



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Nuno Renato Amorim de Lima

**MODELOS EXPERIMENTAIS DE METÁSTASES
PULMONARES DE OSTEOSSARCOMA EM
MURGANHOS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Patologia Experimental, orientada pela
Doutora Célia Maria Freitas Gomes, apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre.

Novembro de 2020

Faculdade de Medicina
da Universidade de Coimbra

MODELOS EXPERIMENTAIS DE METÁSTASES PULMONARES DE OSTEOSSARCOMA EM MURGANHOS

Nuno Renato Amorim de Lima

Dissertação no âmbito do Mestrado em Patologia Experimental, orientada pela Doutora Célia Maria Freitas Gomes, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre.



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Novembro de 2020

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, sob a orientação da Doutora Célia Maria Freitas Gomes e coorientação do Doutor Flávio Nelson Fernandes Reis, no âmbito do Mestrado em Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NO ÂMBITO DESTA DISSERTAÇÃO

Trabalhos apresentados em painel (poster):

1. **Nuno R. Lima**, Sara F.F. Almeida, Rui C. Oliveira, Catarina O. Miranda, Luís Pereira de Almeida, Flávio Reis e Célia M.F. Gomes; ***Secretome from osteosarcoma cells promotes lung metastatic outgrowth in a murine model***; Conferência “Cancer Biology: From Basic to Translational Research”; 25 de setembro de 2020, Lisboa, Portugal.
2. Sara F.F. Almeida, Liliana Santos, **Nuno Lima**, Rui C. Oliveira, Tânia Martins-Marques, Teresa Ribeiro-Rodrigues, Henrique Girão, Amílcar C. Falcão, Antero J. Abrunhosa e Célia Gomes; ***Osteosarcoma cells-derived secretome induce endothelial cell dysfunction and stroma lung damage favourable for metastasis formation***; Conferência “Cancer Biology: From Basic to Translational Research”; 25 de setembro de 2020, Lisboa, Portugal.
3. Sara F.F. Almeida, **Nuno Lima**, Rui C. Oliveira, Tânia Martins-Marques, Teresa Ribeiro-Rodrigues, Catarina O. Miranda, Luís Pereira de Almeida, Amílcar C. Falcão, Antero J. Abrunhosa e Célia Gomes; ***Preconditioning mice with Osteosarcoma cells-derived secretome promote tumour cells engraftment and lung metastasis development***; Tumor Microenvironment (EACR-AACR Basic and Translational Research Conference in partnership with ASPIC); 2 a 4 de março de 2020, Lisboa, Portugal.
4. Sara F.F. Almeida, **Nuno Lima**, Rui C. Oliveira, Tânia Martins-Marques, Catarina O. Miranda, Luís Pereira de Almeida, Amílcar C. Falcão, Antero J. Abrunhosa e Célia Gomes; ***Secretome derived from osteosarcoma (OS) cells promote tumour cell colonization and lung metastasis formation in pre-treated mice***; CIBB Meeting 2019; 19 e 20 de dezembro de 2019, Coimbra, Portugal.
5. Sara F.F. Almeida, **Nuno Lima**, Tânia Martins-Marques, Henrique Girão, Catarina O. Miranda, Luís Pereira de Almeida, Amílcar C. Falcão, Antero J. Abrunhosa e Célia Gomes; ***Osteosarcoma-released bioactive factors facilitate lung metastasis by regulating cell adhesion***; Seed and Soil: Mechanisms of Metastasis – 2nd joint The European Association for Cancer Research (EACR) and Metastasis Research Society (MRS) conference; 7 a 9 de outubro de 2019, Berlin, Alemanha.

Trabalho apresentado na forma de comunicação oral:

1. Sara F.F. Almeida, **Nuno Lima**, Tânia Martins-Marques, Teresa Ribeiro-Rodrigues, Rui C. Oliveira, Catarina O. Miranda, Luís Pereira de Almeida, Amílcar C. Falcão, Antero J. Abrunhosa e Célia Gomes; ***Osteosarcoma cell-derived secretome induced structural lung damage favourable for metastasis formation***; SPF 2020 – 50th Meeting of the Portuguese Society of Pharmacology, 38th Meeting of Clinical Pharmacology and 19th Meeting of Toxicology. 5 a 7 de fevereiro de 2020, Coimbra, Portugal.

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência adequada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do Projeto Estratégico UID/NEU/04539/2019 e COMPETE-FEDER (POCI-01-0145-FEDER-007440) e pelo Projeto Estratégico UIDB/04539/2020 e UIDP/04539/2020 (CIBB). Liga Portuguesa contra o Cancro/Lions Portugal.

This work was funded by the Foundation for Science and Technology (FCT) through the Strategic Project UID/NEU/04539/2019 and COMPETE-FEDER (POCI-01-0145-FEDER-007440), and for the Strategic Project UIDB/04539/2020 and UIDP/04539/2020 (CIBB). Portuguese League Against Cancer/Lions Portugal.



DEDICATÓRIA

Dedico inteiramente este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais Arlindo Lima e Clorinda Lima, pelos exemplos de coragem e de perseverança que sempre me transmitiram. Obrigado por me terem ensinado a sonhar, por sonharem comigo e por acreditarem nos meus sonhos, por mais difícil que fosse suportar a saudade...

Aos meus amigos Alice Semblano e Aurélio Lima, que infelizmente viveram de perto a realidade desta doença. Obrigado pela vossa presença inspiradora, por terem sido a minha força motriz para nunca “desistir dos meus sonhos”...

Certeza

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

Fernando Sabino

ÍNDICE

Resumo.....	xv
Palavras-chave	xv
Lista de abreviaturas e acrónimos.....	xvii
Lista de figuras.....	xxi
Lista de tabelas.....	xxiii
1. Introdução.....	1
1.1 Osteossarcoma.....	3
1.1.1 Fatores de risco e patogénese	4
1.1.2 Classificação e estadiamento	5
1.1.3 Sintomatologia.....	7
1.1.4 Diagnóstico.....	8
1.1.5 Tratamento.....	10
1.1.5.1 Resseção cirúrgica	10
1.1.5.2 Quimioterapia sistémica.....	11
1.1.5.3 Radioterapia	13
1.2 Metastização.....	14
1.2.1 Cascata metastática	14
1.2.2 Metástases pulmonares.....	16
1.3 Modelos pré-clínicos de metástases	17
1.3.1 Modelos de transplantação.....	17
1.3.1.1 Modelo de metástases experimental.....	17
1.3.1.2 Modelo de metástases espontâneas.....	18
1.3.2 Modelos de metástases geneticamente modificados.....	18
2. Objetivos	23
3. Material e métodos.....	27
3.1 Cultura celular.....	27
3.2 Transdução da linha celular com o gene repórter da luciferase	27

3.3	Preparação do secretoma.....	28
3.4	Modelos animais de metástases pulmonares de osteossarcoma.....	28
3.4.1	Modelo experimental de metástases pulmonares.....	28
3.4.2	Modelo espontâneo de metástases pulmonares.....	29
3.5	Processamento do material biológico.....	29
3.5.1	Análise histopatológica.....	30
3.5.2	Análise imunohistoquímica.....	30
3.5.3	Análise hematológica.....	30
3.6	Análise estatística.....	31
4.	Resultados e discussão.....	35
4.1	Expressão do gene repórter da luciferase nas células 143B de osteossarcoma.....	35
4.2	Modelo experimental de metástases pulmonares de osteossarcoma.....	35
4.2.1	Injeção intravenosa das células 143B na veia lateral da cauda.....	36
4.2.2	Precondicionamento com o secretoma das células 143B.....	39
4.3	Modelo espontâneo de metástases pulmonares de osteossarcoma.....	43
4.4	Dados hematológicos.....	47
5.	Conclusões.....	49
6.	Referências bibliográficas.....	55

AGRADECIMENTOS

É muito difícil descrever o sentimento de reconhecimento aos que fizeram parte deste caminho, mas estarei eternamente grato a todos que de forma direta e indireta me permitiram crescer pessoal e profissionalmente.

Começo por agradecer à minha orientadora Doutora Célia Gomes, pelas constantes palavras de incentivo, pela confiança que depositou em mim e por tudo o que me proporcionou aprender. Por ter partilhado comigo as conquistas e as frustrações de cada experiência. Obrigado por ter sido a minha mentora na área de Oncobiologia e por me ter recebido de braços abertos no seu grupo de investigação.

Ao meu coorientador Doutor Flávio Reis, pela partilha extraordinária de conhecimento científico que me fez crescer profissionalmente e pelo estímulo constante na realização desta dissertação. Obrigado pela amizade e por todos os preciosos conselhos.

À Mestre Sara Almeida pelo tempo que despendeu a ensinar-me novas técnicas experimentais, bem como por toda a sua disponibilidade permanente no esclarecimento de dúvidas que me surgiram.

Ao Doutor Rui Caetano Oliveira, do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, a quem agradeço a sua valiosa ajuda na análise e interpretação dos resultados histopatológicos.

Ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e à Doutora Catarina Oliveira Miranda pela transdução da linha celular, que contribuiu para a realização do trabalho experimental.

Ao Professor Doutor Francisco Caramelo, pelo apoio e sugestões no tratamento dos dados e análise estatística dos resultados.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Fontes Ribeiro (Diretor do serviço de Farmacologia e Terapêutica Experimental do iCBR), os meus mais sinceros agradecimentos pelo acolhimento nas instalações laboratoriais do departamento.

À Professora Doutora Teresa Letra Mateus, que desde a minha licenciatura me incitou o gosto pela investigação e a “pensar fora da caixa”. Por ter sido e continuar a ser uma amiga presente em vários momentos da minha vida, quer académica quer pessoal.

À Professora Doutora Paula Ferreira (Diretora do laboratório de Imunologia Mário Arala-Chaves do Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia do ICBAS), por todos os bons conselhos, por ter acreditado em mim e por toda a boa energia contagiante que me impulsionou a progredir nos meus estudos.

Aos meus colegas do Mestrado em Patologia Experimental (Catarina Miranda, Miguel Teixeira, Patrícia Santos e Rui Oliveira) por todo o espírito de entreajuda e companheirismo que compartilhamos. Foi um gosto e orgulho ter-vos conhecido, fomos sem dúvida um exemplo de como trabalhar em equipa. Obrigado por se terem cruzado no meu percurso.

Aos meus amigos e colegas: Carlota Nóbrega, Miguel Morgado e Sílvia Amaral, que permaneceram ao meu lado em todas as circunstâncias, quer nos momentos de tensão, mas também de muita alegria e descontração. Obrigado por terem estado sempre presentes e por me ajudarem a relativizar os obstáculos que me surgiram neste ano que foi extremamente intenso.

Às minhas irmãs Márcia Lima e Filipa Lourenço (irmã do coração), pela vossa presença transformadora, por compartilharem comigo o verdadeiro sentimento da amizade e por me acompanharem sempre em todos os objetivos que traço. Obrigado por fazerem parte do meu crescimento e da minha vida.

Aos meus sobrinhos Martim Lima e Matilde Lima, por me terem ensinado que a beleza da vida não está nas grandes conquistas, mas na intensidade dos pequenos momentos. Obrigado por despertarem o melhor de mim.

“Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigantes”

Isaac Newton

Resumo

Introdução: O desenvolvimento de metástases pulmonares é atualmente a principal causa de morte nos doentes com osteossarcoma (OS). As abordagens terapêuticas atualmente disponíveis para o tratamento da doença metastática são pouco eficazes, sendo urgente a identificação de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos. A falta de modelos animais que mimetizem de forma fiel o desenvolvimento da doença metastática tem contribuído para os poucos avanços no tratamento de OS metastizado. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de modelos de metástases pulmonares de OS em murganhos, capazes de recapitularem as diferentes etapas da cascata metastática e com potencial de aplicação em investigação pré-clínica.

Materiais e Métodos: Foram utilizados murganhos da estirpe Swiss nu/nu e uma linha celular humana de OS (143B) transduzida com o gene repórter da luciferase. Na indução de metástases pulmonares foram utilizadas duas abordagens: o modelo de metastização experimental e o modelo de metastização espontânea. O primeiro foi induzido através da injeção intravenosa das células tumorais na veia lateral da cauda. Dentre estes, um grupo de animais foi sujeito a um pré-tratamento com o secretoma das células tumorais antes da injeção das células na veia lateral da cauda. No modelo de metastização espontânea, foi induzido um tumor primário por injeção subcutânea das células tumorais. O tumor foi removido cirurgicamente e os animais foram mantidos em observação até ao aparecimento das lesões. A formação de metástases pulmonares foi monitorizada semanalmente por imagiologia ótica de bioluminescência até um máximo de 8 semanas. Após a necrópsia, as lesões pulmonares foram recolhidas para caracterização histopatológica.

Resultados: No grupo de animais inoculados com as células tumorais na veia lateral da cauda, apenas 50% desenvolveram metástases pulmonares unilobulares. O pré-tratamento com o secretoma promoveu a formação de metástases em todos os animais e mais precocemente, tendo evoluído na sua maioria para múltiplas metástases. No modelo espontâneo, apenas um terço desenvolveu metástases pulmonares após a remoção do tumor primário. As lesões pulmonares apresentaram um padrão histopatológico semelhante, com áreas de necrose central e deposição de α -SMA nos septos alveolares peritumorais.

Conclusões: O secretoma das células tumorais contém moléculas bioativas que favorecem a colonização e subsequente proliferação das células tumorais no parênquima pulmonar, destacando a importância do nicho pré-metastático na formação de metástases. O modelo de metastização espontânea confirmou o tropismo das células de OS para o pulmão. Apesar de melhor reproduzir todas as etapas da cascata metastática, a eficiência de formação é baixa.

Palavras-chave

Metástases pulmonares, secretoma, modelo animal, osteossarcoma

Abstract

Introduction: The development of lung metastases is currently the leading cause of death in patients with osteosarcoma (OS). The therapeutic approaches available for the treatment of metastatic disease are ineffective, which underlies the urgent need to identify new therapeutic targets and to develop more effective drugs. The lack of animal models that faithfully mimic the development of metastatic disease has contributed to the few advances in the metastatic OS treatment. The aim of this work was the development of models of lung metastasis of OS in mice, capable of mimicking the different stages on the metastatic cascade with potential for application in preclinical investigation.

Materials and Methods: Swiss nu/nu mice and a human OS (143B) cell line stably transduced with the luciferase reporter gene were used. Two different approaches were employed to induce lung metastases: the experimentally induced and spontaneous metastasis models. The first was induced by intravenous injection of tumor cells into the lateral vein of the tail. A group was pretreated with the tumor cell secretome before the intravenous cells injection. In the spontaneous metastasis model, a primary tumor was induced by subcutaneous injection of tumor cells. The tumor was surgically resected and the animals maintained under observation for metastasis to develop. The formation of lung metastases was monitored weekly by optical imaging of bioluminescence up to a maximum of 8 weeks. Pulmonary lesions were collected at necropsies for histopathological characterization.

Results: Only 50% of the animals inoculated with tumor cells in the tail vein developed unilobular lung metastases. Pretreatment with the secretome promoted the formation of lung metastases in all animals that have appeared early and evolved mostly to multiple metastases. In the spontaneous model, only one third developed lung metastases one week after removal of the primary tumor. The pulmonary lesions showed a similar histopathological pattern, with areas of central necrosis and deposition of α -SMA in the peritumoral alveolar septa.

Conclusions: The tumor cell secretome contains bioactive molecules that favor colonization and subsequent proliferation of tumor cells in the lung parenchyma, highlighting the importance of the pre-metastatic niche in the formation of lung metastases. The spontaneous metastasis model confirmed the tropism of OS cells to the lung. Despite reproducing all stages of the metastatic cascade, the efficiency of spontaneous lung metastasis formation is low.

keywords

Lung metastasis, secretome, animal model, osteosarcoma

Lista de abreviaturas e acrónimos

%	Porcentagem
α -SMA	Alfa-actina do músculo liso
®	Marca registada
μ m	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLI	Bioluminescência
CAFs	<i>Cancer-associated fibroblasts</i>
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
CO ₂	Dióxido de Carbono
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro Fetal Bovino
fL	Fentolitro
FMUC	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
g	Grama
GBs	Glóbulos brancos
GEMMs	Modelos animais geneticamente modificados
GVs	Glóbulos vermelhos
Gy	Gray
H&E	Hematoxilina e eosina

Hb	Hemoglobina
HGM	Hemoglobina globular média
Htc	Hematócrito
iCBR	Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra
Kg	Quilograma
L	Litro
m ²	Metro quadrado
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
MMP-9	Metaloproteinase-9 da matriz
ng	Nanograma
°C	Graus centígrados
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORBEA	Organismo Responsável pelo Bem-estar dos Animais
OS	Osteossarcoma
PBS	Solução salina tamponada
PET	Tomografia por Emissão de Positrões
pg	Picograma
RDW	Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos
RM	Ressonância Magnética
rpm	Rotações por minuto
RT	Radioterapia
SD	Desvio padrão
SEM	Erro padrão da média

TC	Tomografia Computadorizada
VEGFR-1	Recetor tipo 1 do fator de crescimento endotelial vascular
VGM	Volume globular médio
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrómetro

Lista de figuras

Figura 1.1 Principais fatores de risco associados à etiologia de osteossarcoma	4
Figura 1.2 Imagens microscópicas representativas de um osteossarcoma osteoblástico numa ampliação de 20x (A) e de 40x (B)	6
Figura 1.3 Imagens radiográficas de um fêmur e de um úmero com osteossarcoma	9
Figura 1.4 Representação esquemática das etapas da disseminação metastática.....	15
Figura 4.1 Monitorização da intensidade do sinal de bioluminescência nas células 143B-luc ⁺ com diferentes passagens.....	35
Figura 4.2 Desenvolvimento de metástases pulmonares por injeção intravenosa de células 143B ⁺ em murganhos atímicos.....	37
Figura 4.3 Imagens representativas de uma lesão metastática pulmonar de um animal inoculado com células 143B na veia lateral da cauda	38
Figura 4.4 Efeito do secretoma na formação de metástases pulmonares em murganhos atímicos.....	39
Figura 4.5 Imagens representativas de uma lesão metastática pulmonar num animal tratado com secretoma seguido de injeção intravenosa de células 143B	40
Figura 4.6 Comparação da cinética de crescimento das lesões metastáticas entre o grupo de animais não tratado e o grupo pré-tratado com o secretoma tumoral	41
Figura 4.7 Remoção cirúrgica do tumor primário subcutâneo	43
Figura 4.8 Crescimento do tumor primário e desenvolvimento de metástases pulmonares após inoculação subcutânea de células 143B luc ⁺ em murganhos atímicos	44
Figura 4.9 Caracterização histopatológica do tumor primário subcutâneo.....	45
Figura 4.10 Metástases pulmonares espontâneas	45

Lista de tabelas

Tabela 1.1 Sistema de Enneking usado para o estadiamento de osteossarcoma	7
Tabela 1.2 Mecanismos de ação e efeitos adversos dos principais fármacos antineoplásicos usados no tratamento de osteossarcoma	13
Tabela 4.1 Parâmetros das curvas de ajuste exponencial	41
Tabela 4.2 Parâmetros hematológicos no grupo de animais não tratados e sujeitos ao tratamento com o secretoma das células 143B	48

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Osteossarcoma

Os tumores ósseos representam cerca de 3 a 5% dos câncros na população infantojuvenil e menos de 1% em adultos, sendo o osteossarcoma (OS) o tumor ósseo maligno primário mais frequentemente diagnosticado¹. É um tumor de origem mesenquimal que se caracteriza pela produção de osteóide pelas células tumorais²⁻⁴. A taxa de sobrevivência dos indivíduos com esta neoplasia pode variar de acordo com a idade, estado da doença, localização anatômica das lesões e resposta histológica à quimioterapia pré-cirúrgica⁵.

