante que o plano de biópsia seja realizado por um cirurgião com experiência em oncologia musculoesquelética para evitar comprometer potenciais cirurgias de salvação de membros. O trajeto da biópsia deve ser realizado de forma a poder ser excisado em bloco com a ressecção cirúrgica definitiva [16] .

Normalmente o diagnóstico de OS é fácil. Contudo, os estudos de imagem quando realizados isoladamente podem, ocasionalmente, induzir em erro. Osteossarcomas com lesões puramente osteolíticas podem assemelhar-se a histiocitomas fibrosos malignos, fibrossarcomas ou tumores de células gigantes. Um OS com localização diafisária pode sugerir um sarcoma de Ewing ou linfoma [17]. Histologicamente, o OS tem que ser distinguido de um histiocitoma fibroso maligno ou um fibrossarcoma pouco diferenciado. Expecionalmente, histologicamente um OS assemelha-se a um osteoblastoma ou quisto ósseo aneurismático [17].

Fatores adversos de prognóstico incluem: localização axial do tumor ou proximalmente numa extremidade, grande volume tumoral, níveis séricos elevados de LDH ou FA e, principalmente, metástases primárias detetáveis e má resposta histológica à quimioterapia pré-operatória [18].

VI. TERAPIAS CORRENTES

Anteriormente à década de 70, o OS era uma doença com um desfecho trágico, com uma taxa de sobrevida global aos 5 anos entre os 10-20% [4]. Aproximadamente 80% dos pacientes desenvolvia recidiva local ou doença metastática, numa média de dez meses após a cirurgia, e o tempo médio até à morte após o desenvolvimento das metástases era 6 meses. Estes factos sugeriam que, na altura do diagnóstico, um grande número de pacientes tinha micrometástases clinicamente indetetáveis pelas técnicas de imagiologia então disponíveis. No início dos anos 70, houve interesse em usar quimioterapia adjuvante em doentes recentemente diagnosticados com osteossarcoma não metastático, com o objetivo de impedir o grande número de recidivas precoces. O desenvolvimento das técnicas de salvamento de membros levaram ao uso de quimioterapia pré-operatória, e a era da quimioterapia neoadjuvante como parte integrante do tratamento *standard* tinha começado [19].

A terapêutica multimodal tornou-se a abordagem *standard* no tratamento dos pacientes com osteossarcoma [20]. Os programas de tratamento modernos consistem na combinação de cirurgia com quimioterapia adjuvante e neoadjuvante [2].

PAPÉIS DA CIRURGIA E QUIMIOTERAPIA NA TERAPÊUTICA MULTIMODAL

A cirurgia completa, tanto do tumor primário bem como, no caso de existirem, de todas as metástases detetáveis radiograficamente, é um pré-requisito para a cura [21].

Os objetivos da cirurgia consistem na remoção completa do tumor, de forma a obter o mínimo risco de recidivas locais e a máxima probabilidade de sobrevida global, e ainda, na preservação da função da extremidade tanto quanto possível [4, 21].

Como referido anteriormente, metástases subclínicas microscópicas estão presentes no momento do diagnóstico na maioria dos pacientes, enquanto metástases clinicamente detetáveis no momento do diagnóstico estão presentes em 20-25% dos pacientes [16]. O objetivo principal da quimioterapia é erradicar estas micrometástases. Sozinha, a quimioterapia não é suficiente para destruir com fiabilidade o tumor primário ou erradicar as metástases clinicamente detetáveis [21]. Por esse motivo, a cirurgia continua a ser uma parte essencial do programa de tratamento de todos os pacientes com OS [4]. E, na ausência de quimioterapia eficaz, a cirurgia oferece a única possibilidade de cura [4].

QUIMIOTERAPIA MULTIMODAL

O OS foi um dos primeiros tumores sólidos no qual foi demonstrado o benefício da quimioterapia adjuvante [22]. Os avanços realizados na quimioterapia, nos últimos 30 anos, contribuíram para um maior sucesso da cirurgia de salvamento de membros e

conduziram a taxas de sobrevida mais elevadas, assim como mostraram reduzir o número de metástases pulmonares ou atrasar o seu aparecimento. De um modo geral, a associação da cirurgia à quimioterapia moderna aumentou incrivelmente a sobrevida livre de doença ao fim de 5 anos para 60-70% [4]. Estudos randomizados controlados realizados por Link et al. [23] e Eilber e Rosen [6] estabelecem firmemente a necessidade de terapia sistémica no osteossarcoma.

Atualmente, os fármacos mais amplamente utilizados no tratamento do OS de alto grau são a doxorrubicina, metotrexato em altas doses, cisplatina e ifosfamida isolada ou em associação com o etoposido [24]. Outros fármacos que têm sido utilizados para o tratamento do OS de alto grau não provaram ser tão eficazes como os referidos quatro agentes que, portanto, podem ser considerados como os citotóxicos convencionais para o OS [5]. Os mecanismos de ação dos fármacos mencionados são diversos e encontram-se resumidos nos parágrafos seguintes e na tabela 2.

Nos anos 80, a doxorrubicina foi também usada isoladamente em alguns protocolos de tratamento, mostrando uma boa eficácia no OS não-metastático [5]. Esta droga é uma antraciclina que interfere com a transcrição e replicação do DNA, uma vez que se intercala na dupla hélice, formando um complexo ternário entre este e a TOP2. A TOP2 é uma enzima que atua reduzindo a tensão de torção do DNA, durante a replicação e condensação dos cromossomas, e induzindo a clivagem das duas cadeias. Após a quebra momentânea da dupla hélice, a própria enzima efetua o reparo do DNA e a religação das cadeias. A DOX vai atuar bloqueando a ação dessa enzima e, como consequência, o período em que as duas cadeias permanecem quebradas é mais longo e leva as células a ativarem a via da apoptose.

Usada pela primeira vez no início dos anos 70, a cisplatina ainda faz parte dos protocolos de quimioterapia usados atualmente para o OS, com doses cumulativas que variam de 500-600 mg/m² [5]. A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina II) é uma droga ciclo-celular não específica que se liga ao DNA gerando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais no DNA [25]. O efeito citotóxico da cisplatina é, assim, causado pela inibição da transcrição e replicação e induzindo a morte celular programada.

O uso da ifosfamida na quimioterapia de tumores musculoesqueléticos começou no início dos anos 80, quando esta se mostrou ativa em sarcomas recorrentes de tecidos moles e osso [5]. A ifosfamida é um análogo estrutural da ciclofosfamida. A ifosfamida requer ativação microssomal hepática para a produção do intermediário 4-hidroxioxazaforina reativo, que é a molécula responsável pela libertação final intracelular de acroleína e mostarda de fosforamida, que são os agentes alquilantes ativos bifuncionais [5]. Estes metabólitos ativos da ifosfamida formam ligações covalentes com a cadeia de DNA, prejudicando sua forma e função e causando a morte celular.

O metotrexato tem sido utilizado no OS desde o início do uso da quimioterapia neste tumor, mostrando uma eficácia clínica relevante, em particular quando administradas em altas doses (acima de 8 mg/m²). O metotrexato é um análogo do ácido fólico que atua principalmente como um inibidor da dihidrofolato redutase (DHFR), mas tem também como alvos a timidilato sintase (enzima de grande importância para a síntese de DNA) e as enzimas envolvidas na síntese das purinas, a glicinamida ribonucleotídeo formiltransferase e a 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo

formiltransferase. O maior efeito antitumoral do metotrexato é a inibição da síntese do DNA através da interação com as enzimas mencionadas acima [5].

Tabela 2 – Mecanismos de ação dos agentes de quimioterapia usados no tratamento do OS [26].

Agente citostático	Mecanismo de ação
Doxorrubicina (Adriamicina)	A doxorrubicina inibe a síntese de DNA e RNA através da intercalação entre os pares de bases do DNA, pela inibição da topoisomerase II e pelo impedimento estérico.
Cisplatina (Patinol)	A cisplatina liga-se diretamente ao DNA do tumor e inibe a sua síntese através da formação de ligações cruzadas do DNA
Ifosfamida	A ifosfamida provoca ligações cruzadas entre as cadeias de DNA, o que vai inibir a síntese de DNA e proteínas.
Metotrexato	O metotrexato é uma droga que atua inibindo o metabolismo do ácido fólico e a síntese de purinas e ácido timidílico através da ligação à dihidrofolato redutase.

Uma vez que o tratamento com quimioterapia no osteossarcoma pode resultar em disfunção cardíaca e auditiva, os pacientes devem fazer uma avaliação inicial através de ecocardiograma ou ventriculografia com radioisótopos, e também um

audiograma [18]. O armazenamento de esperma é recomendado em pacientes do sexo masculino em idade reprodutiva [18].

TRATAMENTO DO OS LOCALIZADO

O tratamento curativo do osteossarcoma localizado de alto-grau consiste na quimioterapia e na cirurgia. Comparativamente com a cirurgia isolada, a terapia multimodal aumenta a probabilidade de sobrevida livre de doença de 10-20% para mais de 60% [18].

Como referido anteriormente, atualmente, a doxorrubicina, a cisplatina, o metotrexato em altas doses e a ifosfamida são considerados os agentes mais ativos no tratamento do OS, apesar da combinação ideal ainda estar para ser definida. Uma variedade de combinações de quimioterapia pré e pós-operatória são utilizadas na prática clínica comum e em ensaios clínicos. A maioria dos protocolos atuais incluem um período de quimioterapia pré-operatória, embora ainda não tenha sido comprovado o benefício adicional na sobrevida, em relação à quimioterapia pós-operatória sozinha [27]. Regimes eficazes utilizam as drogas acima citadas, geralmente durante um período de 6-12 meses [18].

Os princípios terapêuticos referidos são aplicados em crianças, adolescentes e adultos jovens com OS de alto-grau central, mas também em adultos, pelo menos, até aos 60 anos e em raras variantes do OS de alto-grau [27]. A quimioterapia também é recomendada nos pacientes idosos com osteossarcoma, utilizando protocolos adaptados [27].

TRATAMENTO DO OS METASTÁTICO E RECIDIVANTE

Os pacientes com Os metastático primário são tratados com intenção curativa com os mesmos princípios que o osteossarcoma não-metastático. Há grupos de pacientes que podem ter um prognóstico muito semelhante ao da doença localizada, com a adição obrigatória de remoção cirúrgica de todos os depósitos metastáticos conhecidos, geralmente por toracotomia exploradora incluindo palpação do pulmão. Aproximadamente 30% de todos os pacientes com metástases primárias de OS e > 40% daqueles que atingem uma remissão cirúrgica completa, tornam-se sobreviventes a longo prazo [27].

A abordagem do osteossarcoma recorrente deve ter em conta o tempo de recidiva / metástases, número e local das metástases. O tratamento para o osteossarcoma recidivante é, primariamente, cirúrgico. O prognóstico é pobre, com uma sobrevida a longo prazo pós-recidiva <20% [27]. A remoção completa de todas as metástases deve ser tentada, uma vez que, de outra forma, a doença é universalmente fatal, enquanto que, mais de um terço dos pacientes com uma segunda remissão cirúrgica sobrevivem mais de 5 anos. Mesmo os pacientes com múltiplas recorrências podem ser curados, desde que as recidivas sejam ressecáveis e toracotomias repetidas garantidas. A tomografia computadorizada pode tanto sobrestimar e subestimar o número de metástases [27].

O papel da quimioterapia de segunda-linha para o OS recidivante está pior definido do que o da cirurgia, e não existe um regime *standard* definido. A escolha pode ter em conta o intervalo livre de doença anterior, e muitas vezes inclui ifosfamida, com ou sem a etoposida, com ou sem carboplatina, etc. Nas duas maiores séries relatadas, a

utilização de quimioterapia de segunda linha correlaciona-se com o prolongamento limitado da sobrevida em doentes com recidivas metastáticas inoperáveis, enquanto que, uma correlação positiva na doença operável foi observada em apenas um dos dois.

