

GUILHERME CHOEFI DE MIGUEL

**MODELOS ORTOTÓPICOS DE OSTEOSARCOMA DE
COLUNA VERTEBRAL E DE CALOTA CRANIANA EM
CAMUNDONGO ATÍMICO**

Bragança Paulista

2013

GUILHERME CHOIFI DE MIGUEL

**MODELOS ORTOTÓPICOS DE OSTEOSARCOMA DE
COLUNA VERTEBRAL E DE CALOTA CRANIANA EM
CAMUNDONGO ATÍMICO**

Orientador

DENISE GONÇALVES PRIOLLI

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde
da Universidade São Francisco para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2013

WE 258 Miguel, Guilherme Chohfi de.
M577m Modelos ortotópicos de osteossarcoma de coluna vertebral e de calota craniana em camundongo atímico / Guilherme Chohfi de Miguel. – Bragança Paulista, 2013. 73 p.

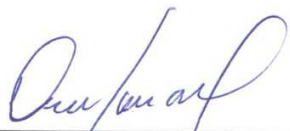
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Denise Gonçalves Priolli

1. Osteossarcoma. 2. Camundongos nus. 3. Tecnécio Tc 99m Sestamibi. 4. Ensaios antitumorais modelo de xenoenxerto. I. Priolli, Denise Gonçalves. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

MIGUEL, C.,Guilherme, “ Modelos ortotópicos de osteossarcoma de coluna vertebral e de calota craniana em camundongo atímico”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em onze de Julho de dois mil e treze pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Denise Gonçalves Priólli
Universidade São Francisco



Prof. Dra. Alessandra Gambero
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Valter Penna
Universidade Estadual de São Paulo

Dedicatória

A meu Pai João José e Mãe Sheila que sempre mostraram e ensinaram os verdadeiros valores da vida, a respeitar, amar e sempre valorizar o maior bem de todos: o amor familiar.

A minha irmã Mariana que sempre foi paciente e compreensiva com seu irmão.

A minha namorada Wanessa pelo apoio, amor e carinho durante o mestrado.

A minha “loira” Belle que sempre está com sua carinha feliz e carinhosa o tempo todo, conseguindo arrancar risadas até nos momentos mais tensos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Universidade São Francisco, onde encontrei um ambiente acolhedor e com ótima infra-estrutura, desde a faculdade, minha Residência Médica em Ortopedia e Traumatologia e durante o período do Curso de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde.

Um agradecimento especial a Denise Gonçalves Priolli, orientadora e amiga, pelo esforço e dedicação durante os dois anos e meio de mestrado, sempre apoiando e ajudando, independente dos momentos. Professor Valter Penna, obrigado também pelo acolhimento durante meu estágio no Hospital de Câncer de Barretos, certamente me guiou a escolher o tema junto com minha orientadora.

Agradeço também a todos os professores e professoras que tive o prazer de ser aluno durante todos esses onze anos de Universidade São Francisco.

Aos meus amigos de residência, em especial Guilherme Fonseca Bortoluzzi Rafael de Nucci, Luis Augusto Lapinha, Kilder Martiniano Costa, Janaina Pecego e Jedaías Junior, por sempre me apoiarem e ajudarem com bons momentos.

Certamente serei sempre grato às pessoas que me apoiaram com esta dissertação na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, em especial Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Mafalda Laranjo e Margarida Abrantes. Um agradecimento especial aos amigos dos laboratórios envolvidos neste experimento, tanto em Coimbra quanto em Bragança Paulista, representados aqui pela amiga Marta Gracia.

Agradeço a Professora Alessandra Gambero, Professora Celena Maria Zani Souza pelo auxílio na qualificação, a Professora Thalita Rocha na preparação das amostras e Professora Izilda Aparecida Cardinalli nas análises anatomopatológicas.

Não posso esquecerde agradecer meus amigos de infância que sempre entenderam minha distância e ausência em momentos importantes nesses anos: Jozé Octavio Freitas(Juzão), Adryanna Toledo(Danny), Daniel Boturão, Ana Paula Carvalho, Ricardo e Fernando Staffa, Erico Bacelar, Rodrigo Amaral e Victor Petty.

Meus amigos de Faculdade por também entenderem minha ausência: Marcio Truffa, Renata Callegari, Gustavo Magalhaes, Jose Eduardo Cristofolletti Freitas e Vitor Gomes.

Meus amigos bragantinos que estiveram juntos durante meu estudo: Pedro Porto, Roberto Lo Sardo, Ulisses Oliveira. Também meus confrades em especial ao João Marcolini.

Agradeço também a todos amigos que fiz em Coimbra, saibam que sem dúvida nenhuma vocês tem grande participação nesta trajetória, pois não conseguiria ficar longe de casa se não tivesse sido acolhido de maneira tão amigável e portuguesa como foi.

Novamente minha família e namorada, sem vocês não sou nem seria nada nessa vida. Amo muito vocês!

E finalmente, a todos os outros que me ajudaram direta ou indiretamente neste projeto. Muito obrigado.

“Você pode encarar um erro como uma besteira a ser esquecida, ou como um resultado
que aponta uma nova direção”

Steve Jobs

RESUMO

O osteossarcoma, tumor maligno caracterizado pela formação direta de osso ou osteóide, é a segunda neoplasia primária óssea mais comum, com epidemiologia bimodal acometendo crianças e adultos. Tem preferência pela região metafisária dos ossos longos nos jovens e ossos chatos em pacientes acima de 50 anos. Sua etiologia é desconhecida, com quadro clínico de dor local e na articulação adjacente, sem alívio com repouso e analgesia. Seu prognóstico está relacionado a completa remoção do tumor no ato cirúrgico. Tumores localizados em regiões pouco susceptíveis à exérese completa apresentam baixo sucesso terapêutico, já que é um tumor que em alguns tipos histopatológicos apresenta baixa resposta à quimioterapia. Tal fato gera limitação a propostas terapêuticas adequadas, com baixa taxa de sucesso especialmente naqueles localizados em regiões de difícil acesso cirúrgico, tal como coluna vertebral e calota craniana, regiões estas muitas vezes também envolvidas na recorrência deste tipo tumoral. Para que novas opções terapêuticas sejam testadas, o desenvolvimento de modelo animal com evolução tumoral semelhante àquele que ocorre no homem, auxilia e permite que possam ser acompanhadas sem a necessidade do sacrifício do animal, como, por exemplo, por cintilografia com Tecnécio 99m Sestamibi, o qual apresenta baixo custo e alta especificidade na detecção de tumores malignos.

Objetivo: Desenvolver um modelo animal de osteossarcoma de calota craniana e de coluna vertebral *in vivo* que possa ser empregado no desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Como objetivo secundário pretende-se determinar a eficácia da cintilografia com 99mTc-MIBI na detecção dos osteossarcomas em modelo animal ortotópico de calota craniana e coluna vertebral. **Material e Métodos:** Foram utilizados camundongos Balb/c nu/nu e foram divididos em dois grupos: aqueles a serem implantados na calota craniana (n=8) ou coluna vertebral (n=9). Células de osteossarcoma humano (10^6 células MNNG/HOS) foram inoculadas diretamente na superfície da calota craniana após escarificação por via percutânea, assim como no processo transverso da coluna vertebral. Imagens com 99mTc-MIBI e Radiografia simples foram realizadas após a implantação e evolução do tumor. **Resultados:** Todos os animais do Grupo Calota Craniana e cinco do Grupo Coluna Vertebral apresentaram tumor detectáveis macroscopicamente. Todos os ratos apresentaram alterações de captação de 99mTc-MIBI. Ao Raio X todos os animais do grupo Calota Craniana e 3 dos 5 animais do grupo Coluna Vertebral que desenvolveram tumor apresentaram imagens sugestivas de lesão. **Conclusão:** Os modelos ortotópicos de osteossarcoma de calota craniana e coluna vertebral em camundongos atímicos são factíveis e permitem o acompanhamento *in vivo* para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas. A cintilografia com 99mTc-MIBI foi eficaz na detecção dos osteossarcomas em modelo animal ortotópico de calota craniana e coluna vertebral.

Palavras chave: Osteossarcoma, Camundongos nus, Tecnécio 99mTc Sestamibi, Ensaios Antitumorais Modelo de Xenoenxerto

ABSTRACT

Osteosarcoma (OS), a malignant tumor characterized by a direct formation of bones or osteoid, is the second most common primary bone neoplasm, with bimodal epidemiology. This type of cancer affects both children and adults and it grows preferably on metaphyseal region (either on long bones in young adults or flat bones on patients over 50 years). It has an unknown etiology, and the clinical symptom comprises local pain and pain in the surrounding area, such as adjacent joint, unrelieved by rest or anesthesia. Furthermore, it is a tumor with low responses to chemotherapy, leading to a variety of tumor cell necrosis, with a prognosis of surgery for complete removal of the tumor. Therefore, if the tumor is located on a so-called hard to access location or an impossible area to access surgically, leading to difficulties on removing it, it is otherwise necessary to adopt a new therapeutic treatment to pursue the success on its treatment. In order that new therapies could be tested, new models are necessary to be developed, with no sacrifice of the animals during the tests, as an example 99mTc-MIBI, which have low cost, high especificity in malignant tumors detection. **Objective:** Develop a model of vertebral OS and skull OS that permits to test further therapies. As a secondary objective to determine the effectiveness of images with 99mTc-MIBI in detecting osteosarcoma tumors in the presented model. **Material and Methods:** The animals used in this study were nude mice and were divided into two different groups: those with implantation of OS on the skull (n = 6) and those with implantation on vertebra (n = 9). OS cells (10^6 MNNH/HOS) were inoculated directly onto the surface of the skull after scarification with percutaneous via, as well as in the vertebra. Images were realized with 99mTc-MIBI and X-ray in all animals that developed tumor. **Results:** All animals in Skull group and five in Vertebra group developed tumor macroscopically. Less uptake in central tumor area were showed in all animals with 99mTc-MIBI. X-ray showed images that suggests tumor in all animals in Skull group and in 3 of 5 animals in Vertebra group. **Conclusion:** Skull and Vertebra OS tumor models in athymic mice are feasible and allow *in vivo* follow up during new therapies development and test. Images with 99mTc-MIBI were effective to detect tumor areas in vertebra and skull groups.

Keywords: Osteosarcoma, Nude mice, Technetium 99mTc Sestamibi, Xenograft Model Antitumor Assays

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP- Anatomopatológico

ATCC- do inglês American Type Culture Collection

CO₂- Dióxido de Carbono

DMEM- de glucose e L-glutamina

FBS- do inglês Fetal Bovine Serum

FHM- Fibrohistiocitoma maligno

HE- Hematoxilina-Eosina

MIBI- 2metoxi-isobutil-isonitrilo

MNNG- do inglês N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine

O₂- Oxigênio

OMS- Organização Mundial da Saúde

OR- Odds Ratio

OS - Osteossarcoma

Qtx- Quimioterapia

RNM- Ressonância Nuclear Magnética

SPCAL- Sociedade Portuguesa de Ciências em Animais de Laboratório

Tc- Tecnécio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Necessidade de reinoculação das células de OS humano para o desenvolvimento dos modelos em Calota Craniana e Coluna Vertebral.....	19
Tabela 2. Distribuição dos animais conforme formação ou não de Os nos modelos em Calota Craniana e Coluna Vertebral.....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ^{99m}Tc -MIBI - $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_6\text{Tc}$ Retirado de Abram e Alberto, 2006.....	4
Figura 2. Seqüência das etapas do procedimento do Grupo Calota Craniana: 1) transfixação percutânea da pele, 2) escarificação da calota e 3) inoculação celular.....	13
Figura 3. Seqüência das etapas do procedimento do Grupo Coluna Vertebral: 1) transfixação da pele e processo espinhoso percutaneamente e 2) inoculação celular.....	14
Figura 4. Máquina Portátil Dental X-ray.....	15
Figura 5. Câmara-gama para cintilografia com ^{99m}Tc -MIBI.....	16
Figura 6. Evolução crescimento do OS de todos os animais grupo Coluna Vertebral.....	20
Figura 7. Evolução do crescimento tumoral nos animais que obtiveram sucesso do implante no grupo Coluna Vertebral.....	21
Figura 8. A resultante R^2 demonstra o tipo de crescimento tumoral, polinomial, para o grupo Coluna Vertebral.....	21
Figura 9. Evolução crescimento do OS de todos os animais grupo Calota Craniana.....	22
Figura 10. A resultante R^2 demonstra o tipo de crescimento tumoral, polinomial, no grupo Calota Craniana.....	22
Figura 11. Sobrevivência cumulativa de animais com OS de Coluna Vertebral e Calota Craniana (*teste de Log Rank).....	23
Figura 12. Evolução do peso dos animais do modelo de Os do grupo Calota Craniana (*teste de Friedman).....	24
Figura 13. Evolução de peso dos animais do modelo de OS do grupo Coluna Vertebral (*teste de Friedman).....	24
Figura 14. Radiografia de crânio do camundongo em perfil sem alterações da estrutura óssea.....	25

Figura 15. Radiografia de crânio do camundongo em perfil com alterações da estrutura óssea (indicadas pelas setas) sugerindo acometimento ósseo do tumor.....	26
Figura 16. Radiografia de crânio do camundongo em perfil com as medidas das soluções de continuidade na calota.....	26
Figura 17. Radiografia de coluna vertebral lombo-sacra de camundongo em perfil sem alterações da estrutura óssea.....	27
Figura 18. Radiografia de coluna vertebral de camundongo em perfil com alterações da estrutura óssea (indicadas pelas setas) sugerindo acometimento ósseo pelo tumor. Notar aumento de partes moles.....	27
Figura 19. Radiografia de coluna vertebral de camundongo em posição anteroposterior com alterações da estrutura óssea (indicadas pelas setas) sugerindo acometimento dos processos transversos, pedículos e corpo pelo tumor.....	28
Figura 20. Radiografia simples de coluna vertebral em posição frente com as medidas das soluções de continuidade na calota.....	28
Figura 21. Imagem com cintilografia com 99m Tc MIBI de corpo inteiro de camundongo em perfil. Nota-se Calota Craniana sem alteração da captação (seta).....	29
Figura 22. Imagem com cintilografia com 99mTc MIBI de corpo inteiro de camundongo em perfil. Nota-se Calota Craniana com aumento da captação na área tumoral.....	30
Figura 23. Imagem com cintilografia com 99mTc MIBI de corpo inteiro de camundongo em perfil. Nota-se coluna vertebral sem alteração da captação (seta).....	30
Figura 24. Imagem com cintilografia com 99mTc MIBI de corpo inteiro de camundongo em perfil. Nota-se coluna vertebral com aumento da captação na área tumoral (seta).....	31
Figura 25. Imagem com cintilografia com 99m Tc MIBI de corpo inteiro de camundongo posteroanterior. Nota-se coluna vertebral com aumento da captação na área tumoral (seta).....	31
Figura 26. Tecido tumoral de osteossarcoma de Calota Craniana. HE (400X). Notar as características nucleares e formação de matriz osteóide (seta).....	32

Figura 27. Tecido tumoral de osteossarcoma de Calota Craniana. HE (100X). Notar infiltração extensa no tecido ósseo.....	33
Figura 28. Tecido ósseo normal. HE (100X). Notar elementos das séries hematopoiéticas.....	33
Figura 29. Tecido ósseo normal. HE (100X). Notar infiltração muscular pelo tumor e o contraste entre as fibras normais (seta verde) e células tumorais (seta laranja).....	34

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Desenvolvimento dos Modelos.....	11
3.1.1 Cultura de células.....	11
3.1.2 Animal de experimentação.....	11
3.1.2.1 Grupos experimentais	11
3.1.2.2 Período pré-operatório	12
3.1.2.3 Técnica anestésica.....	12
3.1.2.4 Técnica cirúrgica para implante das células.....	12
3.1.2.5 Pós-operatório.....	14
3.2 Estudos <i>in vivo</i>	14
4.2.1 Volumetria	14
4.2.2 Imaginologia.....	15
4.2.2.1 Raio X simples	15
4.2.2.2 Cintilografia com 99mTc-methoxyisobutylisonitrile (MIBI)	15
3.3 Preparação das peças para análise histopatológica.....	16
3.4 Análise Estatística.....	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Quanto ao desenvolvimento dos modelos de OS	19
4.1.1 Quanto à necessidade de reinoculação nos modelos	19
4.1.2 Quanto à porcentagem de sucesso do implante para o desenvolvimento do OS	19
4.1.3 Quanto ao crescimento do OS.....	20
4.1.4 Quanto à sobrevida global dos animais	23
4.2 Quanto ao acompanhamento <i>in vivo</i>	24
4.2.2 Quanto ao acompanhamento por Exames de imagem	25
4.2.2.1 Radiologia simples	25
4.2.2.2 Imagens com 99mTc-methoxyisobutylisonitrile (MIBI)	29
4.2.3 Confirmação anatomopatológica (AP).....	32
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

8.ANEXOS.....	56
8.1 ANEXO I- ATCC product Sheet.....	57
8.2 ANEXO II- Dados individuais da amostra- peso.....	61
8.3 ANEXO III- Dados individuais da amostra- volume.....	63
8.4 ANEXO IV- Dados individuais da amostra- sobrevida.....	65
8.5 ANEXO V- Declaração de investigação “sanduíche”- Universidade de Coimbra.....	67
8.6 ANEXO VI- Comitê de ética em Pesquisa da Universidade São Francisco.....	69
8.7 ANEXO VII- Carta de aceite do trabalho no Congresso Europeu de Câncer 2013..	71

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OS) é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como “um tumor maligno caracterizado pela formação direta de osso ou osteóide através de proliferação de células mesenquimais” (Schajowicz et al., 1995).