O OS é classificado como uma doença rara, com uma incidência global de 0,2 a 3 por 100 mil habitantes por ano (0,8 a 11 por 100 mil habitantes por ano na faixa etária de 15 a 19 anos) na União Europeia⁶. Apesar de ser relativamente pouco frequente, é o oitavo tipo mais comum de tumor ósseo observado em crianças e adolescentes⁷ e a segunda principal causa de morte de câncer nestas faixas etárias⁸. Apresenta uma distribuição etária bimodal, em que pode ser observado um primeiro pico de incidência durante a puberdade no período de crescimento esquelético (entre os 10 e os 14 anos)⁹ e um segundo pico em adultos (acima dos 65 anos)^{1,10}. Porém, é extremamente raro ocorrer antes dos 5 anos¹¹. A sua prevalência é maior em indivíduos do sexo masculino, numa proporção de homens:mulheres de 1,5:1⁷. O crescimento ósseo e as alterações hormonais podem justificar em parte a sua ocorrência mais elevada no sexo masculino⁵. No entanto, manifesta-se mais cedo no sexo feminino, pelo facto de na puberdade o seu pico de crescimento ser mais precoce¹⁰.

A maioria dos casos de OS são de elevado grau de malignidade e geralmente ocorrem nas regiões de crescimento ósseo rápido, como as placas de crescimento da metáfise dos ossos longos. Embora possa ocorrer em qualquer osso, os locais anatómicos mais afetados são o fêmur distal (43%), a tíbia proximal (23%) e o úmero proximal (10%)^{7,10,12,13}. Apenas 8% de todos os casos ocorrem no crânio e na mandíbula e cerca de 8% na região pélvica⁷.

Apesar da introdução de novos regimes de quimioterapia e dos avanços nas técnicas cirúrgicas, que se refletem na melhoria da taxa de sobrevivência em 50-60%, cerca de 15-20% dos indivíduos com OS apresentam um prognóstico desfavorável, devido ao aparecimento de metástases¹⁴. A doença metastática surge com maior frequência nos pulmões (85-90%) e é a principal causa de morte dos doentes com OS, especialmente relacionada com a presença de micrometástases clinicamente não detetáveis no diagnóstico^{11,15}. A extensa área vascular do parênquima pulmonar, torna-o um microambiente particularmente atraente para suportar o desenvolvimento de metástases¹⁶. Contudo, apesar de menos comum, estas também se podem desenvolver nos ossos (8-10%) e raramente nos gânglios linfáticos¹⁷.

1.1.1 Fatores de risco e patogénese

As causas exatas que levam ao aparecimento de OS são desconhecidas, mas várias evidências sugerem a interação entre fatores epidemiológicos, genéticos e ambientais associados à sua etiologia⁹. Na Figura 1.1 encontram-se referidos alguns dos principais fatores de risco predisponentes ao desenvolvimento de OS.

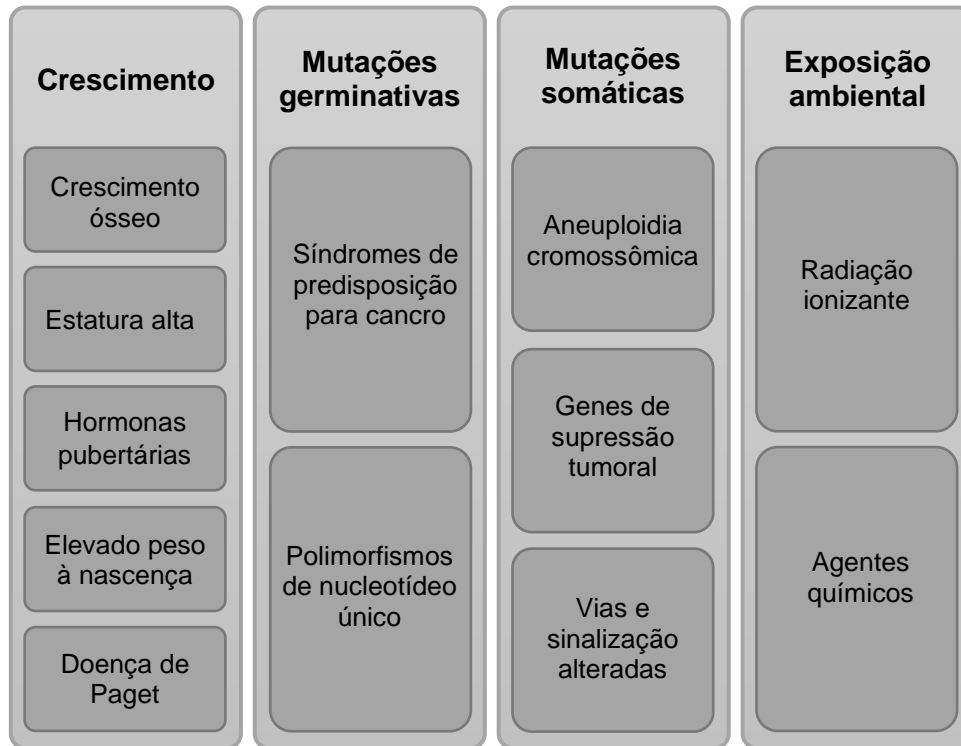


Figura 1.1 | Principais fatores de risco associados à etiologia de osteossarcoma
[Adaptado de ⁵].

As perturbações fisiológicas e patológicas que ocorrem na remodelação óssea, são fatores de risco envolvidos na patogénese de OS. Várias evidências clínicas apontam para uma associação entre o OS e o rápido crescimento ósseo que se verifica durante a puberdade¹⁸. O OS ocorre mais comumente nos locais de crescimento ósseo, porque presumivelmente a proliferação faz com que as células osteoblásticas adquiram mutações que podem conduzir a uma transformação neoplásica^{19,20}. Além disso, estudos recentes mostram que os adolescentes com OS apresentam uma estatura mais alta, quando comparados com a altura padrão da população nesta faixa etária. Tal sugere que os fatores de crescimento desempenham um papel importante no aparecimento desta neoplasia^{18,21}. Outro fator correlacionado com o risco de desenvolver OS secundário é a ocorrência de doenças ósseas, como a doença de Paget ou outras síndromes displásicas. A doença de Paget é um distúrbio crónico do esqueleto adulto, que é marcado por áreas focais de reabsorção e de formação óssea desregulada⁸.

As células de proliferação rápida podem ser particularmente suscetíveis a agentes oncogênicos e a erros mitóticos que levam à transformação neoplásica. As células tumorais de OS exibem cariótipos com um alto grau de complexidade, o que dificulta a determinação das aberrações cromossômicas que os caracterizam⁹. Algumas das mutações hereditárias do ácido desoxirribonucleico (ADN) causam síndromes que se encontram associadas com maior frequência ao OS, como as alterações que ocorrem nas vias de sinalização dos genes supressores tumorais p53 e RB1. A maioria dos casos de mutações na linha germinativa do gene supressor p53 estão relacionados com indivíduos que apresentam um histórico familiar sugestivo de síndrome de Li-Fraumeni^{4,9}. O gene p53 codifica uma fosfoproteína nuclear que atua como um supressor tumoral²², promovendo a reparação do ADN ou a indução da apoptose em caso de danos genéticos irreparáveis^{23,24}. Desta forma, a desativação do gene p53 pode contribuir para a tumorigênese, através da desregulação dos mecanismos apoptóticos e da propagação de mutações genéticas²⁵. Embora extremamente raro, os indivíduos com retinoblastoma hereditário apresentam uma predisposição genética para o desenvolvimento de OS, que resulta de mutações germinativas no gene supressor tumoral RB1⁹. Na ausência do gene RB1 funcional, as células podem proliferar de forma descontrolada, levando à transformação maligna de células primitivas da retina²⁶.

Várias condições ambientais estão relacionadas com o desenvolvimento de OS, sendo a exposição à radiação ionizante a mais descrita. A terapia com radiação ionizante é um dos fatores de risco para a ocorrência de OS secundário e que está implicada em aproximadamente 2% dos casos^{4,5}. Por outro lado, o aumento da sua incidência induzido pela radiação está associado com uma maior taxa de sobrevivência após a irradiação primária⁴. Paralelamente, a exposição a alguns agentes químicos como metilcololeno, óxido de berílio e silicato de zinco-berílio, também podem contribuir para a indução de OS²⁷.

1.1.2 Classificação e estadiamento

O OS possui um amplo espectro de aparências histológicas, que têm em comum a proliferação de células malignas de origem mesenquimal e a produção de matriz osteóide e/ou óssea pelas células tumorais. A matriz condróide e fibrosa também podem estar presentes, refletindo a origem mesenquimal das células tumorais e a sua consequente capacidade de se diferenciar em vários tipos de células¹¹. O OS convencional é um sarcoma intramedular primário de alto grau, responsável por 80-90% dos casos desta neoplasia em crianças e adolescentes^{4,6,11}.

A atual classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), dependendo do tipo de matriz celular predominante, reconhece três principais subtipos de OS convencional: condroblástico (25%), fibroblástico (25%) e osteoblástico (50%)²⁸. Contudo, apesar desta

classificação, um mesmo tumor pode apresentar características histológicas dos três subtipos de OS convencional²⁹. O subtipo condroblástico é constituído sobretudo por uma matriz condróide, que geralmente se assemelha à cartilagem hialina, com a presença de células malignas nas lacunas. Por sua vez, o subtipo fibroblástico é composto por células fusiformes malignas e por uma matriz osteóide escassa. A presença de uma matriz osteóide, mesmo que mínima, permite distinguir respetivamente os subtipos condroblástico e fibroblástico de outros tipos de cancros ósseos como do condrosarcoma e do fibrossarcoma/histiocitoma fibroso maligno, com os quais podem ser confundidos histologicamente¹¹. Por último, o subtipo osteoblástico que constitui a forma patológica mais frequente e no qual predomina a matriz osteóide, é caracterizado por células mesenquimais fusiformes ou poliédricas malignas com núcleos pleomórficos e hiper cromáticos, figuras mitóticas dispersas e níveis variáveis de anaplasia como exemplificado na Figura 1.2^{11,30}.

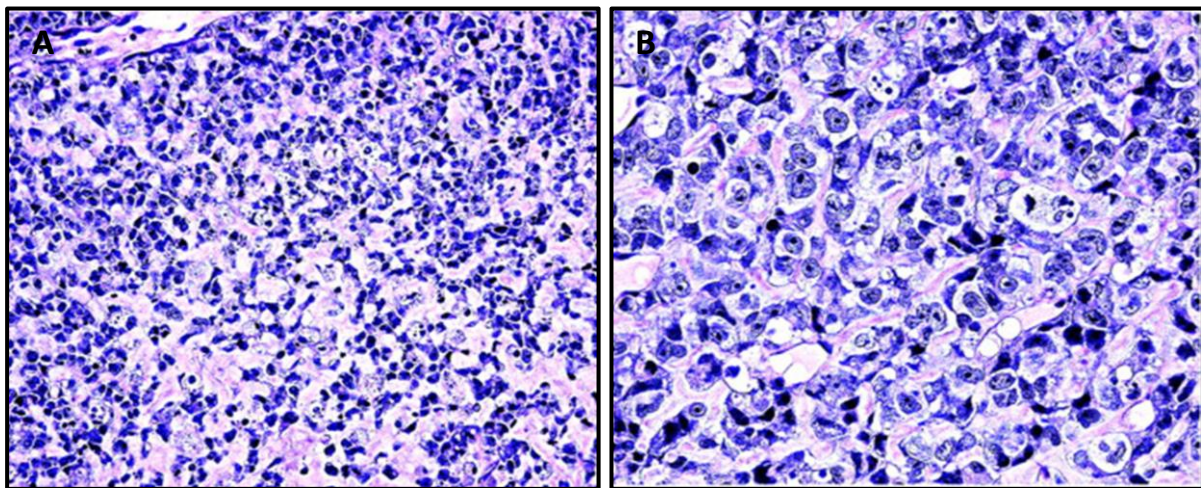


Figura 1.2 | Imagens microscópicas representativas de um osteossarcoma osteoblástico numa ampliação de 20x (A) e de 40x (B). Observa-se a presença de uma alta celularidade, polimorfismo nuclear, atipia e produção desordenada de tecido osteóide [Fonte: ¹¹].

Além de OS convencional a classificação da OMS considera outras variantes histológicas adicionais menos frequentes, que incluem os tipos telangiectásico, de pequenas células, parosteais e periosteais²⁸. Por outro lado, o OS não compreende apenas um conjunto de características histopatológicas diversificadas com graus de malignidade distintos, podendo igualmente ser classificado de acordo com a sua localização anatómica. A maioria das lesões ocorrem no interior dos ossos (no compartimento intramedular ou intracortical), podendo também surgir na superfície externa do córtex ósseo e em locais extraósseos²⁹. Existe também o OS secundário que ocorre no osso afetado por anormalidades pré-existentes, sobretudo em adultos idosos, associado a fatores predisponentes como a doença de Paget ou a alterações induzidas pela radioterapia (RT)^{6,19}.

O estudo do estadiamento do tumor assume um papel preponderante no planeamento da abordagem cirúrgica e na especificação da região que provavelmente produzirá material patológico representativo para análise³¹. O sistema de Enneking proposto pela Sociedade de Tumores Músculo-esqueléticos que se encontra representado na Tabela 1.1 é o mais amplamente utilizado para descrever a extensão dos tumores ósseos¹¹.

Tabela 1.1 | Sistema de Enneking usado para o estadiamento de osteossarcoma

	Intracompartimental	Extracompartimental
Baixo grau	IA	IB
Alto grau	IIA	IIB
Metastático	III	III

[Fonte: Adaptado de ³²].

Este sistema de estadiamento permite distinguir os tumores ósseos malignos consoante o seu grau histológico (baixo grau: estágio I ou alto grau: estágio II, dependendo da sua malignidade), localização anatómica (A: intracompartimental ou B: extracompartimental) e através da presença de metástases (III)³². As lesões de baixo grau são bem diferenciadas, têm poucas mitoses e exibem apenas uma atipia citológica moderada com menor risco de metástases (menos de 25%). As lesões de alto grau são pouco diferenciadas e apresentam uma elevada taxa mitótica³³. Existem muito poucas lesões intramedulares de alto grau (estágio IIA), porque a maioria dos casos de OS com esta classificação, rompem o córtex no início de sua história natural. Nas faixas etárias mais jovens, a generalidade das lesões são de alto grau (estágio IIB ou III), que apenas se distinguem pela presença ou ausência de doença metastática detetável¹¹.

1.1.3 Sintomatologia

A maioria dos doentes com OS apresentam dor progressiva nos ossos ou nas articulações, antes que o tumor se torne perceptível¹². O aumento da intensidade da dor está correlacionado com a penetração tumoral no osso cortical e com o estiramento do perióstio^{12,31}. Inicialmente, a dor pode não ser constante e ser mais intensa durante a noite ou em repouso^{32,34}. O doente frequentemente associa a dor a um evento traumático recente, mas é pouco provável que o trauma tenha origem no tumor. Os sintomas geralmente não são valorizados, pois a maior parte das vezes são inespecíficos e característicos de outras lesões ósseas ou musculares (artrite, entorse ou dores de crescimento) que podem estar ou não associados a um historial clínico de lesão musculoesquelética traumática^{34,35}. Se envolver a articulação do joelho, a dor pode ser exacerbada pelo peso e o doente pode exibir dificuldades

locomotoras^{34,36}. O desenvolvimento de uma dor súbita e intensa pode ser indício de uma fratura patológica grave e é um achado clínico pouco observado em adultos⁴. O seu aparecimento não é comum no OS, exceto no tipo telangiectático que apesar de raro é mais propenso a causar fraturas locais³⁴.