Estudos a decorrer para aperfeiçoar os regimes de QT:

O COG e vários grupos cooperativos Europeus uniram-se para iniciar o estudo EURAMOS-1, no final de 2005 [28]. Este grande estudo clínico randomizado visa responder, essencialmente, a duas perguntas: (1) se a adição de ifosfamida e etoposido à quimioterapia pós-operatória com doxorrubicina, cisplatina e metotrexato, melhora a sobrevida livre de eventos e a sobrevida global dos pacientes com OS ressecável e com uma fraca resposta histológica às 10 semanas quimioterapia pré-operatória; e (2) se a adição de interferão α-2b peguilado (IFNα-2b) como terapia de manutenção após quimioterapia pós-operatória com doxorrubicina, cisplatina e metotrexato, melhora a sobrevida livre de eventos e a sobrevida global dos pacientes com OS ressecável e com uma boa resposta histológica às 10 semanas quimioterapia pré-operatória.

Novas hipóteses terapêuticas surgiram entretanto no horizonte, sendo uma delas relatada em 2005, pelo Children's Cancer Group e pelo Pedriatic Oncology Group. O estudo realizado é notável e combina a quimioterapia citotóxica clássica com um tratamento biológico. Neste estudo, a adição de Muramil tripeptídeo fosfatidiletanolamina (MTP-PE) ao regime clássico de 4 drogas aumentou a sobrevida livre de eventos aos 5 anos para 72%. Esta nova terapêutica será alvo de mais detalhes, mais adiante neste artigo, na parte das "Terapêuticas Emergentes".

RADIOTERAPIA

O papel da radioterapia no OS é limitado, mas pode ser adequada em casos altamente selecionados ou para paliação. A radioterapia pode, em combinação com a quimioterapia, alcançar o controlo local, mas a cirurgia completa quando possível, tem que ser considerada como a primeira opção de tratamento local. A cirurgia incompleta, mesmo quando combinada com a radioterapia pós-operatória, não é superior à radioterapia isolada e deve ser evitada. Se, no entanto, a cirurgia incompleta ocorreu, deve ser seguida de radioterapia pós-operatória [27].

VII. FOLLOW-UP

Os intervalos recomendados de follow-up nos ensaios clínicos multinacionais atuais são a cada 6 semanas a 3 meses, nos primeiro e segundo ano após o diagnóstico, cada 2-4 meses no terceiro e quarto ano, cada 6 meses do quinto ao décimo ano e cada 6-12 meses daí em diante. Cada visita deve incluir a história clínica e exame físico e uma radiografia torácica. Uma radiografia do local do tumor primário é recomendada casa 4 meses até ao final dos 4 anos após o diagnóstico. Metástases tardias podem ocorrer em mais de 10 anos após o diagnóstico e não há nenhum momento universalmente aceite para parar a vigilância do tumor.

A terapia multimodal do OS pode estar associada a alterações permanentes do foro cardíaco, renal, auditivo e reprodutivo, problemas ortopédicos e outros efeitos tardios incluindo neoplasias, por isso, investigações adicionais apropriadas devem ser incluídas durante o follow-up regular [27]

VIII. TERAPIAS EMERGENTES

Um dos maiores desafios para os próximos 10 anos, assim como foi nos últimos 10, é responder à questão: "Qual é o próximo agente ativo para o osteossarcoma?". Nos últimos 15 anos, a sobrevida permaneceu igual, apesar dos avanços contínuos nos cuidados de suporte, técnicas cirúrgicas e até mesmo no desenvolvimento de novas terapêuticas. Ao mesmo tempo, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos sofreu uma grande evolução, passando de drogas citotóxicas não seletivas, como a ifosfamida, para terapias com alvos mais definidos, tais como, por exemplo, pequenas moléculas inibidoras das proteínas cinases e anticorpos monoclonais [4].

Os agentes citotóxicos convencionais utilizados atualmente, foram descobertos há mais de 20 anos. Aparentemente, essas drogas já foram utilizadas na sua dose máxima tolerável na terapêutica do OS. É muito improvável que mais modificações dos regimes que contêm os agentes convencionais, com as suas janelas terapêuticas estreitas e toxicidades associadas, resultem numa melhoria significativa dos resultados para os pacientes com osteossarcoma [29]. No entanto, o futuro permanece confiante.

Diferentemente de outros sarcomas, o OS é caraterizado por cariótipos complexos e alterações em múltiplos genes e vias celulares [30]. Este fundo genético origina elevada instabilidade genética das células do OS, o que pode levar à existência de várias populações de células dentro do mesmo tumor, com consequentes alterações no comportamento celular. Estas alterações podem ser responsáveis pela agressividade das células do OS e podem resultar no aparecimento de resistências ao tratamento com quimioterapia [30].

Tendo em conta estas características, a pesquisa de novas modalidades terapêuticas para o OS de alto-grau tem-se dedicado a identificar e a validar agentes contra os alvos terapêuticos candidatos, que se revelaram ou pareceram ser relevantes, na patogénese do OS, na resposta ao tratamento ou no resultado clínico. Os objetivos atuais da pesquisa consistem na identificação e validação dos agentes que podem ser utilizados como agentes únicos, ou administrados de forma adjuvante à quimioterapia convencional para um melhor controlo da doença local e metastática, assim como melhorar a eficácia dos regimes de quimioterapia standard, sem aumentar a toxicidade dos efeitos colaterais [1, 29]. Estes fatos oferecem esperança, não só para um aumento da probabilidade de sobrevida, mas também para uma melhor qualidade de vida dos pacientes curados, o que é particularmente relevante para tumores que afetam pessoas jovens, como o OS [1].

Um importante desafio que surgiu nos últimos anos como uma possibilidade de melhorar os resultados clínicos dos tratamentos convencionais em vários cancros humanos é atingir, não apenas as características do tumor que estão diretamente relacionadas com as resistências ao tratamento, mas também os sistemas biológicos que sustentam o crescimento e progressão tumoral. Neste sentido, este artigo resume os novos alvos terapêuticos em desenvolvimento para o osteossarcoma, que se encontram atualmente em ensaios clínicos.

Os novos agentes terapêuticos revistos neste artigo, encontram-se agrupados em três categorias consoante os alvos a atingir e a fase de evolução tumoral, ou seja: agentes que têm como alvos factores ligados ao osso / fenótipo mesenquimal, agentes direccionados para impedir o processo metastático e agentes cujo alvo são as lesões metastáticas já estabelecidas. Num outro grupo, estão incluídos os fármacos que se

encontram em desenvolvimento com o objetivo de superar a resistência à quimioterapia atual. Em cada um dos referidos grupos, os fármacos estão subdivididos de acordo com os seus mecanismos de ação, como se observa na Tabela 3, em anexo.

1 - AGENTES QUE TÊM COMO ALVOS FATORES LIGADOS AO OSSO/FENÓTIPO MESENQUIMAL

1.1 - Fármacos que têm como alvo os recetores tirosina-quinase (RTQs)

O conhecimento dos RTQs e do seu papel na transdução de sinais celulares, particularmente no que diz respeito ao crescimento celular e à oncogénese, resultou no desenvolvimento de anticorpos e pequenas moléculas inibitórias que têm como alvo estes RTQs. Em parte, a associação do rápido crescimento ósseo à patogénese do OS, e o papel dos RTQs na via de sinalização celular do FCT (fator de crescimento de transformação), levaram à investigação de agentes que têm como alvo estes receptores [29].

1.1.1 - Antagonistas dos recetores IGF-1

O crescimento e desenvolvimento do esqueleto adulto resulta, em grande parte, da libertação da hormona de crescimento que induz a secreção do IGF-1 (Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1), e pela interacção deste com os osteoblastos e outras células de suporte. As células primitivas de origem mesenquimal, sugeridas por

vários estudos recentes como sendo o alvo celular para a transformação em OS, possuem vários tipos de recetores na sua superfície, sendo o IGF-1R um deles. A proliferação e sobrevivência das células normais e malignas está ligada à ativação deste recetor [31].

A via do IGF, é importante para prevenir a apoptose durante o normal desenvolvimento, stresse ou doença, em muitos tipos de células, incluindo os osteoblastos e o OS [1]. Esta via de sinalização do IGF foi recentemente revista em relação ao seu papel no OS e outros cancros pediátricos [32]. Uma expressão consistente do recetor do IGF-1 (IGF-1R), IGF-1 e IGF-2 foi descrita nas linhas celulares do OS e em amostras clínicas, sugerindo que a estimulação do sistema autócrino IGF pode ser importante para a proliferação no OS [32]. Indivíduos com mutações no IGF-1 ou IGF-1R, exibem um pobre desenvolvimento e um atraso no neurodesenvolvimento, destacando a natureza da via IGF para o crescimento e desenvolvimento normais [29].

O IGF-1R é um RTQ dimérico composto por duas α-subunidades extracelulares e duas ß-subunidades transmembranares que mediam os efeitos do IGF-1 e do IGF-2, após a ligação dos ligandos ao seu domínio extracelular [33]. Por sua vez, o circuito mediado pelo IGF-1R é ativado em conjunto com outras vias autócrinas dependentes do fator de crescimento, como a *via* fosfatidilinositol 3-quinase (PI3Q) e a via proteína quinase mitogénica ativada (MAPK), um fato que pode afetar negativamente a eficácia das terapias dirigidas apenas ao IGF-1R.

Várias linhas de evidência ligam o sistema IGF ao desenvolvimento de cancro [29]. Uma expressão abundante de IGF-1, IGF-2 e IGF-1R foi demonstrada em diversos tipos de cancro, incluindo sarcomas primários [34]. Não surpreendentemente, tem

havido muitas tentativas de desenvolver agentes anticancerígenos que bloqueiem a sinalização através da via IGF em ambos os ligandos, ou a nível do recetor.

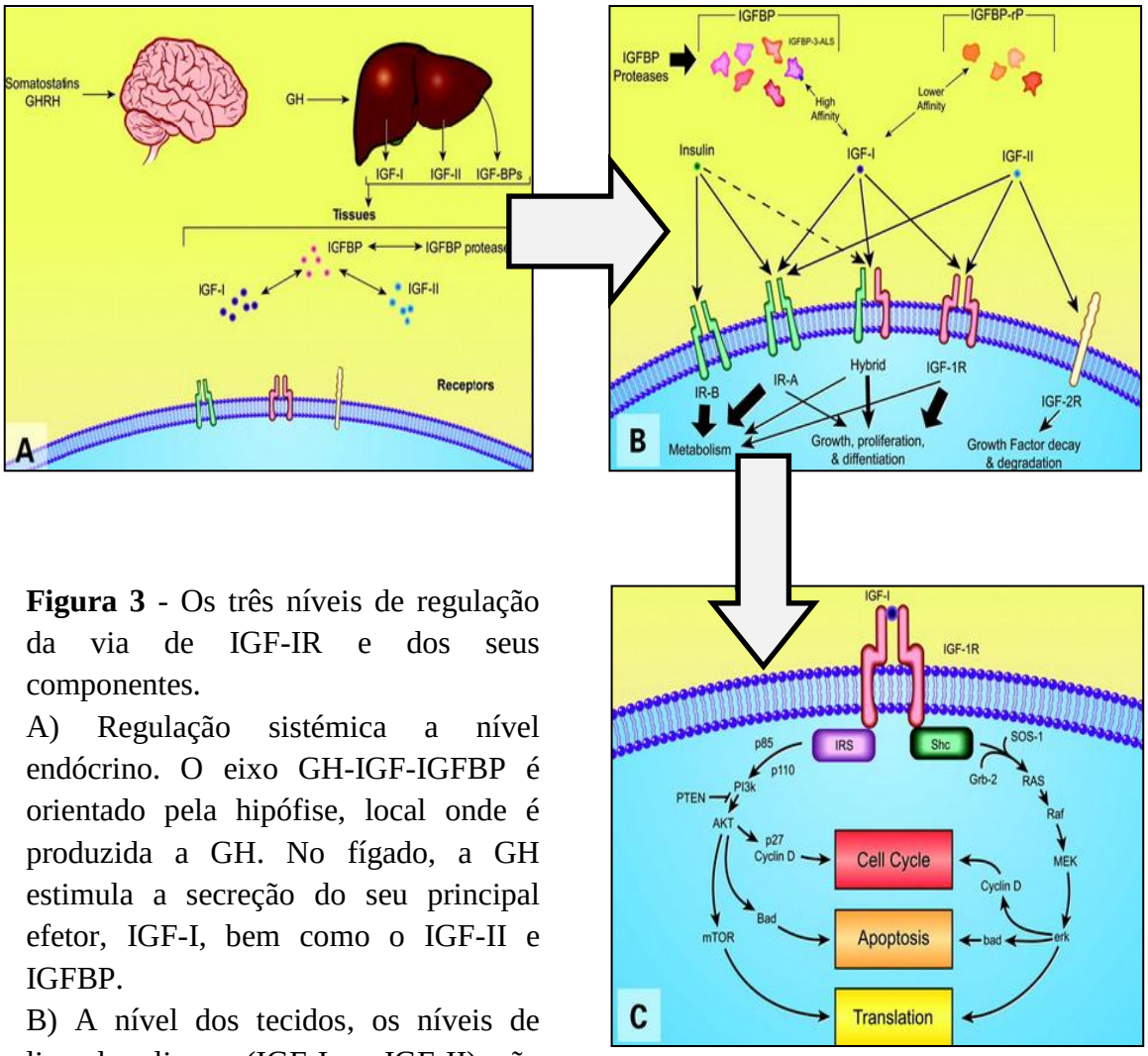

Figura 3 - Os três níveis de regulação da via de IGF-IR e dos seus componentes.

