

Ministério da Saúde  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SAIS MESOIÔNICOS NO  
OSTEOSSARCOMA: ESTUDO *IN VITRO*

Luma Duarte Barbosa

Rio de Janeiro  
2018

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SAIS MESOIÔNICOS NO  
OSTEOSSARCOMA: ESTUDO *IN VITRO*

Luma Duarte Barbosa

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

Orientador (es): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Amanda dos Santos Cavalcanti  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Carolina Leal

Rio de Janeiro  
Fevereiro  
2018

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SAIS MESOIÔNICOS NO OSTEOSSARCOMA: ESTUDO *IN VITRO*

Luma Duarte Barbosa

Amanda dos Santos Cavalcanti e Ana Carolina Leal

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

Banca examinadora:

Dra. Andressa Esteves de Souza dos Santos (UFRRJ)

Dra. Rafaela Sartore da Costa Gomes (INTO)

Dra. Jamila Alessandra Perini Machado (INTO)

Dra. Aurea Echevarria (UFRRJ - suplente)

Dra. Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa (suplente)

Rio de Janeiro  
Fevereiro  
2018

Dedico esta dissertação as pessoas mais importantes da minha vida. Meus pais e meu irmão que sempre me apoiaram e tornaram meus sonhos realidade me dando todo suporte para os estudos. Meu marido pela compreensão de toda ausência e companheirismo durante esse tempo de longos estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Centro de Oncologia Ortopédica do INTO por todos os ensinamentos em tumores ósseos e pelos dois maravilhosos anos de convivência durante a minha especialização. Ao Dr. Walter Meohas por ter me acolhido em seu serviço e ter me instruído grandes experiências em Oncologia Ortopédica. Agradeço a minha orientadora Dra. Amanda Cavalcanti, pessoa espetacular, com uma paciência incrível, que esteve junto comigo em todas as etapas dessa longa jornada, me ensinando cada detalhe sobre pesquisa e persistindo nesse desafio. Também agradeço a Dra. Ana Carolina Leal pela dedicação e por passar seu conhecimento em citometria de fluxo. Por fim, a Dra. Aurea Echevarria por permitir o desenvolvimento desse estudo através da disponibilização dos sais mesoiônicos sintetizados por seu grupo de pesquisa.

## RESUMO

---

BARBOSA, Luma Duarte. Avaliação da atividade antitumoral de Sais Mesoionicos no Osteossarcoma: Estudo *In Vitro*. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2018.

O osteossarcoma é o tumor primário maligno mais comum do osso e acomete principalmente crianças e adolescentes. Cerca de 30 – 40% dos casos evoluem com metástases, o que diminui consideravelmente a sobrevida dos pacientes. O tratamento consiste em quimioterapia associada à cirurgia, porém, há poucas opções de medicamentos e os disponíveis provocam efeitos adversos. Além disso, determinou-se que 46,9% dos pacientes apresentam má resposta à quimioterapia pré-operatória. A identificação de novos compostos com aplicação terapêutica no osteossarcoma é fundamental para aumentar as possibilidades de tratamento dessa doença. Os sais mesoiônicos pertencem a uma classe de compostos heterocíclicos que possuem estruturas químicas que favorecem a interação com biomoléculas. A atividade antitumoral desses sais já foi verificada em diferentes tumores como hepatocarcinoma, melanoma e carcinossarcoma. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antitumoral de sais mesoiônicos em células de osteossarcoma. Mediante o ensaio de redução de MTT, foi verificado que os sais MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> reduziram a viabilidade relativa das células da linhagem de osteossarcoma MG-63, enquanto os sais MI-3,4-F e MI-F não foram capazes de reduzir a viabilidade das células após tratamento por 24 e 48 horas. Através da contagem das células com azul de tripan, foi verificado que o tratamento com os sais MIC-NO<sub>2</sub> e MIC-F por 24 e 48 horas reduziu a viabilidade das células MG-63, sendo, portanto, citotóxicos. Por último, a análise de anexina-V e iodeto de propídeo por citometria de fluxo revelou que o tratamento com MIC-NO<sub>2</sub> e MIC-F induziu morte celular por apoptose. Assim, dentre os quatro sais mesoiônicos avaliados neste estudo, apenas MIC-NO<sub>2</sub> e MIC-F apresentaram efeitos citotóxicos em células de osteossarcoma MG-63 e, por isso, podem ser potenciais candidatos para o desenvolvimento de fármacos direcionados para o tratamento desta doença.