No Brasil, devido à dificuldade em se obter o registro de casos para todo o país, o número estimado de casos novos de OS, em pacientes de até 20 anos, é de aproximadamente 350 casos/ano (Censo Demográfico- IBGE, 2000). É a segunda neoplasia primária maligna mais comum dos ossos, perdendo somente para o mieloma múltiplo, sendo responsável por 20% das neoplasias malignas primárias. Sua incidência é de 2 a 3 casos por milhão de nascidos vivos, exceto na faixa etária de 15 a 19 anos que atinge 8 a 11 casos por milhão (Heck, 2006).

Tumores primários do sistema esquelético são raros e correspondem a 0,2% de todos os cânceres (Jemal et al., 2004). Geralmente apresentam distribuição bimodal, correspondendo a 5% das doenças malignas em menores de 20 anos, sendo, destes, 75% dos casos de OS (Rosemberg et al., 2005). Nos pacientes idosos, 25% dos casos foram acompanhados de condições pré-existentes, como Doença de Paget e radioterapia prévia (Parkin, 1993).

O OS tem preferência pelas metáfises dos ossos longos (89%) sendo as mais acometidas a metáfise distal de fêmur, proximal de tíbia, úmero, fêmur e distal do rádio. A região diafisária é acometida em 10% e apenas 1% na região epifisária (Schajowicz, 2000; Próspero, 2001). Nos pacientes mais jovens, metade dos casos ocorre ao redor do joelho (fêmur distal e tíbia proximal). Já em pacientes acima de 50 anos, 40% dos casos acometem ossos chatos (Rosemberg, 2005). O esqueleto axial ou ossos craniofaciais são comprometidos principalmente em pacientes mais velhos (Huvos, 1991; Arndt e Crist 1999).

Há alguns fatores de risco, como exposição à irradiação ou agentes alquilantes, retinoblastoma, Síndrome de Li-Fraumeni e doença de Paget (Tucker & Nimmo, 1991; Hawkins et al, 1996; Ha, 1999).

Como diagnósticos diferenciais de OS de calota craniana têm-se o condrossarcoma e o osteocondroma (Haque et al., 2006).

O quadro clínico da doença tem início com dor progressiva no local do tumor, irradiada para a articulação adjacente, de início insidioso, não sendo aliviada com uso de analgésicos e/ ou repouso.

Sinais radiológicos de agressividade como reações periosteais, destruição da cortical e invasão articular geralmente são encontradas no momento do diagnóstico. As lesões podem ser predominantemente blásticas ou líticas.

Cerca de 85% dos doentes que sofreram amputação, mesmo que imediata, acabam por apresentar desfecho letal, por complicações advindas de metástases pulmonares. Assim, deduz-se que a maior parte dos doentes já apresenta foco secundário ao diagnóstico (Martins, 2010).

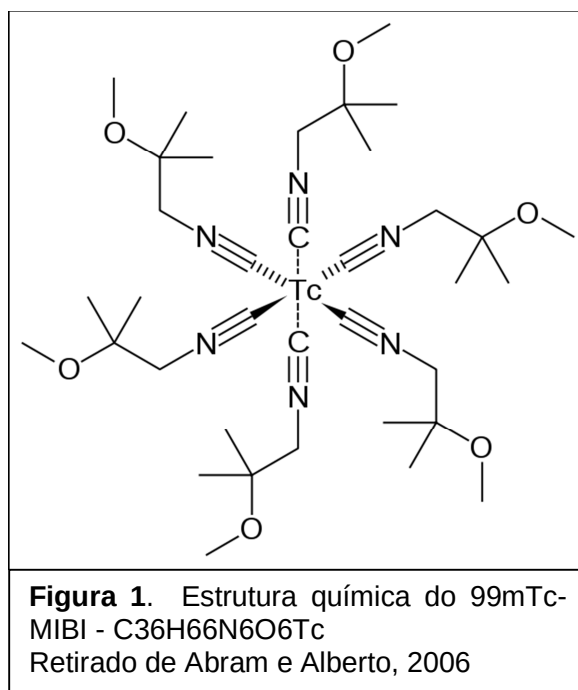
Acredita-se que em pacientes entre 15 a 29 anos, o tempo médio para o diagnóstico seja de 13,1 semanas, segundo levantamento com 207 pacientes de serviços públicos e privados americanos, no período de 2001 a 2003 (Martin et al., 2007).

A etiologia do OS permanece desconhecida e vários aspectos da carcinogênese têm sido enfocados para esclarecer e proporcionar seu melhor entendimento. Do ponto de vista histopatológico, trata-se de tumor maligno bastante indiferenciado (alto grau histológico), caracterizado pela presença de células malignas mesenquimais que produzem matriz osteóide ou osso imaturo (Rosemberg, 2005). O OS é um tumor de células progenitoras, multipotentes, com células do periósteo e da medula, estroma hormônio responsivo, as quais se diferenciam em várias linhagens, dependendo dos sinais do ambiente (Bianco et al., 2001). Pode ser dividido em variantes de alto e baixo grau, dependendo da celularidade, pleomorfismo, anaplasia e número de mitoses (Bramwell, 2000). São classificados pela OMS conforme tipo celular predominante (Fletcher et al., 2002) e os produtos de proliferação celular (Schajowicz et al., 1995).

A ressonância nuclear magnética (RNM) é um exame indispensável para avaliar a extensão do tumor, tanto dentro do osso quanto sua extensão para partes moles, determinando sua relação com as estruturas anatômicas próximas (Schajowicz, 2000). A cintilografia óssea é importante para avaliar metástases esqueléticas e, a radiografia e tomografia de tórax e abdome são utilizadas para investigar metástases abdominais e pulmonares.

Alternativa ao acompanhamento por imagem destes tumores se faz por meio de cintilografia com ^{99m}Tc MIBI que pode demonstrar não apenas a presença de crescimento local, mas também detectar metástases à distância (Lorke et al., 2001; Priolli et al., 2012; Botelho & Abrantes, 2012). Pode também ser utilizada para detecção de metástases ósseas à distância ou tumores primários, tendo valor para planejamento de terapia profilática para metástases (Wakasugi, 2002), bem como permite monitorização da viabilidade celular do tumor após radioterapia (Zhu et al., 2002).

A cintilografia com MIBI utiliza o ^{99m}Tc -MIBI [^{99m}Tc -hexakis-2metoxi-isobutil-isonitrilo], composto lipofílico e catiônico, inicialmente desenvolvido para estudos de perfusão do miocárdio. Através de análise química, foi possível conhecer que este agente é um cátion monovalente, no qual o átomo de tecnécio (Tc) ocupa a posição central, rodeado por 6 ligantes alquil-isonitrilos, dispostos segundo uma geometria octaédrica, conforme descrito por Abram e Alberto em 2006 (Figura 1). Sua captação realiza-se por difusão passiva, assim como, pela diferença de potencial através da membrana mitocondrial. Tendo por base estes mecanismos, a sua captação é maior nos tecidos ou órgãos ricos em mitocôndrias, pelo que está indicado para o estudo funcional do miocárdio nas situações de insuficiência coronária e na detecção de patologia proliferativa, especialmente na área oncológica (Botelho & Abrantes, 2012).



A despeito das melhores técnicas de diagnóstico e de Qtx, a cirurgia continua sendo importante para a cura da doença. Os procedimentos cirúrgicos podem ser divididos em amputação ou cirurgia conservadora, os dois com excisão completa do tumor com margens seguras. A escolha do tipo de cirurgia dependerá do local primário, da situação anatômica e do grau de invasão do tumor. O controle local eficiente é sempre cirúrgico em bloco, podendo ser dividido em intralesional, marginal, amplo ou radical. A recorrência local está relacionada com a remoção total ou não do tumor.

A Qtx não associada ao procedimento cirúrgico não é suficiente para controlar o tumor primário ou as metástases à distância (Jaffe et al., 2002; Petrilli et al., 2006). Esta característica, de tumor pouco responsivo à Qtx, faz com que pacientes que apresentam tumores primários ou metástases em locais onde haja impossibilidade ou dificuldade de extirpação, como mandíbula, calota craniana e vértebras da coluna fiquem com os recursos terapêuticos limitados a tratamento pouco eficaz, sendo, desta forma, necessário o desenvolvimento de modelos para o teste de novas formas de terapias mais eficazes para a doença nestas localizações.

Opção ao estudo de terapêutica padrão e/ou adjuvante são os modelos experimentais de doença humana em animais imunodeprimidos. Desde 1968, quando foram apresentados os camundongos atímicos (Pantelouris, 1968), estes animais são usados como importante ferramenta biomédica. Esta utilização é principalmente devido às características que o aproximam do animal ideal que incluem crescimento tumoral rápido, fácil manuseio, bem como a capacidade para aceitar as células tumorais humanas. Como estes animais são imunocomprometidos, aceitam enxertos alogênicos ou xenogênicos, incluindo os tumores malignos humanos. O transplante de tumores malignos em camundongos atímicos foi amplamente utilizado em muitos tipos de pesquisa em câncer, porque o animal pode manter as características histológicas originais do tumor, tais como cariótipo, expressão de oncogenes, estrutura molecular e evolução clonal (Rygaard et al, 1990).

Os xenoenxertos, enxerto de tecido entre espécies diferentes, podem ser divididos conforme a localização escolhida para o implante das células tumorais em ortotópicos e heterotópicos, entendendo-se como ortotópico quando o implante é executado no animal, em mesmo órgão que deu origem as células tumorais e,

heterotópico quando esta implantação ocorrer em local distinto à origem da célula implantada (Priolli et al., 2012). Nos anos 90 autores conseguiram desenvolver modelo de OS com implantação de células de tumor humano no subcutâneo (Asai et al., 1998) e o modelo ortotópico de tíbia (Berlin et al., 1993) em ratos.

Ao pesquisar-se no Pubmed o uni termo “osteosarcoma animal model” temos 1340 resultados, “osteosarcoma model” “orthotopic” somente 78 trabalhos são selecionados. Quando associado “osteosarcoma animal model” a “MNNG/HOS”, linhagem celular utilizada no trabalho, somente 10 trabalhos são resgatados e ao adicionar-se “orthotopic” a “osteosarcoma animal model” a pesquisa resulta em 3 trabalhos, sendo dois artigos do mesmo grupo de cientistas (Luu et al. 2005; Su et al., 2011), ou seja, com descrição de um único modelo por este grupo e, um outro de Gomes et al., descrito 2007. Nenhum dos dois modelos, entretanto, trata da localização em coluna vertebral ou calota craniana.

Inicialmente os modelos experimentais de OS foram obtidos quando animais experimentais foram expostos a alta concentração de material radioativo (Ross, 1936), implantando benzopireno e colesterol na tíbia (Brunschwig, 1938), irradiação externa (Janik, 1972), inoculação de isótopos radioativos (Barnes et al., 1970; Cobb, 1970) e vírus oncogênicos (Osion, 1977). Mais recentemente, devido à imprevisão destes modelos, visando modelos mais robustos, surgiram novos estudos, os quais relataram surgimento espontâneo de OS em cão (Kirpensteijn et al., 2002) e ratos (Schmidt et al., 1988).

Em 2001, Kanna et al., desenvolveram modelo de xenoenxerto ortotópico de tíbia em Balb/c nu/nu onde células de OS de ratos (K7M2) foram injetadas dentro da tíbia proximal, obtendo maior êxito no desenvolvimento primário de tumor e maior incidência de metástases pulmonares, quando comparada a injeção subcutânea, endovenosa e intramuscular. A implantação de células de OS humano (UMR 106-01) em ratos atímicos foi descrita no mesmo ano por Fisher et al.

Várias tentativas de desenvolver metástases pulmonares após inoculação de células de OS (HOS) cultivadas *in vivo* foram descritas tanto com implantação heterotópica (Arnstein et al., 1974) quanto com inoculação ortotópica (McGary et al., 2002; Luu et al., 2005), porém não houve sucesso. Até que, após modificação genética

da linha celular HOS com o agente químico MNNG (do inglês N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine), por Rhim et al. em 1977, o desenvolvimento das metástases foi possível. Vinte anos depois outra técnica apresentada obteve sucesso utilizando a mesma linhagem celular. Neste modelo foi realizada abertura na cortical da tíbia e, após, inoculadas as células, ao invés da utilização da transfixação da cortical óssea (Crnalic et al., 1997).

O desenvolvimento de linha celular de OS humano possibilitou mimetizar o tumor em animal de experimentação. Até o momento, modelos de OS ortotópicos apresentado na literatura restringem-se a implantação em fêmur (Yu et al., 2009,) ou em tíbia (Berlin et al., 1993; Crnalic et al., 1997; Fischer et al., 2001). Devido à grande agressividade, prognóstico reservado deste tipo de tumor e terapêutica ainda pouco eficaz oferecida a doentes que não podem ter seu tumor primário completamente ressecado, tais como os que se localizam em coluna vertebral e calota craniana, é de importância crucial desenvolver modelos de OS ortotópicos que permitam verificar *in vivo* os resultados de novas possibilidades terapêuticas.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Descrever modelos ortotópicos factíveis de osteossarcoma de calota craniana e coluna vertebral em camundongos atímicos que permitam o acompanhamento *in vivo* e o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

Como objetivo secundário pretende-se determinar a eficácia da cintilografia com ^{99m}Tc-MIBI na detecção dos osteossarcomas em modelo animal ortotópico de calota craniana e coluna vertebral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo cumpriu todas as orientações da Sociedade Portuguesa de Ciência em Animais de Laboratório (SPCAL), a Diretiva 2010/63/EU, sempre numa perspectiva dos 3R's (*Replacement, Reduction e Refinement*) em pesquisa com animais. Esteve sempre sob a orientação e executado por pessoal devidamente formado e creditado para o manuseamento de animais de laboratório. Foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade São Francisco sob o protocolo 001.05.12. O modelo foi desenvolvido na Universidade de Coimbra.

3.1 Desenvolvimento dos Modelos

3.1.1 Cultura de células

A linhagem celular de OS humano utilizada neste estudo foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) e designa-se por MNNG-HOS (Anexo1).

Todas as células utilizadas para o enxerto apresentaram menos de 22 passagens.

As células foram propagadas de acordo com as recomendações da ATCC em meio DMEM (Sigma) suplementado com FBS 10% (Sigma), a 37°C em incubadora com atmosfera com 95% de ar e 5% de CO₂. Para todos os estudos as células foram separadas com o uso de solução de tripsina-EDTA a 0.25% (Gibco).

3.1.2 Animal de experimentação

Foram utilizados 17 camundongos nus, da estirpe Balb/c nu/nu, machos, com peso variando entre 18 a 25 gramas e idade entre 4 e 6 semanas.

3.1.2.1 Grupos experimentais

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais:

Grupo Calota Craniana– Oito animais para implante de OS humano em calota craniana;

Grupo Coluna Vertebral– Nove animais para implante de OS humano em coluna vertebral.

3.1.2.2 Período pré-operatório

Os animais não foram submetidos a qualquer tratamento prévio à data da cirurgia.