A) Regulação sistémica a nível endócrino. O eixo GH-IGF-IGFBP é orientado pela hipófise, local onde é produzida a GH. No fígado, a GH estimula a secreção do seu principal efetor, IGF-I, bem como o IGF-II e IGFBP.

B) A nível dos tecidos, os níveis de ligandos livres (IGF-I e IGF-II) são regulados pela presença de seis IGFBPs diferentes, as quais se ligam aos fatores a diferentes recetores (recetores de insulina A e B, IGF-IR e IGF-IIR), com diferentes afinidades, e cada receptor desencadeia diferentes cascatas de sinalização intracelular. Os receptores híbridos são constituídos por uma subunidade-α e uma subunidade-β do IGF-IR e uma subunidade-α e uma subunidade-β do receptor de insulina.

C) A nível celular, a ligação do IGF-I ao seu recetor desencadeia a autofosforilação de proteínas que, por sua vez, incitam diferentes cascatas de sinalização. O eixo GH-IGF-IGFBP controla, através destes três níveis de regulação, os mediadores do ciclo celular, a apoptose e a tradução, bem como do metabolismo energético.

Tanto pequenas moléculas inibidoras da tirosina-quinase e anticorpos monoclonais contra o IGF-1R têm sido desenvolvidos, e encontram-se em várias fases de testes pré-clínicos e clínicos. As pequenas moléculas inibidoras impedem a sinalização através do IGF-1R pela ligação ao local de ligação de ATP ou ao local de ligação do substrato no domínio IGF-1R quinase. Um problema relacionado com esta abordagem é o elevado grau de homologia entre estes locais no IGF-1R e o recetor de insulina, o que resulta em reatividade cruzada e no potencial de disrupção do metabolismo da glicose [35]. No entanto, duas pequenas moléculas inibidoras da tirosina-quinase estão neste momento integradas em ensaios clínicos para o OS, nomeadamente, Linsitinib (OSI-906) e BMS-754807, encontrando-se as duas na fase I dos ensaios clínicos.

Relativamente aos anticorpos monoclonais, uma das suas vantagens comparativamente às pequenas moléculas inibidoras do IGF-1R, é a sua capacidade para regular negativamente a expressão de IGF-1R sem terem afinidade para os recetores de insulina. Assim, espera-se que os anticorpos não afetem via da insulina, o que tem sido visto como um elemento atrativo desta abordagem. Vários anticorpos humanizados contra IGF-1R estão atualmente disponíveis, alguns dos quais estiveram ou estão a ser avaliados nas fases I/II de testes clínicos, nos quais os pacientes com OS também foram incluídos. No entanto, nenhum deles foi ainda testado em combinação com as drogas utilizadas nos protocolos de quimioterapia para OS de alto grau [1].

Um desses anticorpos, o Robatumumab (SCH717454), demonstrou ampla atividade contra o rol de tumores sólidos *in vivo* do Pedriatic Preclinical Testing Program (PPTP), produzindo uma resposta completa em três xenoenxertos de tumores sólidos, incluindo dois xenoenxertos de osteossarcoma. De notar que, todos os três

xenoenxertos com uma resposta completa, tinham altos níveis de expressão de IGF-1R. Estudos em Fase II deste anticorpo, para o tratamento de doentes com recidiva do Sarcoma de Ewing e osteossarcoma, estão atualmente em curso [29]. Em particular, os pacientes com OS ressecável serão randomizados após a cirurgia para receber uma de duas doses diferentes de Robatumumab, e os resultados primários serão a determinação das alterações no índice de proliferação do tumor em pacientes com OS ressecável e da taxa de resposta do tumor em doentes com tumores inoperáveis [1].

O Figitumumab (CP-751.871) é outro dos anticorpos monoclonais em estudo para o tratamento do OS, e uma fase I do ensaio clínico está presentemente a recrutar pacientes com tumores sólidos avançados (incluindo sarcomas ósseos), para avaliar a segurança e tolerabilidade do anticorpo em combinação com outras drogas [1]. Aliás, foi recentemente relatado que, utilizado isoladamente, o Figitumumab não provocou qualquer regressão tumoral, no entanto, em combinação com a Rapamicina, induziu remissões completas em três dos quatro modelos de xenoenxertos. Noutros estudos, foi relatada uma estabilização prolongada da doença em três dos 24 pacientes com tumores sólidos refratários, num estudo de Fase I do CP-751.871, e em onze de 26 pacientes com tumores sólidos avançados, num estudo de Fase I do R1507 [36]. Um estudo na Fase II deste anticorpo, o R1507, que inclui um grupo de osteossarcoma, está atualmente em curso.

A Fase I de estudo multicêntrico no qual o Cixutumumab (IMC A12) tem sido utilizado para tratar pacientes jovens com OS recidivante ou refratário e outros tumores sólidos, foi recentemente concluído [1]. Informações detalhadas sobre os resultados deste estudo não foram ainda publicadas, mas um estudo multicêntrico consecutivo, de fase II, já foi planeado e está atualmente em curso. Neste estudo, o Cixutumumab é

administrado a pacientes com tumores sólidos recidivantes ou refratários (incluindo OS), com menos de 30 anos de idade, com os objetivos primários de determinar a taxa de resposta e continuar a estimar a toxicidade colateral deste anticorpo.

1.1.2 – Bloqueadores do recetor HER2/neu

O gene HER2, responsável pela produção da glicoproteína transmembranar HER2, é um proto-oncogene. A proteína HER2 codificada por esse gene tem um papel importante no crescimento e diferenciação das células com funcionamento normal. O oncogene HER2/neu codifica uma glicoproteína transmembranar com homologia para o recetor EGF, que também pode ser um potencial alvo no tratamento do OS [29].

Vários grupos têm estudado a expressão do HER2 no osteossarcoma apresentando resultados divergentes [29]. Alguns destes estudos mostraram uma correlação entre a expressão do HER2 no OS e as metástases pulmonares e um mau prognóstico, enquanto que outros estudos não encontraram tal ligação, com um deles até sugerindo uma correlação com o aumento da sobrevida [29]. No entanto, um estudo cooperativo do COG, que terminou em Outubro de 2007, avaliou a adição de trastuzumab à quimioterapia padrão em pacientes com osteossarcoma metastático cujos tumores sobrexpressavam HER2. Os resultados deste ensaio, o qual foi concebido para avaliar a segurança e viabilidade, bem como para produzir uma estimativa da taxa de resposta e da taxa de sobrevida aos 3 anos desta combinação, ainda não foram publicados [29].

1.1.3 – Inibidores do PDFG (fator de crescimento derivado das plaquetas)

O PDGF exerce os seus efeitos sobre a proliferação e sobrevivência celular através de um outro conjunto de TRQs, o receptor do factor de crescimento derivado das plaquetas, PDGFR-α e PDGFR-β. Tem sido demostrado que o PDGF age como um fator mitogénico para as células do mesênquima e linhas de células de osteossarcoma [37]. Além disso, a sinalização através do PDGFR pode inibir a apoptose através da fosforilação da Akt, resultando na inibição do BCL_{XL}, um activador de apoptose [37]. A família do PDGF é composta por várias formas diméricas (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC e PDGF-DD). Foi demonstrado que a coexpressão do PDGF-AA e do PDGFR-α no osteossarcoma está correlacionada com um pobre prognóstico, destacando o PDGFR como um potencial alvo terapêutico .

O Imatinib (STI571, Gleevac®) é um inibidor, racionalmente concebido, da tirosina-quinase ABL. Mas em doses farmacológicas, também inibe o c-Kit e o PDGFR. *In vitro*, o imatinib inibiu o crescimento mediado pelo PDGF e a apoptose em duas linhas celulares do osteossarcoma [37]. Apesar desta evidência pré-clínica encorajadora, a fase II do estudo COG do imatinib em crianças com tumores sólidos refratários ou recidivantes, incluindo o OS, falhou em demonstrar actividade contra o osteossarcoma como agente único nas doses convencionais [38].

1.2 – Agentes que alteram o microambiente tumoral

1.2.1 – Inibidores do RANKL e Bifosfonatos

Os cientistas têm focado a sua atenção além do tumor, para a interacção deste com o seu microambiente envolvente, uma vez que esta pode ser importante para o crescimento tumoral e de metástases. Por este motivo, acredita-se que terapias que quebrem esta interação possam levar a novos caminhos no tratamento do OS.

A integridade óssea é mantida através de um balanço entre a formação de osso e a sua reabsorção [39]. Os osteoclastos estão principalmente envolvidos na reabsorção óssea e, por conseguinte, têm um papel fundamental na progressão das lesões tumorais ósseas [1]. O sistema de sinalização do recetor do fator nuclear κ-B (RANK), do ligando do RANK (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), é a via primária associada à ativação dos osteoclastos [1, 8]. A OPG é um receptor solúvel do RANKL, cujo nome deriva dos seus efeitos de protecção contra a perda óssea. A OPG liga-se especificamente ao RANK e inibe a osteoclastogénese induzida pelo RANKL e a reabsorção óssea [39]. Talvez o efetor mais crítico da destruição óssea mediada pelos osteoclastos, em tumores ósseos primários ou metastáticos, é o RANKL. O RANKL liga-se ao RANK na superfície dos precursores dos osteoclastos e osteoclastos maduros, colocando assim em movimento o ciclo de destruição óssea, a libertação do factor de crescimento e a proliferação das células de tumor [29].

Um dos mais estudados inibidores do RANK é o denosumab, um anticorpo monoclonal que se liga ao RANKL e inibe os osteoclastos e a reabsorção óssea, que tem sido principalmente desenvolvido para o tratamento da osteoporose e metástases ósseas [1]. Até agora, o denosumab mostrou-se promissor no tratamento de pacientes com cancro da mama com metástases ósseas, no mieloma múltiplo e no tumor de células

gigantes do osso; o seu potencial benefício no osteossarcoma ainda está a ser investigado, não fazendo ainda parte de ensaios clínicos para o OS [1, 29].

Para além de inibir directamente o RANK/RANK-L, existem outras três estratégias terapêuticas direccionadas para os osteoclastos: inibição da osteoclastogénese induzida pelo tumor, supressão da actividade de reabsorção óssea osteoclástica e indução da apoptose específica dos osteoclastos [1].

Os bifosfonatos inibem a actividade osteoclástica através do bloqueio da interação RANK-RANKL e são, atualmente, os inibidores da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos mais amplamente investigados. Logo, são clinicamente aplicados para o tratamento e prevenção da osteoporose, doença de Paget, metástases ósseas e outras perturbações do esqueleto. No entanto, o reconhecimento do seu potencial terapêutico no OS é mais recente [29, 31]. Os bifosfonatos ligam-se fortemente à hidroxiapatita na superfície óssea, inibindo a atividade osteoclástica, quer directamente através da indução da apoptose dos osteoclastos, ou indirectamente, pela inibição da osteoclastogénese e aumentando a OPG. Além disso, eles provaram ser muito eficaz contra várias células tumorais, incluindo o OS [1, 29].