A presença de uma massa palpável surge algumas semanas após o início da dor. Embora cerca de 90% dos casos de OS exibam extensão para os tecidos moles, apenas alguns dos doentes reportam uma tumefação local⁴. O aumento do volume regional observado no exame físico pode ser inicialmente suave e difuso, devido ao edema circundante. Contudo, a sua consistência aumenta gradualmente à medida que o tumor cresce³⁷. A diminuição da amplitude dos movimentos nas articulações e a atrofia muscular são também indicações clínicas que caracterizam esta neoplasia e que podem ser evidentes 6 meses antes do diagnóstico^{12,31}.

Problemas respiratórios são raros e quando presentes indicam um extenso envolvimento pulmonar associado à doença metastática³⁴. Para além dos sintomas locais do tumor primário, uma minoria dos doentes podem evidenciar sintomas sistêmicos adicionais como: perda de peso, palidez, febre, anorexia e linfadenopatia^{2,4,12}.

1.1.4 Diagnóstico

Devido à natureza complexa das neoplasias ósseas primárias, o diagnóstico de OS é realizado através de uma abordagem multidisciplinar, que engloba a combinação de estudos de imagem e posterior confirmação por biópsia³¹. No entanto, o diagnóstico de OS pode ser desafiador devido à sua baixa incidência e aos seus sintomas inespecíficos²⁰. Os testes laboratoriais não são essenciais para o diagnóstico desta neoplasia, mas níveis séricos elevados de fosfatase alcalina e de lactato desidrogenase podem ser sugestivos de um mau prognóstico^{3,12}.

A avaliação de um doente com suspeita de OS, inicia-se com um exame clínico detalhado, seguido de uma radiografia simples^{3,38}. Os doentes comumente associam os primeiros sintomas da doença a pequenas lesões traumáticas e são submetidos a uma radiografia do membro afetado com suspeita de fratura, em vez de malignidade óssea²⁰. O exame por raios X é extremamente útil para diferenciar entre as possíveis causas de uma massa óssea e para detetar a presença de metástases pulmonares. Embora a tomografia computadorizada (TC) ao tórax seja mais sensível para este efeito³¹. Radiograficamente, o OS apresenta-se como uma lesão esclerótica e lítica mista, que surge de forma excêntrica na metafise dos ossos longos³². O tumor pode sofrer erosão através do córtex formando o “triângulo de Codman”, provocado pela elevação do perióstio, dando origem a uma

tumefação significativa nos tecidos moles adjacentes⁴. A Figura 1.3 evidencia diferentes projeções radiográficas de lesões no tecido ósseo características de OS.



Figura 1.3 | Imagens radiográficas de um fêmur e de um úmero com osteossarcoma. Incidências ântero-posterior (A) e lateral (B) na região femoral distal demonstrando uma lesão radiodensa mista com reação periosteal associada; Incidência ântero-posterior (C) e lateral (D) evidenciando uma lesão diafisária do úmero com extensão para os tecidos moles acompanhada por destruição cortical e por uma descontinuidade no periósteo [Fonte: ³²].

Para delinear a extensão local do tumor e a presença de outras lesões ósseas, é essencial recorrer a outros exames de diagnóstico. A TC raramente é realizada para o tumor primário, uma vez que a sua extensão extraóssea e intraóssea são mais facilmente reconhecidas por ressonância magnética (RM). No entanto, na presença de necrose e edema circundante, a TC revela-se ser mais precisa do que a RM. Tal deve-se ao facto, da TC permitir delimitar com maior exatidão o envolvimento do tumor com os tecidos moles e a sua proximidade com as estruturas neurovasculares³¹. Apesar disto, a TC apresenta limitações, pois não consegue diferenciar com grande segurança pequenas metástases pulmonares de lesões benignas³⁹. O exame de RM deve incluir todo o osso para possibilitar a identificação da dimensão anatómica das lesões tumorais nos tecidos, avaliar a sua proximidade com as estruturas circundantes e detetar a presença de metástases³². Além disso, a RM tem vindo a ser associada à tomografia por emissão de positrões (PET), devido ao seu potencial em avaliar o envolvimento sistémico do tumor, a sua recorrência local e o desenvolvimento de metástases após o tratamento³³. Adicionalmente, o PET quando associado com a TC, pode ser usado no planeamento de biópsias ou para avaliar lesões tumorais em doentes que não podem ser submetidos à RM²⁰. Outra técnica de imagem complementar para o diagnóstico de OS é a cintigrafia óssea, que através do radiofármaco tecnécio-99m permite a deteção de metástases ósseas em locais distantes³¹.

O diagnóstico definitivo de OS deve ser confirmado por análise histopatológica, antes da terapia direcionada ao tumor ser iniciada³⁹. Para isso é imprescindível a realização de uma

biópsia dos tecidos lesionados, através de uma punção com agulha fina ou por cirurgia aberta⁴. A biópsia executada com agulha fina é um procedimento minimamente invasivo, que não requer cicatrização e que está associado a um menor risco de infecção, contaminação e fratura pós-biópsia. É muito adequada para a recolha de amostras em áreas profundas e de difícil alcance, como a pélvis e a coluna vertebral^{31,33}. Quando a biópsia é efetuada por cirurgia aberta, esta é realizada através de uma pequena incisão e tem a vantagem de possibilitar obter uma quantidade adequada de amostra para análise histopatológica, genética e imunohistoquímica. Contudo, quando é executada de forma incorreta, pode promover a disseminação de células tumorais para a corrente sanguínea³³. Para prevenir a contaminação de células tumorais e reduzir a sua viabilidade, pode ser realizado um tratamento por RT com baixas doses de irradiação (aproximadamente 1 Gy), antes da biópsia inicial⁴⁰.

1.1.5 Tratamento

Antes da década de 1970, a resseção cirúrgica do tumor era o único tratamento para o OS e a amputação era o procedimento padrão para o controlo local da doença. Com os avanços nas técnicas de imagem, quimioterapia e reconstrução cirúrgica, este paradigma modificou-se³⁰. Nas últimas décadas, a introdução da quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante) e pós-operatória (adjuvante) mostraram ser eficazes no tratamento da doença localizada (não metastática), o que permitiu melhorar a taxa de sobrevida dos doentes com OS⁴¹. Porém, em alguns casos metastáticos, a taxa de sobrevivência dos doentes permaneceu inalterada⁴². Além disso, o desenvolvimento das técnicas cirúrgicas em combinação com a radioterapia pós-operatória e/ou com o tratamento sistêmico, tornaram o procedimento de conservação dos membros uma alternativa segura à sua amputação⁴⁰.

O tratamento convencional para o OS inclui a quimioterapia pré-operatória para redução do volume tumoral, seguida pela remoção cirúrgica do tumor primário e por quimioterapia pós-operatória^{13,41,43,44}. Antes do uso da quimioterapia, a taxa de sobrevida global para os doentes com tumores clássicos de alto grau era inferior a 20%, o que indicava a presença de micrometástases (tipicamente pulmonares) mesmo com a amputação cirúrgica^{44,45}. Atualmente, a combinação da resseção cirúrgica com a quimioterapia multimodal e os estudos de imagem aprimorados, permitiram aumentar a sobrevida livre de doença ao fim de 5 anos entre 60-70%⁴⁰.

1.1.5.1 Resseção cirúrgica

A cirurgia oncológica ortopédica de resseção é uma das principais etapas no tratamento de OS, quer seja por amputação ou por cirurgia conservadora dos membros¹¹. O objetivo primordial do tratamento cirúrgico é a remoção completa do tumor, com uma boa margem de segurança^{38,46}. A seleção do tipo de abordagem cirúrgica depende da idade do

doente, da localização anatômica e da extensão das lesões, bem como da resposta do tumor primário à quimioterapia pós-operatória¹¹. Para o OS de baixo grau apenas é realizada a excisão cirúrgica como tratamento único. No caso de OS de alto grau, o tratamento cirúrgico deve ser combinado com a quimioterapia multimodal⁴⁶.

Atualmente, 90-95% dos doentes com OS evitam a amputação do membro afetado, com ressecções cirúrgicas conservadoras bem-sucedidas. A amputação tornou-se numa opção menos frequente devido às terapias neoadjuvantes, aos avanços nas técnicas cirúrgicas e ao aperfeiçoamento nos métodos de diagnóstico⁴⁰. No entanto, se uma ressecção adequada com preservação do membro não puder ser realizada, a amputação deve ser considerada³¹. Esta é vantajosa nos casos em que ocorre extensão do tumor para os tecidos moles, em que as estruturas vasculares vitais se encontram comprometidas ou quando a resposta tumoral à quimioterapia não é favorável^{20,40}. Os doentes com recidiva do tumor ou com danos graves causados pela irradiação, são igualmente excluídos da cirurgia de preservação dos membros. A preservação do membro apresenta benefícios, mas não existem evidências consistentes se a qualidade de vida dos doentes é superior aos que sofrem amputação. A taxa de complicações não oncológicas é muito maior após a cirurgia de preservação do membro e conseqüentemente podem ser necessárias cirurgias adicionais⁴⁷.

Além disto, a cirurgia é fundamental para reconstruir e restabelecer a função do membro afetado, após a ressecção do tumor^{38,40}. No caso de ossos que não suportam o peso corporal, como a fíbula ou a clavícula, a sua reconstrução é desnecessária porque a excisão destas estruturas não causam défices funcionais^{44,46}. Devido à complexidade do sistema musculoesquelético, podem ser consideradas diferentes opções reconstrutivas, dependendo da localização do tumor e da idade do doente, que incluem: enxertos ósseos autógenos, aloenxertos ósseos estruturais e endopróteses metálicas¹¹.

1.1.5.2 Quimioterapia sistêmica

O tratamento bem-sucedido de OS requer o uso da quimioterapia sistêmica, baseada na combinação de fármacos que interferem na viabilidade das células tumorais⁴². Os avanços no tratamento quimioterápico nos últimos 30 anos, têm sido responsáveis pelo aumento do sucesso da cirurgia de preservação do membro que conduziram a taxas de sobrevida mais elevadas, assim como contribuíram para a redução do número de metástases pulmonares ou por atrasar o seu aparecimento³¹. Embora a quimioterapia seja o método com maior probabilidade de cura, a cirurgia continua a ser uma componente essencial no plano terapêutico dos doentes com OS. Na ausência de quimioterapia eficaz, a cirurgia torna-se a única hipótese possível de tratamento. Mesmo com uma quimioterapia eficiente, o OS raramente é curado sem ressecção cirúrgica³⁸.

A quimioterapia pré-operatória ou neoadjuvante induz a necrose do tumor primário e possibilita um tratamento precoce da doença metastática³¹. Tendo sido demonstrado que os doentes com mais de 90% de necrose do tumor primário (após a sua resseção e terapia pré-operatória) têm uma maior probabilidade de sobrevivência^{31,48}. Além disto, a quimioterapia pré-operatória permite a resseção cirúrgica do tumor com margens amplas e tem sido um dos principais fatores que têm contribuído para a preservação do membro³¹. Apesar de a quimioterapia pós-operatória ser eficaz no tratamento de OS localizado, o desfecho dos doentes com metástases clinicamente detetáveis no diagnóstico continua a ser abaixo do esperado. O tratamento dos indivíduos que desenvolvem OS recorrente depende da resposta à terapia inicial, do tempo de recorrência e da localização do tumor, bem como do número de tumores recorrentes. Com o tratamento agressivo, aproximadamente 40% dos doentes que desenvolvem metástases pulmonares, sobrevivem mais de 5 anos depois da recidiva. Os doentes que recaem após o uso das abordagens terapêuticas atuais (incluindo quimioterapia e cirurgia) têm uma menor probabilidade de sobrevivência¹¹.

Os fármacos antineoplásicos que apresentam maior eficácia no tratamento de OS incluem a doxorrubicina, cisplatina, ifosfamida e metotrexato em doses elevadas, existindo diferentes regimes de quimioterapia combinada que são usados na prática clínica comum³¹. Contudo, o tratamento quimioterápico pode estar associado a alterações permanentes na função cardíaca, renal, auditiva, reprodutiva, problemas ortopédicos e a outros efeitos colaterais, incluindo doenças malignas secundárias³⁸. Os mecanismos de ação e os principais efeitos adversos destes agentes antitumorais encontram-se resumidos na Tabela 1.2.

A maioria dos regimes terapêuticos usa doxorrubicina e cisplatina, com ou sem metotrexato administrado em doses elevadas, tanto na quimioterapia pré-operatória como na pós-operatória. Estudos recentes incorporaram a ifosfamida nos protocolos terapêuticos. No entanto, o benefício da ifosfamida sobre os regimes convencionais na melhoria da sobrevida dos doentes ainda não foi completamente esclarecido³¹. Apesar dos avanços alcançados nos últimos anos com a introdução de regimes de quimioterapia intensificados e que tiveram um impacto favorável na sobrevida global, a taxa de sobrevida livre de doença aos 5 anos estagnou entre 65-70%^{49,50}.

Tabela 1.2 | Mecanismos de ação e efeitos adversos dos principais fármacos antineoplásicos usados no tratamento de osteossarcoma

Fármaco	Mecanismo de ação^{31,42}	Efeitos adversos³¹
Doxorrubicina	Intercala-se entre os pares de bases da dupla hélice de ADN; Inibe a síntese de ADN e de ARN	Cardiomiopatia; anormalidades eletrocardiográficas transitórias; emese; alopecia; mucosite; mielossupressão
Cisplatina	Inibe a síntese de ADN pela formação de ligações cruzadas; liga-se diretamente ao ADN do tumor e desnatura a dupla hélice de ADN	Insuficiência renal aguda e crônica; neuropatia periférica; ototoxicidade; emese; mielossupressão; alopecia; hipomagnesemia
Ifosfamida	Promove a formação de ligações cruzadas entre as cadeias de ADN, inibindo a síntese de ADN e de proteínas	Cistite hemorrágica; insuficiência renal; mielossupressão; alopecia; emese; encefalopatia
Metotrexato	Inibe a síntese de purinas e de ácido timidílico pela ligação à enzima dihidrofolato redutase	Insuficiência renal; mucosite; mielossupressão leve; efeitos no sistema nervoso central raros

A quimiorresistência em doentes com OS é frequente e pode ser devida a vários mecanismos, tais como a diminuição da acumulação intracelular ou inativação dos fármacos antitumorais, ativação de mecanismos de reparação de ADN, desregulação nas vias de transdução de sinal e existência células estaminais tumorais. Estes mecanismos que podem coexistir e constituem o principal obstáculo à eficácia da quimioterapia, podem ser intrínsecos ou adquiridos durante o tratamento⁴².

1.1.5.3 Radioterapia

Na prática clínica a RT não é frequente ser usada no tratamento primário de OS, exceto em certas situações particulares⁴⁰. O melhor método para o seu controle local envolve a cirurgia com margens adequadas, devido ao facto deste tumor ser relativamente radorresistente¹¹. Porém, dados sugerem que a RT pré-operatória permite reduzir a viabilidade do tumor, aumentar a probabilidade de realizar a cirurgia de preservação do membro e diminuir o risco de recorrência local⁴⁰.

O tratamento dos tumores ósseos com RT, geralmente requer a utilização de radiações ionizantes de alta energia (na faixa de 45-70 Gy) que permitem o seu controlo local adequado⁴³. A exposição a doses elevadas de radiação, pode ser ponderada em doentes que apresentem focos residuais do tumor (após a sua tentativa de resseção) ou quando este se encontra em locais em que não é possível fazer a sua resseção completa (ossos pélvicos,

coluna vertebral ou base do crânio). Os doentes que recusam a cirurgia definitiva podem igualmente beneficiar do uso da RT com altas doses. Nestes casos, a irradiação pode ser uma opção no tratamento primário do tumor em conjunto com a quimioterapia⁴⁰. Doses inferiores de radiação, são úteis no tratamento paliativo dos doentes com metástases sintomáticas⁴³.

1.2 Metastização

A doença metastática representa uma das principais causas de morte em aproximadamente 90% dos doentes oncológicos⁵¹⁻⁵³. O fato de certos tumores apresentarem uma tendência para a formação de metástases em órgãos específicos é reconhecido há mais de um século. Embora a ressecção cirúrgica e a terapia adjuvante possam ser efetivas no tratamento dos tumores primários, a doença metastática é praticamente incurável devido à sua natureza sistêmica e à resistência à terapêutica atualmente disponível⁵⁴. Neste contexto, a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no processo metastático, torna-se crucial na identificação de novos alvos para terapias moleculares que possam interromper ou possivelmente reverter o crescimento e o desenvolvimento de metástases⁵⁵.

Vários estudos têm surgido no sentido de compreender os mecanismos que estão subjacentes ao tropismo das células tumorais para metastizar em órgãos específicos⁵⁶. Embora alguns tumores tenham a capacidade de formar metástases em múltiplos órgãos, os locais-alvo mais frequentes são: osso, cérebro, fígado e pulmão¹⁶. O desenvolvimento de metástases é influenciado por inúmeros fatores e por complexas interações celulares, inicialmente descritas por Stephen Paget (1889) como a hipótese de “seed and soil”. Tendo como base esta teoria, a metastização depende da interação entre as células tumorais selecionadas (“seed”) e o microambiente previamente preparado em órgãos específicos (“soil”)^{51,56}. Evidências crescentes reforçam a hipótese de que os tumores primários criam um microambiente favorável, ou seja, um nicho pré-metastático preparado remotamente antes da sua colonização⁵⁷⁻⁵⁹.