**Palavras-chave:** Osteossarcoma, Mesoionicos, Quimioterapia, Estudo pré-clínico.

## ABSTRACT

---

BARBOSA, Luma Duarte. Evaluation of Mesoionic Salts antitumor activity in Osteosarcoma: *In Vitro* Study. Rio de Janeiro, 2018. Master Thesis. (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2018.

Osteosarcoma is the most common primary bone malignancy of childhood and adolescence. About 30 - 40 % of the cases develop with metastases, which considerably decreases the survival of patients. The current treatment includes cycles of preoperative chemotherapy followed by surgical resection and additional cycles of postoperative chemotherapy, but there are few options of chemotherapeutic agents and the available ones cause side effects. In addition, it was determined that 46.9% of patients present a poor response to preoperative chemotherapy. The identification of new compounds with promising application in osteosarcoma is relevant to the treatment of this disease. The mesoionic salts belong to a class of heterocyclic compounds with chemical structures that favor the interaction with biomolecules. The antitumor activity of these salts has already been verified in different tumors such as hepatocarcinoma, melanoma, and carcinosarcoma. The present study aimed to evaluate the antitumor effect of mesoionic salts in osteosarcoma cells. By the MTT reduction assay, it was found that the MIC-F and MIC-NO<sub>2</sub> salts reduced the relative viability of the MG-63 osteosarcoma cells, while the MI-3,4-F and MI-F salts were not able to reduce the cell viability after treatment for 24 and 48 hours. By counting cells with trypan blue, it was found that treatment with the MIC-NO<sub>2</sub> and MIC-F salts, for 24 and 48 hours, reduced the viability of MG-63 cells and were therefore cytotoxic. Finally, the analysis of annexin-V and propidium iodide by flow cytometry revealed that the treatment with MIC-NO<sub>2</sub> and MIC-F induced cell death by apoptosis. Thus, among the four mesoionic salts evaluated in this study, only MIC-NO<sub>2</sub> and MIC-F had cytotoxic effects on MG-63 osteosarcoma cells and, therefore, may be potential candidates for the development of drugs targeted to the treatment of this disease.

**Keywords:** Osteosarcoma, Mesoionic, Chemotherapy, Preclinical research

## SUMÁRIO

---

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMO.....                                                                                            | VI        |
| ABSTRACT.....                                                                                          | VII       |
| SUMÁRIO .....                                                                                          | VIII      |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....                                                                    | X         |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                                  | XI        |
| LISTA DE QUADROS E TABELAS .....                                                                       | XII       |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                              | <b>13</b> |
| <b>1.1 Osteossarcoma .....</b>                                                                         | <b>13</b> |
| <b>1.2 Investigação diagnóstica do osteossarcoma.....</b>                                              | <b>15</b> |
| 1.2.1 Apresentação clínica .....                                                                       | 15        |
| 1.2.2 Exames complementares .....                                                                      | 16        |
| 1.2.3 Avaliação histológica.....                                                                       | 20        |
| <b>1.3 Tratamento do osteossarcoma.....</b>                                                            | <b>22</b> |
| 1.3.1 Tratamento cirúrgico.....                                                                        | 23        |
| 1.3.2 Tratamento quimioterápico .....                                                                  | 23        |
| 1.3.2.1 Aspectos históricos .....                                                                      | 24        |
| 1.3.2.2 Mecanismo de ação dos quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do osteossarcoma..... | 26        |
| <b>1.4 Compostos mesoiônicos .....</b>                                                                 | <b>29</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                                                | <b>33</b> |
| <b>2.1 Objetivo Principal .....</b>                                                                    | <b>33</b> |
| <b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>                                                                 | <b>33</b> |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                      | <b>34</b> |
| <b>3.1 Sais mesoiônicos .....</b>                                                                      | <b>34</b> |
| <b>3.2 Cultura das células .....</b>                                                                   | <b>35</b> |
| <b>3.3 Tratamento <i>in vitro</i> com os sais mesoiônicos.....</b>                                     | <b>36</b> |