Estudos *in vitro* e em modelos animais, sugeriram que os bifosfonatos têm efeitos antitumorais diretos no OS, podendo ainda ter o efeito benéfico adicional de diminuir a osteoporose relacionada com a quimioterapia e perda óssea periprostética [29].

Um estudo publicado em 2010 pelo MSKCC, no qual o pamidronato, um bifosfonato de segunda geração, é adicionado à QT (cisplatina, doxorrubicina e metotrexato) por 12 doses mensais, avaliou a sobrevivência, a sobrevivência livre de

eventos e durabilidade da reconstrução ortopédica. As conclusões retiradas deste estudo em fase II foram que o pamidronato pode ser seguramente incorporado na quimioterapia para o tratamento do osteossarcoma, não prejudicando a eficácia desta, e pode ainda melhorar a durabilidade da reconstrução do membro. No entanto, se essa adição resulta num benefício para a sobrevida terá de ser demonstrado num estudo mais alargado posteriormente [40].

O ácido zoledrónico, um bifosfonato de terceira geração, é aplicado clinicamente como um novo agente terapêutico que reduz eventos esqueléticos relacionados com tumores de pacientes com cancro, e é geralmente reconhecido como seguro e bem tolerado. Foi demonstrado que o ácido zoledrónico impede ou inibe eventos relacionados com o esqueleto, possui efeitos antitumorais diretos, e sinergicamente aumenta os efeitos dos agentes anticancerígenos, em várias linhas celulares [39].

Vários estudos demonstraram que o ácido zoledrónico diminuiu, *in vitro*, a proliferação celular tumoral e que tem um efeito inibitório na invasão e migração celular [1]. Por outro lado, observações *in vivo* têm tido resultados conflituosos. Em ratinhos portadores da linha celular induzida, Saos-2, do OS, foram descritas uma inibição do crescimento do tumor primário, uma redução das metástases pulmonares, uma diminuição dramática da osteólise, uma redução clara no número de osteoclastos no osso exposto ao tumor e uma menor densidade vascular tumoral [41]. Em contraste, noutros estudos realizados em ratos modelo, as doses clinicamente relevantes de ácido zoledrónico não inibiram o crescimento do tumor primário e não reduziram as metástases pulmonares, mesmo que inibida a osteólise e reduzida significativamente a formação de osso induzida por tumor [41, 42].

Para além destes dados, foi também relatada a evidência de que o ácido zoledrónico pode ser combinado com os fármacos utilizados na quimioterapia clássica do OS [31]. Aliás, um estudo piloto foi recentemente aberto pela COG, no qual é avaliada a adição de ácido zoledrónico à cisplatina, doxorrubicina, altas doses de metotrexato, ifosfamida e etoposido, nos pacientes com osteossarcoma metastizado recentemente diagnosticado. Este estudo irá avaliar novamente a segurança da adição de um bifosfonato à quimioterapia padrão [29].

Devido ao fato de a maioria dos pacientes com OS ter uma longa esperança de vida, o alto risco de osteonecrose da mandíbula, um dos maiores efeitos adversos do ácido zoledrónico no tratamento de pacientes com cancro, tem que ser considerado. Para além da osteonecrose da mandíbula, efeitos gastrointestinais (como dor abdominal, diarreia) e leve a moderados sintomas de gripe, fazem parte dos efeitos secundários dos bifosfonatos orais [39].

2 - AGENTES DIRECIONADOS PARA IMPEDIR O PROCESSO METASTÁTICO

2.1 - Antagonistas da Tirosina-Quinase Src

A Src é uma tirosina-quinase indispensável para a reabsorção osteoclástica do osso, e tem sido demonstrado que é expressa e fosforilada em linhas celulares do OS, surgindo assim como um atrativo alvo terapêutico [43].

Entre os fármacos que têm como alvo a tirosina-quinase Src, encontram-se duas pequenas moléculas, o dasatinib e o saracatinib. O primeiro, um inibidor da quinase biodisponível via oral, foi testado com sucesso *in vitro*, numa série de linhas celulares humanas de sarcoma e provou ser activo em concentrações nanomolares na inibição da sinalização da quinase Src, da adesão, migração e invasão de células do OS [44]. No entanto, num modelo de rato com metástases espontâneas, o dasatinib não teve efeito sobre o crescimento do tumor primário, o grau de apoptose e o desenvolvimento de metástases pulmonares, apesar da inibição completa da fosforilação da Src que foi observada no tumor primário [45].

O dasatinib está incluído na Fase I / II de um ensaio clínico que está a recrutar pacientes jovens com tumores sólidos malignos, metastáticos ou recorrentes (incluindo o OS), com o objetivo de estudar os seus efeitos colaterais e as melhores doses quando administrado em combinação com a carboplatina, ifosfamida e etoposídeo [1].

Outros dois ensaios de Fase II estão em curso a estudar um inibidor selectivo das quinases Abl e Src, o saracatinib (AZD0530), em pacientes com OS recorrente localizado no pulmão. O objetivo destes estudos é determinar quanto tempo pacientes que se submetem a remoção cirúrgica completa do OS recorrente no pulmão, permanecem livres de doença após tomarem saracatinib durante um ano, em comparação com doentes tratados com placebo. Como estes estudos começaram recentemente, não há dados ainda disponíveis, mas evidências preliminares mostraram um crescimento mais lento do tumor em alguns doentes adultos tratados com saracatinib [1].

2.2 – Inibidores doVEGF

A angiogénese é essencial para o crescimento de tumores sólidos e é induzida por peptídeos angiogénicos produzidos pelas células tumorais. Entre estes, o VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial), um dos mais potentes estimuladores da angiogénese, pareceu ser altamente relevante em várias neoplasias pediátricas, onde tem sido indicado como um marcador associado ao aumento do potencial metastático [46].

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica que promove a migração e previne a apoptose das células endoteliais vasculares, promovendo assim a angiogénese. Além disso, o VEGF aumenta a área de superfície dos vasos sanguíneos e a sua permeabilidade, proporcionando mais oportunidades para que as células do tumor entrarem na circulação e metastizem [47].

No OS, foram relatados níveis elevados de VEGF circulante, produzido pelo tumor, que se associam a aumentada densidade microvascular local, desenvolvimento de metástases pulmonares (82% em tumores VEGF positivo versus 10% em tumores VEGF negativo) e pior prognóstico [46].

Em conjunto, estes resultados destacam novos candidatos a alvos terapêuticos a serem considerados para terapias personalizadas destinadas a alcançar um melhor controlo do crescimento local e disseminação sistémica do OS e outros cancros humanos.

O anticorpo monoclonal anti-VEGF, bevacizumab (Avastin®), foi o primeiro agente a traduzir a inibição da angiogénese com sucesso clínico, ao ser demonstrado que adicionava benefício na sobrevida para os pacientes com carcinoma colo-rectal avançado quando combinado com quimioterapia [29]. Bevacizumab já tem sido utilizado no tratamento do OS de alto grau, onde parece ser altamente eficaz quando

administrado em combinação com a doxorrubicina lipossomal [43]. Mais recentemente, este anticorpo monoclonal foi introduzido na Fase III de um ensaio clínico que está a decorrer, para o OS de alto grau ou histiocitoma fibroso maligno do osso, que se estima que termine em 2015 (http://www.clinicaltrial.gov/). Neste estudo, o bevacizumab será utilizado para o tratamento de pacientes com OS não-metastático, em associação com a doxorrubicina, cisplatina e alta dose de metotrexato, assim como nos regimes de quimioterapia administrados a pacientes portadores de tumores metastáticos ou com lesões que não podem ser removidos por cirurgia, em associação com a cisplatina, doxorrubicina, metotrexato em alta doses, ifosfamida e etoposido.

É esperado que os resultados deste estudo forneçam informação sobre a possibilidade de utilizar o bevacizumab em combinação com quimioterapia convencional.

De um modo geral, pode ser especulado que, perante a complexidade da angiogénese e dos fenótipos metastáticos, a inibição de um único fator que esteja envolvido neste processo (como o VEGF) possa não ser suficiente para alcançar um controlo clínico significativo do crescimento e progressão tumorais. Com base neste raciocínio, inibidores da angiogénese com uma especificidade mais alargada, têm sido desenvolvidos. Um dos fármacos mais promissores é o endostar, uma endostatina recombinante humana, que inibe a angiogénese, tendo como alvo o colagénio tipo XVIII-α 1. O endostar está atualmente incluído em ensaios clínicos de Fase II para o melanoma, carcinoma colo-rectal e carcinoma de pequenas células do pulmão, e osteossarcoma de alto grau. Este último estudo será realizado em pacientes com OS de alto grau não-metastático, em que será usado o endostar em associação com cisplatina, doxorrubicina, metotrexato em altas doses e ifosfamida (http://www.clinicaltrial.gov/).

2.3 – Agentes Imunomodeladores

2.3.1 - GM-CSF inalado

O GM-CSF inalado está a ser investigado no contexto de pacientes com osteossarcoma com recidiva pulmonar. O GM-CSF induz a proliferação e diferenciação de células estaminais hematopoiéticas, e tem sido utilizado principalmente para aumentar a recuperação de neutrófilos após a quimioterapia. Só recentemente foi reconhecido o seu potencial imunomodulador. Dranoff *et al.* conceberam células tumorais irradiadas para secretarem GM-CSF de murino; a vacinação com estas células produziu imunidade específica e de longa duração em três modelos de tumores [29]. Baseado, em parte, nestes resultados, um estudo de Fase I foi conduzido em pacientes com metástases pulmonares utilizando um esquema de duas doses diárias durante 7 dias. No referido estudo não houve toxicidade, nem se verificaram aumentos na contagem de leucócitos ou neutrófilos, nem houve qualquer alteração significativa nos testes de função pulmonar. Um paciente com sarcoma de Ewing teve uma resposta completa e vários pacientes tiveram uma estabilização da doença, incluindo um paciente com OS [48].

2.3.2 - Interferão α-2b peguilado

Os interferões têm propriedades antitumorais, antiangiogénicas e imunoestimulatórias [49]. Apesar das observações iniciais de um potencial papel no

tratamento do cancro, há cerca de quatro décadas, o seu lugar na terapêutica de uma série de tipos de cancro, especialmente o melanoma e neoplasias hematológicas, ainda está a ser delineado. No OS, existe uma experiência de duas décadas de utilização de interferão-α como um adjuvante único da cirurgia, com aparente eficácia clínica [49]. Além disso, existem dados laboratoriais que advogam que linhagens de células do osteossarcoma resistentes a várias drogas utilizadas, são sensíveis ao interferão alfa [50]. O interferão peguilhado (interferão α-2b peguilado) é uma forma do interferão que tem uma ação prolongada (mais do que as 8h do interferão convencional) porque foi modificado através da adição de uma molécula de polietileno glicol. A peguilação oferece a vantagem de um aumento significativo da dose, sem toxicidade inaceitável. Como referido anteriormente, neste momento está a decorrer um estudo realizado pelo EURAMOS-1 com o objetivo de saber se a adição de interferão α-2b peguilado (IFNα-2b) como terapia de manutenção após quimioterapia pós-operatória com doxorrubicina, cisplatina e metotrexato, melhora a sobrevida livre de eventos e a sobrevida global dos pacientes com OS ressecável e com uma boa resposta histológica às 10 semanas quimioterapia pré-operatória. A avaliação deste agente através da colaboração internacional oferece alguma esperança aos pacientes com OS.

2.3.3 - MTP-PE (Mifamurtide)

Esta opção terapêutica será abordada adiante no tópico relativo aos novos mecanismos de libertação.

3 - AGENTES PARA COMBATER AS LESÕES METASTÁTICAS

3.1 – Inibidores do mROT

A descoberta das vias de transdução de sinais e a sua importância numa variedade de cancros levou ao desenvolvimento de muitos novos agentes direcionados para intervenientes dessas vias.

A via mTOR (mammalian target of rapamycin) é muito importante para as células-tronco mesenquimais e para a biologia do osso, sendo considerada um alvo terapêutico atractivo para o tratamento de vários tumores, incluindo o OS [1].