1.2.1 Cascata metastática

A formação de metástases resulta de uma série de eventos que incluem: a libertação de células do tumor primário, intravasão e sobrevivência na corrente sanguínea ou no sistema linfático, extravasão da circulação sanguínea/linfática, colonização e subsequente proliferação num órgão secundário⁶⁰⁻⁶³. As diferentes etapas do processo metastático encontram-se ilustradas na Figura 1.4.

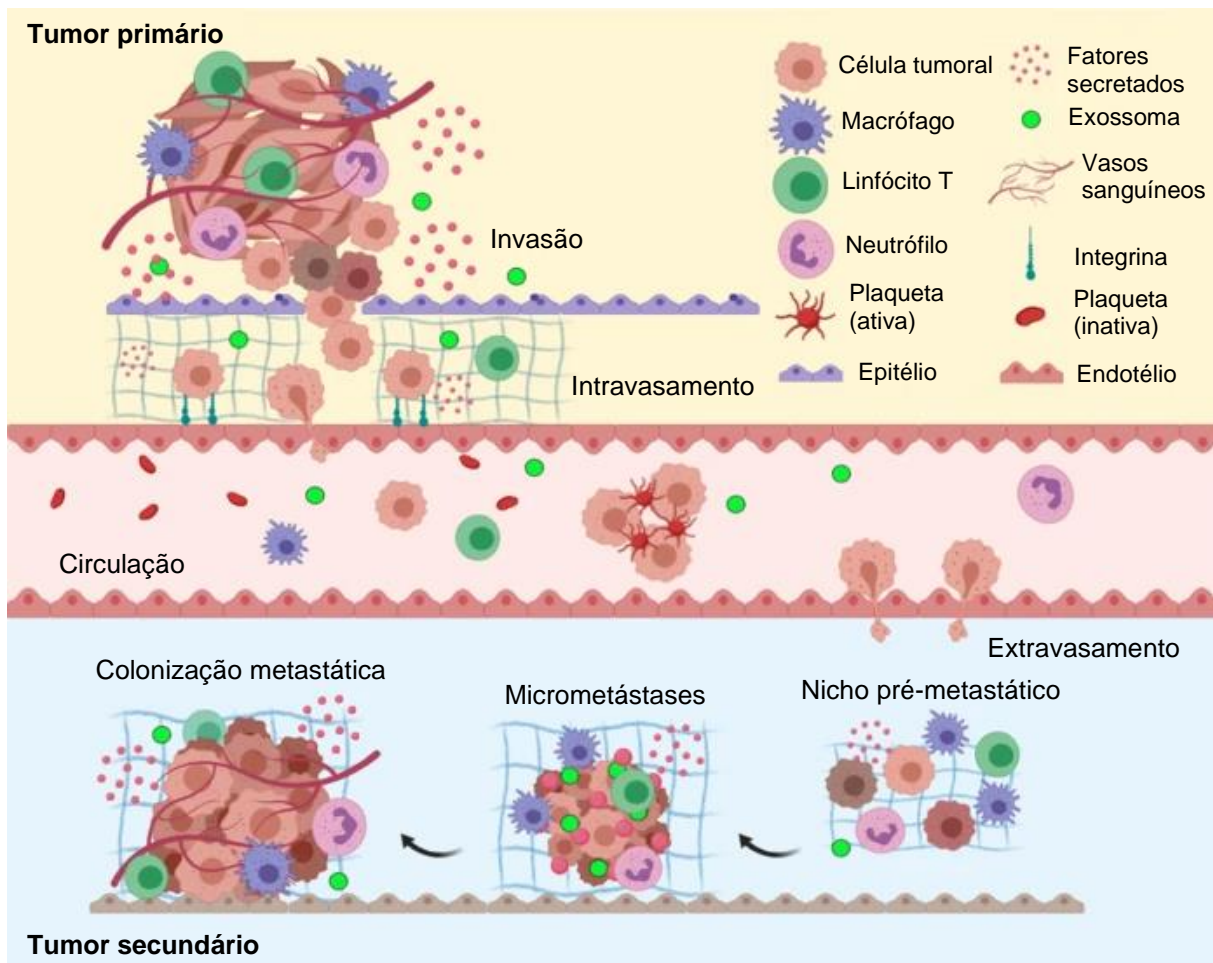


Figura 1.4 | Representação esquemática das etapas da disseminação metastática. As células tumorais destacam-se do tumor primário para o lúmen da vasculatura por intravasamento. Algumas destas células aderem às paredes dos vasos, extravasando para um local distante e originando o crescimento do tumor secundário [Fonte: Adaptado de ⁵⁵].

Este processo requer a ativação de vias de sinalização que regulam a dinâmica citoesquelética, a perda de adesão entre as células tumorais e a degradação da matriz extracelular (MEC)⁶⁴, seguido por efeitos sistêmicos no sistema imunológico⁶⁵. O intravasamento de células tumorais para a circulação é promovido pelo recrutamento de macrófagos, que aumentam a sua motilidade e originam uma permeabilidade transitória na vasculatura⁶⁶. A perda de adesão das células endoteliais e a degradação da MEC são essenciais para a migração das células tumorais. Estes processos além dos macrófagos, são mediados por proteases secretadas pelas próprias células tumorais⁶⁷. Por outro lado, a angiogênese é fundamental no destacamento das células tumorais do tumor primário para a circulação, fornecendo nutrientes e oxigênio que estimulam a sua disseminação⁶⁸. Contudo, a maioria das células tumorais que entram na circulação morrem, como resultado de danos físicos hidrodinâmicos ou devido à ação dos glóbulos brancos⁶⁹.

Após a entrada na circulação, as células tumorais podem dispersar-se por todo o organismo. Ao atingirem tecidos ou órgãos distantes, as células tumorais sobreviventes podem ser retidas em pequenos capilares ou aderir ativamente aos vasos, extravasando para locais secundários⁶¹. A maioria das células tumorais disseminam-se como células únicas. Porém, podem formar aglomerados circulantes que têm uma maior probabilidade de formar metástases. Além de células tumorais invasoras, os aglomerados contêm células do estroma e componentes imunológicos do microambiente original que contribuem para a sua heterogeneidade e aumentam a sua sobrevivência⁵⁵. Estas alterações envolvem a participação de fibroblastos, células endoteliais e imunológicas (especialmente células mielóides imaturas derivadas da medula óssea), que são responsáveis pelo estabelecimento de um nicho pré-metastático, que fornece um microambiente favorável ao recrutamento, colonização e posterior crescimento de células tumorais. A formação do nicho pré-metastático é modulada por fatores secretados pelo tumor primário, incluindo fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas inflamatórias. Paralelamente, os exossomas também podem promover o estabelecimento do nicho pré-metastático e determinar a especificidade do órgão em alguns tipos de cancro^{57,65}.

As células tumorais, depois de colonizarem o local metastático, podem permanecer inativas por tempo indeterminado como células únicas ou micrometástases, antes de estabelecerem as macrometástases, num processo denominado colonização⁷⁰. Os fibroblastos senescentes produzem proteases e citocinas, particularmente inflamatórias, que podem promover a proliferação de células epiteliais e ativar células dormentes que desencadeiam a tumorigênese. Tais fatores não são produzidos pelos fibroblastos “jovens”, fornecendo uma forte ligação do cancro com o envelhecimento e a inflamação⁷¹.

1.2.2 Metástases pulmonares

O pulmão é o segundo local anatómico mais comum para a ocorrência de metástases. A elevada área da superfície vascular do pulmão (~100m²) e o facto de esta ser formada por pequenos capilares que se encontram a uma distância muito curta das células teciduais, tornam este órgão particularmente rico em oxigênio e nutrientes essenciais à disseminação metastática⁷⁷. Além disto, as células tumorais que entram na circulação sanguínea através da drenagem venosa, após a sua passagem pelo coração (aurícula e ventrículo direito) e pelas artérias pulmonares, atingem os pulmões e são retidas nos capilares pulmonares. Desta forma, a capacidade de filtração da rede capilar pulmonar, explica também o facto de o parênquima pulmonar ser um dos locais prediletos para o desenvolvimento de metástases⁷⁸.

Os mecanismos que determinam o organotropismo metastático não estão claramente esclarecidos. Contudo, evidências sugerem que os tumores primários transmitem sinais pré-

metastáticos para o pulmão, preparando-o remotamente para a chegada das células tumorais. Por exemplo, a ativação do recetor tipo 1 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-1) e da metaloproteinase-9 (MMP-9) em células endoteliais pulmonares e em macrófagos, durante a fase pré-metastática, demonstrou tornar este tecido muito mais recetivo à invasão de células tumorais⁷². Outras evidências indicam que os tumores primários produzem fatores que estimulam os fibroblastos pulmonares a aumentar a expressão de fibronectina. Os níveis elevados desta proteína presente na MEC, fornecem um gradiente quimiotático para as células progenitoras hematopoéticas positivas para VEGFR-1 que migram para o pulmão. Paralelamente, libertam citocinas quimiotáticas que sistemicamente reprogramam o microambiente pulmonar durante a formação do nicho pré-metastático⁷³.

1.3 Modelos pré-clínicos de metástases

A complexidade biológica que caracteriza a formação de metástases dificulta o desenvolvimento de modelos experimentais que mimetizem o desenvolvimento da doença em contexto clínico. A maioria dos modelos são desenvolvidos em murganhos por transplante de células tumorais, as quais podem ser de origem humana ou murina. No primeiro caso são utilizados animais imunodeprimidos, não se contemplando a influência do sistema imunitário na progressão da doença. No caso de as células tumorais serem de origem murina, os modelos podem ser desenvolvidos em murganhos imunocompetentes com o mesmo fundo genético do animal de onde se derivou a linha celular tumoral. Para além destes, existem também os modelos animais geneticamente modificados (GEMMs)^{74,75}.

Os modelos animais além de permitirem compreender os mecanismos patofisiológicos envolvidos na formação das metástases, são também importantes ferramentas para a identificação de novos alvos terapêuticos e para delinear novas estratégias dirigidas à erradicação das metástases⁸¹.

1.3.1 Modelos de transplantação

1.3.1.1 Modelo de metástases experimental

O modelo de metástases experimental é desenvolvido por inoculação das células tumorais diretamente na corrente sanguínea. Regra geral, o local de injeção das células tumorais que pode ser na veia lateral da caudal, intraportal e intracardiaca, define o lugar da colonização das células tumorais^{56,82}. A injeção na veia lateral da caudal leva à formação de metástases pulmonares, o que reflete o aprisionamento rápido das células na microvasculatura do pulmão algum tempo após a administração celular^{56,63}. Em contraste, a injeção de células tumorais na veia intraportal é o local mais frequentemente utilizado para o

desenvolvimento de metástases no fígado⁸². Por sua vez, a injeção intracardíaca permite uma disseminação celular mais abrangente e é sobretudo usada na modelagem de metástases ósseas e cerebrais⁶³. Estes modelos de metástases apresentam várias vantagens: o tempo para o seu desenvolvimento é geralmente rápido, a biologia das metástases é facilmente reproduzível e permitem o controle do número de células administradas⁸². Contudo, como as células tumorais são introduzidas diretamente na circulação, estes modelos não recapitulam as etapas iniciais do processo metastático, restringindo assim o seu potencial de aplicação^{63,81}.

1.3.1.2 Modelo de metástases espontâneas

Os modelos de metástases espontâneas pressupõem a disseminação das células a partir de um tumor primário para locais secundários^{83,84}. O fato das metástases espontâneas surgirem a partir de um tumor primário transplantado, permite estudar as fases iniciais da cascata metastática que são contornados no modelo de metástases experimental⁸². Apesar de o transplante subcutâneo ectópico ser amplamente usado para monitorizar a formação de tumores primários, as metástases dificilmente se desenvolvem nestes modelos. Os modelos ortotópicos, em que o tumor se desenvolve no seu microambiente natural mimetizam de forma mais fidedigna a interação com o hospedeiro e a disseminação metastática observada nestes modelos^{83,84}. Esta abordagem tem sido bem-sucedida em vários tipos de cancros incluindo carcinoma da mama, pâncreas, pulmão e cólon⁶³. Para os modelos ortotópicos em que o crescimento do tumor primário é rápido, poderá ser necessário recorrer à excisão cirúrgica para controlar a morbilidade associada à extensão do tumor primário^{76,77}.

1.3.2 Modelos de metástases geneticamente modificados

Os benefícios dos GEMMs na formação de tumores que crescem no local/órgão de origem (autóctone) em hospedeiros imunocompetentes, levaram ao uso destes modelos em estudos pré-clínicos⁶³. Os tumores que se desenvolvem nos GEMMs assemelham-se às características histopatológicas e moleculares das lesões do doente humano. Além de exibirem uma heterogeneidade genética, estes modelos são também capazes de progredir espontaneamente para a doença metastática⁸⁵. Os GEMMs em oposição aos modelos de inoculação das células tumorais, desenvolvem os tumores num microambiente natural imunologicamente competente⁸⁵. No entanto, apesar das técnicas avançadas de imagem *in vivo*, o seu longo período de latência dificulta a previsão do início das metástases e a sua monitorização. Por outro lado, estes modelos são frequentemente limitados pelo crescimento exacerbado do tumor primário que leva à necessidade de occisão dos animais, não permitindo avaliar os verdadeiros efeitos na sobrevida associados à progressão metastática⁶³. Por esta razão, os modelos de transplantação no estudo das metástases são considerados muitas

vezes como uma opção alternativa, embora possam negligenciar o impacto do sistema imunológico ou não mimetizar as etapas iniciais da cascata metastática⁸⁶.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. Objetivos

O desenvolvimento de metástases pulmonares continua a ser a principal causa de morte nos doentes com OS, muitas das vezes já existentes na altura do diagnóstico, mas clinicamente não detetáveis devido ao seu reduzido tamanho¹⁵. Apesar dos recentes avanços nas técnicas cirúrgicas, de RT e no desenvolvimento de terapias direcionadas, o cenário para os doentes com OS metastizados mantém-se praticamente inalterável, com taxas de sobrevida aos 5 anos de 20-30%.

As terapias atualmente utilizadas apesar de eficazes no tratamento do tumor primário, nem sempre previnem o desenvolvimento de metástases e não são eficazes na sua erradicação. Nesse sentido, é urgente uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que estão subjacentes ao desenvolvimento da doença metastática, assim como identificar potenciais alvos para novas estratégias terapêuticas.

A complexidade inerente ao processo metastático e a falta de modelos experimentais adequados, são uma realidade que tem contribuído para os poucos avanços na prevenção e na cura da doença metastática, que representa um grande desafio clínico.

Com este trabalho, pretendemos contribuir para a colmatação desta lacuna através do desenvolvimento de modelos de metástases pulmonares de OS em murganhos, capazes de mimetizarem diferentes etapas da cascata metastática, e que permitam compreender alguns dos mecanismos patofisiológicos envolvidos na formação das metástases, identificar novos alvos terapêuticos, e avaliar a eficácia de novas abordagens terapêuticas.

Assim, os objetivos específicos deste projeto são:

- Explorar o efeito do condicionamento com o secretoma das células tumorais no modelo de metastização experimental.
- Otimização do modelo espontâneo com injeção subcutânea do tumor primário.

Capítulo 3

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e métodos

3.1 Cultura celular

Na realização deste trabalho experimental utilizou-se a linha celular humana de OS 143B, adquirida e certificada pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA). Esta linha celular foi cultivada em meio *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) (Gibco, Paisley, Escócia) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Paisley, Escócia), 0.015 mg/mL 5-bromo-2'-deoxiuridina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 1.0 mM de piruvato de sódio (Mediatech, Herndon, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Paisley, Escócia). As células foram mantidas numa atmosfera húmida a 37°C com 5% de CO₂ e sub-cultivadas em condições estéreis, numa câmara de fluxo laminar sempre que atingiram uma confluência de cerca de 90%.

Para isso, removeu-se o meio de cultura e lavou-se com tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate-buffered saline*). De seguida, para promover o destacamento celular, as células foram incubadas com uma solução de tripsina-EDTA a 0.25% (Gibco, Paisley, Escócia) durante cinco minutos a 37°C. Para parar a reação de tripsinização, adicionou-se meio de cultura EMEM contendo FBS e centrifugou-se a suspensão celular a 3500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos a 25°C. Depois da centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular em meio de cultura. Utilizando uma câmara de Neubauer e recorrendo ao corante azul de tripano a 0.4% (Gibco, Paisley, Escócia), efetuou-se a contagem das células num microscópio invertido e determinou-se a viabilidade celular. Apenas as células com uma viabilidade superior a 90% foram utilizadas nas experiências subsequentes.

3.2 Transdução da linha celular com o gene repórter da luciferase

As células 143B foram plaqueadas em placas de 6 poços com uma densidade de 100x10³ por poço. No dia seguinte, as células foram incubadas com o lentivírus codificado para o gene repórter da luciferase (30 ng de vírus/100.000 células) e com 4 µl/mL de brometo de hexadimetrina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) numa atmosfera húmida a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas. No fim do período de incubação, o meio de cultura com o lentivírus foi removido e substituído do meio regular de cultura, na presença 0.01 mg/mL de puromicina (Gibco, Paisley, Escócia) para seleção das células infetadas. A expressão da luciferase foi confirmada por imagiologia de bioluminescência (BLI) utilizando o equipamento IVIS Lumina XR (*Caliper Life Sciences*, Hopkinton, EUA) após incubação com 150 µg/mL de D-luciferina (Synchem, BHg, Alemanha). As imagens de BLI foram analisadas utilizando o *software* Living Image® versão 4.10 (Xenogen, Alameda, Califórnia).