|     |                                                                            |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4 | Ensaio de viabilidade celular por MTT .....                                | 36 |
| 3.5 | Ensaio de citotoxicidade.....                                              | 37 |
| 3.6 | Citometria de fluxo.....                                                   | 37 |
| 3.7 | Análise estatística .....                                                  | 38 |
| 4   | RESULTADOS.....                                                            | 40 |
| 4.1 | Efeito dos sais mesoiônicos na viabilidade celular .....                   | 40 |
| 4.2 | Citotoxicidade dos sais mesoiônicos sobre as células de osteossarcoma..... | 43 |
| 4.3 | Indução da morte celular por apoptose .....                                | 44 |
| 5   | DISCUSSÃO.....                                                             | 47 |
| 6   | CONCLUSÕES .....                                                           | 54 |
| 7   | REFERÊNCIAS .....                                                          | 55 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

|                     |                                                                                                             |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CIS                 | Cisplatina                                                                                                  |
| DMEM-F12            | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12</i> (Meio Dubelcco Modificado com nutriente F-12) |
| DMSO                | Dimetilsulfóxido                                                                                            |
| DOX                 | Doxorrubicina                                                                                               |
| EDTA                | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)                                |
| FA                  | Fosfatase alcalina                                                                                          |
| FITC                | <i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de Fluoresceína)                                           |
| IC <sub>50</sub>    | Concentrações mínimas capazes de inibir a funcionalidade de 50% das células                                 |
| INTO                | Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia                                                             |
| MAP                 | Metotrexato, Adriamicina e Cisplatina                                                                       |
| MTT                 | 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl) -2,5- Brometo de Difeniltetrazolium                                              |
| MTX                 | Metotrexato                                                                                                 |
| PBS                 | <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Salina Fosfato)                                                    |
| PI                  | <i>Propidium Iodide</i> (Iodeto de Propídio)                                                                |
| RM                  | Ressonância Magnética                                                                                       |
| SFB                 | Soro Fetal Bovino                                                                                           |
| TC                  | Tomografia computadorizada                                                                                  |
| MIC-NO <sub>2</sub> | Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina                                     |
| MIC-F               | Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina                                     |
| MI – 4F             | Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina                                        |
| MI – 3,4-F          | Cloreto de 4-fenil-5-(3'4'-diflúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina                                    |

## LISTA DE FIGURAS

---

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1-1 Epidemiologia do osteossarcoma clássico central.....                                                                                                  | 15 |
| Figura 1-2 Aspectos clínicos do osteossarcoma. ....                                                                                                              | 16 |
| Figura 1-3 Características radiológicas do osteossarcoma: aparência em raios de sol e levantamento do periósteo com formação do triângulo de Codman (setas)..... | 17 |
| Figura 1-4 Tomografia computadorizada da região do joelho em antero-posterior (A) e perfil (B) evidenciando ossificação e calcificação do osteossarcoma.....     | 18 |
| Figura 1-5 Tomografia computadorizada de tórax de paciente com osteossarcoma. ....                                                                               | 19 |
| Figura 1-6 Aspecto microscópico do osteossarcoma evidenciando pela matriz osteóide (*) e atipia celular.....                                                     | 21 |
| Figura 1-7 Mecanismo de ação dos quimioterápicos mais comumente utilizados no tratamento do osteossarcoma.....                                                   | 29 |
| Figura 1-8 Estrutura química básica dos compostos mesoiônicos.. ....                                                                                             | 30 |
| Figura 3-1. Estrutura química dos sais mesoiônicos utilizados no estudo. Núcleo mesoiônico identificado por um quadrado azul. ....                               | 35 |
| Figura 4-1 Efeito dos sais mesoiônicos na viabilidade de células de osteossarcoma após 24 horas de incubação. ....                                               | 41 |
| Figura 4-2 Efeito dos sais mesoiônicos na viabilidade de células de osteossarcoma após 48 horas de incubação. ....                                               | 42 |
| Figura 4-3 Citotoxicidade dos sais MIC-F e MIC-NO <sub>2</sub> sobre as células de osteossarcoma. ....                                                           | 44 |
| Figura 4-4 Avaliação da indução de apoptose por citometria de fluxo. ....                                                                                        | 45 |
| Figura 4-5 Percentual de células MG-63 tratadas com as concentrações de 1 e 5 µM dos sais MIC-F e MIC-NO <sub>2</sub> .....                                      | 46 |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