Os camundongos, identificadas pelo número, foram alojados em gaiolas individuais e mantidos em isolamento por uma semana até a data do sacrifício, permanecendo em ambiente climatizado e com controle de luminosidade (ciclo claro-escuro) com dieta *ad libitum* para ingestão de água e ração padronizada. Dados de acompanhamento foram anotados em fichas individuais.

3.1.2.3 Técnica anestésica

No dia da intervenção os camundongos foram pesados e anestesiados com o emprego de quetamina na concentração 500mg/10ml associado a 3ml de cloridrato de cloropromazida na concentração de 25mg/5ml, administrado 0,1 ml desta solução a cada procedimento, por via intraperitoneal, com agulha hipodérmica de 30-gauge (0,3 X 13mm).

3.1.2.4 Técnica cirúrgica para implante das células

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo e caráter de rigidez séptica.

Após estarem completamente anestesiados, os animais foram restritos em mesa cirúrgica apropriada em decúbito ventral.

Foi realizada antissepsia com soro fisiológico na região onde as células foram implantadas.

As células de OS cultivadas, conforme anteriormente descrito, foram suspensas em 50 µl de solução salina normal e implantadas por injeção percutânea, utilizando

seringas de 1 ml e agulhas hipodérmica de 30-gauge (0,3 X 13mm). A técnica de enxerto para cada grupo obedeceu a descrição abaixo:

a) Grupo Calota Craniana:

A punção percutânea obedeceu a angulação de 45°. Foi realizada escarificação óssea, com o bisel da agulha hipodérmica, com cuidado para não transfixar a calota craniana e somente após, foram injetadas as células, sem troca da agulha. A densidade celular implantada foi de 10^6 células/animal (Figura 2).



Figura 2. Sequência das etapas do procedimento do Grupo Calota Craniana: 1) transfixação percutânea da pele, 2) escarificação da calota e 3) inoculação celular

b) Grupo Coluna Vertebral:

Foi adotado o intervalo L4-L5 para punção com agulha, sendo utilizada a crista ilíaca posterosuperior como referência.

A agulha foi inserida lateromedialmente até atingir o processo espinhoso vertebral, quando então foi realizada trepanação e consequente transfixação do processo espinhoso. A distância do processo espinhoso foi marcada no momento da transfixação e, no retorno da agulha, quando esta se encontrava no processo espinhoso novamente, as células foram, então, injetadas em densidade de 10^6 células/animal (Figura 3).

Sete dos nove animais deste grupo receberam nova inoculação com 2×10^6 células após o 7º dia do primeiro implante. Esta necessidade esteve vinculada a ausência de sinais macroscópicos do crescimento tumoral.

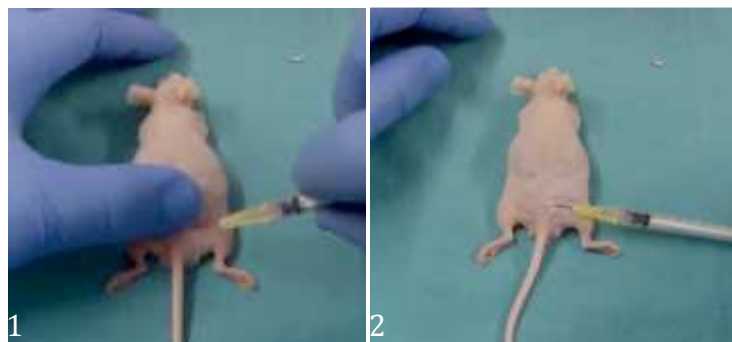


Figura 3. Seqüência das etapas do procedimento do Grupo Coluna Vertebral: 1) transfixação da pele e processo espinhoso percutaneamente e 2) inoculação celular

3.1.2.5 Pós-operatório

Dados de acompanhamento pós-operatório foram anotados em fichas individuais.

a) imediato

Após o término da operação os animais foram mantidos por 10 minutos sob manta aquecida, e após recuperação anestésica, mantidos sob as mesmas condições do pré-operatório, conforme descrição anterior.

b) tardio

Os animais foram submetidos aos estudos *in vivo* quanto ao crescimento tumoral e exames de imagem até a data do sacrifício.

3.2 Estudos *in vivo*

3.2.1 Volumetria – crescimento tumoral

Os animais foram monitorados por pelo menos 30 dias após a inoculação e os tumores medidos diariamente com paquímetro de metal, sendo feitos registros fotográficos individuais.

O volume do tumor foi calculado baseado em duas dimensões e expresso em milímetros cúbicos de acordo com a fórmula:

$$V = (L \times S^2) / 2$$

Onde L corresponde ao diâmetro maior do tumor e S ao diâmetro menor (Mary et al., 1989).

3.2.2 Imaginologia

3.2.2.1 Raio X simples

Os animais foram submetidos a exame de imagem de raio X com a máquina Genoray, PROT-XII, portable Dental X-ray (Figura 4) e as imagens analisadas pelo software GX Vix Win Pro. Para as imagens do grupo Calota Craniana foi utilizada a técnica de 0,05 e para os animais do grupo Coluna Vertebral, a técnica adotada foi 0,07.

As imagens foram analisadas individualmente a procura de critérios que denotassem alterações na estrutura óssea envolvida pelo tumor.



Figura 4. Máquina Portátil Dental X-ray

3.2.2.2 Cintilografia com ^{99m}Tc -methoxyisobutylisonitrile (MIBI)

Para a aquisição de imagens, 6 animais do grupo Calota Craniana e 3 animais do grupo Coluna Vertebral foram anestesiados como anteriormente descrito.

As injeções do radio fármaco foram realizadas por via endovenosa, na veia dorsal da cauda, com atividade de $100,6 \pm 65,3$ MBq de ^{99m}Tc -MIBI (STAMICIS®, IBA-Molecular, Espanha).

Imediatamente após a injeção, iniciou-se aquisição dinâmica através de câmara-gama (Millennium 2010 *GE-Healthcare, General Electric Company*, EUA. (Figura 5). A aquisição foi controlada por computador pelo *software* GenieAcq, sendo feita em duas fases sequenciais. Durante a fase dinâmica, as imagens foram registadas a cada 30 segundos durante 10 minutos. Em seguida foram obtidas imagens estáticas aos 10, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção. As imagens obtidas foram depois transferidas para uma estação de trabalho Xeleris (HP xw6400, Hewlett-Packard, EUA) onde foram processadas, sendo determinadas as áreas com aumento de captação, correspondente a região tumoral.

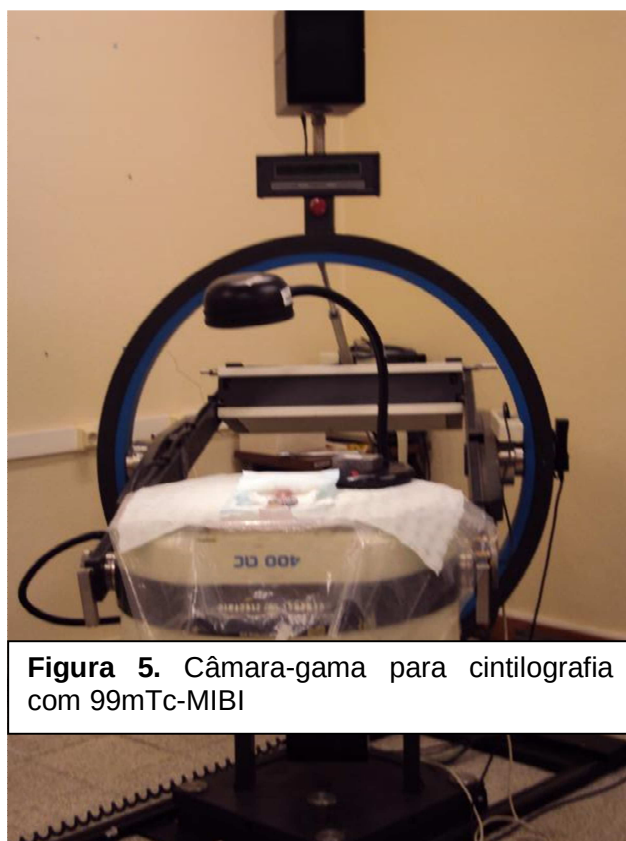


Figura 5. Câmara-gama para cintilografia com ^{99m}Tc -MIBI

3.3 Preparação das peças para análise histopatológica

Para a realização do estudo histopatológico todos os espécimes cirúrgicos previamente fixados em solução de formalina a 10% foram incluídos em blocos de parafina.

Três cortes de 4 µm foram obtidos de cada bloco na periferia do tumor, para obtenção de áreas com e sem tumor, sendo corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para diagnóstico anatomopatológico.

O estudo histopatológico foi realizado por patologista experiente no diagnóstico de OS que não teve acesso aos demais aspectos do estudo.

3.4 Análise Estatística

A análise dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância menor que 5% ($p \leq 0,05$), mediante os seguintes modelos: estatística descritiva; medidas de tendência central; Teste de normalidade; Teste de Fisher, Teste de Friedman, Regressão linear, Análise de sobrevida (Kaplan Meier, Log Rank).

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de análise estatística SPSS for Windows, versão 13.0.

Cada resultado foi acompanhado do teste utilizado com suas respectivas justificativas no capítulo resultados.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Quanto ao desenvolvimento dos modelos de OS

4.1.1 Quanto à necessidade de reinoculação nos modelos

Tabela 1. Necessidade de reinoculação das células de OS humano para o desenvolvimento dos modelos em Calota Craniana e Coluna Vertebral

	Reinoculação	Não reinoculação
Coluna vertebral	7 (77,8%)	2 (22,2%)
Calota craniana	0 (0%)	6 (100%)

$p = 0,007$; Odds Ratio (OR) = 4,5 [1,326; 15,277]

*Teste de Fisher

Foi utilizado o teste exato de Fisher uma vez que comparamos duas variáveis nominais, cada uma com duas categorias e com valores esperados inferiores a 5 em pelo menos uma das categorias (Regras de Cochran).

OR é uma medida que estima o risco relativo. Os ratos do grupo coluna vertebral tem uma possibilidade 4,5 vezes superior (com intervalo de confiança a 95% como descrito na Tabela 1) de ser reinjetados do que os do grupo calota craniana.

4.1.2 Quanto à porcentagem de sucesso do implante para o desenvolvimento do OS

Tabela 2. Distribuição dos animais conforme formação ou não de Os nos modelos em Calota Craniana e Coluna Vertebral

	Forma tumor	Não forma tumor
Coluna vertebral	6 (66,7%)	3 (33,3%)
Calota craniana	6 (100%)	0 (0%)

$p = 0,229$

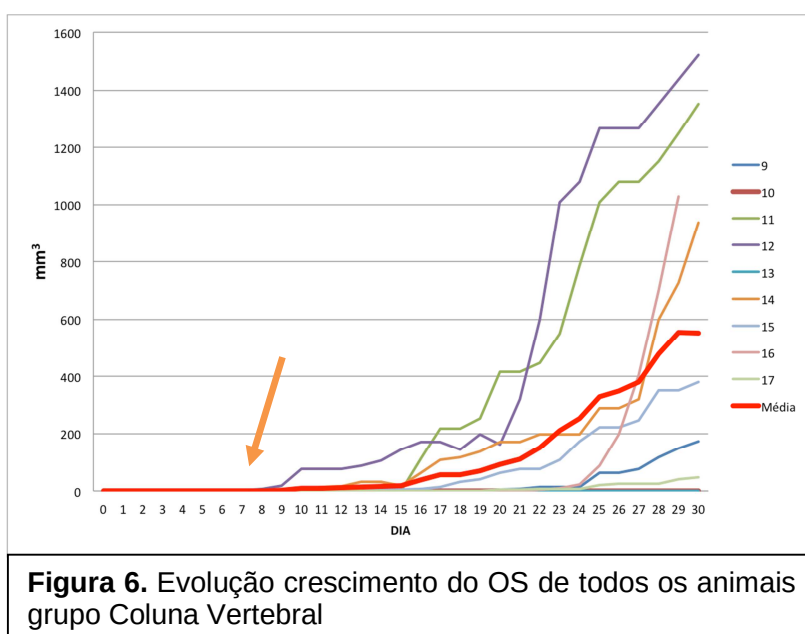
*Teste de Fisher

Foi utilizado o teste de Fisher pelas mesmas razões apresentadas no item anterior.

Não foi encontrada diferença significativa quanto à formação ou não do tumor nos grupos de coluna vertebral e calota craniana.

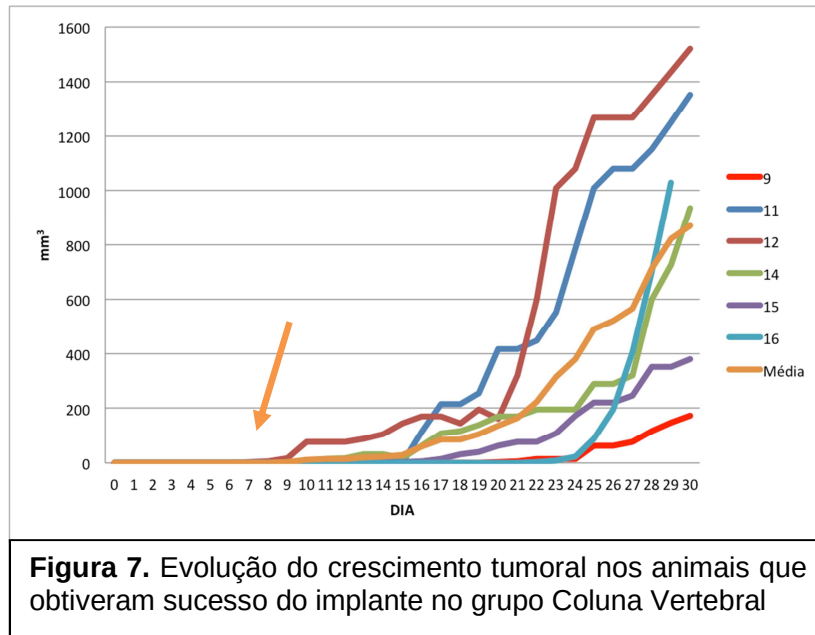
4.1.3 Quanto ao crescimento do OS

4.1.3.1 Grupo Coluna Vertebral

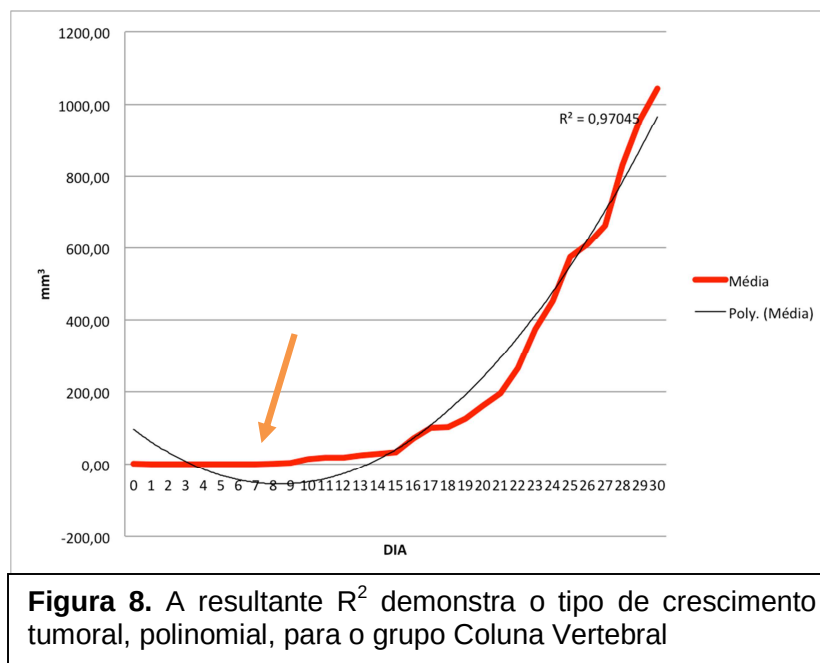


Cinco dos nove animais do grupo Coluna Certebral apresentaram crescimento tumoral, com padrão de crescimento semelhante (Figura 6).

Deve-se ressaltar a necessidade de reinoculação no 7º dia (indicada pela seta) com início do crescimento tumoral.