3.3 Preparação do secretoma

O secretoma das células tumorais foi obtido a partir da recolha do meio condicionado das células tumorais 143B. A sua preparação e protocolo de administração estão sob confidencialidade ao abrigo da propriedade intelectual.

3.4 Modelos animais de metástases pulmonares de osteossarcoma

Foram utilizados murganhos da estirpe Swiss nu/nu (com 8 semanas de idade e 20-30 g de peso) do sexo masculino ou feminino, provenientes do Biotério do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR, Coimbra, Portugal) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC). Os animais foram alojados em condições livres de agentes patogénicos e ambientais controladas (ciclos de luminosidade de 12 horas e temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$), bem como mantidos em sistemas de gaiolas ventiladas individualmente com ração padrão (4RF21; Mucedola, Milano, Itália) e água *ad libitum*.

Os animais foram occisados por deslocamento cervical, sempre que se observou qualquer sinal de ausência de bem-estar animal como: perda de peso superior a 20% do peso inicial, dificuldade em respirar (acompanhada de secreção nasal e/ou cianose), tumores subcutâneos com 15 mm de diâmetro (ou um volume de $1,5 \text{ cm}^3$), quando os tumores se apresentavam necróticos ou quando a dimensão do tumor foi igual a 10% do peso do animal. Os limites críticos foram definidos de acordo com as *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research*⁷⁸.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo a legislação internacional (Diretiva 2010/63/EU) e nacional (Decreto Lei nº 113/2013) em vigor sobre a proteção de animais utilizados para fins científicos, tendo sido aprovados com parecer favorável pelo Organismo Responsável pelo Bem-estar dos Animais (ORBEA) do iCBR da FMUC (ID ORBEA: 11/2020).

3.4.1 Modelo experimental de metástases pulmonares

O modelo experimental de metástases pulmonares foi induzido através de uma injeção intravenosa na veia lateral da cauda de 100 μL de uma suspensão contendo 1×10^6 células em PBS. Os animais foram previamente anestesiados com Isoflurano (Virbac, Carros, France) na concentração de 2-3% (com ventilação de oxigénio de 1,5 L/min). Um grupo de animais foi tratado com o secretoma das células tumorais antes da administração das células tumorais na veia lateral da cauda.

O desenvolvimento de metástases pulmonares foi monitorizado uma vez por semana pela técnica de imagiologia ótica de BLI, utilizando o equipamento IVIS Lumina XR. Para isso,

os animais foram injetados por via intraperitoneal com D-Luciferina dissolvida em PBS na dose de 150 mg/kg. As imagens foram adquiridas em modo automático, com os animais anestesiados por inalação com Isoflurano (com ventilação de oxigénio de 1,5 L/min) na concentração de 2,5%. O peso dos animais foi monitorizado semanalmente, bem como manifestações de sinais de ausência de bem-estar.

Foram definidas regiões de interesse (ROIs) em torno das lesões pulmonares, e quantificado o sinal de BLI em fotões/segundo através do *software* Living Image® versão 4.10 (Xenogen, Alameda, Califórnia).

3.4.2 Modelo espontâneo de metástases pulmonares

Foi induzida a formação de um tumor primário, através de uma injeção subcutânea no flanco inferior de uma suspensão de $5,0 \times 10^5$ células em PBS. Quando o tumor primário atingiu um volume de 40 a 50 mm³ (entre 4 a 5 mm em cada uma das dimensões) procedeu-se à sua excisão. Para isso, os animais foram anestesiados por inalação contínua de Isoflurano a 2-3% (com ventilação de oxigénio de 1,5 L/min) e colocados em decúbito lateral. Antes da realização da incisão cirúrgica procedeu-se à antissepsia da pele com uma solução aquosa de Iodopovidona a 10%. Para exposição do tumor primário, realizou-se uma incisão na pele (com uma lâmina de bisturi número 22) com cerca de 1 cm de comprimento e procedeu-se à sua remoção com uma tesoura cirúrgica estéril. O tecido subcutâneo foi encerrado com pontos de sutura simples e com um fio 3/0 não absorvível (Silkam, Rubi, Espanha). Para alívio da dor pós-cirúrgica, administrou-se por via subcutânea Meloxicam (Meloxidyl, Libourne, França) na dose de 1 mg/kg a cada 24 horas.

Os animais foram sujeitos à técnica de BLI antes da cirurgia, e durante 7 semanas após a excisão do tumor (conforme descrito na secção 3.4.1) para monitorizar a formação de metástases pulmonares.

3.5 Processamento do material biológico

Os animais foram occisados por deslocamento cervical, tendo sido realizada sob anestesia profunda a colheita prévia de sangue por punção cardíaca para análise hematológica. Para a caracterização anátomo-patológica e imunohistoquímica, foram recolhidas amostras dos tumores primários e das lesões pulmonares.

As amostras recolhidas foram processadas nos Serviços de Patologia Clínica e de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). As amostras dos tumores primários e das lesões pulmonares recolhidas foram fixadas em formalina

tamponada na concentração de 10%, desidratadas com concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

3.5.1 Análise histopatológica

Os tecidos foram cortados em secções de 4 µm de espessura num micrótomo e submetidos à técnica de coloração com hematoxilina e eosina (H&E; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), para posterior avaliação por microscopia ótica.

3.5.2 Análise imunohistoquímica

Após inclusão em parafina, as amostras das lesões foram cortadas em secções de 4 µm de espessura num micrótomo de tipo Minot, Leica Biosystems RM2245 Micrótomo rotativo semiautomatizado e posteriormente colocadas em lâminas de vidro.

De seguida, de forma a facilitar o processo de adesão à lâmina, os cortes histológicos foram colocados numa estufa durante 30 minutos a 57°C. Os tecidos foram posteriormente sujeitos a um processo de desparafinização e hidratação. A recuperação antigénica foi efetuada com imersão das lâminas numa solução tampão de EDTA-Tris (com pH 8) durante 8 minutos a 95°C. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com uma solução hiperproteica tamponada durante 4 minutos.

A caracterização imunohistoquímica foi efetuada numa plataforma Ventana Marker Platform Bench Mark ULTRA IHC/ISH, com recurso a um sistema de deteção multimérico indireto livre de biotina – Optiview DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA), com temperatura otimizada em 36°C. De seguida, as amostras foram processadas por técnicas de deteção imunológica indireta e incubadas com os anticorpos primários anti-vimentina (V9, Ventana, Arizona, EUA) e anti- α -SMA (ABT 1487, Millipore, Darmstadt, Alemanha) de acordo com as indicações do fornecedor.

A avaliação da marcação foi efetuada de modo semi-quantitativo como ausente, ligeira, moderada ou severa.

3.5.3 Análise hematológica

A análise dos parâmetros hematológicos foi efetuada no grupo de animais sujeitos ao tratamento com o secretoma e num grupo de animais controlo com igual volume de uma solução salina a 0,9% durante o mesmo período de tempo. Esta análise foi realizada 24 horas após a última administração.

Decorrido o período de tratamento, sob anestesia profunda de Ketamina (Ketamidor[®], Durisolstrasse, Áustria) na dose de 100 mg/kg em associação com Xilazina (Rompun[®] 2%, Kiel, Alemanha) na dose de 10 mg/kg administrada por via intraperitoneal, recolheu-se 1 mL de sangue por punção cardíaca em cada um dos animais. De seguida, para avaliação dos índices hematológicos no sangue total, as amostras foram distribuídas em tubos com anticoagulante a 10% (K₃EDTA; Beckman Coulter, Fullerton, EUA). Foram avaliados os seguintes índices hematológicos (Hitachi 717 analyser, Roche Diagnostics Inc., Massachusetts, EUA): glóbulos vermelhos (GVs), hematócrito (Htc), hemoglobina (Hb); volume globular médio (VGM); hemoglobina globular média (HGM); concentração de hemoglobina globular média (CHGM); amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW); glóbulos brancos (GBs); linfócitos B, neutrófilos, monócitos e basófilos.

3.6 Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão (SD) ou como média \pm erro padrão da média (SEM), com *n* a indicar o número de experiências realizadas. O teste não-paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para comparações entre duas condições distintas. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados obtidos foram estatisticamente tratados utilizando o *software* GraphPad Prism[®], Versão 8.0 (GraphPad Inc, La Jolla, CA, EUA).

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e discussão

4.1 Expressão do gene repórter da luciferase nas células 143B de osteossarcoma

A linha celular 143B de OS humano foi transduzida com o gene repórter da luciferase, usando um vetor lentiviral que se integra de forma permanente no genoma das células alvo. De forma a verificar a estabilidade da expressão do gene repórter nestas células, mediu-se o seu sinal de BLI emitido pelas células durante várias passagens e antes da sua injeção nos animais.

O sinal de BLI correspondente a 100×10^3 células manteve-se estável pelo menos até às 30 passagens após a transdução, o que confirma que o gene foi inserido de forma permanente no genoma das células tumorais como indicado na Figura 4.1.

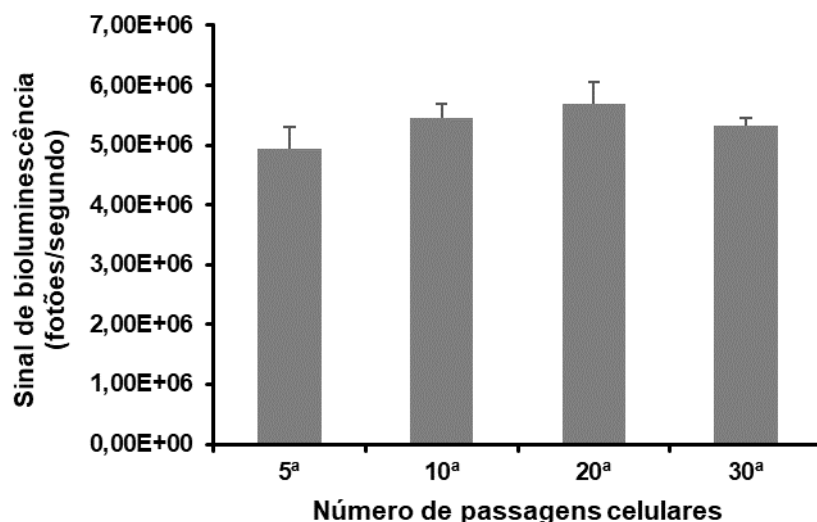


Figura 4.1 | Monitorização da intensidade do sinal de bioluminescência nas células 143B-luc⁺ com diferentes passagens. O sinal de BLI corresponde a 100×10^3 células após a incubação com D-luciferina. Os valores correspondem à média \pm SEM dos triplicados.

4.2 Modelo experimental de metástases pulmonares de osteossarcoma

Neste estudo, começámos por desenvolver o modelo experimental de metástases pulmonares de OS usando a linha celular 143B que expressa a luciferase (143B-luc⁺), descrita na literatura como tendo um fenótipo metastático⁷⁹⁻⁸¹. Para isso, foram utilizados murganhos atímicos da estirpe Swiss (*nude*), que pelo facto de apresentarem uma depleção marcada de linfócitos T não rejeitam o transplante de células tumorais de origem humana⁸². No desenvolvimento deste modelo experimental foram utilizadas duas abordagens: i) injeção direta das células tumorais na corrente sanguínea através da injeção intravenosa de uma

suspensão celular na veia lateral da cauda; ii) pré-tratamento dos animais com secretoma das células 143B seguido da injeção intravenosa da suspensão celular na veia lateral da cauda.

4.2.1 Injeção intravenosa das células 143B na veia lateral da cauda

Para avaliar o potencial metastático da linha celular 143B, inoculou-se uma suspensão celular na veia lateral da cauda de murganhos nude atímicos. A progressão metastática foi monitorizada semanalmente por imagiologia ótica de BLI durante 8 semanas após a inoculação das células. Esta técnica de imagiologia permite detetar e acompanhar de forma não invasiva a formação de metástases pulmonares, sem proceder à occisão dos animais. O peso dos animais, a presença de dificuldades respiratórias (acompanhada de secreção nasal e/ou cianose) ou outras manifestações críticas de ausência de bem-estar foram igualmente monitorizados semanalmente. Terminado o período experimental, procedeu-se à occisão dos animais por deslocamento cervical e à recolha dos pulmões para posterior análise histopatológica.

A Figura 4.2 (A-B) ilustra o desenvolvimento de metástases pulmonares pela técnica de BLI ao longo do tempo. A quantificação dos sinais de BLI (fotões/segundo) em cada uma das imagens permitiu acompanhar o crescimento das lesões metastáticas ao longo do tempo. Na Figura 4.2B encontram-se representadas as médias dos sinais de BLI dos animais que desenvolveram metástases.

Dos 6 animais inoculados, apenas 50% (3/6) desenvolveram metástases pulmonares com formação de lesões unilobulares. Como se pode observar na Figura 4.2A, a primeira metástase pulmonar foi detetada às 4 semanas após a inoculação intravenosa das células 143B-luc⁺, que evoluiu progressivamente como evidenciado pelo aumento na intensidade do sinal de BLI. Não foi registada perda de peso (Figura 4.2C) nos animais que desenvolveram metástases nem observados sinais de ausência de bem-estar. Os restantes animais que não desenvolveram lesões foram igualmente monitorizados, não se tendo observado alterações de peso nem manifestações de ausência de bem-estar (dados não apresentados).

A linha celular 143B, apesar de descrita como metastática⁷⁹⁻⁸¹, apenas induziu a formação de metástases em metade dos animais inoculados, o que sugere que nem todas as células tumorais que atingem os pulmões têm a capacidade de sobreviver e proliferar num tecido distinto do seu microambiente natural.

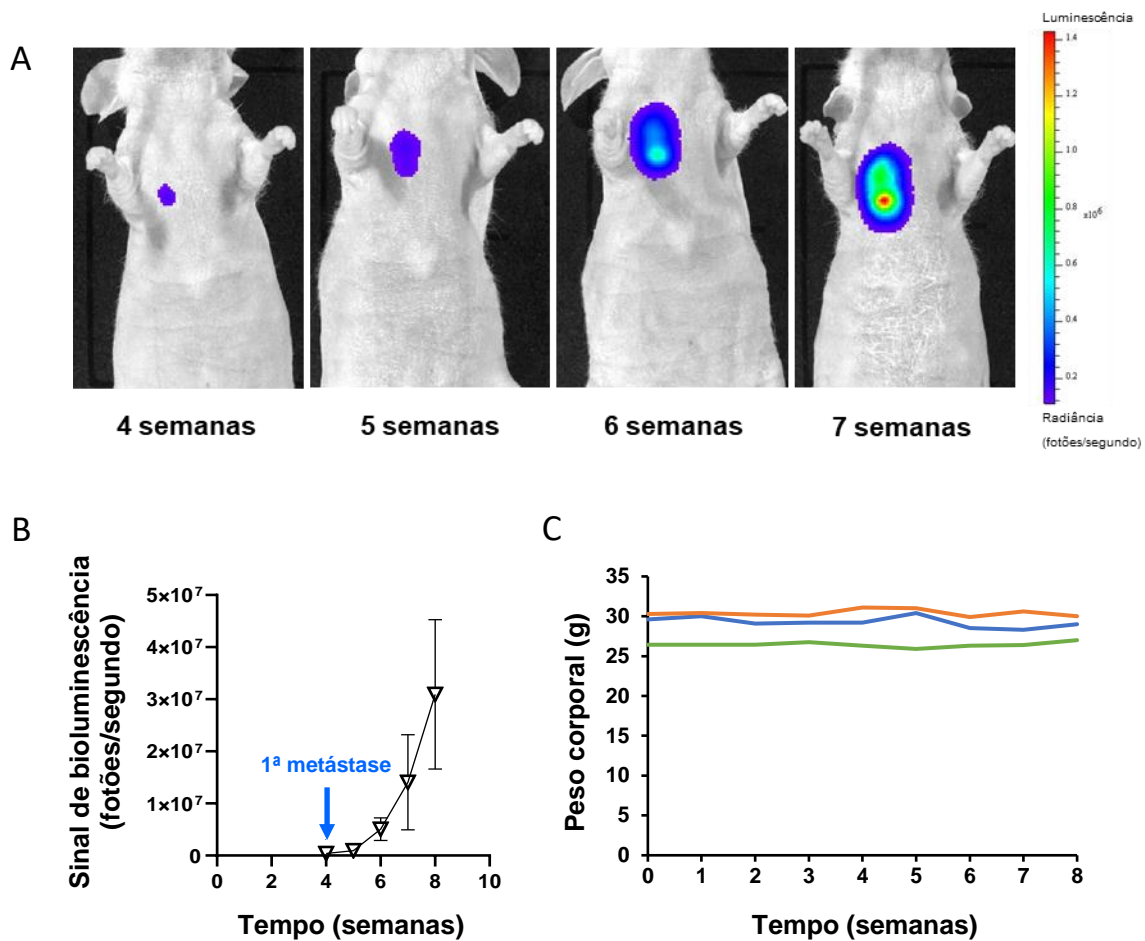


Figura 4.2 | Desenvolvimento de metástases pulmonares por injeção intravenosa de células 143B-luc⁺ em murganhos atímicos. (A) Imagens representativas de BLI de um animal inoculado com células 143B na veia lateral da cauda às 4, 5, 6 e 7 semanas após a injeção. (B) Quantificação do sinal de BLI (fotões/segundo) ao longo do tempo (média \pm SEM, n=3). (C) Monitorização do peso corporal dos animais durante as 8 semanas do estudo.