---

|                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 4-1 Concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) dos sais mesoiônicos sobre a linhagem celular de osteossarcoma MG-63. ....</b> | <b>43</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Osteossarcoma

As neoplasias em pacientes abaixo de 19 anos são consideradas raras quando comparadas às dos adultos, correspondendo entre 2% e 3% de todos os tumores malignos. Apesar disso, são a segunda causa de morte nesta faixa etária (INCA, 2008). Os tumores ósseos malignos representam, em todo o mundo, 5% dos cânceres que ocorrem na infância e na adolescência (0 a 19 anos) (PARKIN; STILLER; NECTOUX, 1993). Nesta faixa etária a incidência global é de 8,7 casos por um milhão de pessoas, o que corresponde entre 650 a 700 novos casos de câncer ósseo ao ano (MIRABELLO; TROISI; SAVAGE, 2009a).

Dentre os tumores ósseos, o osteossarcoma é o mais comum, representando 55% dos tumores ósseos malignos em crianças e adolescentes (DAMRON; WARD; STEWART, 2007; MIRABELLO; TROISI; SAVAGE, 2009b; BERGOVEC et al., 2015). O Grupo Brasileiro de Tratamento de Osteossarcoma, criado em 1980, se dedica a estudar as características dessa patologia na população brasileira e demonstrou que cerca de 350 novos casos de osteossarcoma são diagnosticados ao ano no país (PETRILLI et al., 2013).

O osteossarcoma é um tumor altamente metastático e estima-se que 20% dos pacientes apresentem metástase pulmonar no momento do diagnóstico e 30-40% dos pacientes com osteossarcoma localizado evoluirão com metástases dentro de 2-3 anos (PETRILLI et al., 2006; LUETKE, MEYERS et al., 2014). A presença de metástases diminuiu consideravelmente a sobrevida global, que está em torno de 12,5% no Brasil (PETRILLI et al., 2006) e de 25% nos Estados Unidos e Europa (BIELACK et al., 2002).

O osteossarcoma é caracterizado por instabilidade cromossômica, o que leva à presença de abundantes alterações genéticas (ALFRANCA et al., 2015). Na maioria dos casos, a etiologia permanece desconhecida (MUTSAERS e WALKLEY, 2014), mas acredita-

se que possa estar relacionada a mutações nas células progenitoras mesenquimais presentes no estroma da medula óssea (GIBBS et al., 2005; VISVADER; LINDEMAN, 2012; XIAO et al., 2013; MUTSAERS; WALKLEY, 2014).

Entretanto, a doença pode ser secundária, quando é induzida por elementos químicos, como, por exemplo, o Berílio; quando induzida pela exposição à radiação (FUCHS; PRITCHARD, 2002; ABARRATEGI et al., 2016) ou quando resulta de outras patologias. Um por cento dos pacientes com doença de Paget desenvolve osteossarcoma, sendo o esqueleto axial mais predominantemente acometido e, em especial, a pelve (GRUENER; CAMACHO, 2014). Pode também ser secundário ao infarto ósseo, uma osteonecrose na medula óssea, correspondendo a 1% das ocorrências (ENDO et al., 2013; STACY; LO; MONTAG, 2015). A neoplasia pode ainda estar associada a algumas síndromes, incluindo o retinoblastoma bilateral hereditário (FRIEND et al., 1986), a Síndrome de Li-Fraumeni (MAI et al., 2017), a Síndrome de Bloom (GERMAN, 1997) e a Síndrome de Rothmund Thomson (WANG et al., 2003). Portanto, o tumor é considerado primário quando o osso adjacente é normal e secundário quando o osso é alterado pelas condições acima citadas (WHO, 2013).