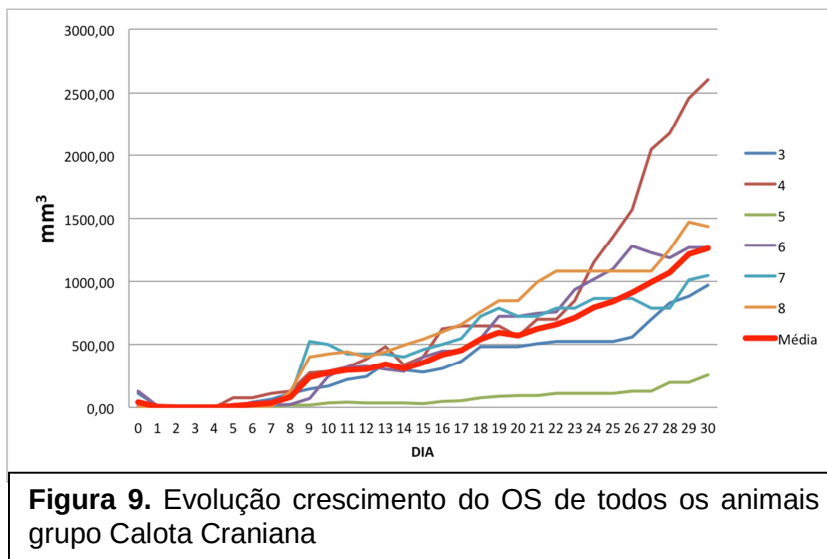


Ao se excluir os animais que não desenvolveram tumor macroscopicamente, fica mais evidente o padrão de crescimento tumoral (Figura 7).

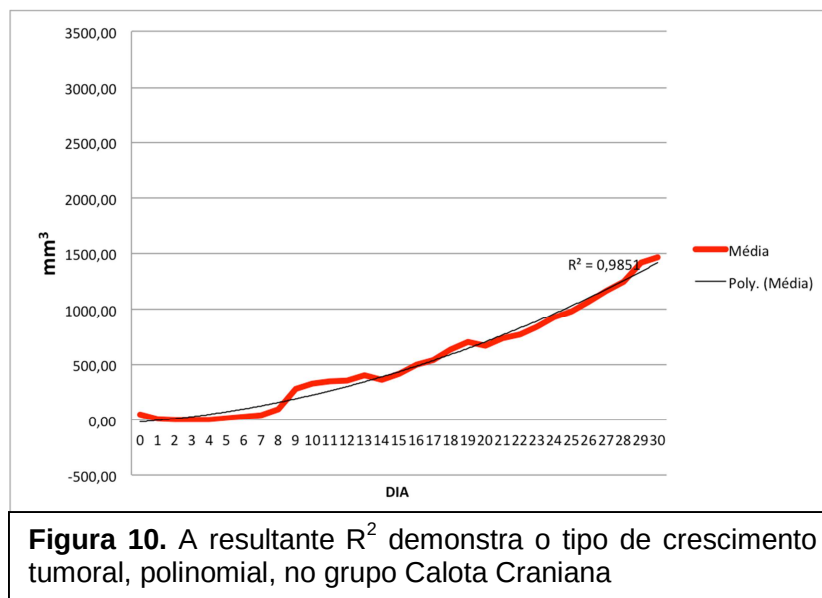


Analisando as médias dos volumes tumorais, observa-se padrão de crescimento tumoral que demonstra uma resultante polinomial $R^2=0,97$ (Figura 8).

4.1.3.2 Grupo Calota Craniana

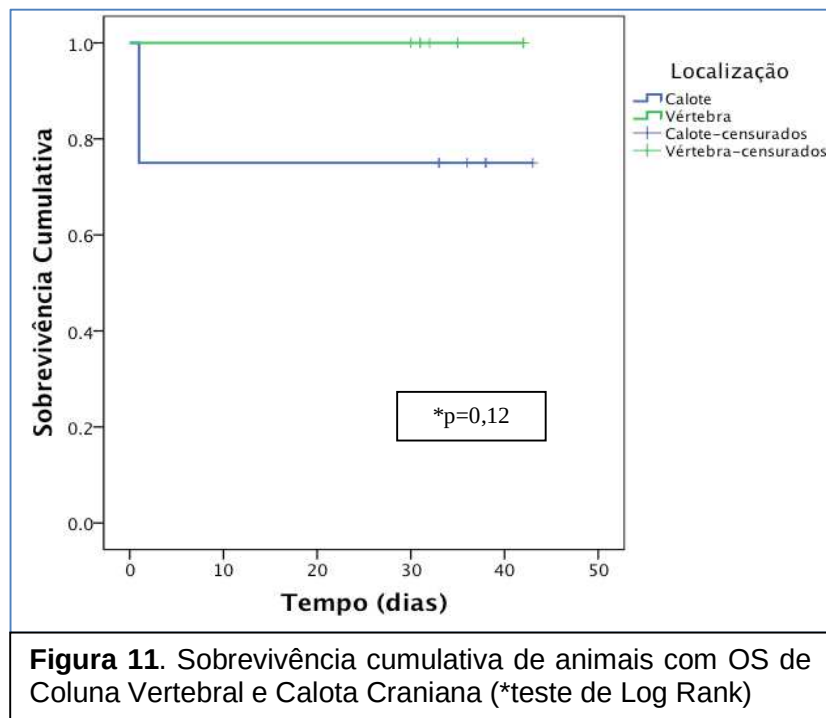


Todos os animais do grupo calota craniana apresentaram crescimento tumoral observado à macroscopia (Figura 9).



Semelhante ao grupo coluna vertebral o padrão de crescimento tumoral do grupo calota craniana resultou em curva polinomial, com $R^2=0,98$ (Figura 10).

4.1.4 Quanto à sobrevida global dos animais

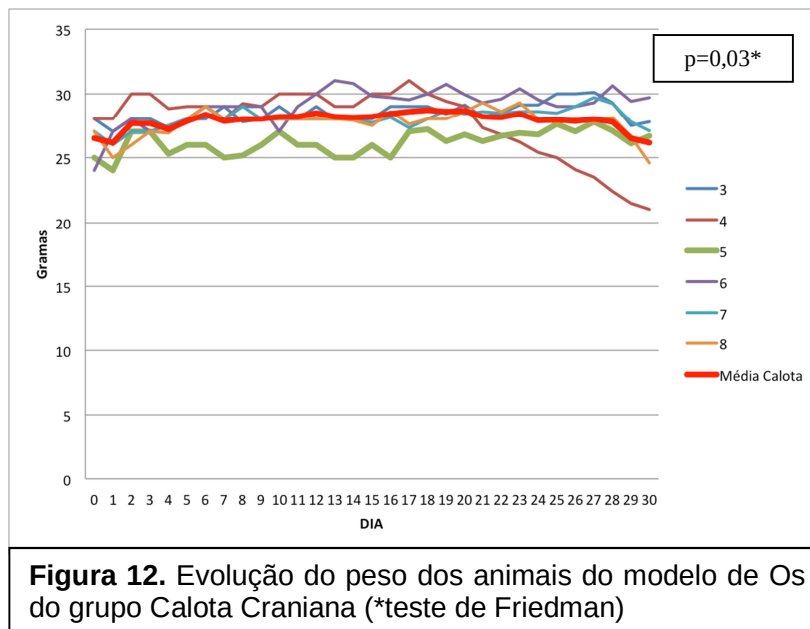


Dois animais do grupo calota craniana morreram no momento experimento, devido a complicações da anestesia, antes mesmo de realizar-se a inoculação das células.

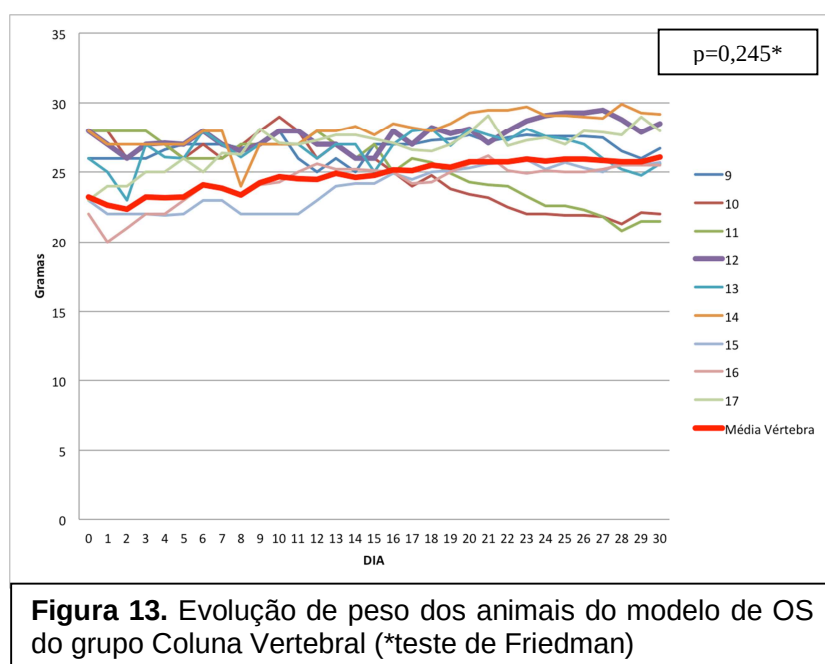
Para avaliar a sobrevivência dos camundongos foram elaboradas curvas de sobrevivência pelo método Kaplan-Meier para os dois grupos. As sobrevivências foram comparadas pelo teste de Log-Rank. A comparação não mostrou diferenças significativas, com $p=0,12$ (Figura 11).

4.2 Quanto ao acompanhamento *in vivo*

4.2.1 Quanto ao peso dos animais



A comparação dos pesos dentro de cada grupo de ratos ao longo do experimento foi feita segundo teste de Friedman, desenho não paramétrico para acompanhamento de vários animais. Para o grupo calota craniana verificou-se variação significativa com $p=0,03$ (Figura 12).



Para o grupo coluna vertebral esta comparação não teve significância, com $p=0,245$ (Figura 13).

4.2.2 Quanto ao acompanhamento por Exames de imagem

Para comparação ilustrativa das imagens dos resultados obtidos nos exames, assumiu-se como controle os animais do outro grupo, ou seja, para os animais do grupo calota craniana foram utilizadas imagens do crânio dos animais do grupo coluna vertebral, e vice e versa.

4.2.2.1 Radiologia simples

No grupo Calota Craniana foram visualizadas alterações radiográficas em todos os animais. No grupo Coluna Vertebral as alterações foram visualizadas em três dos cinco animais que desenvolveram o tumor macroscopicamente.

As lesões apresentaram caráter heterogêneo na calota craniana, corpos vertebrais, pedículos e processos transversos, em diversos níveis, com componente osteoblástico e osteolítico com predomínio de padrão lítico, promovendo inclusive solução de continuidade da cortical óssea em alguns pontos (Figuras 15,16, 18,19 e 20) quando comparadas a radiografias normais (Figuras 14 e 17).

4.2.2.1.a Grupo Calota Craniana

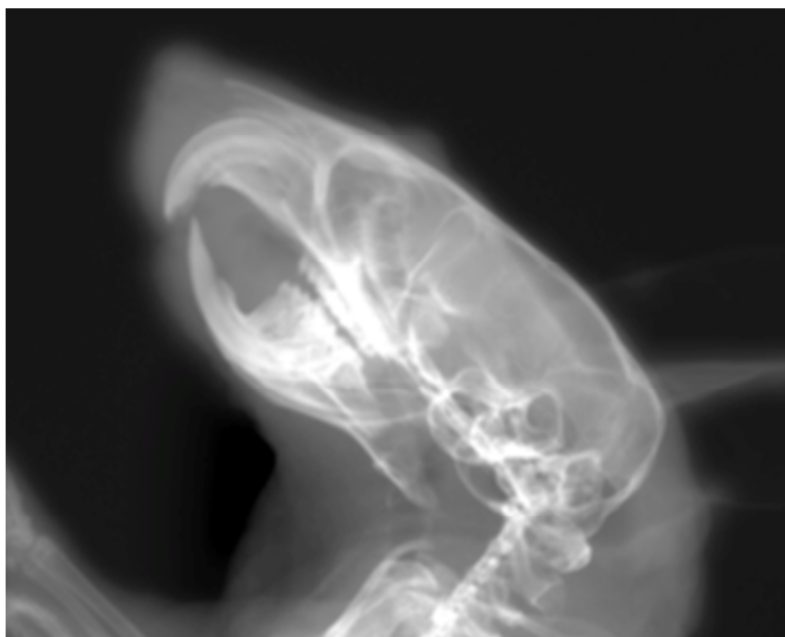


Figura 14. Radiografia de crânio do camundongo em perfil sem alterações da estrutura óssea

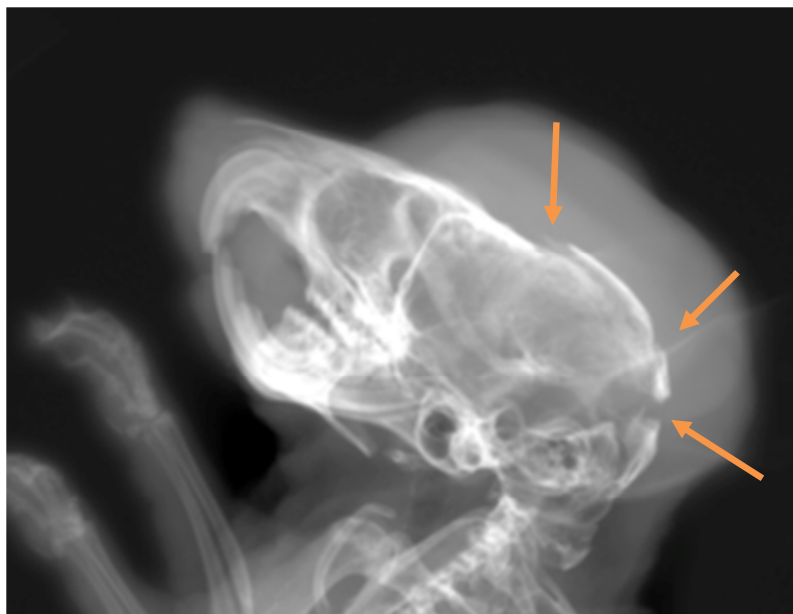


Figura 15. Radiografia de crânio do camundongo em perfil com alterações da estrutura óssea (indicadas pelas setas) sugerindo acometimento ósseo do tumor

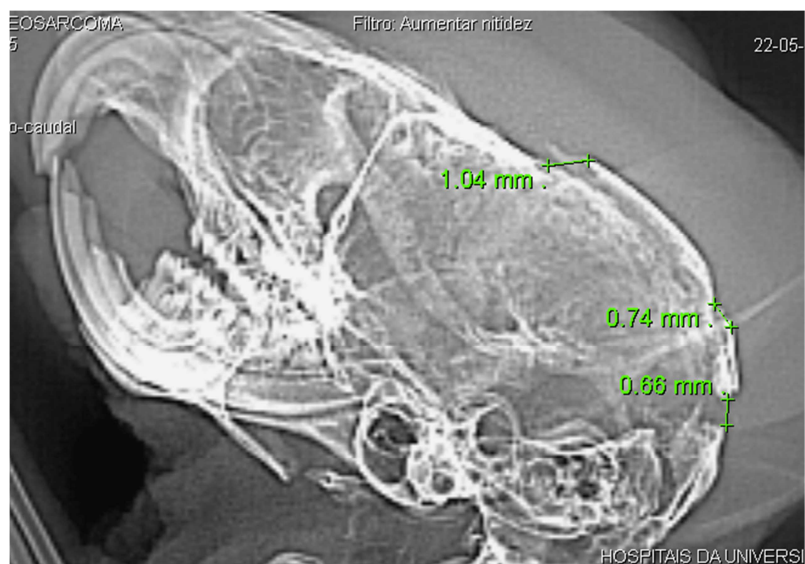


Figura 16. Radiografia de crânio do camundongo em perfil com as medidas das soluções de continuidade na calota