O mTOR, uma proteína quinase serina/treonina, controla a tradução o mRNA e regula o crescimento e proliferação celulares. mTOR atua como um sensor dos factores de crescimento (incluindo a insulina e o IGF), aminoácidos, ATP e níveis de oxigénio; sob condições favoráveis para o crescimento celular, o mTOR ativa a tradução de proteínas ribossomais (via S6K1) e a tradução cap-dependente (via eIF4E), permitindo a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S [51]. A sinalização das vias a montante e a jusante da mTOR é anormal numa variedade de cancros humanos [51].

Como o nome indica, a via mTOR é inibida pela rapamicina. A rapamicina (também conhecida por Sirolimus or Rapamune®) é um antibiótico com uma lactona macrocíclica, que foi originalmente investigada como um agente anti-cancerígeno em 1980.

No entanto, desenvolvimento adicional para esta indicação foi abandonado devido a problemas de formulação e estabilidade. A rapamicina foi aprovada como droga imunossupressora após um transplante renal em 1999, pela FDA, e está atualmente a ter uso clínico para esta e outras indicações imunossupressoras. Mais

recentemente, dados pré-clínicos encorajaram a reavaliação da rapamicina como um agente anti-cancerígeno [29]. Foi demonstrado que a rapamicina inibe o desenvolvimento de metástases em modelos murinos de OS [52]. Para além disso, o Pediatric Preclinical Testing Program demonstrou recentemente uma atividade significativa da rapamicina, in vivo, contra o OS e outros aloenxertos de tumores humanos [29].

Vários análogos da rapamicina, ou "rapalogs", estão atualmente em vários estágios de desenvolvimento clínico, incluindo o temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD-001) e deforolimus (AP23573). A primeira evidência encorajadora que surgiu de alguns estudos realizados com estes agentes, é que estes são, geralmente, bem tolerados pela maioria dos pacientes.

O temsirolímus foi incluído na fase I/II de um ensaio clínico não-randomizado em 45 pacientes com sarcomas avançados de tecidos moles e osso, com o objetivo de avaliar a segurança e eficácia da sua combinação com a doxorrubicina lipossomal. Até agora ainda não há relatos desses ensaios.

O everolimus foi incluído em ensaios da fase I em pacientes pediátricos com tumores sólidos refratários ou recorrentes, incluindo o OS. Estes estudos demonstraram que a administração oral de everolimus é bem tolerada e que a sua farmacocinética é idêntica à observada nos pacientes adultos, sugerindo a continuação desta avaliação clínica em ensaios de fase II [53].

Dados clínicos relativos à eficácia do deforolimus num ensaio clínico de fase I dirigido a doentes com tumores sólidos avançados (incluindo o OS) foram recentemente publicados e mostram que, em conjunto com uma actividade anti-tumoral encorajadora, o deforolimus também foi bem tolerado. Num ensaio de fase II de deforolimus em

pacientes com sarcomas avançados, 28% dos pacientes obteve quer uma resposta parcial, quer uma estabilização da doença por, pelo menos, 16 semanas [29]. Atualmente, o deforolimus está a ser estudado num ensaio clínico de fase III que envolve 650 pacientes com sarcomas ósseos e dos tecidos-moles metastizados, planeado pelo SARC (Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration).

A conclusão de todos estes ensaios clínicos em curso deve ser aguardada para permitir qualquer conclusão sobre o potencial valor terapêutico dos inibidores mTOR no tratamento do osteossarcoma.

4 - AGENTES PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA À QT

4.1 – Novos antifolatos

Para além da compreensão das vias de transdução de sinais para o desenvolvimento de osteossarcoma, avanços na compreensão dos mecanismos de resistência às terapias atuais são também a conduzir ao desenvolvimento de novos compostos que possam superar essa resistência.

Um exemplo promissor desse conceito é o estudo de novos agentes antifolatos no tratamento do osteossarcoma. Como já referido, o uso de metotrexato em altas dose é um componente importante dos protocolos correntes para o tratamento do OS. O metotrexato inibe a di-hidrofolato redutase (DHFR), o que interfere com o metabolismo do folato, esgotando os precursores nucleótidos e inibindo o DNA, o RNA e a síntese de proteínas. Embora a dose de metotrexato convencional seja bastante eficaz na leucemia aguda linfoblástica e outras neoplasias, no OS, o metotrexato em altas doses tem uma

eficácia significativamente mais elevada em comparação com a dose convencional, sugerindo um mecanismo de resistência que é superado com doses mais elevadas [54].

Um dos mecanismos que contribui para a resistência ao metotrexato consiste no transporte alterado de metotrexato para dentro das células, devido a uma diminuição da expressão do transportador de folato reduzido (RFC – reduced folate carrier) [29].

O trimetrexato é um novo antifolato que não requer o RFC para entrar nas células, tendo assim atividade potencial em células de osteossarcoma com defeitos de transporte. Um estudo de Fase II do trimetrexato em pacientes com osteossarcoma recorrente ou refratário demonstrou uma resposta em cinco dos 38 pacientes (13%) [29].

Estes dados podem, portanto, indicar que esta estratégia é uma abordagem terapêutica candidata a ser considerado para pacientes que não respondem ao metotrexato.

Um segundo novo antifolato, pemetrexed, é o objeto de um estudo de Fase II realizado pelo COG dirigido a pacientes com neoplasias recorrentes, incluindo o osteossarcoma. O pemetrexed exerce a sua atividade por meio da inibição de várias enzimas folato-dependentes como a timidilato-sintase, a DHFR, e outras, o que pode permitir que a atividade em células de osteossarcoma resistente ao metotrexato, com base na sobrexpressão da DHFR [29]. Apesar de bem tolerado, não foram observadas repostas objectivas neste estudo, além de uma prolongada estabilização da doença em vários pacientes, sendo um deles um paciente com OS [29].

4.2 – Gemcitabina e Docetaxel

Como mencionado anteriormente, o uso dos regimes tradicionais de quimioterapia no OS recidivante é limitado devido ao desenvolvimento de resistências, bem como das toxicidades associadas. A combinação de gemcitabina e docetaxel tem sido avaliada em adultos e, mais recentemente, em pacientes pediátricos com sarcomas recorrentes, incluindo o OS, como uma das formas de ultrapassar esta resistência.

A gemcitabina é um análogo da desoxicitidina, um nucleosídeo, em que os átomos de hidrogénio sobre o carbono 2 da desoxicitidina são substituídos por átomos de flúor. A gemcitabina quando convertida na sua forma ativa esgota o pool dos desoxinucleotídeos e interfere com o alongamento da cadeia de DNA e, assim, com o crescimento das células. O docetaxel é um taxano semi-sintético que atua como um estabilizador dos microtúbulos, resultando na paragem do ciclo celular. Estudos *in vitro* de gemcitabina seguida de docetaxel em linhas celulares Saos-2 do osteossarcoma produziram um efeito sinérgico [55].

Uma análise retrospectiva de 35 adultos, com uma variedade de sarcomas dos ossos e tecidos moles, tratados com gemcitabina e docetaxel, revelou uma taxa de resposta de 43%, com dois dos quatro pacientes com osteossarcoma atingindo uma resposta parcial [55]. A toxicidade deste e outros estudos foi globalmente favorável, com a ocorrência de mielosupressão como efeito adverso mais frequente [29].

4.3 – Novos mecanismos de libertação

Outra abordagem para superar a resistência a agentes de quimioterapia convencionais, tem sido o desenvolvimento de novos mecanismos de libertação dos fármacos. Por exemplo, nos últimos anos foi testada uma formulação lipossomal aerossolizada de cisplatina (Sustained-release Lipid Inhalation Targeting [SLIT] cisplatin) em Fase II, dirigida para tratar pacientes com metástases pulmonares de osteossarcoma [29]. A lógica desta abordagem baseia-se no fato de que, após a remoção cirúrgica de metástases pulmonares de osteossarcoma, novas lesões metastáticas pulmonares frequentemente reaparecem. A administração de cisplatina por inalação pode permitir a chegada de concentrações locais mais elevadas com o objetivo de produzir um efeito terapêutico mais prolongado no pulmão, de forma a controlar melhor a doença metastática. Esta forma de administração ajuda assim a ultrapassar os mecanismos de resistência e contribui também para a eliminação dos efeitos secundários sistémicos associados.

Os resultados do referido estudo indicam que a cisplatina SLIT foi bem tolerada e mostrou possuir uma atividade promissora [29]. No entanto, informação adicional é necessária para afirmar qualquer conclusão sobre a potencial aplicabilidade clínica desta abordagem terapêutica.

A doxorrubicina lipossomal encapsulada (DOXIL, doxorubicin HCl liposome injection) tem sido utilizada na Fase I / II de ensaios clínicos organizados para sarcomas de tecidos moles, nos quais parece ser eficaz e potencialmente útil para ultrapassar a resistência ao fármaco.

Outra terapia inalatória, o fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos inalado (GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), é atualmente objeto de estudo num ensaio clínico levado a cabo pelo COG, de Fase II, em pacientes com a primeira recorrência pulmonar do osteossarcoma. Esta opção terapêutica já foi abordada anteriormente no tópico relativo aos agentes imunossupressores.

- **L-MTP-PE (muramyl tripeptide phosphatidiyethanolamine)**

Até agora, apenas o IFN-α-2b e o mifamurtide estão a ser (IFN-alfa-2b) ou já foram (mifamurtide) avaliados como adjuvantes dos protocolos de tratamento existentes em estudos de fase III randomizados. Os dados amadureceram e os resultados levaram a que o mifamurtide obtivesse a aprovação da União Europeia. Assim, o mifamurtide tornou-se o primeiro novo agente a ser introduzido comercialmente para o tratamento do osteossarcoma em mais de duas décadas. Por este motivo, este fármaco será abordado com mais pormenor relativamente aos restantes.

Mepact, mifamurtide, ou L-MTP-PE, é uma formulação lipossomal de muramil tripeptídeo fosfatidiletanolamina (MTP-PE) que atua como um potente activador dos monócitos/macrófagos. É um modelador imune que atua estimulando o próprio sistema imunitário do organismo para montar um ataque contra as células das micrometástases via processo imunológico normal, grande parte envolvendo macrófagos [56, 57]. Os monócitos humanos, após ativação pelo MDP (muramil dipeptídeo), reconhecem especificamente as células tumorais, mas não são, contudo, citotóxicos para as células

normais. É também provável que as citocinas libertadas a partir dos macrófagos ativados possam ter outras ações tumoricidas que contribuem para a actividade anti-tumor do MEPACT. Tendo em conta todas estas ações, é sugerido que o aspecto mais importante da ação do mifamurtide é eliminar as micrometástases, em vez de uma ação directa sobre o tumor primário. É provável, portanto, que este agente seja mais útil como um adjuvante da quimioterapia, em condições em que o tumor primário é ressecável [56, 58, 59].

- Estrutura do L-MTP-PE

MTP-PE é um derivado lipofílico totalmente sintético do muramil dipeptídeo (MDP), um peptidoglicano, que é o imunoestimulador natural mais pequeno, encontrado nas paredes das células bacterianas gram-positivas e gram-negativas [40].

Apesar do MDP ser o princípio ativo do MTP-PE, a adição de alanina e dipalmitoilfosfatidiletanolamina ao MDP resulta numa molécula mais lipofílica que tem as vantagens acrescidas de uma semi-vida plasmática superior e menor toxicidade [5].

Ambas estas moléculas ativam, *in vitro*, monócitos e macrófagos. Esta ativação manifesta-se com um aumento da atividade tumoricida de células e da secreção de citocinas e fatores pró-inflamatórios. As propriedades lipofílicas do MTP-PE resultam numa maior absorção celular por transporte passivo através da membrana citoplasmática, com maior disponibilidade para um receptor intracelular [5, 57].

A fim de aumentar a concentração de MTP-PE nos monócitos e macrófagos, *in vivo*, Fidler e os seus colaboradores desenvolveram uma formulação lipossomal que, quando injectada por via intravenosa, distribui-se principalmente pelo fígado, baço e

pulmões, onde é fagocitado pelos monócitos e macrófagos . O L-MTP-PE, a formulação lipossomal do MTP-PE, foi concebido com o objetivo de transportar o MTP-PE até aos macrófagos. Esta formulação melhora as propriedades de ativação tumoricida dos macrófagos e monócitos, e prolonga a sua presença nos tecidos, especialmente os pulmões [57, 59].