A caracterização anátomo-patológica confirmou a formação de uma lesão pulmonar maligna unilobular com áreas de necrose central, caracterizada pela presença de células pleomórficas com elevada atividade mitótica (H&E), tal como ilustrado na Figura 4.3. A análise imunohistoquímica do α -SMA, um marcador para a alfa actina do músculo liso, demonstra um padrão heterogêneo de marcação na periferia do tumor na região dos septos alveolares com espessamento fibrótico das suas paredes. Esta marcação de intensidade ligeira a moderada do α -SMA sugere uma ativação dos fibroblastos e a sua diferenciação em miofibroblastos na região peritumoral.

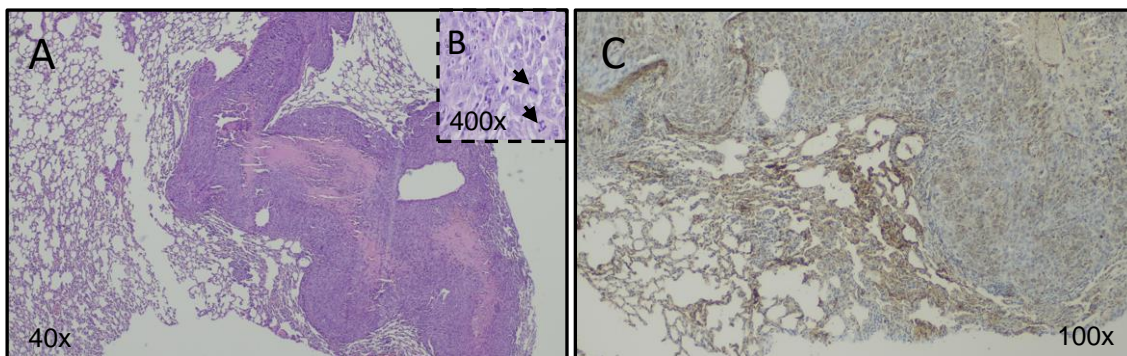


Figura 4.3 | Imagens representativas de uma lesão metastática pulmonar de um animal inoculado com células 143B na veia lateral da cauda. (A) Coloração de H&E (40x) demonstrando uma lesão de alto grau perialveolar com áreas de necrose central. (B) Ampliação (400x) evidenciando células com marcado pleomorfismo e intensa atividade mitótica (setas). (C) Análise imunohistoquímica de α -SMA com marcação focal e heterogênea nos septos alveolares (100x) na periferia da lesão.

A injeção de células tumorais diretamente no sistema vascular em murganhos é um dos métodos mais usados para recriar experimentalmente o desenvolvimento de metástases pulmonares. Contudo, não recapitula as etapas iniciais da cascata metastática, limitando o seu potencial de aplicação^{83,84}. Além disso, requer a injeção simultânea de um grande número de células na circulação sanguínea, podendo não mimetizar totalmente a disseminação das células tumorais que ocorre de forma faseada e prolongada a partir do tumor primário⁸⁵.

De acordo com a literatura existem poucas linhas celulares de OS com potencial metastático, sendo a células 143B uma das mais referenciadas⁷⁹⁻⁸¹. Esta escassez de linhas celulares e o facto de ser necessário a injeção de um elevado número de células, sugere que o processo de mobilização das células em circulação para o tecido pulmonar é pouco eficaz⁸⁶.

Diferentes linhas celulares de OS têm sido utilizadas no desenvolvimento de modelos experimentais de metástases pulmonares. Manara et al.⁸⁷ em estudos com a linha celular U2-OS, estabeleceram um modelo de metástases experimental com formação de lesões pulmonares 8 semanas após a sua inoculação na veia lateral da cauda. Neste estudo, a capacidade metastática da linha celular U2-OS foi demonstrada em 100% dos animais. Num outro estudo desenvolvido por Jia et al.⁸⁸, os autores estabeleceram uma linha metastática (SAOS-LM6) a partir de células com baixo potencial metastático (SAOS), através da injeção intravenosa de células em murganhos atímicos, da recolha de tecido pulmonar com lesões, do isolamento das células tumorais e re-injeção intravenosa para indução de novas lesões. Ao fim de 6 ciclos sucessivos, a injeção destas células resultou no desenvolvimento de metástases pulmonares microscópicas após 5-6 semanas que progrediram para lesões macroscópicas às 8 semanas.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram uma cinética de crescimento mais rápida para as células 143B, com o aparecimento das primeiras metástases pulmonares às 4

semanas após inoculação. Estas diferenças poderão ser explicadas por características inerentes às próprias linhas celulares.

4.2.2 Precondicionamento com o secretoma das células 143B

Partindo da evidência de que os tumores preparam remotamente o nicho pré-metastático, para facilitar a sua posterior colonização e proliferação em órgãos distantes⁵⁷⁻⁵⁹, avaliou-se o efeito do secretoma produzido pelas células 143B na formação das metástases pulmonares. Para isso, os animais foram precondicionados com o secretoma recolhido das células 143B, antes destas serem administradas na veia lateral da cauda como descrito anteriormente. O desenvolvimento das lesões pulmonares foi monitorizado semanalmente por imagiologia ótica de BLI, assim como o peso dos animais, conforme ilustrado na Figura 4.4.

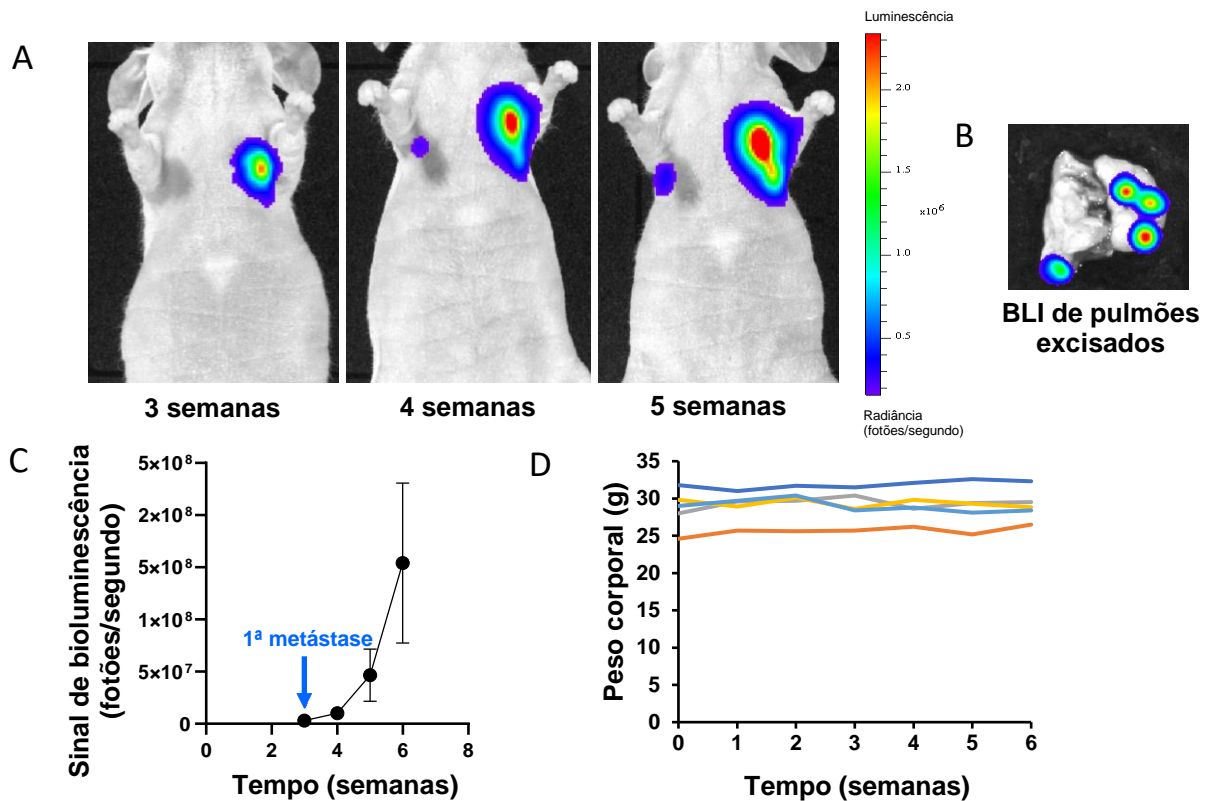


Figura 4.4 | Efeito do secretoma na formação de metástases pulmonares em murganhos atípicos. (A) Imagens representativas da formação de metástases pulmonares por imagiologia ótica de BLI às 3, 4 e 5 semanas após a inoculação das células. (B) Imagem de BLI dos pulmões recolhidos de um animal às 6 semanas após a inoculação das células tumorais. (C) Quantificação do sinal de BLI (fotões/segundo) ao longo do tempo (média ± SEM, n=5). (D) Monitorização do peso corporal dos animais durante as 6 semanas do estudo.

Com esta abordagem de condicionamento pretendemos mimetizar a existência de um tumor primário, através da administração contínua do secretoma contendo fatores solúveis e vesiculares libertados pelas células do tumor primário.

Todos os animais que foram sujeitos ao pré-tratamento com o secretoma, desenvolveram metástases pulmonares após a inoculação intravascular das células 143B-luc⁺. As metástases foram detetadas por BLI às 3 semanas após a injeção das células. Estas lesões inicialmente unilobulares progrediram na sua maioria para múltiplas metástases como ilustrado nas Figuras 4.4 A e B. A imagem *ex vivo* dos pulmões recolhidos imediatamente após o sacrifício de um dos animais, revela a formação de múltiplas lesões individualizadas. A quantificação do sinal de BLI demonstrou um crescimento mais rápido em comparação com as dos animais não tratados com o secretoma. De referir que os valores da quantificação correspondem apenas aos da primeira lesão identificada após a inoculação das células. Apesar de nestes animais a progressão da doença metastática ter sido mais rápida, não se registaram perdas de peso nem sinais de ausência de bem-estar nos animais ao longo do estudo.

A análise histopatológica do tecido pulmonar confirmou a formação de lesões pulmonares malignas de alto grau com áreas de necrose central semelhantes às observadas no modelo anteriormente descrito. A coloração com H&E apresentou a existência de células pouco diferenciadas com intensa atividade mitótica e núcleos pleomórficos como ilustrado na Figura 4.5. Também nestas lesões se observou um padrão heterogéneo de marcação do α -SMA na periferia do tumor ao longo dos septos alveolares com espessamento das suas paredes. O aumento da deposição de filamentos de actina alfa de músculo liso sugere a diferenciação dos fibroblastos residentes em miofibroblastos.

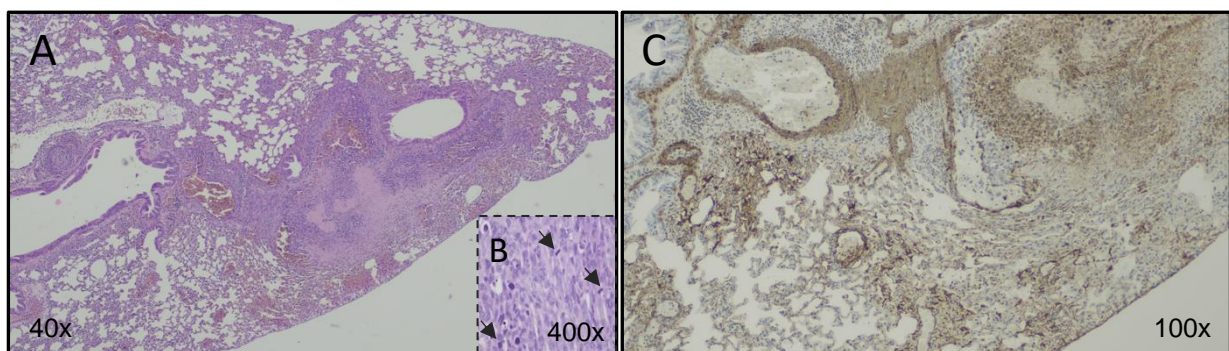


Figura 4.5 | Imagens representativas de uma lesão metastática pulmonar num animal tratado com secretoma seguido de injeção intravenosa de células 143B. (A) Coloração de H&E (40x) evidenciando uma lesão maligna de alto grau com áreas de necrose central. (B) Ampliação (400x) demonstrando células pleomórficas com elevada atividade mitótica (setas). (C) Imunorreatividade do α -SMA com marcação focal e heterogénea nos septos alveolares na periferia do tumor (100x).

Na Figura 4.6 podemos comparar a cinética de crescimento das metástases pulmonares entre o grupo de animais não tratado e o grupo tratado com o secretoma das células 143B.

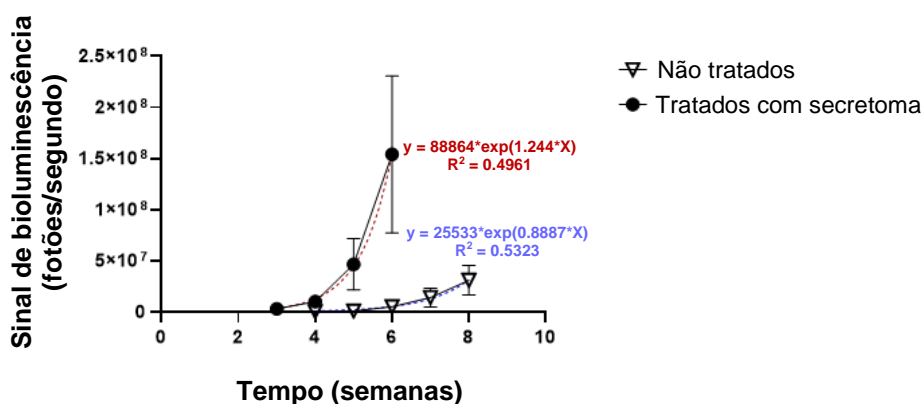


Figura 4.6 | Comparação da cinética de crescimento das lesões metastáticas entre o grupo de animais não tratado e o grupo pré-tratado com o secretoma tumoral. Quantificação do sinal BLI ao longo do tempo, no grupo de animais sem tratamento (▽n=3) e no grupo de animais pré-condicionados com o secretoma das células 143B (● n=5).

Nesta análise, apenas considerámos a quantificação do sinal de BLI na primeira lesão identificada em cada um dos animais, que foi monitorizada até às 8 semanas no grupo de animais não tratados e até às 6 semanas no grupo de animais tratados com o secretoma. Cada uma das curvas foi ajustada a uma função exponencial do tipo:

$$Y(t) = Y(0) \cdot e^{kt}$$

onde Y é o valor do sinal de BLI para o instante t, Y(0) é o sinal de BLI para t=0, k é a constante de crescimento, e t é o tempo.

Os valores de ajuste para cada uma das curvas estão apresentados na Tabela 4.1. Nos valores de k estão indicados os intervalos de valores entre o mínimo e o máximo.

Tabela 4.1 | Parâmetros das curvas de ajuste exponencial

Parâmetros	Não tratados (n=3)	Tratados (n=5)
Y(0)	25 533	88 864
K	0,889 (0,379 – 2,880)	1,244 (0,614 -3,488)
R ²	0,532	0,496

Comparando o desenvolvimento metastático nos dois grupos de animais, verificou-se que os animais pré-tratados com o secretoma desenvolveram metástases pulmonares mais precocemente e com maior velocidade de crescimento, como indicado pelo valor da constante $k = 1,244$.

No grupo de animais não tratados a primeira metástase foi detetada às 4 semanas após a inoculação celular, tendo evoluído progressivamente mas a uma velocidade mais lenta ($k=0,888$). De facto, neste grupo a intensidade de emissão dos sinais de BLI foi substancialmente inferior às obtidas no grupo de animais pré-tratados em todos os intervalos de tempo medidos. Apesar disto, o facto de existir sobreposição nos intervalos de confiança dos valores de k , significa que não existem diferenças estatisticamente significativas na velocidade de crescimento das metástases entre os dois grupos, o que pode ser atribuído ao reduzido número de animais incluídos neste estudo.

Porém, os resultados sugerem fortemente que o secretoma, de alguma forma promove e acelera o desenvolvimento de metástases pulmonares. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de “seed and soil” de Stephen Paget que defende que os tumores preparam remotamente um microambiente favorável à colonização e subsequente desenvolvimento de lesões metastáticas num órgão secundário⁵⁷⁻⁵⁹. Neste modelo, o papel do tumor primário mimetizado pela administração do secretoma das células tumorais, mostra que há de facto alterações no parênquima pulmonar induzidas pelos componentes do secretoma que o tornam mais fértil e que promovem o crescimento das lesões pulmonares.

Sabe-se hoje que os tumores primários libertam para a corrente sanguínea uma variedade de componentes incorporados em vesículas ou na forma solúvel, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e outras biomoléculas que participam na formação do nicho pré-metastático^{67,89,90}. Todos estes fatores produzidos e secretados pelas células tumorais constituem o secretoma tumoral. A sua composição é atualmente encarada como uma fonte promissora para a descoberta de novos alvos moleculares envolvidos na interação entre o tumor primário e os órgãos metastáticos distantes⁶⁵. Existem estudos que sugerem que os exossomas presentes no secretoma desempenham um papel importante no organotropismo das metástases. Hoshino et al.⁹¹ demonstraram que os exossomas derivados de células de cancro de mama podem ser endocitados por células residentes do respetivo órgão metastático, com o propósito de preparar o nicho pré-metastático. Neste estudo, a análise proteómica dos exossomas demonstrou que perfis distintos da expressão de integrinas determinam o organotropismo das lesões.

Os nossos resultados comprovam que o secretoma das células 143B contem moléculas bioativas que favorecem a sua colonização no parênquima pulmonar, reforçando o papel do nicho pré-metastático na modelação das metástases pulmonares.