4.2.2.1.b Grupo Coluna Vertebral

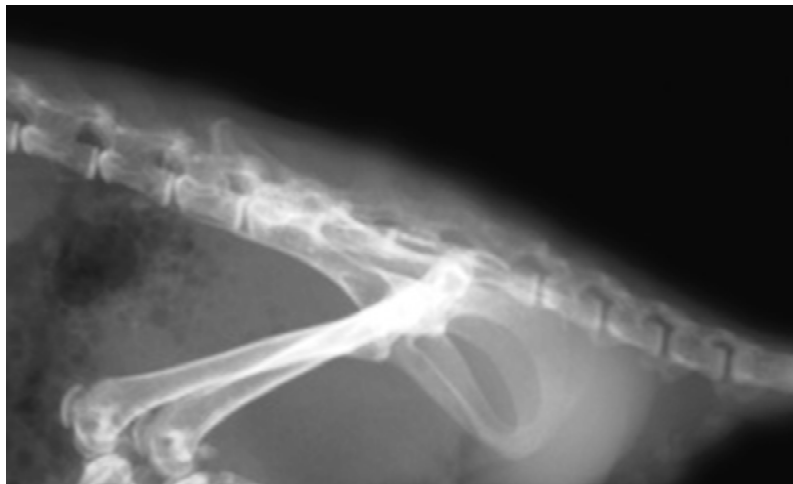


Figura 17. Radiografia de coluna vertebral lombo-sacra de camundongo em perfil sem alterações da estrutura óssea

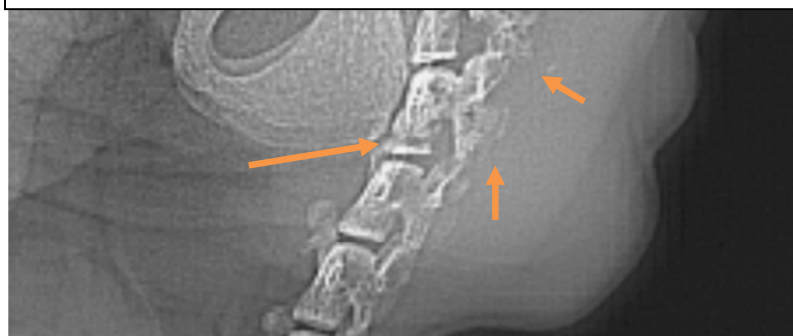


Figura 18. Radiografia de coluna vertebral de camundongo em perfil com alterações da estrutura óssea (indicadas pelas setas) sugerindo acometimento ósseo pelo tumor. Notar aumento de partes moles



Figura 19. Radiografia de coluna vertebral de camundongo em posição anteroposterior com alterações da estrutura óssea (indicadas pelas setas) sugerindo acometimento dos processos transversos, pedículos e corpo pelo tumor

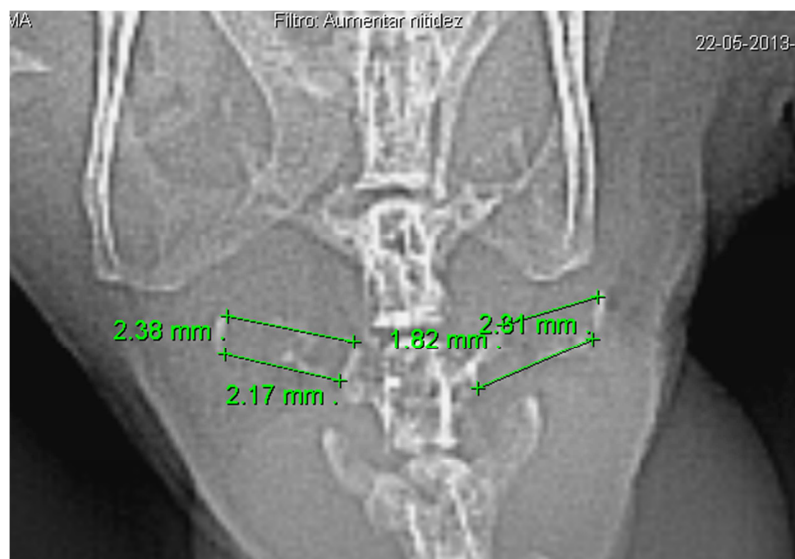


Figura 20. Radiografia simples de coluna vertebral em posição frente com as medidas das soluções de continuidade na Vértebra

4.2.2.2 Imagens com ^{99m}Tc -methoxyisobutylisonitrile (MIBI)

Importante ressaltar que para o diagnóstico de aumento de captação é utilizado relação entre a captação músculo normal X área tumoral no mesmo animal.

4.2.2.2.a Grupo Calota Craniana

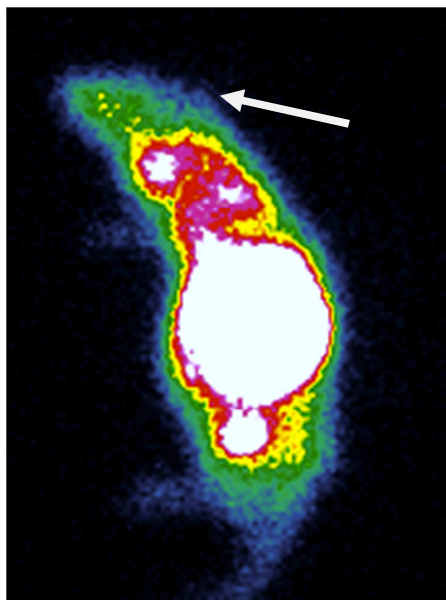


Figura 21. Imagem com cintilografia com ^{99m}Tc MIBI de corpo inteiro de camundongo em perfil. Nota-se calota craniana sem alteração da captação (seta)

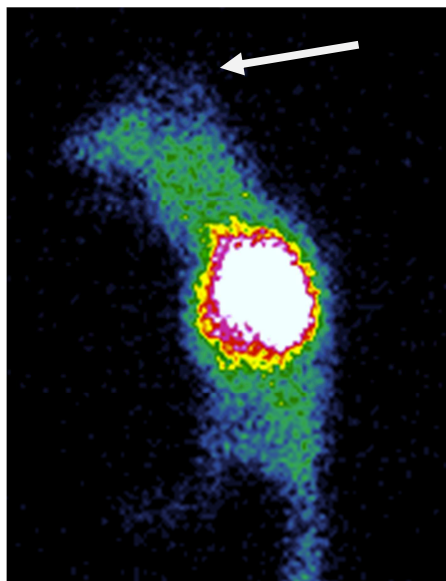


Figura 22. Imagem com cintilografia com ^{99m}Tc MIBI de corpo inteiro de camundongo em perfil. Nota-se calota craniana com aumento da captação na área tumoral (seta)

4.2.2.2.b Grupo Coluna Vertebral

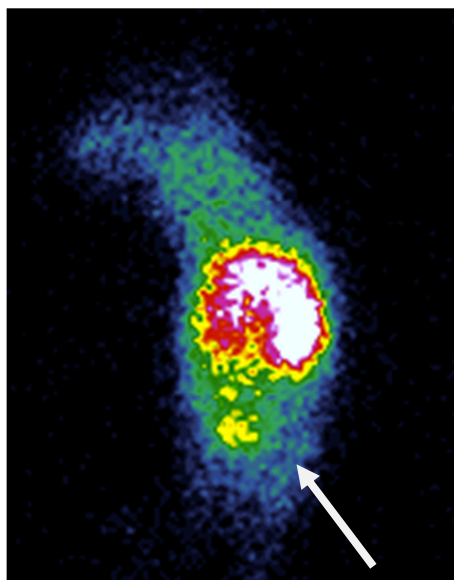


Figura 23. Imagem com cintilografia com ^{99m}Tc MIBI de corpo inteiro de camundongo em perfil. Nota-se coluna vertebral sem alteração da captação (seta)

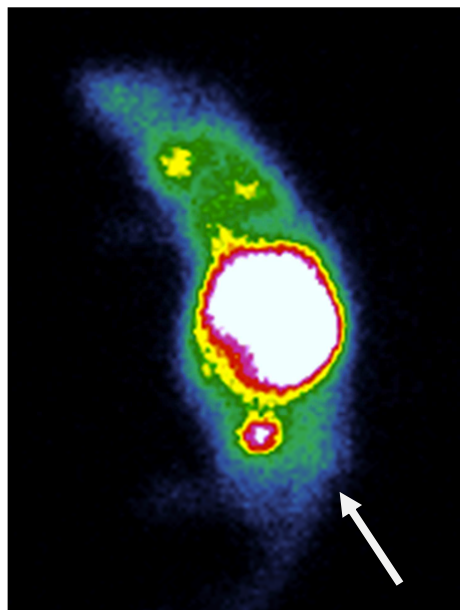


Figura 24. Imagem com cintilografia com ^{99m}Tc MIBI de corpo inteiro de camundongo em perfil. Nota-se coluna vertebral com aumento da captação na área tumoral (seta)

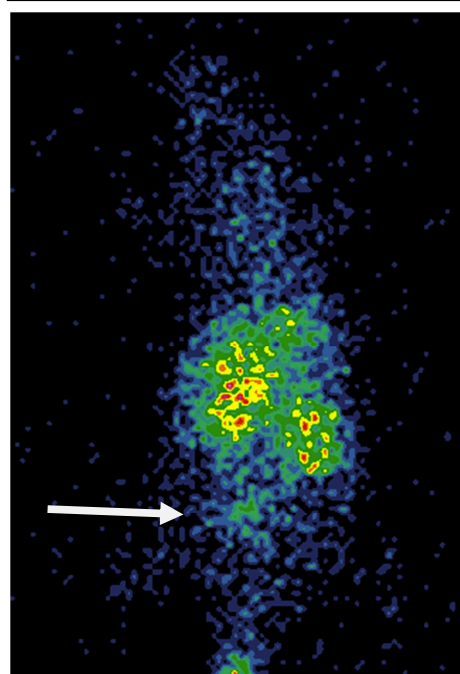


Figura 25. Imagem com cintilografia com ^{99m}Tc MIBI de corpo inteiro de camundongo posteroanterior. Nota-se coluna vertebral com aumento da captação na área tumoral (seta)

4.2.3 Confirmação anatomopatológica (AP)

Todos os animais do grupo calota craniana apresentara OS ao exame AP.

Foi observado infiltração por agrupamentos de células tumorais de grande tamanho com citoplasma acidófilo e escasso, notando-se inversão da relação núcleo citoplasma. As células mostraram núcleo ovalado ou arredondado de cromatina delicada e nucléolos evidentes. Houve formação de matriz osteóide atípica pelas células tumorais (Figura 26).

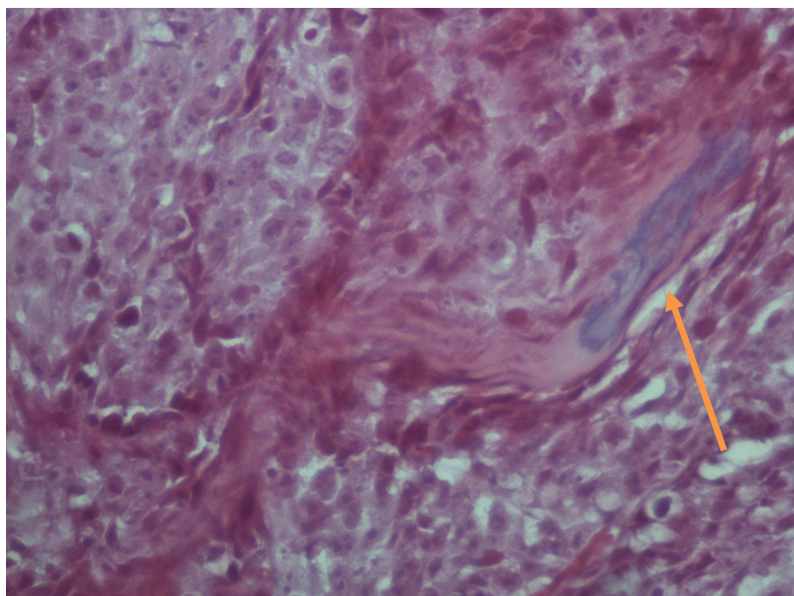


Figura 26. Tecido tumoral de osteossarcoma de calota craniana. HE (400X). Notar as características nucleares e formação de matriz osteóide (seta)

No grupo coluna vertebral dois dos cinco animais enviados a análise anatomopatológica apresentaram infiltração extensa no tecido ósseo por neoplasia de grandes células ovaladas compatíveis com infiltração por OS (Figura 27).

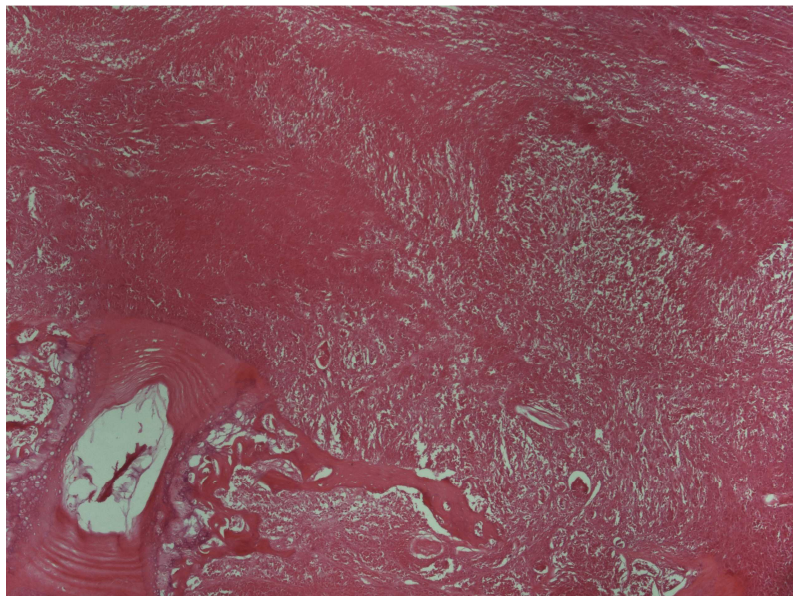


Figura 27. Tecido tumoral de osteossarcoma de calota craniana. HE (100X). Notar infiltração extensa no tecido ósseo

Os outros três animais apresentaram medula óssea normal, sem evidências de tumor com os respectivos elementos das três séries hematopoiéticas (Figura 28). Estes animais que não apresentaram infiltração óssea, demonstraram grande lesão tumoral com característica de OS em partes moles (Figura 29).

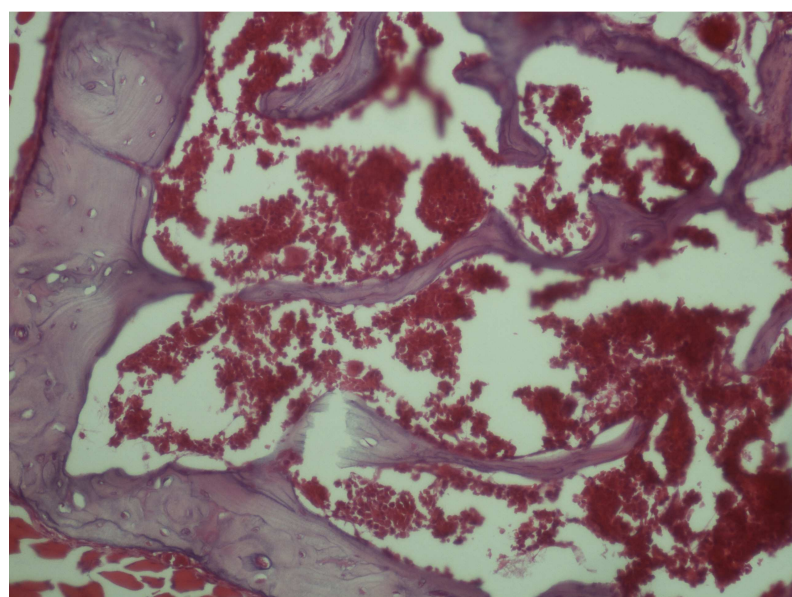


Figura 28. Tecido ósseo normal. HE (100X). Notar elementos das séries hematopoiéticas

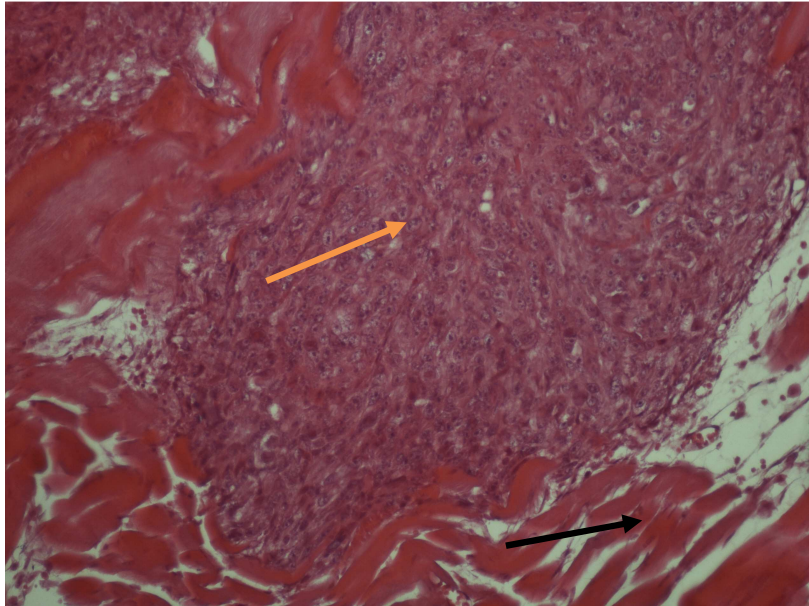


Figura 29. Tecido ósseo normal. HE (100X). Notar infiltração muscular pelo tumor e o contraste entre as fibras normais (seta preta) e células tumorais (seta laranja)

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A cultura de células, cultivo de células dispersas, retiradas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma linha celular, tem sido muito usada como principal modelo *in vitro* para os estudos, quer do comportamento quer das vias de sinalização dos cânceres. Apesar de todos os contras apontados ao uso de linhas imortalizadas, a grande vantagem é a sua replicabilidade, servindo como modelo inicial para novos estudos na área da oncobiologia.