A distribuição por idade do osteossarcoma é bimodal, com um pico maior em adolescentes com idades entre 10-16 anos e outro menor em adultos (Figura 1-1 A). O gênero masculino é mais acometido que o feminino numa proporção de 1,5:1 (LONGHI et al., 2005; FRIEBELE et al., 2015;). Em 90% dos pacientes há o acometimento da metáfise dos ossos longos, em 9% a diáfise e em 1% a epífise (KUNDU, 2014). O maior acometimento da região metafisária está relacionado a placa de crescimento, onde ocorre rápida proliferação celular (WHO, 2013; DENDULURI et al., 2015;). Trinta por cento dos casos ocorrem no fêmur distal, 15% na tíbia proximal e 15% no úmero proximal e a menor parte dos casos ocorre no esqueleto axial (ALFRANCA et al., 2015) (Figura 1-1B). Uma apresentação rara é o osteossarcoma multicêntrico, que corresponde a 1,5% dos casos e é caracterizado por

múltiplas lesões no esqueleto que podem ser simultâneas ou sequenciais (CORRADI et al., 2011).

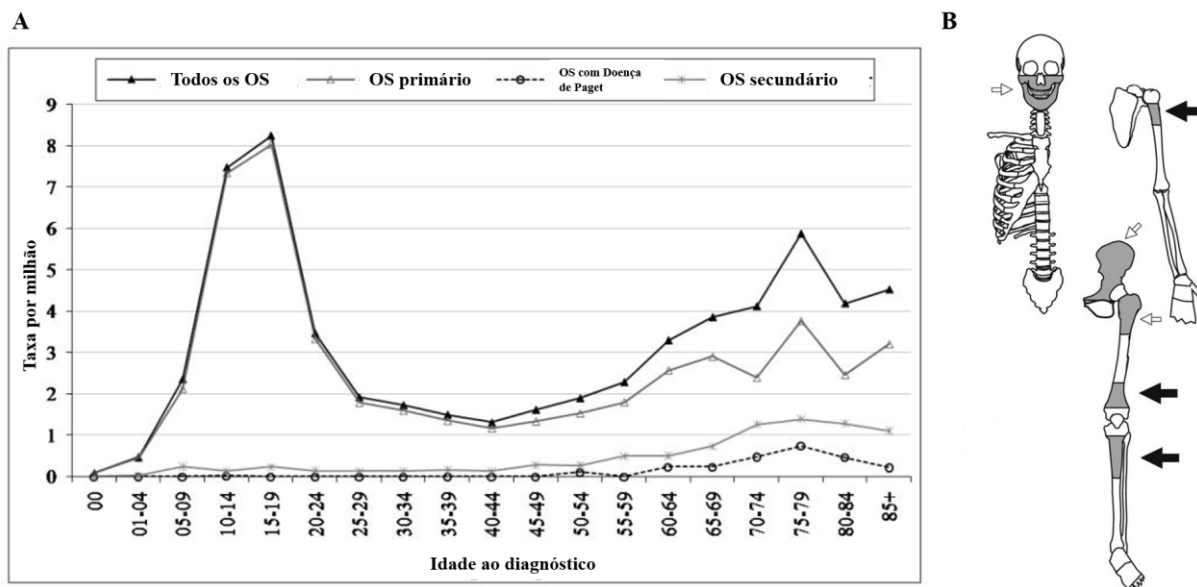


Figura 1-1 Epidemiologia do osteossarcoma clássico central. (A) Incidência por idade. Dados do *National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results program of United States* de 1973 a 2004 de um total de 3.482 casos. (B) Sítios anatômicos de ocorrência. Setas pretas indicam locais de maior incidência (fêmur distal, tíbia proximal e úmero proximal) e setas brancas indicam aqueles com menor incidência (fêmur proximal, pelve e ossos da face). OS – Osteossarcoma. Fonte : A- adaptada de MIRABELLO ; TROISI ; SAVAGE, (2009b); B - <https://basicmedicalkey.com/osteosarcoma-6/>