Nesse sentido, a caracterização deste secretoma por análise de proteômica, poderá permitir a identificação de novos biomarcadores e fornecer informações relevantes sobre os mediadores-chave envolvidos no processo metastático, e assim identificar potenciais alvos terapêuticos capazes de retardar ou prevenir a doença metastática.

Este modelo experimental, apesar de mimetizar de forma aproximada o efeito das biomoléculas secretadas pelas células tumorais na formação do nicho pré-metastático e subsequente desenvolvimento de metástases, não reproduz as etapas iniciais da cascata metastática, nomeadamente a intrvasão das células tumorais na corrente sanguínea.

4.3 Modelo espontâneo de metástases pulmonares de osteossarcoma

Com o objetivo de reproduzir todas as etapas da cascata metastática, estabelecemos um modelo espontâneo de metástases pulmonares. Para isso foi induzido um tumor primário através da injeção subcutânea das células 143B-luc⁺ num dos flancos do animal. Quando o tumor primário atingiu um volume de 40 a 50 mm³, cerca de 10 dias após a injeção subcutânea das células tumorais, procedeu-se à sua excisão como ilustrado a Figura 4.7.

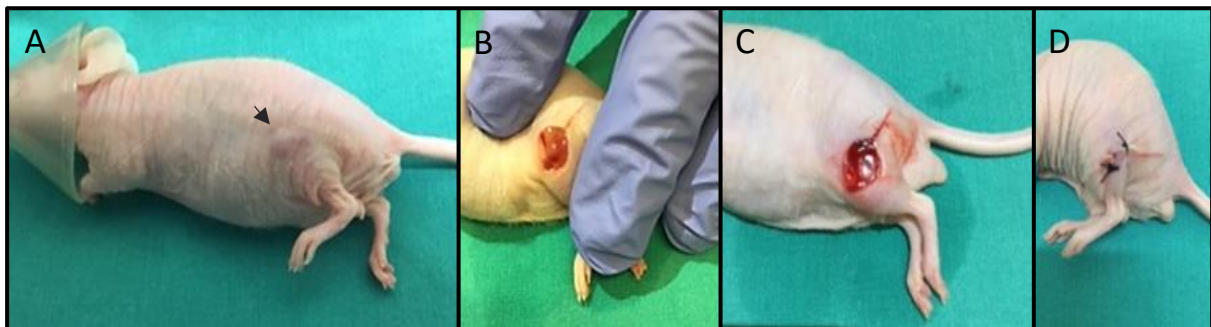


Figura 4.7 | Remoção cirúrgica do tumor primário subcutâneo. (A) Imobilização do animal por anestesia volátil. (B) Exposição do tumor primário subcutâneo no flanco esquerdo. (C) Flanco esquerdo após excisão do tumor. (D) Sutura descontínua simples da incisão cirúrgica.

Dois dias após a remoção cirúrgica, os animais foram avaliados por imagiologia ótica de BLI para verificar se a remoção tumor primário foi total e se já existiriam metástases pulmonares (Figura 4.8). As imagens de BLI mostram o tumor primário no flanco esquerdo antes da cirurgia e que esta foi eficaz na remoção total do tumor como demonstrado pela ausência de sinal de BLI. Logo após a cirurgia ainda não era visível a formação de metástases pulmonares.

Os animais continuaram a ser monitorizados por BLI, e aos 7 dias após a excisão cirúrgica do tumor primário foram visíveis as primeiras metástases pulmonares, que evoluíram de forma progressiva. Durante este período não foram evidentes sinais de ausência de bem-estar nem perda de peso nos animais, que se manteve estável ao longo do estudo (dados não apresentados).

Esta metodologia foi aplicada em 3 animais, mas apenas um deles desenvolveu metástases de forma espontânea, o que está de acordo com a literatura que refere as dificuldades em estabelecer modelos espontâneos de metastização a partir de tumores primários subcutâneos^{56,61,74}.

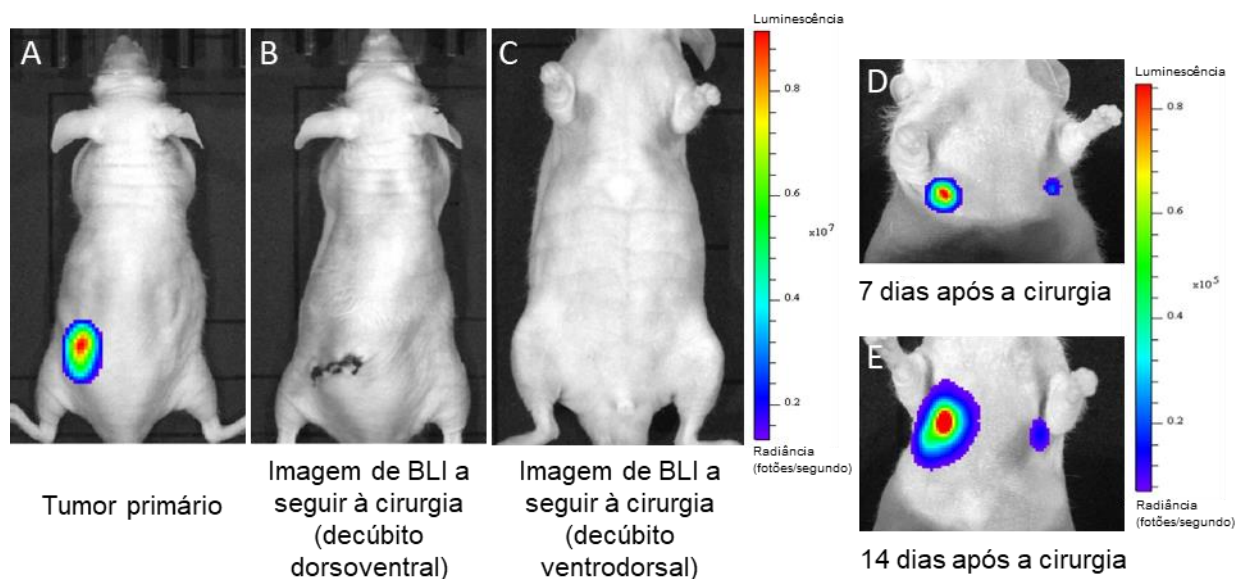


Figura 4.8 | Crescimento do tumor primário e desenvolvimento de metástases pulmonares após inoculação subcutânea de células 143B-luc⁺ em murganhos atímicos. (A-B) Imagens de BLI adquiridas 10 dias depois da indução do tumor primário e 4 dias depois da sua remoção cirúrgica, respetivamente. (C) Visão ventrodorsal demonstrando a ausência de metástases pulmonares 4 dias após a remoção cirúrgica do tumor primário. (D-E) Imagens de BLI adquiridas 6 dias e 12 dias depois da excisão do tumor primário, respetivamente.

A análise histopatológica do tumor primário confirmou a formação de uma lesão maligna de alto grau com focos de necrose e tecido adiposo à periferia. A coloração de H&E mostra a existência de células indiferenciadas, com núcleos pleomórficos e elevada atividade mitótica (Figura 4.9A). A intensa imunorreatividade para a vimentina confirma a natureza mesenquimal desta lesão (Figura 4.9B).

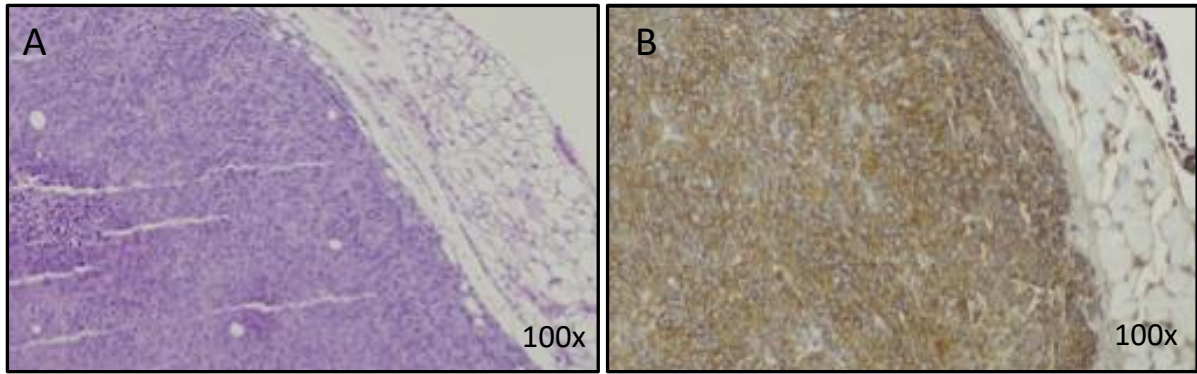


Figura 4.9 | Caracterização histopatológica do tumor primário subcutâneo. (A) Coloração de H&E do tumor primário (100X). (B) Imunoreatividade para a vimentina (100x).

A análise histopatológica dos pulmões revelou a formação de metástases pulmonares com um padrão semelhante ao dos modelos anteriores, com áreas de necrose central e núcleos pleomórficos com elevada atividade mitótica. Também nestas lesões se observou a deposição de α -SMA nos septos alveolares peritumorais com uma intensidade moderada a severa resultante da ativação dos fibroblastos (Figura 4.10)

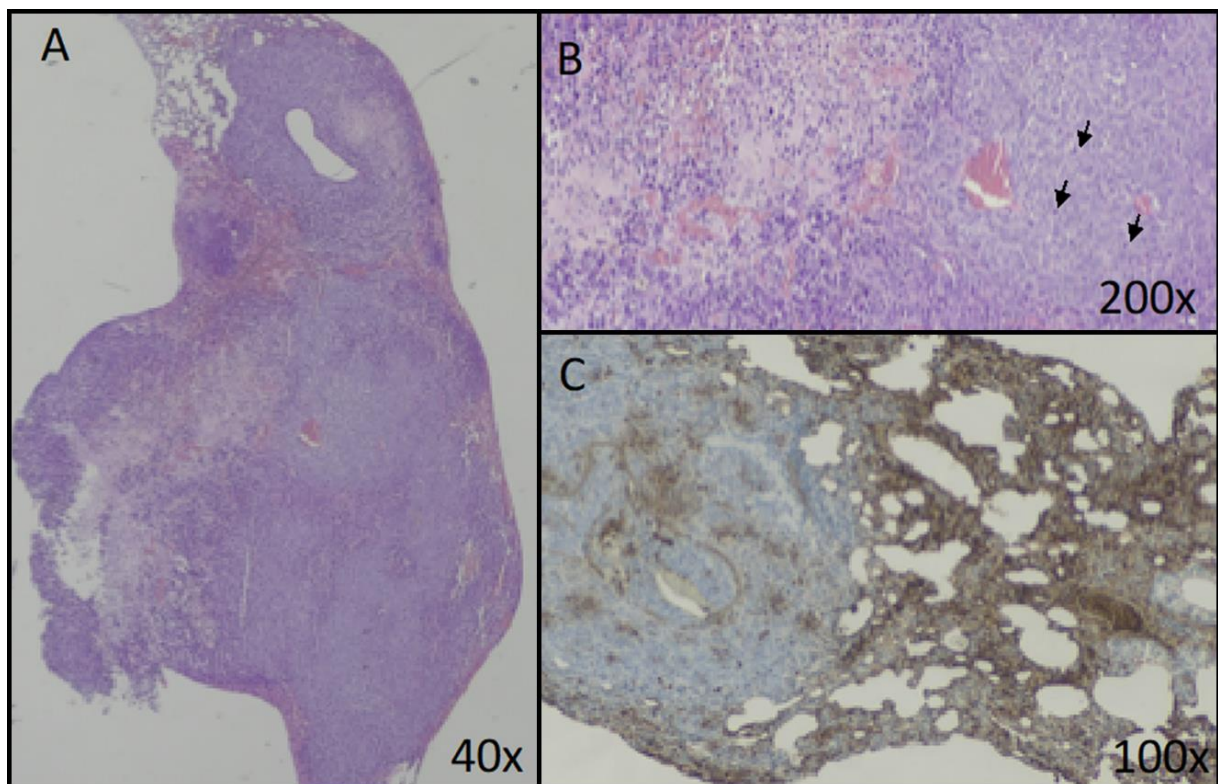


Figura 4.10 | Metástases pulmonares espontâneas. (A) Coloração de H&E da lesão pulmonar (40X). (B) Ampliação (200X) da lesão pulmonar. (C) Imunorreatividade do α -SMA com marcação intensidade moderada a severa nos septos alveolares peritumorais (100x).

O modelo espontâneo é sem dúvida o que melhor reproduz o processo de disseminação metastática, uma vez que contempla todas as fases de cascata metastática desde a libertação das células tumorais e intravasão na corrente sanguínea até ao seu extravasamento, colonização e proliferação no órgão secundário. No entanto, nem sempre é possível o seu desenvolvimento, uma vez que requer um longo período de tempo para o estabelecimento das metástases, o que não é compatível com a elevada taxa de crescimento do tumor primário, normalmente induzido por linhas celulares agressivas, que rapidamente formam tumores com tamanhos que excedem os limites éticos permitidos^{83,92}. Para ultrapassar esta limitação, recorre-se muitas vezes à ressecção do tumor primário após este atingir um determinado tamanho, que permita a preparação do nicho pré-metastático e o intravasamento das células tumorais na corrente sanguínea, considerados passos essenciais à formação de metástases. Além de que com a excisão do tumor primário é possível monitorizar os animais por tempos mais prolongados, sem os condicionamentos éticos do crescimento do tumor primário. Por outro lado, também reproduz as intervenções cirúrgicas com remoção do tumor primário efetuadas na prática clínica. Embora o impacto deste procedimento na progressão metastática tenha sido questionado, um estudo recente demonstrou que o efeito da remoção do tumor primário no número e no fenótipo das células tumorais circulantes é insignificante⁹².

O modelo espontâneo aproxima-se mais do contexto real, mas caracteriza-se por uma menor previsibilidade do padrão de disseminação e da incidência geral de metástases⁹². Um estudo recente desenvolvido por Manara et al.⁸⁷ demonstrou a capacidade tumorigénica da linha celular U2-OS através da injeção subcutânea de 30×10^6 células. A inoculação destas células resultou no desenvolvimento de um tumor primário local (com um volume médio de 5 cm^3) cerca de 55 dias após a injeção das células tumorais, com uma incidência de 63%. Contudo, apesar do sucesso no estabelecimento do tumor primário, não se verificou o desenvolvimento de metástases pulmonares. Num estudo desenvolvido por Luu et al.⁸¹, os autores avaliaram a formação de tumores subcutâneos usando duas linhas celulares MNNG/HOS e 143B. Apenas 50-75% dos animais, desenvolveram tumores primários, sem no entanto especificarem se houve ou não formação de metástases pulmonares.

Os nossos resultados confirmaram o tropismo intrínseco das células de OS para o tecido pulmonar, como demonstrado pela formação espontânea de metástases no pulmão, que se sabe ser o órgão preferencial de metastização nos doentes com OS^{11,15}.

Neste estudo optámos pela indução de um tumor primário subcutâneo em vez do modelo ortotópico que melhor reproduz as características histopatológicas e o microambiente natural do tumor. Os modelos ortotópicos são geralmente induzidos por injeção das células tumorais na cavidade medular da tíbia ou do fémur, que são os locais mais comuns de

desenvolvimento de OS e que rapidamente formam lesões agressivas osteolíticas^{81,93,94}. Para além de ser um procedimento com algum grau de severidade, a remoção cirúrgica do tumor requer a amputação do membro. Trata-se de um procedimento extremamente agressivo para o animal e com elevado grau de sofrimento e de mortalidade associados, razão pela qual não foi utilizado neste estudo.

Dada a origem mesenquimal e óssea dos sarcomas, a injeção heterotópica de células tumorais não tem em consideração as interações celulares com o seu microambiente normal. No entanto, apresenta a vantagem de ser tecnicamente mais fácil de executar e de induzirem um menor grau de sofrimento nos animais⁹⁵.

Uma limitação deste modelo é o facto de os animais serem imunocomprometidos não permitindo avaliar a influência do sistema imunitário no desenvolvimento de metástases, que se sabe ter um papel relevante nesse processo. O desenvolvimento de modelos animais com células tumorais de origem humana só é possível em animais atímicos, o que nos limitou à utilização destes animais. A outra alternativa seriam os animais humanizados que requerem técnicas sofisticadas de manipulações genética e custos extremamente dispendiosos.

A caracterização das lesões pulmonares induzidas pelas diferentes abordagens experimentais revelaram um padrão histológico semelhante, com áreas de necrose central e deposição de α -SMA nos septos alveolares na periferia do tumor, com espessamento das suas paredes. O α -SMA é utilizado como marcador de miofibroblastos também conhecidos como fibroblastos associados ao cancro (CAFs, do inglês *cancer-associated fibroblasts*). Estas células são um componente importante do estroma tumoral e parecem contribuir para o carácter mais agressivo das células tumorais, através da secreção de fatores de crescimento, citocinas e metaloproteinases⁹⁶⁻⁹⁹. Os nossos resultados sugerem um papel ativo dos miofibroblastos na formação e estabelecimento das lesões tumorais, um aspeto que merece ser investigado em estudos futuros.