Para a sua manutenção é necessário assegurar rigorosas condições de assepsia, bem como condições ambientais propícias, tais como pH, umidade, temperatura e concentrações de CO₂ e O₂, meios de cultura apropriados e substratos adequados.

Células normais em cultura apresentam um padrão sigmoidal de atividade proliferativa denominada curva de crescimento, que reflete a adaptação à cultura, as condições do ambiente, a disponibilidade de substrato físico e suprimentos de nutrientes necessários para promover a produção de novas células. A determinação desta curva é importante para avaliarem-se as características específicas da cultura celular (Peres, 2005). Entretanto, embora o modelo *in vitro* seja viável, ele apresenta restrições principalmente relacionadas à biotransformação e disponibilidade das possíveis drogas a serem testadas para o tratamento/prevenção da doença que o modelo representa.

O desenho de modelos experimentais viáveis que mimetizem melhor a doença oncológica é uma vontade há muito tempo idealizada, desse modo, a concretização do primeiro modelo de xenotransplante, em 1969 por Rygaard e Povlsen, constituiu um marco histórico científico na investigação em oncologia, tornando-se ferramenta imprescindível em qualquer estudo para a compreensão do câncer. Apesar das claras vantagens sobre os modelos *in vitro*, até a altura disponível, rapidamente as desvantagens que os modelos de xenotransplante subcutâneo, heterotópico, apresentavam, levaram à idealização de novos modelos que mais se aproximariam à doença no homem.

A modificação genética da linha celular HOS com o agente químico MNNG data

de 1977 (Rhim et al., 1977). A partir desta modificação modelos de OS em ratos foram obtidos, mimetizando a evolução natural da doença no homem, sendo possível o desenvolvimento das metástases em modelo animal de OS. Deste então, assim como no presente estudo, a maior parte dos modelos de OS utilizam esta linhagem celular para mimetizar o OS em humanos, estando o modelo em tíbia e fêmur consagrados na literatura fêmur (Crnalic et al., 1997; Berlin et al., 1993; Fischer et al., 2001, Gomes et al., 2007 e Yu et al., 2009;).

No presente estudo, o Balb/c nu/nu foi escolhido tendo em conta que estes animais permitem o desenvolvimento de xenotransplantes, uma vez que são animais atímicos e, portanto, deficientes em células T1 (principais efetores da imunidade celular). O fato é que a mutação genética induzida nos camundongos Balb/c nu/nu, que leva ao deterioramento ou ausência do timo, é tido como fator crítico na não formação de respostas imunitárias por parte destes animais, o que permite o desenvolvimento de tumores humanos a partir de xenoenxertos, ou seja, entre espécies diferentes. Esta alteração leva a incapacidade de produção de linfócitos T maduros, impedindo que consigam manter alguns tipos de resposta imune, alguns responsáveis pela mediação de respostas celulares e rejeição a xenotransplantes. Apesar disso, respostas imunitárias associadas e desencadeadas por outros tipos de células continuam ativas e estão mantidas (Fogh & Giovanella, 1982; River, 2010), garantindo maior proximidade de resposta imune humana na presença da neoplasia para estes animais, em relação àqueles com a imunidade completamente comprometida.

Desta forma, o desenvolvimento do Balb/c nu/nu por Pantelouris em 1968 foi decisivo na melhor compreensão da neoplasia humana, com novas possibilidades de desenvolvimento de terapêutica dirigida. Muito embora esta estirpe não se preste ao estudo da carcinogênese humana, mas tão apenas a tumorigênese, já que a célula iniciada (mutada) é implantada no animal e que se deva considerar como viés, a ausência da resposta imunitária tumoral mediada pelos linfócitos T1, seu uso está consagrado, não apenas para o desenvolvimento de tumores ósseos (Berlin et al., 1993; Crnalic et al., 1997; Fischer et al., 2001; Yu et al., 2009, Su et al., 2011 e Gomes et al., 2007), como corrobora este estudo, onde foi factível o desenvolvimento dos tumores em calota craniana e coluna vertebral, como em outros modelos de

tumores humanos de cólon (Priolli et al., 2012), mama (McManus et al., 1978), próstata (Stephenson et al., 1992), entre outros.

Modelos de OS em Balb/c nu/nu foram descritos anteriormente com resultados muito variados quando comparados com a taxa de sucesso de desenvolvimento tumoral que variaram entre 0, ausência de pega tumoral, a 100%, sucesso completo (Crnalic et al., 1997, Khanna et al. 2001). A quantidade celular necessária para implante foi descrita por Zhe et al. em 2009 como 10^6 células para cada inoculação.

Embora não exista descrição na literatura de modelo de OS ortotópico de Calota Craniana e Coluna Vertebral para serem comparados quanto à taxa específica de sucesso, tem-se, para o grupo do modelo de Calota Craniana taxa de sucesso de 100%, o que demonstra sem sombra de dúvidas, a eficácia deste tipo de enxerto. Para o modelo de Coluna Vertebral, obteve-se taxa de sucesso de 66,7%. Muito embora não tenha existido diferença significativa entre os grupos de Calota Craniana e Coluna Vertebral quanto à pega tumoral ($p=0,229$) esta diferença percentual tem que ser observada. Tal fato pode ser justificado pela maior dificuldade e complexidade técnica no desenvolvimento do OS de coluna vertebral, reafirmado pela necessidade de reinoculação de células tumorais, apresentado para este grupo. Estas taxas de formação do tumor após a inoculação correspondem ao encontrado na literatura, conforme previamente descrito.

O volume do tumor, como dito anteriormente, foi calculado pela fórmula recomendada por Mary et al. em 1989 e os valores expressos em mm^3 . Este trabalho foi validado pelos resultados apresentados por Yu et al. em 2009, onde os volumes apresentados na mensuração foram comparados àqueles obtidos por análise com aparelho de ultrasonografia. Os valores encontrados na necropsia dos 57 animais foram comparados aos valores obtidos com paquímetro, obtendo-se relação positiva.

No presente estudo, a partir das medidas executadas, foi possível obter a curva de desenvolvimento tumoral, que demonstrou crescimento polinomial, após cálculo de regressão. Este fato, embora inicialmente possa parecer incoerente, visto o conhecido crescimento exponencial dos tumores *in vivo* é facilmente explicável pelo fato da inoculação das células em meio, levarem a formação inicial de pápula local a qual regride com o passar do tempo, até que ocorra a total absorção do meio e morte de

parte das células tumorais com consequente redução do volume da pápula inicial. As células tumorais sobreviventes entram então, em fase de replicação, gerando o crescimento tumoral, que agora sim, cresce em ritmo exponencial. Este crescimento em dois ciclos, com aparecimento da pápula seguido de seu desaparecimento e depois de novo crescimento local gera o aspecto típico da curva polinomial. Na literatura não há referência ao ritmo do crescimento tumoral nos modelos de OS de Calota Craniana e Coluna Vertebral já que estes modelos ainda não haviam sido descritos. Esta curva é de importância fundamental para pesquisadores que desejem utilizar este modelo, já que até cerca de uma semana após a inoculação não necessariamente se notará macroscopicamente a lesão tumoral, sem que isto signifique ausência de pega do enxerto. Adicionalmente gera a possibilidade de reinoculação das células em cultura, caso até esta data não se note qualquer sinal macroscópico ou por imagem da neoplasia, sem necessariamente obrigar ao sacrifício do animal, com a necessária observância dos 3Rs.

Embora tecnicamente mais complexo quanto ao procedimento, não houve diferença significativa quanto à sobrevida do grupo Coluna Vertebral quando comparado ao da Calota Craniana. Este fato é importante na medida em que garante que haja tempo suficiente para a execução de pesquisas de novas terapias *in vivo*, tal como proposto para os modelos de OS apresentados. Desta maneira pode-se assumir que ambos os modelos apresentam segurança para o acompanhamento durante todo o experimento, devendo-se ficar atento, entretanto, durante os procedimentos que envolvam técnicas de anestesia ou que induzam a hipotermia. Por tratar-se de animal atímico, há comprometimento do gene que controla a calvície/pilificação por ocasião da indução da atimia, o que resulta em animais sem pêlos (nus), razão pela qual desenvolve hipotermia com grande facilidade, assim, o camundongo deve permanecer sob cuidados rigorosos de temperatura, como por exemplo, mantê-lo sob manta térmica em todos os procedimentos executados, em especial na cintilografia.

Recentes avanços nos mecanismos moleculares das doenças permitem o diagnóstico em estágio inicial das neoplasias. Algumas meses antes das alterações morfológicas poderem revelar a doença, estudo de imagem com ^{99m}Tc-MIBI pode ser capaz de visualizar a atividade proliferativa com alta especificidade na detecção de

tumores malignos e poderia ser útil para discriminar tumores de alto grau dos benignos ou de baixo grau (Abrantes et al., 2012; Botelho & Abrantes, 2012).

Estudo com utilização de cobaias demonstraram que o local de acumulação intracelular do 99mTc-MIBI é precisamente a mitocôndria (Crane *et al.*, 1993). Este estudo juntamente com outros, verificaram que o 99mTc-MIBI se localiza em tecidos com elevados níveis de mitocôndrias, no sentido de suportar o aumento de metabolismo, com consequente aumento do potencial negativo de membrana mitocondrial, como ocorre no miocárdio e em tumores malignos (Piwnica-Worms et al., 1990; Maffioli et al., 1996; Fukumoto, 2004, Botelho & Abrantes, 2012). Nas imagens obtidas neste estudo foi possível, corroborando com os estudos apresentados, identificar áreas centrais de necrose na zona de implante tumoral. Uma grande quantidade de necrose celular acompanhada por irrigação sanguínea ineficiente e hipoxia pode alterar significativamente a cinética e reduzir a captação do MIBI em tumores. A hipoxia tecidual é um fator importante na determinação da resposta do tumor ao tratamento e a ocorrência de células hipóxicas em tumores é uma das principais causas de insucesso da quimioterapia e radioterapia (Kinuya et al., 2002), podendo ser detectada pelo 99mTc-MIBI. No caso específico do OS, quanto maior a área de necrose após a QTx melhor é o prognóstico do paciente (Huvos, 1991), sendo este exame, portanto, de grande utilidade para o acompanhamento da resposta terapêutica anti-neoplásica em modelos *in vivo*. Esta condição proporciona o acompanhamento de resposta a possíveis novas terapêuticas para os modelos apresentados no presente estudo, sem a necessidade de sacrifício dos animais, como proposto no presente estudo.

Outra forma possível de acompanhamento das lesões do OS *in vivo* pode ser feita por meio de Radiografias simples, que trazem inúmeras informações sobre a doença. Sinais radiológicos como reações periosteais, destruição da cortical e invasão articular geralmente são encontradas no momento do diagnóstico no humano e demonstram a agressividade do tumor e doença avançada (Ayala, 1996). No presente estudo, todos os animais do Grupo Calota Craniana apresentaram perda de contiguidade óssea com aspecto lítico e aumento de sinal ao RX no local do tumor. Já nos animais do Grupo Coluna Vertebral a avaliação demonstrou estas alterações em

três dos cinco animais estudados. Estes dados estão em acordo com a descrição mais habitualmente encontrada na literatura, onde o OS apresenta padrão lítico e blástico (misto), padrão de mineralização difuso ou em cachos e bordas infinitas. Outros aspectos descritos comumente, tais como imagens em aspecto de raios de sol e triângulo de Codman, ou seja, sinais de reação periosteal (Ayala, 1996) não puderam ser visualizados nas imagens dos modelos de Calota Craniana e Coluna Vertebral, possivelmente pela área diminuta e pouco tempo de evolução tumoral. A detecção ao Raio X simples de imagens tipicamente descritas traz forte suspeita da presença do tumor, entretanto na prática clínica o método de imagem mais sensível para o diagnóstico do OS ainda permanece sendo a RM (Schajowicz, 2000), que infelizmente não é, ainda, utilizada na maioria dos centros de pesquisa com animais.

Evidentemente, apesar de todos os esforços e desenvolvimento tecnológico atual, apenas os resultados obtidos com a leitura microscópica das lâminas poderá gerar de forma indubitável o diagnóstico da lesão. No presente estudo pode-se observar, para ambos os modelos, comportamento microscópico idêntico, independentemente da localização do tumor em calota craniana ou coluna vertebral, com infiltração por agrupamentos de células tumorais de grande tamanho com citoplasma acidófilo e escasso, notando-se inversão da relação núcleo citoplasma. As células mostraram núcleo ovalado ou arredondado com cromatina delicada e nucléolos evidentes. Houve formação de matriz osteóide atípica pelas células tumorais, descrição típica do OS. Os OS podem ser divididos em variantes de alto e baixo grau, dependendo da celularidade, pleomorfismo, anaplasia e número de mitoses (Bramwell, 2000). São classificados pela OMS conforme tipo celular predominante (Fletcher et al., 2002) e os produtos de proliferação celular (Schajowicz et al., 1995). Assim, descritivamente tem-se:

- 1- Osteossarcoma convencional: clássico ou central, tumores grandes, metafisários, que tendem a invadir o córtex, associado a partes moles. Histologicamente tumores de células fusiformes. Podem produzir quantidade variada de cartilagem e tecido fibroso e são divididos conforme a matriz predominante em osteoblástico (50%), fibroblástico (25%) e condroblástico (25%);
- 2- Osteossarcoma teleangiectásico: é lesão puramente lítica, ao Raio X demonstra

aspecto invasivo ou insuflado. Macroscopicamente é um cisto preenchido por sangue com apenas uma parte sólida. Microscopicamente apresenta espaços cheios de sangue separados por septos muito finos;

3- Osteossarcoma de pequenas células: lesão rara com pequenas células azuis que podem parecer com tumor de Ewing ou linfoma, podendo ser necessário estudo citogenético ou imunoistoquímico para diferenciação;

4- Osteossarcoma central de baixo grau: intramedular bem diferenciado ou intraósseo de baixo grau, inicia-se na medular do osso (Choong et al., 1996);

5- Osteossarcoma parosteal: raro e de baixo grau, originado na superfície óssea, histologicamente diferenciado com presença de osteóide bem individualizado e estroma fusiforme, com envolvimento de até 25% da superfície (Okada et al., 1994);

6- Osteossarcoma periosteal: maligno, de grau intermediário, origina-se na superfície do osso, geralmente na diáfise do fêmur e da tíbia, com faixa etária ligeiramente mais elevada e ampla. Ao exame macroscópico o tumor apresenta filamentos de células fusiforme produtoras de osteóide em forma de raios de cartilagem (Próspero, 2001);

7- Osteossarcoma de alto grau de superfície: é menos comum, agressivo e origina-se na face externa da cortical. Ao raio X demonstra lesão invasiva com margem mal definida. Na microscopia apresenta hipercelularidade, figuras mitóticas e acentuado pleomorfismo nuclear (Próspero, 2001);

8- Osteossarcoma secundário: ocorre em pacientes previamente afetados por doença de Paget e radioterapia;

9-Osteossarcoma extraósseo: sarcoma não rabdômio incomum, frequentemente em tecidos moles da extremidade inferior em adultos de meia idade. Tem sido relatado como complicação de radioterapia e deve ser tratado como OS (Dahlin, 1977; Bane, 1990);

10- Osteossarcoma multicêntrico ou multifocal: raro onde múltiplos tumores ósseos estão presentes ao diagnóstico e cada lesão lembra um tumor primário. Pode ser:

- Sincrônico: alto grau, esclerosante, intramedular e prognóstico limitado a 6 meses;

- Metacrônico: menos agressivo;

11- Fibrohistiocitoma maligno (FHM): distingue-se do fibrohistiocitoma maligno do osso

pelo encontro de tumor osteóide no componente ósseo do tumor. Os dois têm comportamento de sarcoma de alto grau e a distinção é apenas acadêmica (Ballance, 1988);

12-Osteossarcoma primário de mandíbula: em pacientes idosos, geralmente com diferenciação condróide e curso indolente, mais propenso à recorrência local do que a metástases a distância, principalmente se for de baixo grau (Bertoni et al., 1991).