## 1.2 Investigação diagnóstica do osteossarcoma

### 1.2.1 Apresentação clínica

A maioria dos pacientes com osteossarcoma apresenta dor e edema local (Figura 1-2), que inicialmente são atribuídos a um trauma ou ao exercício físico intenso, motivando à procura por atendimento médico (SHIVES et al., 1986). Entretanto, não há relação entre o surgimento tumoral e o trauma ocorrido. A dor é constante, tende a piorar com o tempo e os pacientes geralmente apresentam sintomas durante três a quatro meses antes da primeira consulta. Com a evolução da doença e o aumento tumoral, os pacientes podem apresentar claudicação. Nos estágios iniciais, o tumor não pode ser palpado e nem detectado por

radiografia simples (TARAN; TARAN; MALIPATIL, 2017).



Figura 1-2 Aspectos clínicos do osteossarcoma. Volumosa massa tumoral em coxa esquerda evidenciando aumento de volume local com circulação colateral (vasodilatação). Fonte: Arquivo Pessoal.

O osso se torna frágil devido à presença do tumor (TARAN; TARAN; MALIPATIL, 2017) e cerca de 17% dos pacientes apresentam fraturas patológicas (SCULLY et al., 2002). A ocorrência de fraturas foi relacionada ao menor tempo de sobrevida livre de doença, ao aparecimento de recidiva (SCULLY et al., 2002) e ao pior desfecho funcional (HAYNES et al., 2017). Porém, outros estudos mostram que não há relação com prognóstico desfavorável (CHUNG et al., 2016; POUDEL et al., 2017) ou menor sobrevida (HAYNES et al., 2017). Assim, ainda não está esclarecida na literatura a relação entre a fratura patológica e o prognóstico do osteossarcoma.

#### 1.2.2 Exames complementares

Os exames de imagem e laboratoriais auxiliam a investigação diagnóstica do osteossarcoma. As características radiológicas são aparência em raios de sol, levantamento de

periósteo com formação de triângulo de Codman (Figura 1-3), formação de osso nos tecidos moles e padrão permeativo de destruição óssea (KUNDU, 2014).

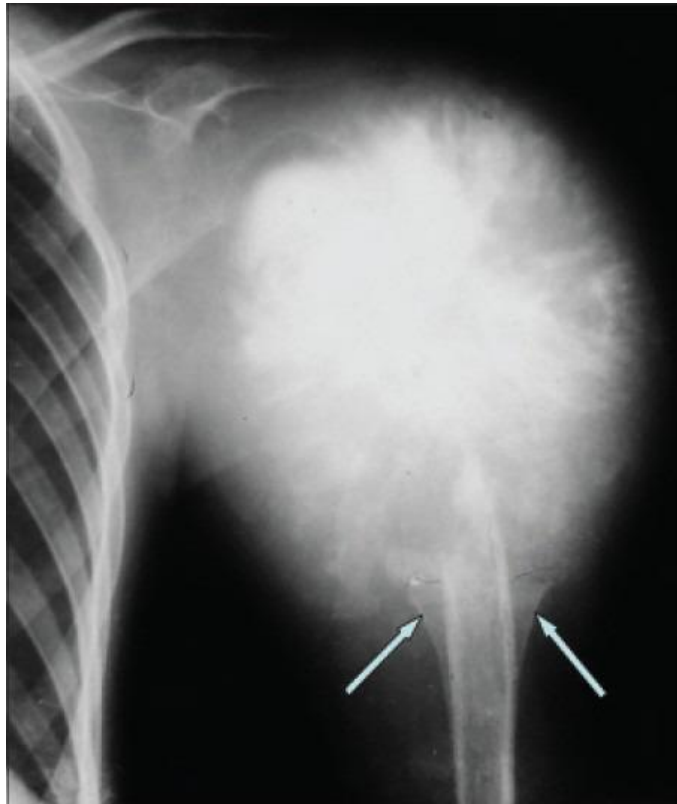


Figura 1-3 Características radiológicas do osteossarcoma: aparência em raios de sol e levantamento do periósteo com formação do triângulo de Codman (setas) (KUNDU, 2014).