- Propriedades físico-químicas do L-MTP-PE

Os lipossomas são criados artificialmente em laboratório através da adição de uma solução aquosa a um gel de fosfolípido para a produção de uma vesícula que tem propriedades semelhantes a organelos celulares, e pode ser facilmente incorporada em células vivas. Os lipossomas utilizados para a entrega do MTP-PE são vesículas multilamelares concêntricas de, aproximadamente, 2-3 µm de diâmetro. Eles são compostos por duas moléculas de fosfolipídios naturais: 1-palmitil-2oleofosfocolina e 1,2 dioleoilfosfatidilserina. A estrutura básica destas vesículas faz lembrar uma cebola, em que cada camada da cebola é uma bicamada de fosfolipidos envolvendo uma camada de água [59]. A formulação lipídica foi seleccionada para uma fagocitose óptima dos lipossomas pelos macrófagos, de modo a aumentar a eficácia da imunoestimulação *in vivo*. Após a fagocitose, a estrutura multilamelar é metabolizada camada a camada, resultando numa libertação prolongada do fármaco, o MTP-PE [59].

- Atividade anti-tumoral do L-MTP-PE

Vários estudos têm demonstrado que os monócitos de pacientes com cancro podem ser ativados para níveis semelhantes de actividade tumoricida como aqueles de dadores saudáveis. Além disso, o mifamurtide estimula o aumento da regulação das moléculas de adesão celular como o LFA-1 (antígeno 1 associado à função leucocitária) e a ICAM-1 (molécula 1 de adesão intercelular) em monócitos humanos, as quais são importantes para a interacção com as células do tumor [40].

É também provável que as citocinas libertadas a partir dos macrófagos ativados possam ter outras ações tumoricidas que contribuem para a actividade anti-tumoral do mifamurtide, como a maturação de células dendríticas, ativação de células natural killer e o recrutamento de polimorfonucleares - todas estas ações podem ter um papel na morte celular.

- Ensaios clínicos de Fase I e II

O trabalho pré-clínico inicial com mifamurtide foi feito na década de 1980 e início da de 1990, no Centro MD Andersen pela Dra. Eugenia Kleinerman e seus colegas. Um grande número ensaios de fase I e fase II com mifamurtide foram executados e, na maioria deles, foi observada a ativação da atividade tumoricida mediada pelos monócitos após tratamento *in vivo* com o referido fármaco [11].

Num dos estudos de fase I, 28 pacientes com metástases cancerígenas receberam doses crescentes (infusões IV de 1 hora) de mifamurtide (0,05-12,0mg/m²), duas vezes por semana. Monócitos de sangue periférico foram colhidos e estudados *ex vivo* para avaliar a sua atividade citotóxica contra a linha celular A375 de melanoma humano, antes do tratamento com mifamurtide e várias vezes durante as 9 semanas de duração do

tratamento. A ativação da atividade citotóxica mediada pelos monócitos foi verificada em 24 (86%) dos 28 pacientes em algum momento durante o tratamento [11]; os monócitos ativados permanecem com atividade tumoricida até 96 horas após a infusão com mifamurtide [11]. A dose ideal de mifamurtide para manter os monócitos tumoricidas in situ foi de 0,5-2mg/m² e a máxima dose tolerável 04-6mg/m² [60].

A decisão de fazer um estudo de fase III com o mifamurtide em conjunto com a quimioterapia adjuvante em pacientes com diagnóstico recente de OS foi baseada, em parte, na atividade da droga num subconjunto de 16 doentes com recidiva de sarcoma num estudo de fase II. A remoção cirúrgica de todas as metástases visíveis e palpáveis, seguida de infusão intravenosa de mifamurtide 2mg/m², duas vezes por semana durante 12 semanas, e, em seguida, uma vez por semana durante 12 semanas adicionais, prolongou o intervalo livre de doença destes indivíduos comparada com a de controlos históricos [60]. O tempo médio de recidiva ou progressão da doença foi de 9 contra 4,5 meses [60].

- Farmacocinética do L-MTP-PE

Mecanismo de ação do MTP-PE

Os macrófagos alveolares que contém MDP ou MTP-PE exibem atividade tumoricida. Quando os lipossomas que continham MDP foram comparados aos que continham MTP-PE, os segundos foram superiores na medida em que a ativação *in vivo* de macrófagos produziu níveis mais elevados de citotoxicidade mediada pelos macrófagos e erradicação de metástases pulmonares espontâneas.

Uma vez libertado do lipossoma encapsulado para o espaço intracelular, o MTP-PE é dividido em MDP, que, em seguida, activa o receptor NOD2 [56]. Há uma família de proteínas com domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD), denominadas NOD1 e NOD2, que reconhecem o componente de peptidoglicano da parede celular bacteriana. Estes recetores citosólicos são principalmente expressos pelos tipos de células que são normalmente expostos a este grupo de bactérias, em condições fisiológicas, isto é, as células apresentadoras de antigénios, tais como macrófagos e células dendríticas. Estes receptores estão envolvidos na defesa imune inata contra bactérias através da detecção de componentes bacterianos e activação de vias de sinalização, tais como o factor nuclear NF-κB e MAPK [56].

Como referido previamente, o MDP é o peptidoglicano mais pequeno capaz de estimular o sistema imunitário e tem sido demonstrado que o MDP se liga ao NOD2 e estimula a sinalização a jusante. Uma vez ativada, a via NF-κB procede à ativação de uma série de agentes de sinalização que culmina por fim, na liberação de citocinas e moléculas inflamatórias que atacam as células tumorais [56]. Poucas horas depois da administração de mifamurtide a pacientes, foram verificados aumentos dos níveis de interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α e outros indicadores de estimulação imunitária, tal como neopterina e proteína C-reactiva.

Efeitos adversos do L-MTP-PE

O perfil de efeitos secundários do L-MTP-PE, quando administrado sem quimioterapia, é em grande parte relacionado com a activação imunitária e atividade

biológica resultante. Os efeitos adversos experienciados por 213 doentes tratados com Mepact são mostrados na tabela 4.

Nas fases I/II de ensaios clínicos, a febre foi o único efeito adverso grave relatado em mais de 5% dos pacientes estudados. Nos dois estudos de fase II do osteossarcoma, um dos quais incluiu quimioterapia, febre, arrepios, leucopenia e granulocitopenia foram os únicos efeitos adversos graves, em mais de 5% dos pacientes [61]. Efeitos adversos graves, como pericardite hemorrágica e trombose, foram raros na fase II dos ensaios clínicos [60].

Como a febre e os arrepios são os efeitos secundários mais frequentes do tratamento com L-MTP-PE, a possibilidade de usar drogas anti-inflamatórias que atenuem estes efeitos adversos foi investigada. Apenas uma dose elevada de ibuprofeno (> 40 µg/ml) atenuou a eficácia anti-tumoral, bem como a produção de IL-1 e TNF-α, enquanto uma dose baixa (<10 µg/ml) não [60]. Assim sendo, Anderson et al. recomendaram o uso de ibuprofeno (200 mg para <40 kg, 400 mg para> 40 Kg) pré-tratamento e, para os casos resistentes ao ibuprofeno, o acetominofeno e/ou meperidina são sugeridos como agentes adicionais [60].

Os efeitos farmacodinâmicos do L-MTP-PE podem ser sintetizados em ativação dos macrófagos, indução de monócitos tumoricidas e aumento dos níveis de citocinas e moléculas inflamatórias resultando numa reação generalizada semelhante aos efeitos clínicos de uma infecção, caracterizada por febre, arrepios, cefaleias, náuseas, e mialgias.

Tabela 4 - Efeitos adversos do L-MTP-PE nas fases I/II do Ensaio clínico [61].

Sintomas gerais	%
Arrepios	89
Febre	85
Fadiga	53
Sudorese	24
Hipotermia	23
Anorexia	21
Dor	15
Mal-estar	13
Astenia	13
Dor torácica	13

Musculo-esqueléticos	%
Mialgia	31
Dor lombar	15
Dor nas estremidades	12
Artralgias	10

Hematológicos	%
Anemia	10

Gastrointestinais	%
Náuseas	57
Vómitos	44
Obstipação	17
Diarreia	13
Dor abdominal	11

Sistema Nervoso	%
Cefaleias	50
Tonturas	17

Respiratórios	%
Dispneia	21
Tosse	18
Taquipneia	13

Cardiovascular	%
Taquicardia	50
Hipotensão	29
Hipertensão	26

- Ensaio clínico de Fase III

Este ensaio clínico pivot de fase III randomisado, foi realizado pelos grupos cooperativos de pediatria norte-americanos: o Children's Cancer Group (CCG) e o Pediatric Oncology Group (POG), que se fundiram mais tarde formando o Children's

Oncology Group (COG), financiado pelo National Cancer Institute (NCI). Este estudo é conhecido pelo nome "Intergroup Study 0133".

Este estudo de fase III do mifamurtide é o maior ensaio clínico completo alguma vez relativamente ao OS. A taxa de sobrevida global, tempo decorrido entre o ensaio e a morte, permanece como o gold standard para demonstrar o benefício clínico. Contudo, para analisar a sobrevida, é essencial que o seguimento seja de duração suficiente para permitir que os investigadores tenham confiança nos resultados como reais e consistente no tempo. O sucesso do tratamento do osteossarcoma em crianças, adolescentes e jovens adultos traduz-se na sobrevida a longo prazo e na cura. Para o acompanhamento da sobrevida ser sólido, os pacientes devem ser seguidos para além do tempo de recidiva, ou seja, para além do tempo em que podem ser considerados curados. As recidivas do OS ocorrem tipicamente dentro dos primeiros 2-3 anos após o diagnóstico, como é evidenciado pelas curvas de sobrevida livre de progressão da maioria dos estudos publicados. Recidivas e mortes além dos cinco anos são raras.

Visão global do estudo

Como referido anteriormente, este estudo representa o maior estudo completo alguma vez realizado para o OS. Um total de 178 locais estiveram envolvidos na cobertura de 1/3 dos casos pediátricos elegíveis nos EUA. A inscrição de crianças recém-diagnosticadas e adultos jovens com osteossarcoma teve lugar entre 1993 e 1997. O estudo envolveu pacientes recém-diagnosticados, destes, 16 foram considerados

inelegíveis. Dos 777 restantes, 91 tinham metástases clinicamente detetáveis e 24 foram registados como tendo um tumor irressecável no início do estudo [40].

Objetivos do estudo

O estudo foi concebido para responder as duas questões principais:

1) se a incorporação de um quarto medicamento (ifosfamida) ao regime de quimioterapia de três drogas (doxorrubicina, cisplatina e altas doses de metotrexato) melhoraria a sobrevida livre de eventos e
2) se a adição de MEPACT à quimioterapia melhoraria o resultado, avaliado através sobrevida global e sobrevida livre de eventos.

Seleção dos pacientes

Os pacientes deste estudo tinham que ter confirmado histologicamente, osteossarcoma de alto grau, intramedular. Os pacientes que realizaram cirurgia previamente, normalmente amputação, foram considerados elegíveis, mas os pacientes que tinham recebido qualquer quimioterapia ou radioterapia não. Para além disso, tinham que ter a função renal adequada, definida pela creatinina sérica ≤1,5 × normal ou pela clearance de creatinina >40ml/min/m²; a função hepática adequada definida pela bilirrubina ≤1,5 × normal; AST e ALT ≤ 2,5 × normal; função cardíaca adequada

definida pela fracção de encurtamento no ecocardiograma ≥ 29% ou fracção de ejecção à angiografia com radionuclídeos ≥50% [62].