4.4 Dados hematológicos

Apesar da estirpe Swiss (*nude*) ser atímica, e de apresentar uma população de linfócitos muito reduzida composta apenas por linfócitos B, decidimos avaliar o efeito do secretoma *per se* em alguns parâmetros hematológicos dos animais. Esta análise foi feita no grupo de animais sujeitos ao tratamento com o secretoma 24 horas após a última administração e no grupo de animais controlo que foram tratados com igual volume de uma solução salina a 0,9% durante o mesmo período de tempo. Os valores das médias e dos respetivos SD para cada um dos parâmetros analisados encontram-se na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 | Parâmetros hematológicos no grupo de animais não tratados e sujeitos ao tratamento com o secretoma das células 143B

Parâmetros	Não tratados (n=4)	Tratados (n=3)
Hemograma		
GVs (10⁶/µL)	9,07 ± 0,17	9,59 ± 0,48
Hb (g/dL)	13,63 ± 0,43	14,23 ± 0,29
Hct (%)	45,10 ± 2,45	46,47 ± 0,96
VGM (fL)	48,45 ± 3,05	48,57 ± 1,38
HGM (pg)	15,03 ± 0,26	14,90 ± 0,53
CHGM (g/dL)	30,28 ± 0,76	30,63 ± 0,24
GBs (10³/µL)	4,66 ± 2,00	3,60 ± 0,69
RDW (%)	19,70 ± 0,45	20,80 ± 1,27
Leucograma		
Linfócitos B (%)	74,35 ± 8,68	80,30 ± 3,93
Neutrófilos (%)	22,58 ± 9,61	18,03 ± 3,49
Monócitos (%)	2,45 ± 2,63	1,50 ± 0,60
Basófilos (%)	0,63 ± 0,54	0,17 ± 0,11

Abreviaturas: Glóbulos vermelhos (GVs); Hemoglobina (Hb); hematócrito (Hct); Volume globular médio (VGM); Hemoglobina globular média (HGM); Concentração de hemoglobina globular média (CHGM); Glóbulos brancos (GBs); Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW).

Para o número de animais estudados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, embora se observe uma tendência para uma diminuição nas populações leucocitárias efetoras da imunidade inata (neutrófilos, monócitos e basófilos) no grupo de animais sujeitos ao tratamento com o secretoma. Esta diminuição ainda que não significativa, sugere que há uma diminuição da resposta imune inata que é permissiva à sobrevivência das células tumorais.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

5. Conclusões

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento e otimização de modelos pré-clínicos de metástases pulmonares de OS, capazes de mimetizar diferentes etapas da cascata metastática e de recapitular alguns dos mecanismos biológicos associados à progressão da doença. Neste sentido, de acordo com a metodologia adotada e com base na análise e discussão dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- O pré-tratamento dos animais com o secretoma acelera o desenvolvimento de metástases pulmonares no modelo de metastização experimental.
- O secretoma das células tumorais contém moléculas bioativas que favorecem a colonização e proliferação das células tumorais no tecido pulmonar, reforçando a importância da formação do nicho pré-metastático no estabelecimento de metástases pulmonares.
- O modelo de metastização espontânea reproduz todas as etapas da cascata metastática e confirma o tropismo intrínseco das células de OS para o tecido pulmonar, mas tem uma baixa taxa de reprodutibilidade.
- No modelo espontâneo, a excisão cirúrgica do tumor primário permite monitorizar a formação de metástases por longos períodos de tempo sem os condicionamentos éticos do crescimento do tumor primário.
- As lesões pulmonares desenvolvidas com as diferentes abordagens experimentais, revelaram a presença de um padrão histopatológico semelhante, caracterizado por áreas de necrose central e por uma deposição de α -SMA nos septos alveolares peritumorais, sugerindo a presença de miofibroblastos nas lesões metastáticas.
- O modelo de metastização experimental em animais condicionados com o secretoma tumoral aproxima-se mais dos modelos de metastização espontânea. No entanto, não recapitula as etapas iniciais da cascata metastática, o que limita a seu potencial de aplicação em investigação pré-clínica.
- A caracterização do secretoma poderá levar à identificação de potenciais alvos terapêuticos e contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos que previnam ou retardem o desenvolvimento de metástases pulmonares que continua a ser um dos maiores desafios no tratamento do OS.

Capítulo 6

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências bibliográficas

1. Mirabello, L., Troisi, R. J. & Savage, S. A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer* **125**, 229–234 (2009).
2. Mutsaers, A. J. & Walkley, C. R. Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* **62**, 56–63 (2014).
3. Taran, S. J., Taran, R. & Nagraj, B. M. Pediatric Osteosarcoma : An Updated Review. *Indian J. Med. Paediatr. Oncology* **38**, 33–43 (2017).
4. Picci, P. Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma). *Orphanet J. Rare Dis.* **2**, 1–4 (2007).
5. Savage, S. A. & Mirabello, L. Using Epidemiology and Genomics to Understand Osteosarcoma Etiology. *Sarcoma* **2011**, 1–13 (2011).
6. Bielack, S., Carrle, D. & Casali, P. G. Osteosarcoma : ESMO Clinical Recommendations for diagnosis , treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **20**, 137–139 (2009).
7. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **152**, 3–13 (2009).
8. Fan, T. M. Animal models of osteosarcoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **10**, 1327–1338 (2010).
9. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **152**, 15–32 (2009).
10. Mirabello, L., Troisi, R. J. & Savage, S. A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the surveillance, epidemiology, and end results program. *Cancer* **115**, 1531–1543 (2009).
11. Marina, N., Gebhardt, M., Teot, L. & Gorlick, R. Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. *Oncologist* **9**, 422–441 (2004).
12. Hendershot, E. Solid Tumor. in *Pediatric Oncology Nursing: Advanced Clinical Handbook* (eds. Tomlinson, D. & Kline, N. E.) 67–71 (Springer, 2010).
13. Isakoff, M. S., Bielack, S. S., Meltzer, P. & Gorlick, R. Osteosarcoma: Current treatment and a collaborative pathway to success. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 3029–3035 (2015).
14. Satonaka, H., Kusuzaki, K., Matsubara, T., Iino, T. & Uchida, A. In vivo anti-tumor activity of photodynamic therapy with intravenous administration of acridine orange , followed by illumination with high-power flash wave light in a mouse osteosarcoma

- model. *Oncol. Lett.* **1**, 69–72 (2010).
15. Ando, K., Mori, K., Verrecchia, F. & Marc, B. Molecular Alterations Associated with Osteosarcoma Development. *Sarcoma* **2012**, 1–12 (2012).
 16. Langley, R. R. & Fidler, I. J. The seed and soil hypothesis revisited - The role of tumor - stroma interactions in metastasis to different organs. *Int. J. Cancer* **128**, 2527–2535 (2011).
 17. Luetke, A., Meyers, P. A., Lewis, I. & Juergens, H. Osteosarcoma treatment - Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 523–532 (2014).
 18. Longhi, A. *et al.* Height as a risk factor for osteosarcoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **27**, 314–318 (2005).
 19. Rosenberg, A. E. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. in *Elsevier Inc.* (eds. Kumar, V., Abbas, A. K. & Aster, J. C.) 1179–1226 (2015).
 20. Ferguson, J. L. & Turner, S. P. Bone cancer: Diagnosis and treatment principles. *Am. Fam. Physician* **98**, 205–213 (2018).
 21. Cotterill, S. J., Wright, C. M., Pearce, M. S. & Craft, A. W. Stature of Young People with Malignant Bone Tumors. *Pediatr. Blood Cancer* **42**, 59–63 (2004).
 22. Carson, D. A. & Lois, A. Cancer progression and p53. *Lancet* **346**, 1009–1011 (1995).
 23. Furihata, M., Sonobe, H. & Ohtsuki, Y. The aberrant p53 protein. *Int. J. Oncol.* **6**, 1209–1226 (1995).
 24. Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A. & Gu, W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* **408**, 377–381 (2000).
 25. Kasetta, M. K. A. *et al.* Prognostic value of bax, bcl-2, and p53 staining in primary osteosarcoma. *J. Surg. Oncol.* **97**, 259–266 (2008).
 26. AlAli, A., Kletke, S., Gallie, B. & Wai-Ching, L. Retinoblastoma for pediatric ophthalmologists. *Asia-Pacific J. Ophthalmol.* **7**, 160–168 (2018).
 27. Fuchs, B. & Pritchard, D. J. Etiology of osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **397**, 40–52 (2002).
 28. Raymond, A., Ayala, A. & Knuutila, S. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. in *World Health Organization Classification of Tumours* (eds. Fletcher, C. D., Unni, K. K. & Mertens, F.) 264–270 (International Agency for Research on Cancer - IARC, 2002).
 29. Klein, M. J. & Siegal, G. P. Osteosarcoma (anatomic and histologic variants). *Am. J.*

- Clin. Pathol.* **125**, 555–581 (2006).
30. Durfee, R. A., Mohammed, M. & Luu, H. H. Review of Osteosarcoma and Current Management. *Rheumatol. Ther.* **3**, 221–243 (2016).
 31. Wittig, J. C. *et al.* Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician* **65**, 1123–1132 (2002).
 32. Geller, D. S. & Gorlick, R. Osteosarcoma: A review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **8**, 705–718 (2010).
 33. Kundu, Z. S. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian J. Orthop.* **48**, 238–246 (2014).
 34. Widhe, B. & Widhe, T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J. Bone Jt. Surg.* **82**, 667–674 (2000).
 35. Anderson, M. E., Randall, R. L., Springfield, D. S. & Gebhart, M. C. Sarcomas of Bone. in *Abeloff's Clinical Oncology* (eds. Niederhuber, J. E., Armitage, J. O., Doroshow, J. H., Kastan, M. B. & Tepper, J. E.) 1693–1752 (Elsevier, 2014).
 36. Pan, K. L., Chan, W. H. & Chia, Y. Y. Initial Symptoms and Delayed Diagnosis of Osteosarcoma around the Knee Joint. *J. Orthop. Surg.* **18**, 55–57 (2010).
 37. Beckingsale, T. B. & Gerrand, C. H. (i) Osteosarcoma. *Orthop. Trauma* **24**, 321–331 (2010).
 38. Ritter, J. & Bielack, S. S. Osteosarcoma. *Educ. B. 35th ESMO Congr. Milan, Italy 8-12 Oct. 2010* **21**, vii320–vii325 (2010).
 39. Bielack, S. S., Hecker-Nolting, S., Blattmann, C. & Kager, L. Advances in the management of Osteosarcoma. *F1000Research* **5**, 2767 (2016).
 40. Ta, H. T., Dass, C. R., Choong, P. F. M. & Dunstan, D. E. Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 247–263 (2009).
 41. Bernthal, N. M. *et al.* Long-term results (>25 years) of a randomized, prospective clinical trial evaluating chemotherapy in patients with high-grade, operable Osteosarcoma. *Cancer* **118**, 5888–5893 (2012).
 42. Siddiqui, S. *et al.* Metallothionein: potential therapeutic target for Osteosarcoma. *J. Oncol. Sci.* **5**, 13–18 (2019).
 43. Meazza, C. & Scanagatta, P. Metastatic Osteosarcoma: a challenging multidisciplinary treatment. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **16**, 543–556 (2016).
 44. Misaghi, A., Goldin, A., Awad, M. & Kulidjian, A. A. Osteosarcoma: a comprehensive

- review. *SICOT-J* **4**, 1–8 (2018).
45. Anderson, M. E. Update on Survival in Osteosarcoma. *Orthop. Clin. North Am.* **47**, 283–292 (2016).
 46. Tiwari, A. Current concepts in surgical treatment of osteosarcoma. *J. Clin. Orthop. Trauma* **3**, 4–9 (2012).
 47. Veth, R. P. H. *et al.* Limb salvage in musculoskeletal oncology. *Lancet Oncol.* **4**, 343–350 (2003).
 48. Rajani, R. & Gibbs, C. P. Treatment of Bone Tumors. *Surg. Pathol. Clin.* **5**, 301–318 (2012).
 49. Lewis, I. J. *et al.* Improvement in histologic response but not survival in osteosarcoma patients treated with intensified chemotherapy: A randomized phase III trial of the european osteosarcoma intergroup. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 112–128 (2007).
 50. 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.* **23**, 2004–2011 (2005).
 51. Mendoza, M. & Khanna, C. Revisiting the seed and soil in cancer metastasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1452–1462 (2009).
 52. Anderson, R. L. *et al.* A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 185–204 (2019).
 53. Steeg, P. S. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 201–218 (2016).
 54. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**, 275–292 (2011).
 55. Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. & Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 1–17 (2020).
 56. Fidler, I. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
 57. Liu, Y. & Cao, X. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell* **30**, 668–681 (2016).
 58. Guo, Y. *et al.* Effects of exosomes on pre-metastatic niche formation in tumors. *Mol. Cancer* **18**, 1–11 (2019).
 59. Altorki, N. K. *et al.* The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth

- and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 9–31 (2019).
60. Weidle, U. H., Birzele, F., Kollmorgen, G. & Ruger, R. Molecular basis of lung tropism of metastasis. *Cancer Genomics and Proteomics* **13**, 129–139 (2016).
 61. Gomez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B. & Brunton, V. G. Mouse models of metastasis: Progress and prospects. *DMM Dis. Model. Mech.* **10**, 1061–1074 (2017).
 62. Stella, G. M., Kolling, S., Benvenuti, S. & Bortolotto, C. Lung-seeking metastases. *Cancers (Basel)*. **11**, 1–18 (2019).
 63. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **168**, 670–691 (2017).
 64. Friedl, P. & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell* **147**, 992–1009 (2011).
 65. Peinado, H. *et al.* Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 302–317 (2017).
 66. Harney, A. S. *et al.* Real-time imaging reveals local, transient vascular permeability, and tumor cell intravasation stimulated by TIE2hi macrophage–derived VEGFA. *Cancer Discov.* **5**, 932–943 (2015).
 67. Joyce, J. A. & Pollard, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer* **9**, 239–252 (2009).
 68. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 401–410 (2003).
 69. Chiang, S. P. H., Cabrera, R. M. & Segall, J. E. Tumor cell intravasation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **311**, C1–C14 (2016).
 70. Massague, J. & Obenauf, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **529**, 298–306 (2016).
 71. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12072–12077 (2001).
 72. Hiratsuka, S. *et al.* MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* **2**, 289–300 (2002).
 73. Kaplan, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820–827 (2005).
 74. Khanna, C. & Hunter, K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* **26**, 513–523

- (2005).
75. Saxena, M. & Christofori, G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Mol. Oncol.* **7**, 283–296 (2013).
 76. Bibby, M. C. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: Advantages and disadvantages. *Eur. J. Cancer* **40**, 852–857 (2004).
 77. Khanna, C. *et al.* An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. *Clin. Exp. Metastasis* **18**, 261–271 (2000).
 78. Workman, P. *et al.* Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br. J. Cancer* **102**, 1555–1577 (2010).
 79. Mohseny, A. B. *et al.* Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab. Investig.* **91**, 1195–1205 (2011).
 80. Dass, C. R., Ek, E. T. H. & Choong, P. F. M. Human xenograft osteosarcoma models with spontaneous metastasis in mice: Clinical relevance and applicability for drug testing. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **133**, 193–198 (2007).
 81. Luu, H. H. *et al.* An orthotopic model of human osteosarcoma growth and spontaneous pulmonary metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **22**, 319–329 (2005).
 82. Wettersten, H. I., Ganti, S. & Weiss, R. H. Metabolomic profiling of tumor-bearing mice. in *Methods in Enzymology* **543**, 275–296 (Academic Press Inc., 2014).
 83. Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P. & Kerbel, R. S. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 135–141 (2011).
 84. Price, J. E. Spontaneous and experimental metastasis models: Nude mice. *Methods Mol. Biol.* **1070**, 223–233 (2014).
 85. Yang, J., Mani, S. A. & Weinberg, R. A. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res.* **66**, 4549–4552 (2006).
 86. Harris, M. A., Shekhar, T. M., Coupland, L. A., Miles, M. A. & Hawkins, C. J. Transient NK cell depletion facilitates pulmonary osteosarcoma metastases after intravenous inoculation in athymic mice. *J. Adolesc. Young Adult Oncol.* 1–5 (2020). doi:10.1089/jayao.2019.0172
 87. Manara, M. C. *et al.* Reversal of malignant phenotype in human osteosarcoma cells transduced with the alkaline phosphatase gene. *Bone* **26**, 215–220 (2000).

88. Jia, S. F., Worth, L. L. & Kleinerman, E. S. A nude mouse model of human osteosarcoma lung metastases for evaluating new therapeutic strategies. *Clin. Exp. Metastasis* **17**, 501–506 (1999).
89. Carvalho, R., Paredes, J. & Ribeiro, A. S. Impact of breast cancer cells' secretome on the brain metastatic niche remodeling. *Semin. Cancer Biol.* **60**, 294–301 (2020).
90. Liu, Q. *et al.* Factors involved in cancer metastasis: A better understanding to 'seed and soil' hypothesis. *Mol. Cancer* **16**, 1–19 (2017).
91. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–335 (2015).
92. Banys, M. *et al.* The influence of removal of primary tumor on incidence and phenotype of circulating tumor cells in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 121–129 (2012).
93. Marques da Costa, M. E. *et al.* Establishment and characterization of in vivo orthotopic bioluminescent xenograft models from human osteosarcoma cell lines in Swiss nude and NSG mice. *Cancer Med.* **7**, 665–676 (2018).
94. Uluçkan, Ö., Segaliny, A., Botter, S., Santiago, J. M. & Mutsaers, A. J. Preclinical mouse models of osteosarcoma. *Bonekey Rep.* **4**, 1–6 (2015).
95. Jacques, C. *et al.* Small animal models for the study of bone sarcoma pathogenesis: characteristics, therapeutic interests and limitations. *J. Bone Oncol.* **12**, 7–13 (2018).
96. Sahai, E. *et al.* A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 174–186 (2020).
97. Orimo, A. *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335–348 (2005).
98. Cirri, P. & Chiarugi, P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 482–97 (2011).
99. Shiga, K. *et al.* Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers (Basel)*. **7**, 2443–2458 (2015).