A tomografia computadorizada (TC) retrata a anatomia óssea mais detalhadamente e capta com mais precisão a integridade cortical bem como a fratura patológica, sendo útil na avaliação de ossificação e calcificação (Figura 1-4), que indicam atividade tumoral (BROWN; KATTAPURAM; ROSENTHAL, 1986). Nos casos atípicos, como no osteossarcoma do fêmur proximal, a confirmação por TC é imperativa para o sucesso do diagnóstico (DAHAN et al., 2017).

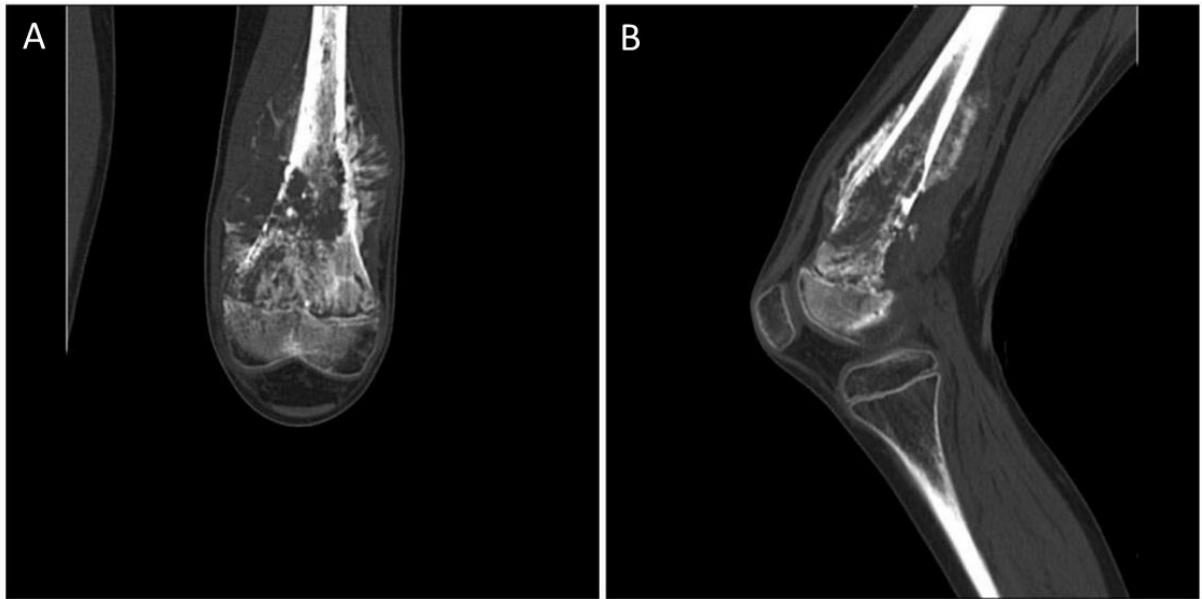


Figura 1-4 Tomografia computadorizada da região do joelho em antero-posterior (A) e perfil (B) evidenciando ossificação e calcificação do osteossarcoma. Fonte: arquivo de imagens do INTO

A TC do tórax (Figura 1-5) é o padrão ouro para detectar metástases pulmonares em paciente com osteossarcoma, apesar de não discriminar pequenos focos metastáticos de outras lesões benignas pequenas (BIELACK et al., 2016). Lesões maiores que 6mm sugerem metástase, entretanto há limitações, pois, alguns focos só são encontrados na toracotomia, uma cirurgia de abertura do tórax (CICCARESE et al., 2015). Mesmo assim, a estratégia de acompanhamento com TC do tórax, em comparação a radiografia simples, resulta em maior taxa de ressecção de nódulos metastáticos (88% vs 60%), aumento da taxa de sobrevida após recidiva (49% vs 30%) e de sobrevida global em cinco anos (60% vs 35%) (PAIOLI et al., 2017), já que a TC é o exame mais sensível para detecção de nódulos pulmonares. Apesar da maior sensibilidade da TC (VANEL et al., 1984; PASS et al., 1985), especificamente em pacientes pediátricos, há preocupação com exposição à intensa radiação, pois, embora raro, há risco potencial de induzir neoplasias (FAHEY; TREVES; ADELSTEIN, 2012) .