Esquema do estudo e tratamento

Os pacientes elegíveis foram inscritos em uma das quatro opções terapêuticas e estratificados pelo nível de LDH (superiores ou inferiores ao limite máximo normal), pela localização tumoral (acima ou abaixo do joelho ou cotovelo), amputação prévia e presença de metástases ou doença irressecável. O plano de tratamento inclui 10 semanas de quimioterapia de indução, depois resseção cirúrgica do tumor, seguida de quimioterapia de manutenção. Todos os grupos foram programados para receber 2 doses de doxorrubicina (25 mg/m²/dia × 3) e 4 doses de metotrexato (12 g/m²) durante a indução. No regime A os pacientes receberam também 2 doses de cisplatina (120 mg/m²) e no regime B receberam dois ciclos de ifosfamida (1,8 mg/m²/dia × 5) durante a indução. A terapia de manutenção iniciada após ressecção cirúrgica, incluía 4 doses de doxorrubicina (25 mg/m² × 3) e 8 doses de metotrexato (12 g/m²) para todos os pacientes. No regime A, os pacientes receberam terapia de manutenção adicional com 2 doses de cisplatina (120 mg/m²); no regime B receberam 3 ciclos de ifosfamida e 4 doses de cisplatina (120 mg/m²). Todos os fármacos foram administrados via intravenosa, usando protocolos standard. Metade dos pacientes foram também programados para receber Mepact (2 mg/m²) com início na 12ª semana de terapia durante a manutenção (regimes A+ e B+). (Figura 4) [62, 63].

O metotrexato em altas doses foi seguido de uma dose fixa de leucovirina (10 mg) com início 24 horas após a infusão de metotrexato, até este último estar em doses

inferiores a 100 nmol/L. A ifosfamida foi associada a mesna durante 5 dias; 1 dose de 9 g/m² foi administrada 5 vezes, 2 delas durante a indução e 3 vezes durante a manutenção.

O Mepact foi dado 2 vezes por semana, durante 12 semanas, com pelo menos 3 dias de intervalo, depois 1 vez semanalmente, durante 24 semanas, como uma infusão intravenosa durante 30-60 minutos. O tratamento foi dado continuamente durante 36 semanas e não foi interrompido, independentemente de atrasos na quimioterapia.

A pré-medicação com ibuprofeno (400 mg >40 Kg e 200 mg <40 Kg) foi permitida para o tratamento da febre. Como alternativa, o paracetamol foi dado numa dose de 10 mg/Kg, com o máximo de 1000 mg. Os arrepios foram tratados com meperidina (0,5 mg/Kg a 25 mg iv.). A febre e os arrepios com duração superior a 8 horas após administração de Mepact, eram avaliados como possíveis sintomas de sépsis. [62, 63].

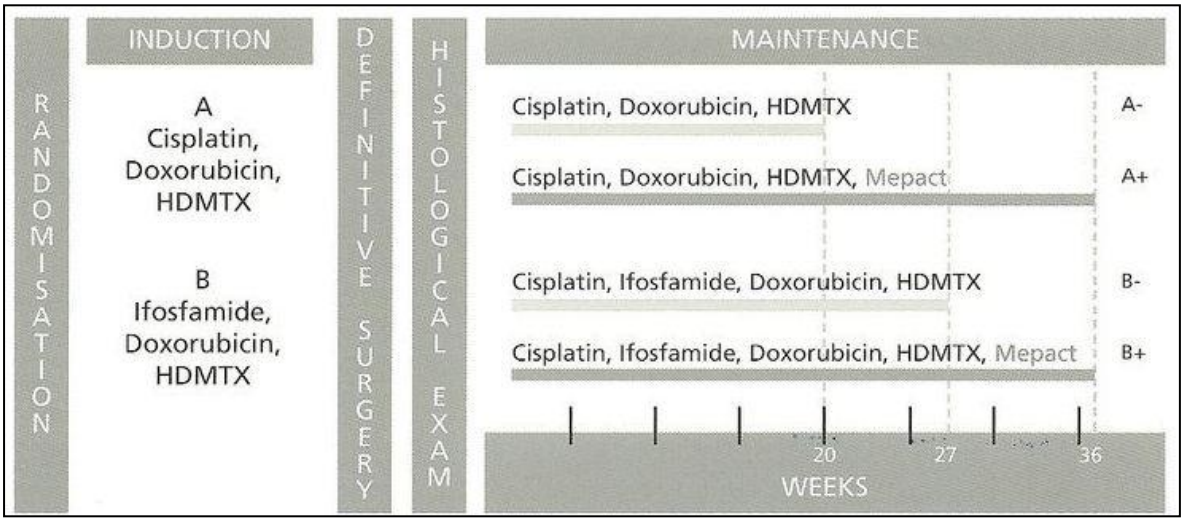

Figura 4 – Esquema do estudo e dosagens dos fármacos na Fase III do Ensaio Clínico [62, 63].

Esquema Fatorial

O estudo foi conduzido através de um esquema fatorial (figura 5). O esquema fatorial é valioso na pesquisa dos ensaios clínicos, permitindo que duas abordagens terapêuticas (e ocasionalmente mais) sejam avaliadas simultaneamente no mesmo estudo, com os mesmos participantes. A abordagem mais simples e mais utilizada é o esquema fatorial 2x2.

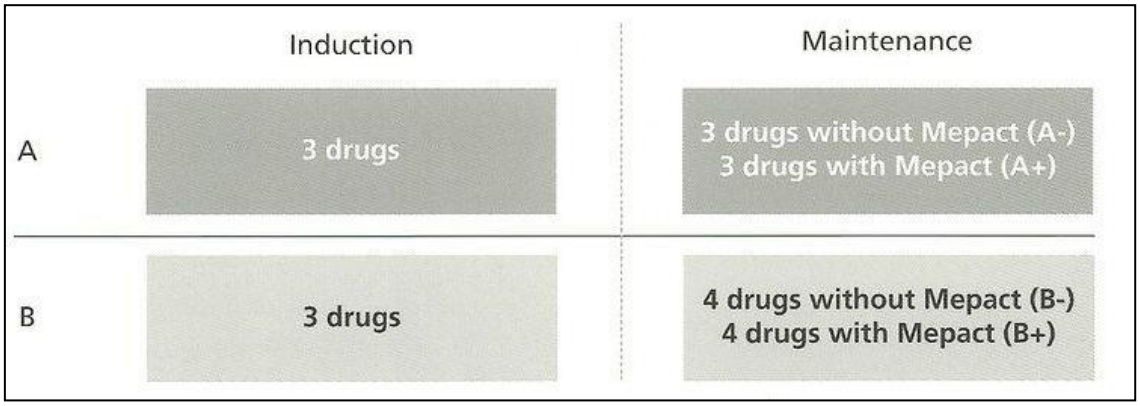

Figura 5 - Esquema fatorial da Fase III do Ensaio Clínico [63].

- Há quatro opções terapêuticas: A-, A+, B-, B+.
- Os pacientes foram randomizados em dois grupos de tratamento diferentes antes da terapia de indução.
- Todos os pacientes iniciaram a terapia de indução com um dos dois regimes de 3 fármacos. O grupo A recebeu cisplatina, doxorrubicina e altas doses de metotrexato, e o grupo B recebeu ifosfamida, doxorrubicina e altas doses de metotrexato.

- O grupo A continuou com este regime durante a terapia de manutenção, com ou sem Mepact. O grupo B continuou com um regime de 4 fármacos na fase de manutenção (foi adicionada a cisplatina ao regime de 3 fármacos), com ou sem Mepact.
- Confrontando todos os pacientes do grupo A (A- e + A) com todos os pacientes do grupo B (B- e B +) pode ser comparado o grupo A (o regime de 3 fármacos) com o grupo B (o regime de 4 fármacos), sendo possível analisar o efeito da quarta droga.
- O efeito de MEPACT pode ser demonstrado através da comparação de pacientes que receberam o referido fármaco com aqueles que não, isto comparando A + e B + associados, com A- e B- associados [62, 63].

Resultados do estudo:

- Necrose após QT de indução

Os pacientes que foram submetidos a ressecção definitiva após terapia de indução, realizaram uma avaliação da necrose, para verificar as diferenças da necrose tumoral com base na terapia de indução. A necrose foi medida de acordo com o método de Huvos, modificado pelo CCG. O sistema de classificação de Huvos determina a percentagem de necrose a partir de um único pedaço de tumor longitudinal de 5 milímetros obtida no momento da cirurgia. Uma resposta de grau III ou IV (ou seja, > 90% de tecido necrótico) prediz uma probabilidade maior de sobrevida livre de eventos [62, 63].

Em geral, 265 (45%) dos pacientes elegíveis apresentaram grau III ou IV de necrose (Tabela 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento, mas o grau de necrose do tumor primário na altura da ressecção cirúrgica definitiva correlacionou-se com a sobrevida livre de eventos.

Tabela 5 - Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento [62].

	Necrosis Grade*									
Chemotherapy Regimen	I		II A		II B		III		IV	
	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
A	11	4	44	15	112	38	84	29	41	14
B	7	2	33	11	112	38	95	33	45	15

***** Medida de acordo com o método de Huvos, modificado pelo CCG.
A = QT de manutenção com 3 fármacos
B = QT de manutenção com 4 fármacos

- Sobrevida global e Sobrevida livre de eventos

Tabela 6 - Probabilidade da sobrevida global e da SLE de acordo com o regime terapêutico [63].

Treatment regimen	EFS Probability (%)		Survival probability (%)	
	4 year	6 year	4 year	6 year
All patients	66	64	81	74
Regimen A Without Mepact (A-) With Mepact (A+)	66 65	64 63	78 82	71 75
Regimen B Without Mepact (B-) With Mepact (B+)	60 74	58 71	77 86	70 81
Regimen A with or without Mepact (A-/A+)	65	63	80	73
Regimen B with or without Mepact (B-/B+)	67	64	82	75
Chemotherapy Without Mepact (A-/B-) With Mepact (A+/B+)	63 69	61 67	78 84	70 78

A adição de Mepact à quimioterapia resultou numa melhoria da sobrevida global. A sobrevida global (combinando ambos os regimes de quimioterapia) foi aumentada de 70% sem Mepact para 78% com Mepact aos 6 anos, o que é estatisticamente significativo ($p = 0,03$). Infere-se portanto, que a adição de Mepact à quimioterapia resultou numa melhoria estatisticamente significativa da sobrevivência global [63].

A adição de Mepact à quimioterapia também resultou numa tendência de melhoria a nível da sobrevida livre de eventos, de 61% para 67% em 6 anos [63].

- Efeitos adversos na Fase III do Ensaio Clínico

Apenas efeitos adversos de toxicidade de grau 3 ou 4 foram coletados no estudo de fase III. A análise dos eventos adversos indica que os eventos mais frequentes são geralmente aqueles associados à quimioterapia intensiva, incluindo náuseas, estomatite e vómitos, alterações nas enzimas hepáticas e infeções.

Em geral, os dados obtidos relativamente à segurança apoiam o perfil de tolerabilidade desenvolvido nos estudos anteriores, indicando que o fármaco é geralmente bem tolerado. Os dados indicam ainda que Mepact pode ser utilizado na dose recomendada e programada simultaneamente com fármacos conhecidos que apresentam risco de lesão renal (cisplatina, ifosfamida) ou hepática (metotrexato de dose elevada, ifosfamida).

Tabela 7 – Efeitos adversos de grau 3 ou 4 observados na Fase III do Ensaio Clínico [63].

Received at least one dose of any study drug Adverse Event	No Mepact n = 391		Mepact n = 390	
	n	%	n	%
Stomatitis	174	45	172	44
Infection	92	24	84	22
Vomiting	66	17	70	18
Hearing loss *within the range of cisplatin reported effect	23	6	47	12*
Ileus	13	3	15	4
Diarrhoea	7	2	16	4
Skin	24	6	19	5
Abdominal pain	9	2	12	3
CNS	19	5	21	5
Pyrexia	8	2	10	3
Depression	9	2	12	3

IX. CONCLUSÃO

Embora raro, o osteossarcoma é uma doença tratável. Com a quimioterapia e uma ressecção cirúrgica agressiva, a maioria dos pacientes pode esperar ser curado. Assim, a quimioterapia e a cirurgia continuam a ser os pilares para este sucesso. No entanto, como a sobrevida dos pacientes com esta doença não melhorou nós últimos 20 anos, há uma grande necessidade de melhoria e inovação. O atual protocolo de tratamento internacional para o osteossarcoma (EURAMOS-1) reúne toda a cooperação que é necessária para resolver rapidamente as questões clínicas não respondidas desta doença.