Os resultados anatomopatológicos encontrados no presente estudo corroboram com os mais tradicionalmente descritos na literatura para os OS, a saber, tumor de alto grau de displasia (Bramwell, 2000) e aspecto classificado como convencional (Schajowicz et al., 1995).

Desta forma, os resultados do presente estudo garantem a exequibilidade dos modelos animais ortotópicos de OS de calota craniana e coluna vertebral, assim como sua detecção por métodos de imagem, quer radiológico quer cintilográfico, além da confirmação anatomopatológica.

Todas as características tipicamente descritas para o osteossarcoma humano puderam ser vistas nos modelos, os quais puderam garantir a similitude com a doença humana. Adicionalmente não houve grande dificuldade técnica para seu desenvolvimento, a taxa de pega e de crescimento tumoral foi satisfatória garantindo, desta forma, a melhoria da compreensão da doença e o desenvolvimento de novas modalidades de terapias. Novos estudos, entretanto, são necessários para garantir a reprodutibilidade destes resultados.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Modelos ortotópicos de osteossarcoma de calota craniana e coluna vertebral em camundongos atímicos são factíveis e permitem o acompanhamento *in vivo* para o desenvolvimento de novas terapêuticas.

A cintilografia com ^{99m}Tc -MIBI foi eficaz na detecção dos osteossarcomas em modelo animal ortotópico de calota craniana e coluna vertebral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abram U, Alberto R. Technetium and rhenium: coordination chemistry and nuclear applications. **Journal of Brazilian chemistry society** 17: 1486-1500, 2006.

Abrantes AM, Serra E, Gonçalves C, Oliveiros B, Laranjo M, Sarmiento-Ribeiro AB, Rocha-Gonçalves A, Botelho MF. Tumor hypoxia and technetium tracers: in vivo studies. **Current Radiopharmaceuticals**. 5:99-105, 2012.

Arndt CA, Crist WM. Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. **N.Engl.J.Med**. 341(5): 342-52, 1999.

Arnstein P, Taylor DO, Nelson-Rees WA, Huebner RJ, Lennette EH. Propagation of human tumors in antithymocyte serum-treated mice. **J Natl Cancer Inst**. 52(1):71–84, 1974.

Asai T, Ueda T, Itoh K, Yoshioka K, Aoki Y, Mori S, et al. Establishment and characterisation of a murine osteosarcoma cell line (LM8) with high metastatic potential to the lung. **Int J Cancer**. 76(3):418–22, 1998.

Ayala AG, Ro JY, Raymond AK. **Bone tumors**. In: Damjanov I, Linder J editors 1 ed 1996.

Ballance WA Jr, Mendelsohn G, Carter JR, Abdul-Karim FW, Jacobs G, Makley JT. Osteogenic sarcoma: malignant fibrous histiocytoma subtype. **Cancer**. 62:763-71, 1988.

Bane BL, Evans HI, Ro JY, Carrasco CH, Grignon DJ, Benjamin RS, Ayala AG. Extraskelletal osteosarcoma: a clinicopathologic review of 26 cases. **Cancer**. 65:2762-70, 1990.

Barnes DW, Carr TE, Evans EP, Lontil JF. 90Sr-induced osteosarcoma in radiation chimeras. **Int J Radiat Biol.** 18:531, 1970.

Berlin O, Samid D, Donthineni-Rao, Akeson W, Amiel D, Woods V. Development of a novel spontaneous metastasis model of human osteosarcoma transplanted orthotopically into the bone of athymic mice. **Cancer Res.** 53:4890–5, 1993.

Bertoni F, Dallera P, Bacchini P, Marchetti C, Campobassi A. The Instituto Rizzoli-Beretta experience with osteosarcoma of the jaw. **Cancer.** 68:1555-2653, 1991.

Botelho MF, Abrantes AM. Radiotracers in oncology. **Current Radiopharmaceuticals.** 5:000-000, 2012.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. Bone marrow stromal cells: nature, biology and potential applications. **Stem Cells.** 19:180-92, 2001.

Bramwell VH. Osteosarcoma and other cancers of bone. **Curr Opin Oncol.** 12:330-6, 2000.

Brunschwig A, Bissell AD. Production of osteosarcoma in a mouse by the intramedullary injection of 1,2-benzpyrene. **Arch Surg.** 36:53, 1938.

Choong PF, Pritchard DJ, Rock MG, Sim FH, McLeod RA, Unni KK. Low grade central osteogenic sarcoma: a long term follow up of 20 patients. **Clin Orthop Relat Res.** (322):198-206, 1996.

Cobb LM. Radiation-induced osteosarcoma in the rat as a model for osteosarcoma in man. **Br J Cancer.** 24(2):294–9, 1970.

Crane P, Laliberté R, Heminway S, Thoolen M, Orlandi C. Effect of mitochondrial viability and metabolism on technetium-99m-sestamibi myocardial retention. **European Journal of Nuclear Medicine**. 20,20-25, 1993.

Crnalic S, Hakansson I, Boquist L, Lofvenberg R, Brostrom LA. A novel spontaneous metastasis model of human osteosarcoma developed using orthotopic transplantation of intact tumor tissue into tibia of nude mice. **Clin Exp Metastasis**. 15(2):164–72, 1997.

Dahlin DC, Unni K. Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties. **Am J Surg Pathol**. 1:61-72, 1977.

Fisher JL, Mackie PS, Howard ML, Zhou H, Choong PF. The expression of urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: an in vivo mouse model. **Clin Cancer Res**. 1654(7):1654–60, 2001.

Fletcher CDM, Krishnan Unni K, Mertens F. World Health Organization classification of tumours. In: **Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone**; 2002. p. 265 [Chapter 11].

Fogh J, Giovanella B, **The nude mouse in experimental and clinical research** (Academic Press) 1982.

Fukumoto M. Single-photon agents for tumor imaging: 201TI, 99mTc-MIBI, and 99mTc-tetrofosmin. **Annals of Nuclear Medicine** 18, 79-95, 2004.

Gomes CM, Welling M, Que I, Henriquez NV, van der Pluijm G, Romeo S, Abrunhosa AJ, Botelho MF, Hogendoorn PC, Pauwels EK, Cleton-Jansen AM. Functional imaging of multidrug resistance in an orthotopic model of osteosarcoma using 99mTc-sestamibi. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. Nov; 34(11): 1793-803, 2007.

Ha PK, Eisele DW, Frassica FJ, et al. Osteosarcoma of the head and neck: a review of the Johns Hopkins experience. **Laryngoscope**. 109:964–9, 1999.

Haque F, Fazal ST, Ahmad SA, et al. Primary osteosarcoma of the skull. **Australasian Radiology**. 50:63–5, 2006.

Hawkins MM, Wilson LM, Burton HS et al. Radiotherapy, alkylating agents, and risk of bone cancer after childhood cancer. **J.Natl.Cancer Inst**. 88(5): 270-8,1996.

Heck RKJ. Tumores malignos do osso. **Cirurgia ortopédica de Campbell**. 2006; 10:827-33.

Huvos A. **Bone tumors. Diagnosis, treatment, and prognosis**. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1991.

Huvos AG, Rosen G, Marcove RC. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy in block resection and prosthetic bone replacement. **Arch Pathol Lab Med**. 101:14-8, 1977.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE. Censo demográfico 2000 [acesso em 10 de maio de 2013] Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>

Jaffe N, Carrasco H, Taymond K, Ayala A, Eftekhari F. Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? **Cancer**. 95:2202-10, 2002.

Janik P, Steel GG. Cell proliferation during immunological perturbation in three transplanted tumours. **Br J Cancer**. 26(2):108–14, 1972.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. American Cancer Society. *Cancer Statistics*, 2004. **CA Cancer J Clin**. 54:8-29, 2004.

Khanna C, Khan J, Nguyen P, Prehn J, Caylor J, Yeung C, et al. Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma. **Cancer Res.** 61(9):3750–9, 2001.

Kinuya, S., Yokoyama, K., Li, X.-F., Bai, J., Watanabe, N., Shuke, N., Takayama, T., Bunko, H., Michigishi, T., and Tonami, N. Hypoxia-induced alteration of tracer accumulation in cultured cancer cells and xenografts in mice: implications for pre-therapeutic prediction of treatment outcomes with (99m)Tc-sestamibi, (201)Tl chloride and (99m)Tc-HL91. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging** 29, 1006–1011, 2002.

Kirpensteijn J, Timmermans-Sprang EP, van Garderen E, Rutteman GR, Lantinga-van Leeuwen IS, Mol JA. Growth hormone gene expression in canine normal growth plates and spontaneous osteosarcoma. **Mol Cell Endocrinol.** 197(1–2):179–85, 2002.

Lorke DE, Kruger M, Buchert R, Bohuslavizki KH, Clausen M, Schumacher U. In vitro and in vivo tracer characteristics of an established multidrug human colon cancer cell line. **J Nucl Med.** 42(4):646-54, 2001.

Luu HH, Kang Q, Park JK, Si W, Luo Q, Jiang W, et al. An orthotopic model of human osteosarcoma growth and spontaneous pulmonary metastasis. **Clin Exp Metastasis.** 22(4):319–29, 2005.

Maffioli L, Steens J, Pauwels E, Bombardieri E. Application of 99mTc-sestamibi in oncology. **Tumori** 82, 12-21, 1996.

Martin SE, Ulrich C, Munsell M, Taylor S, Lange G, Bleyer A. Delays in cancer diagnosis in underinsured young adults and older adolescents. **Oncologist.** 12:816-24, 2007.

Martins GE. Acompanhamento do paciente tratado de osteossarcoma. **Dissertação apresentada ao departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em ciências.** 2-7, 2010.

Mary M., Tomayko and C, Parick Reynolds. Determination os subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** 24:148-154,1989.

McGary EC, Weber K, Mills L, Doucet M, Lewis V, Lev DC, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. **Clin Cancer Res.** 8(11):3584–91, 2002.

McManus MJ, Dembroske SE, Pienkowski MM, Anderson TJ, Mann LC, Schuster JS, Vollwiler LL, Weisch CU. Successful transplantation of human benign breast tumors into the athymic nude mouse and demonstration of enhanced DNA synthesis by human placental lactogen. **Cancer Res.** 38(8):2343-9, 1978.

Okada K, Frassica FJ, Sim FH, Beabout JW, Bond JR, Unni KK. Parosteal osteosarcoma: a clinicopathological study. **J Bone Joint Surg Am.** 76:366-78, 1994.

Oslon HM, Capen CC. Virus-induced animal model of osteosarcoma in the rat: morphologic and biochemical studies. **Am J Pathol.** 86(2):437–58, 1977.

Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant.**Nature.** Jan 27; 217(5126):370-1, 1968.

Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. International variations in the incidence of childhood bone tumors. **Int J Cancer.** 53:371-6, 1993.

Peres CM, Curi R. **Como Cultivar Células.** Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 2005.p.35-37.

Petrilli AS, Epelman S, Brunetto AL, Costa C, Almeida MT. **Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Osteossarcoma (GBTO) para pacientes metastáticos e não metastáticos.** [acesso em 04 de abril de 2013]. Disponível em:<www.bvsmms.saude.gov.br>

Priolli DG, Abrantes AM, Neves S, Batista JN, Cardinalli IA, Botelho MF. A novel model of distal colon cancer in athymic mice. **Acta Cirúrgica Brasileira.** 27 (6) 355-360, 2012.

Próspero JD. neoplasias produtoras de tecido ósseo. **Tumores ósseos;** 2001; 1: 17-41.

PubMed. Resultados de pesquisa sobre modelos de osteossarcoma. [Acesso em 02 jul. 2013]. Disponível em <www.ncbi.nlm.nih.gov>

Pwinca-Worms D, Kronauge JF, Chiu ML. Uptake an retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium(I) in culture chick myocardial cells. Mithochondrial and plasma membrane potential dependence. **Circulation** 82, 1826-1838, 1990.

Rhim JS, Putman DL, Arnstein P, Huebner RJ, McAllister RM. Characterization of human cells transformed in vitro by *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. **Int J Cancer.** 19(4):505–10, 1977.

River C. **Oncology Animal Models.** Charles River. 490, 2010.

Rosemberg AE. Bones, joints and soft tissue tumors. in: Kumar VK, Abbas AK, Fausto N, editors. **Robbins and Cotran pathologic basis of the disease.** 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 1273-324.

Rygaard J, Polvsen CO. Heterotransplantation of a malignant tumour to “Nude” mice. **Acta Pathol Microbiol Scand.** 77(4):758-60, 1969.

Rygaard K, Sorenson GD, Pettengill OS, Cate CC, Spang-Thomsen M, Abnormalities in structure and expression of the retinoblastoma gene in small cell lines and xenografts in nude mice. **Cancer Res** 1;50(17):5312-7, 1990.

Ross JM. The carcinogenic action of radium in the rabbit: the effect of prolonged irradiation with screened radium. **J Pathol Bacteriol.** 43(2):267–76, 1936.

Schajoiwicz F. Tumores produtores de tecido ósseo. **Neoplasias ósseas e lesões pseudotumorais** 2000; 2:131-71.

Schajowicz F, Sissons H, Sobin L. The World Health Organization's histologic classification of bone tumors: a commentary on the second edition. **Int J Cancer.** 75:1208-14, 1995.

Schmidt J, Strauss GP, Schon A, Luz A, Murray AB, Melchiori A, et al. Establishment and characterisation of osteogenic cell lines from a spontaneous murine osteosarcoma. **Differentiation.** 39(3):151–60, 1988.

SPCAL. Sociedade Portuguesa de Ciências em Animais de Laboratório. Saúde [cited 2009 nov] available from <<http://www.spcal.pt>>.

Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K, Ordóñez NG, Killion JJ, Fidler IJ. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. **Natl Cancer Inst.** 84(12):951-7, 1992.

Su Y, Wagner ER, Luo Q, Huang J, He BC, Zuo GW, Shi Q, Shi Q, Zhang BQ, Zhu G, Bi Y, Luo X, Kim SH, Shen J, Rastegar F, Huang E, Gao Y, Gao JL, Yang K, Wietholt C, Li M, Qin J, Hayton RC, He TC, Luu HH. Insulin-like growth factor binding protein 5 suppresses tumor growth and metastasis of human osteosarcoma. **Oncogene.** Sep 15;30(37): 3907-17, 2011.

Tucker GT, Nimmo WS. Antracyclin-induced cardiotoxicity and its relevance in cancer treatment Clinical measurement in drug evaluation. **Wolfe Publishing**, London, 1991, pg. 131-142.

Wakasugi S, Noguti A, Katuda T, Hashizume T, Hasgawa Y. Potential of (99m)Tc-MIBI for detecting bone marrow metastases. **J Nucl Med**. 43(5):596-602, 2002.

Yu Z, Sun H, Fan Q, Long H, Yang T, Ma B. Estabilishmente of reproducible osteossarcoma rat model using orthotopic implantation technique. **Oncology Reports**. 21:1175-1180, 2009.

Zhe Yu, Honghui Sun, Qingyu Fan, Hua Long, Tongtao Yang, Bao'an Ma. Establishment of reproducible osteosarcoma rat model using orthotopic implantation technique. **Oncology Reports** 21: 1175-1180, 2009.

Zhu X, Wu H, Xia J, Zhao M, Xianyu Z. The relationship between (99m)Tc-MIBI uptakes and tumor cell death/proliferation state under irradiation. **Cancer Lett**. 182(2):217-22, 2002.



ATCC

Product Sheet

MNNG/HOS CI #5 [R-1059-D] (ATCC® CRL-1547™)

Please read this **FIRST**



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: MNNG/HOS CI #5 [R-1059-D] (ATCC® CRL-1547™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 3



Description

Organism: *Homo sapiens*, human

Disease: osteosarcoma

Age: 13 years

Gender: female

Growth Properties: adherent

Isoenzymes:

G6PD, B

DNA Profile:

Amelogenin: X

CSF1PO: 12

D13S317: 12

D16S539: 10,13

D5S818: 13

D7S820: 11,12

TH01: 6

TPOX: 8,11

vWA: 18



SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.



Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.



Handling Procedure for Frozen Cells

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

SAFETY PRECAUTION: ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 ml complete culture medium, and spin at approximately 125 xg for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio), and dispense into a 25 cm² or a 75 cm² culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.



Handling Procedure for Flask Cultures

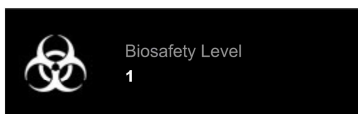
Handling Procedure for Flask Cultures



Product Sheet

MNNG/HOS Cl #5 [R-1059-D] (ATCC® CRL-1547™)

Please read this FIRST



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: MNNG/HOS Cl #5 [R-1059-D] (ATCC® CRL-1547™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
2. **If the cells are still attached**, aseptically remove all but 5 to 10 ml of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
3. **If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 xg for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 ml of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



Subculturing Procedure

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:4 is recommended

Medium Renewal: 2 to 3 times per week

Remove medium, rinse with fresh 0.25% trypsin solution, remove trypsin and let the culture sit at room temperature for 5 to 10 minutes. Add fresh medium, aspirate and dispense into new flasks. Subculture every 2 to 5 days.



Cryopreservation Medium

Cryoprotectant Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO.

Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.



Comments

This line was derived from HOS (ATCC CRL-1543) by transformation with 0.01 mcg/ml MNNG (a carcinogenic nitrosamine). The cells exhibit a high saturation density, a high plating efficiency in soft agar and are tumorigenic in nude mice.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

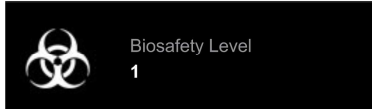
This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from



Product Sheet

MNNG/HOS CI #5 [R-1059-D] (ATCC® CRL-1547™)

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: MNNG/HOS CI #5 [R-1059-D] (ATCC® CRL-1547™)

the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [01/28]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Anexo 1 - Dados individuais de evolução de peso por animal

Animais		Dia																														
Identificação	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1	26,00	Oito																														
Cidra Grmiana	2	28,00	27,00	28,00	28,00	27,30	28,00	28,00	29,00	28,00	28,00	29,00	28,00	29,00	28,00	28,00	28,00	29,00	29,00	28,40	29,10	28,20	28,50	29,10	29,10	30,00	30,00	30,10	29,30	27,50	27,80	
Cidra Grmiana	3	28,00	27,00	28,00	28,00	27,30	28,00	28,00	29,00	28,00	28,00	29,00	28,00	29,00	28,00	28,00	28,00	29,00	29,00	28,40	29,10	28,20	28,50	29,10	29,10	30,00	30,00	30,10	29,30	27,50	27,80	
Cidra Grmiana	4	28,00	27,00	28,00	28,00	27,30	28,00	28,00	29,00	28,00	28,00	29,00	28,00	29,00	28,00	28,00	28,00	29,00	29,00	28,40	29,10	28,20	28,50	29,10	29,10	30,00	30,00	30,10	29,30	27,50	27,80	
Cidra Grmiana	5	25,00	24,00	27,00	27,00	25,30	26,00	26,00	25,00	26,00	26,00	27,00	26,00	26,00	25,00	25,00	26,00	26,00	27,00	27,20	26,30	26,80	26,30	26,70	26,90	27,60	27,60	27,60	27,10	26,10	26,70	
Cidra Grmiana	6	24,00	27,00	28,00	27,00	21,50	28,00	29,00	29,00	29,00	29,00	29,00	28,00	29,00	30,00	31,00	30,80	29,80	29,70	29,50	30,00	30,70	29,90	29,30	29,60	29,50	29,00	29,00	29,30	30,60	29,40	29,70
Cidra Grmiana	7	27,00	26,00	27,00	27,00	28,00	29,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	27,70	28,10	27,30	28,00	28,70	28,40	28,60	28,50	28,60	28,50	29,00	29,70	29,20	27,80	27,10	
Cidra Grmiana	8	27,00	25,00	26,00	27,00	26,00	27,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	27,90	27,50	28,60	27,60	27,60	28,00	28,60	29,30	28,60	29,30	28,00	27,70	28,00	27,70	28,10	26,60	24,60
Cidra Grmiana	9	26,00	28,00	26,00	27,00	26,00	26,00	27,00	26,70	27,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	28,00	27,00	27,00	27,00	27,40	27,70	27,20	27,50	27,70	27,60	27,60	27,50	27,50	26,50	26,70		
Coluna Vermelha	10	28,00	28,00	26,00	27,00	27,00	26,00	26,00	26,90	28,00	28,00	29,00	28,00	28,00	28,00	26,00	26,00	25,00	24,00	24,80	23,80	23,20	22,50	22,50	22,00	21,90	21,90	21,80	21,30	22,10	22,00	
Coluna Vermelha	11	28,00	28,00	26,00	27,00	27,00	26,00	26,00	26,90	28,00	28,00	29,00	28,00	28,00	28,00	26,00	26,00	25,00	24,00	24,80	23,80	23,20	22,50	22,50	22,00	21,90	21,90	21,80	21,30	22,10	22,00	
Coluna Vermelha	12	28,00	27,00	26,00	27,00	27,10	27,00	28,00	27,00	26,50	27,00	28,00	28,00	27,00	27,00	26,00	26,00	28,00	27,00	28,20	27,80	28,10	27,70	27,30	28,10	27,60	27,40	27,00	26,00	25,20	24,80	25,60
Coluna Vermelha	13	26,00	25,00	23,00	27,00	26,10	26,00	28,00	27,00	26,10	27,00	27,00	27,00	26,00	27,00	25,00	25,00	27,00	26,00	28,10	26,90	28,10	27,70	27,30	28,10	27,60	27,40	27,00	26,00	25,20	24,80	25,60
Coluna Vermelha	14	28,00	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00	28,00	28,00	24,00	27,00	27,00	27,00	28,00	28,00	28,30	27,70	28,50	28,20	28,00	28,50	29,30	29,50	29,50	29,70	29,10	29,00	28,90	29,90	29,30	29,20	
Coluna Vermelha	15	23,00	22,00	22,00	22,00	21,90	22,00	23,00	23,00	22,00	22,00	22,00	22,00	23,00	23,00	24,20	24,30	24,90	24,50	25,00	25,10	25,30	25,60	25,70	25,90	25,20	25,30	25,00	25,80	25,30	25,70	
Coluna Vermelha	16	22,00	20,00	21,00	22,00	21,00	24,00	23,00	23,80	23,30	24,10	24,30	24,30	25,00	25,20	25,10	25,00	24,20	24,30	25,00	25,60	26,20	25,10	25,60	25,10	25,90	25,10	25,00	25,20	25,50	25,50	26,00
Coluna Vermelha	17	23,00	24,00	24,00	25,00	25,00	26,00	26,00	26,40	26,30	28,10	27,10	27,00	27,30	27,70	27,70	27,40	27,10	26,60	26,50	27,00	27,90	29,10	26,90	27,30	27,50	27,00	28,00	27,70	29,00	28,00	

Actividad	Identificador	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
Cabeca Crustacea	1																																	
Cabeca Crustacea	2																																	
Cabeca Crustacea	3	100,00	11,50	0,00	0,00	0,00	0,50	1,00	40,00	62,50	100,00	144,00	169,00	220,50	245,00	352,00	298,08	281,75	399,38	348,00	486,00	486,00	886,00	596,75	576,50	576,50	576,50	526,50	562,19	700,00	856,88	882,00	960,00	
Cabeca Crustacea	4	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	75,00	75,00	100,00	176,00	144,00	277,78	280,00	320,00	384,00	480,00	400,00	675,00	675,00	675,00	675,00	967,50	700,00	700,00	897,00	1157,00	1568,00	2048,00	2176,00	2176,00	2416,50	2601,00	
Cabeca Crustacea	5	6,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	4,00	38,00	18,00	31,00	40,00	33,00	32,00	36,00	30,63	45,56	50,63	75,00	87,50	90,75	90,75	108,00	108,00	108,00	108,00	136,00	136,00	196,00	196,00	256,00
Cabeca Crustacea	6	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Cabeca Crustacea	7	11,50	5,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	8,00	87,50	525,00	500,00	420,60	437,63	484,69	405,00	460,00	591,00	550,00	726,00	786,50	726,00	716,50	786,50	786,50	864,50	864,50	864,00	786,50	786,50	1008,00	1044,00	
Cabeca Crustacea	8	6,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	6,00	176,00	405,00	475,25	485,50	487,00	485,50	486,38	541,50	600,00	661,50	756,25	867,00	877,00	911,88	1080,00	1080,00	1080,00	1080,00	1080,00	1080,00	1750,00	1870,00	1816,50	
Cabeca Vertebral	9	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	6,00	6,00	11,50	11,50	62,50	62,50	75,00	117,00	147,88	171,50		
Cabeca Vertebral	10	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00		
Cabeca Vertebral	11	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	112,50	216,00	216,00	416,00	416,00	416,00	448,00	500,00	786,50	1080,00	1080,00	1152,00	1250,00	1352,00		
Cabeca Vertebral	12	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,11	0,50	2,25	6,00	18,00	75,00	87,50	105,38	105,38	144,00	161,00	169,00	196,00	196,00	862,00	520,00	600,00	800,00	800,00	1267,50	1267,50	1267,50	1552,00	1816,50	1816,50		
Cabeca Vertebral	13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
Cabeca Vertebral	14	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,50	15,75	32,00	32,00	18,00	42,50	108,00	117,00	137,31	869,00	869,00	186,00	196,00	238,00	238,00	280,00	320,00	600,00	726,00	916,00	
Cabeca Vertebral	15	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	4,00	4,00	32,00	40,00	40,00	62,50	76,00	76,00	196,00	171,50	238,50	245,00	352,00	378,00	378,00		
Cabeca Vertebral	16	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,50	0,00	0,00	0,50	0,50	4,00	4,00	87,50	196,00	405,00	800,00	808,50	808,50		
Cabeca Vertebral	17	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	1,00	4,00	4,00	4,00	6,00	6,00	6,00	15,34	24,62	24,50	24,50	40,00	40,00	

Anexo IV - Tabela com tempo de óbito para cada animal

Animais	Identificação	Morreu	Data do óbito
Calota	1	Sim	1
Calota	2	Sim	1
Calota	3	Não	33
Calota	4	Não	33
Calota	5	Não	43
Calota	6	Não	38
Calota	7	Não	38
Calota	8	Não	36
Vértebra	9	Não	42
Vértebra	10	Não	42
Vértebra	11	Não	31
Vértebra	12	Não	31
Vértebra	13	Não	42
Vértebra	14	Não	35
Vértebra	15	Não	35
Vértebra	16	Não	30
Vértebra	17	Não	32



Declaration

To whom it may concern this is to certify that Guilherme Chohfi de Miguel, from University of São Francisco – Brazil spent three months from 1st March to 4th of June 2013, on Biophysics Unit, Faculty of Medicine in University of Coimbra.

During this period he performed investigation on the topic "Development of orthotopic models of osteosarcoma in skullcap and vertebra using athymic mice". To develop his work Guilherme contacted with different techniques related with cell biology and molecular imaging using Nuclear Medicine in which he became autonomous. Besides that Guilherme also studied new approaches to osteosarcoma treatment through Photodynamic Therapy. For that, after orthotopic animal model development Guilherme used new photosensitizer molecules synthetised by Biophysics Unit Research Group, in the skullcap and vertebra orthotopic models were tested with success.

During this time he distinguished himself as a person who exhibits an organized, scientific approach to research, and with a high degree of motivation, innovation and initiative. Besides her exceptional professional performance, Guilherme is a very pleasant person to communicate with.

University of Coimbra, 4th June, 2013

Maria Filomena Botelho, MD, PhD
(Director of Biophysics Unit, FMUC)

ANEXO VI- Comitê de ética em Pesquisa da Universidade São Francisco

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 30 de Maio de 2012.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO/APOPTÓTICO DE NOVOS DERIVADOS DE FLAVONÓIDES: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO.

ÁREA DE CONHECIMENTO: Saúde e Biológicas

Autor(es): Profa. Dra. Denise Gonçalves Priolli; Profa.Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.05.12

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária dia **30/05/2012** a **pendência** do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Carlos Augusto Real Martinez
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arç CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

ANEXO VII- Carta de aceite do trabalho no Congresso Europeu de Câncer 2013

ABSTRACT - ECC2013 - POSTER SESSION

14 de jun
Sapna.seth@ecco-org.eu

Dear Mr. Chohfi de Miguel,

We are pleased to inform you that your abstract, "A novel model of skull osteosarcoma in athymic mice", has been selected as a Poster in a Poster Session.

Poster Session

- Your poster will be part of the Poster Session on "Sarcoma: Soft Tissue and Bone" which is scheduled on Monday, September 30, 2013 from 09:30 to 12:00 o'clock.
The timing of your poster session, mentioned above, determines when you put up or remove your poster.
- Your poster will be displayed for 2,5 hours and can be put up, in Hall 4.
- Morning Poster Session (09h30 - 12h00): Posters should be put up as of 07h30 am and removed by 12h30 pm.
- Afternoon Poster Session (14h00 - 16h30): Posters should be put up as of 13h00 pm and removed by 17h00 pm.

Poster Dimensions

- Format: Landscape
 - Dimensions: 190cm width x 135cm height
- Please ensure your poster complies with the aforementioned format and maximum dimensions. Materials to fix the poster on the poster board will be available onsite.

Poster Number

- The new number of your abstract, as per the programme and abstract book (on USB), is 3.809. Your poster must be put up on poster board number: P510.

Abstracts Online

The European CanCer Organisation (ECCO) intends to publish selected abstracts online, for general viewing on its website (www.ecco-org.eu), 2 weeks before the 2013 European Multidisciplinary Cancer Congress. We kindly request your permission and thank you in advance for returning the attached consent form signed, to Simona.Androni@ecco-org.eu.

Note: If we do not receive your response before 30 August 2013, your abstract will be automatically published online.

Posters on USB & Online Viewing

A USB as well as online viewing possibilities, for all the posters presented at the European Cancer Congress 2013, will be arranged. This provides an exceptional opportunity to disseminate data presented in posters during the congress.

Elsevier has been appointed to produce the poster USB and online poster viewing tool. In July 2013, Elsevier will contact you regarding technical information on how to submit your poster for the USB and online viewing tool.

Elsevier also offers you the possibility, at your own expense, of printing and delivering your poster for collection on site in Amsterdam.

Registration

Acceptance of your abstract does not provide free registration to the congress. Please register at your earliest convenience prior to the regular deadline of 6 August 2013 at

<http://eccamsterdam2013.ecco-org.eu/Registration.aspx>

Should you be unable to attend the European Cancer Congress 2013 in Amsterdam, please arrange for one of the co-authors of your abstract to give the presentation. Please notify the European Cancer Congress secretariat (pat.vanhove@ecco-org.eu), as early as possible, of your replacement.

Travel & Accommodation

Please note that it is imperative to arrange your travel and accommodation in Amsterdam as soon as possible as flights and hotel rooms are being booked up for the European Cancer Congress 2013. More information can be found at www.ecco-org.eu.

Congratulations on the acceptance of your abstract and we look forward to meeting you in Amsterdam!

Yours sincerely,

Professor John Yarnold
Scientific Co-Chair

Professor Cora N. Sternberg
Scientific Co-Chair