Olhando para o futuro, o grande número de novos agentes que têm entrado em ensaios clínicos irá ter um grande impacto sobre o tratamento do osteossarcoma nos próximos 20 anos. Desafios permanentes consistem em diminuir o tempo muito longo de desenvolvimento clínico, a toxicidade da terapia e aplicação de agentes clinicamente úteis, tais como L-MTP-PE, e outras abordagens experimentais para pacientes de alto risco.

O Mifamurtide é o primeiro novo agente a ser aprovado para o tratamento do OS em mais de duas décadas. No tratamento de doentes recentemente diagnosticados com osteossarcoma, a adição de mifamurtide foi associada a uma redução do risco de morte em um terço. Este agente é bem tolerado e seguro, e surgiu como uma nova esperança para os pacientes que sofrem deste tumor.

Com a continuação da cooperação internacional que levou à formação do ensaio clínico EURAMOS-1, o próximo grande ensaio randomizado poderá ser capaz de investigar a adição de um novo agente, como por exemplo um anticorpo anti-IGF-1R ou

um inibidor mTOR, à quimioterapia standard. O crescimento contínuo do conhecimento sobre os mecanismos moleculares do osteossarcoma e a utilização de sistemas de modelos pré-clínicos de confiança serão cruciais para traduzir novos agentes terapêuticos em melhores resultados para os pacientes com OS.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Hattinger, C.M., et al., Emerging drugs for high-grade osteosarcoma. Expert Opin Emerg Drugs, 2010.* ***15****(4): p. 615-34.*
2. *Picci, P., Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). Orphanet J Rare Dis, 2007.* ***2****: p. 6.*
3. *Fan, T.M., Animal models of osteosarcoma. Expert Rev Anticancer Ther, 2010.* ***10****(8): p. 1327-38.*
4. *Ta, H.T., et al., Osteosarcoma treatment: state of the art. Cancer Metastasis Rev, 2009.* ***28****(1-2): p. 247-63.*
5. *Meyers, P.A., Muramyl tripeptide (mifamurtide) for the treatment of osteosarcoma. Expert Rev Anticancer Ther, 2009.* ***9****(8): p. 1035-49.*
6. *Eilber, F.R. and G. Rosen, Adjuvant chemotherapy for osteosarcoma. Semin Oncol, 1989.* ***16****(4): p. 312-22.*
7. *Campanacci, M., Bone and Soft Tissue Tumors. Second ed. Clinical Features, Imaging, Pathology and Treatment1999, Wien: Springer-Verlag.*
8. *Michael P. Link, M.C.G., Paul A. Meyers, Osteosarcoma, in Principles and Practice of Pediatric Oncology2002, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.*
9. *Anninga, J.K., et al., Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? Eur J Cancer, 2011.* ***47****(16): p. 2431-45.*
10. *Hughes, D.P., Strategies for the targeted delivery of therapeutics for osteosarcoma. Expert Opin Drug Deliv, 2009.* ***6****(12): p. 1311-21.*
11. *Frampton, J.E., Mifamurtide: a review of its use in the treatment of osteosarcoma. Paediatr Drugs, 2010.* ***12****(3): p. 141-53.*
12. *Fritz Schajowicz, H.A.S., Leslie H Sobin The World Health Organization's Histologic Classification of Bone Tumors. A Commentary on the Second Edition*

13. *Caudill, J.S. and C.A. Arndt, Diagnosis and management of bone malignancy in adolescence. Adolesc Med State Art Rev, 2007.* ***18****(1): p. 62-78, ix.*

14. *Fraumeni, J.F., Jr., Stature and malignant tumors of bone in childhood and adolescence. Cancer, 1967.* ***20****(6): p. 967-73.*

15. *Swaney, J.J., Familial osteogenic sarcoma. Clin Orthop Relat Res, 1973(97): p. 64-8.*

16. *Heare, T., M.A. Hensley, and S. Dell'Orfano, Bone tumors: osteosarcoma and Ewing's sarcoma. Curr Opin Pediatr, 2009.* ***21****(3): p. 365-72.*

17. *Rousselin, B., et al., Clinical and radiologic analysis of 13 cases of primary neuroectodermal tumors of bone. Skeletal Radiol, 1989.* ***18****(2): p. 115-20.*

18. *Bielack, S., D. Carrle, and P.G. Casali, Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol, 2009.* ***20 Suppl 4****: p. 137-9.*

19. *Whelan, J., B. Seddon, and M. Perisoglou, Management of osteosarcoma. Curr Treat Options Oncol, 2006.* ***7****(6): p. 444-55.*

20. *Chou, A.J., D.S. Geller, and R. Gorlick, Therapy for osteosarcoma: where do we go from here? Paediatr Drugs, 2008.* ***10****(5): p. 315-27.*

21. *Carrle, D. and S.S. Bielack, Current strategies of chemotherapy in osteosarcoma. Int Orthop, 2006.* ***30****(6): p. 445-51.*

22. *Patel, S.J., et al., Dose-intense ifosfamide/doxorubicin/cisplatin based chemotherapy for osteosarcoma in adults. Am J Clin Oncol, 2002.* ***25****(5): p. 489-95.*

23. *Link, M.P., et al., The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. N Engl J Med, 1986.* ***314****(25): p. 1600-6.*

24. *Ferrari, S. and E. Palmerini, Adjuvant and neoadjuvant combination chemotherapy for osteogenic sarcoma. Curr Opin Oncol, 2007.* ***19****(4): p. 341-6.*

25. *Siddik, Z.H., Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene, 2003.* ***22****(47): p. 7265-79.*

26. *Wittig, J.C., et al., Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. Am Fam Physician, 2002.* ***65****(6): p. 1123-32.*

27. *Hogendoorn, P.C., et al., Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol, 2010.* ***21 Suppl 5****: p. v204-13.*

28. *Eilber, F., et al., Adjuvant chemotherapy for osteosarcoma: a randomized prospective trial. J Clin Oncol, 1987.* ***5****(1): p. 21-6.*

29. *O'Day, K. and R. Gorlick, Novel therapeutic agents for osteosarcoma. Expert Rev Anticancer Ther, 2009.* ***9****(4): p. 511-23.*

30. *Chou, A.J. and R. Gorlick, Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. Expert Rev Anticancer Ther, 2006.* ***6****(7): p. 1075-85.*

31. *Khanna, C., Novel targets with potential therapeutic applications in osteosarcoma. Curr Oncol Rep, 2008.* ***10****(4): p. 350-8.*

32. *Scotlandi, K., P. Picci, and H. Kovar, Targeted therapies in bone sarcomas. Curr Cancer Drug Targets, 2009.* ***9****(7): p. 843-53.*

33. *Riedemann, J. and V.M. Macaulay, IGF1R signalling and its inhibition. Endocr Relat Cancer, 2006.* ***13 Suppl 1****: p. S33-43.*

34. *Sekyi-Otu, A., et al., Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas. Cancer Res, 1995.* ***55****(1): p. 129-34.*

35. *Sachdev, D. and D. Yee, Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. Mol Cancer Ther, 2007.* ***6****(1): p. 1-12.*

36. *Haluska, P., et al., Phase I dose escalation study of the anti insulin-like growth factor-I receptor monoclonal antibody CP-751,871 in patients with refractory solid tumors. Clin Cancer Res, 2007.* ***13****(19): p. 5834-40.*

37. *McGary, E.C., et al., Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. Clin Cancer Res, 2002.* ***8****(11): p. 3584-91.*

38. *Kubo, T., et al., Platelet-derived growth factor receptor as a prognostic marker and a therapeutic target for imatinib mesylate therapy in osteosarcoma. Cancer, 2008.* ***112****(10): p. 2119-29.*

39. *Akiyama, T., C.R. Dass, and P.F. Choong, Novel therapeutic strategy for osteosarcoma targeting osteoclast differentiation, bone-resorbing activity, and apoptosis pathway. Mol Cancer Ther, 2008.* ***7****(11): p. 3461-9.*

40. *Meyers, P.A., et al., Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. Cancer, 2011.* ***117****(8): p. 1736-44.*

41. *Labrinidis, A., et al., Zoledronic acid inhibits both the osteolytic and osteoblastic components of osteosarcoma lesions in a mouse model. Clin Cancer Res, 2009.* ***15****(10): p. 3451-61.*

42. *Labrinidis, A., et al., Zoledronic acid protects against osteosarcoma-induced bone destruction but lacks efficacy against pulmonary metastases in a syngeneic rat model. Int J Cancer, 2010.* ***127****(2): p. 345-54.*

43. *Hughes, D.P., Novel agents in development for pediatric sarcomas. Curr Opin Oncol, 2009.* ***21****(4): p. 332-7.*

44. *Shor, A.C., et al., Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival. Cancer Res, 2007.* ***67****(6): p. 2800-8.*

45. *Hingorani, P., et al., Inhibition of Src phosphorylation alters metastatic potential of osteosarcoma in vitro but not in vivo. Clin Cancer Res, 2009.* ***15****(10): p. 3416-22.*

46. *El-Houseini, M.E., et al., Clinical significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in sera of patients with pediatric malignancies. J Egypt Natl Canc Inst, 2004.* ***16****(1): p. 57-61.*

47. *DuBois, S. and G. Demetri, Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma. Cancer, 2007.* ***109****(5): p. 813-9.*

48. *Anderson, P.M., et al., Aerosol granulocyte macrophage-colony stimulating factor: a low toxicity, lung-specific biological therapy in patients with lung metastases. Clin Cancer Res, 1999.* ***5****(9): p. 2316-23.*

49. *Whelan, J., et al., The role of interferons in the treatment of osteosarcoma. Pediatr Blood Cancer, 2010.* ***54****(3): p. 350-4.*

50. *Muller, C.R., et al., Interferon-alpha as the only adjuvant treatment in high-grade osteosarcoma: long term results of the Karolinska Hospital series. Acta Oncol, 2005.* ***44****(5): p. 475-80.*

51. *Bjornsti, M.A. and P.J. Houghton, The TOR pathway: a target for cancer therapy. Nat Rev Cancer, 2004.* ***4****(5): p. 335-48.*

52. *Wan, X., et al., Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma. Cancer Res, 2005.* ***65****(6): p. 2406-11.*

53. *Fouladi, M., et al., Phase I study of everolimus in pediatric patients with refractory solid tumors. J Clin Oncol, 2007.* ***25****(30): p. 4806-12.*

54. *Guo, W., et al., Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma. Clin Cancer Res, 1999.* ***5****(3): p. 621-7.*

55. *Navid, F., et al., Combination of gemcitabine and docetaxel in the treatment of children and young adults with refractory bone sarcoma. Cancer, 2008.* ***113****(2): p. 419-25.*

56. *Strober, W., et al., Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. Nat Rev Immunol, 2006.* ***6****(1): p. 9-20.*

57. *Fidler, I.J., et al., Eradication of spontaneous metastases and activation of alveolar macrophages by intravenous injection of liposomes containing muramyl dipeptide. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981.* ***78****(3): p. 1680-4.*

58. *Kleinerman, E.S., et al., Combination therapy with ifosfamide and liposome-encapsulated muramyl tripeptide: tolerability, toxicity, and immune stimulation. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1995.* ***17****(3): p. 181-93.*

59. *Nardin, A., et al., Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine: Targeting and activating macrophages for adjuvant treatment of osteosarcoma. Curr Cancer Drug Targets, 2006.* ***6****(2): p. 123-33.*

60. *Mori, K., K. Ando, and D. Heymann, Liposomal muramyl tripeptide phosphatidyl ethanolamine: a safe and effective agent against osteosarcoma pulmonary metastases. Expert Rev Anticancer Ther, 2008.* ***8****(2): p. 151-9.*

61. *Anderson, P., Liposomal muramyl tripeptide phosphatidyl ethanolamine: ifosfamide-containing chemotherapy in osteosarcoma. Future Oncol, 2006.* ***2****(3): p. 333-43.*

62. *Meyers, P.A., et al., Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. J Clin Oncol, 2005.* ***23****(9): p. 2004-11.*

63. *Meyers, P.A., et al., Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group. J Clin Oncol, 2008.* ***26****(4): p. 633-8.*

XI. ANEXOS