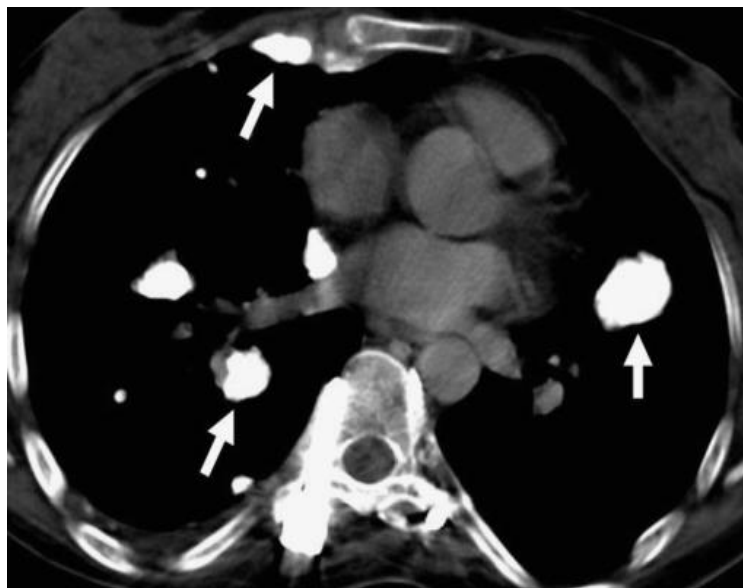


Figura 1-5 Tomografia computadorizada de tórax de paciente com osteossarcoma. Setas indicam os nódulos pulmonares metastáticos. Corte axial. (CEYLAN et al., 2010).

A ressonância magnética (RM) é a ferramenta mais precisa em determinar os limites do tumor dentro e fora do osso, assim como sua relação com os tecidos adjacentes, o que é essencial para cirurgia definitiva e segura. O exame inclui todo o osso envolvido e as articulações proximal e distal, de modo que possam ser visualizadas lesões salteadas e outros focos tumorais no mesmo osso, porém sem contiguidade com o tumor primário (RITTER; BIELACK, 2010). A RM por ponderação de difusão (*quantitative diffusion – weighted magnetic resonance imaging*) mostra-se útil na diferenciação entre áreas viáveis do osteossarcoma osteoblástico e fibroblástico e áreas necrosadas após o tratamento quimioterápico (KUBO et al., 2017; WANG et al., 2017), abrindo caminho para a avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico através do exame de imagem.

Em relação aos exames laboratoriais, o aumento dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FA) ocorre entre 31,5% e 66,3% dos pacientes, dependendo do estágio de evolução da doença. Apesar de ser um exame inespecífico para diagnóstico, ainda é utilizado para acompanhamento evolutivo da doença, uma vez que os valores séricos diminuem após o início da quimioterapia (ABARRATEGI et al., 2016). Um estudo retrospectivo, realizado em

2015 na Universidade de São Paulo analisou 137 casos de osteossarcoma e demonstrou que houve queda nos níveis de FA após a quimioterapia quando comparados com os níveis antes da quimioterapia. No entanto, não houve relação entre os valores dessas enzimas e os índices de necrose tecidual após a quimioterapia (ZUMARRAGA et al., 2016). Além disso, alguns estudos verificaram que a FA é fator prognóstico no osteossarcoma, e em altos níveis está associada à menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença (HAO et al., 2017; KIM et al., 2017). Ainda não foi esclarecido se o aumento deste marcador está relacionado com as células tumorais osteoblásticas ou com a formação óssea reativa em resposta à osteólise tumoral (KIM et al., 2017).

### 1.2.3 Avaliação histológica

O diagnóstico definitivo das neoplasias ósseas é confirmado através da avaliação histológica (ABARRATEGI et al., 2016; ZHANG; ROSENBERG, 2017). Microscopicamente, o osteossarcoma é caracterizado pela presença de células mesenquimais malignas que produzem tecido osteóide (Figura 1-6) (WHO, 2013).

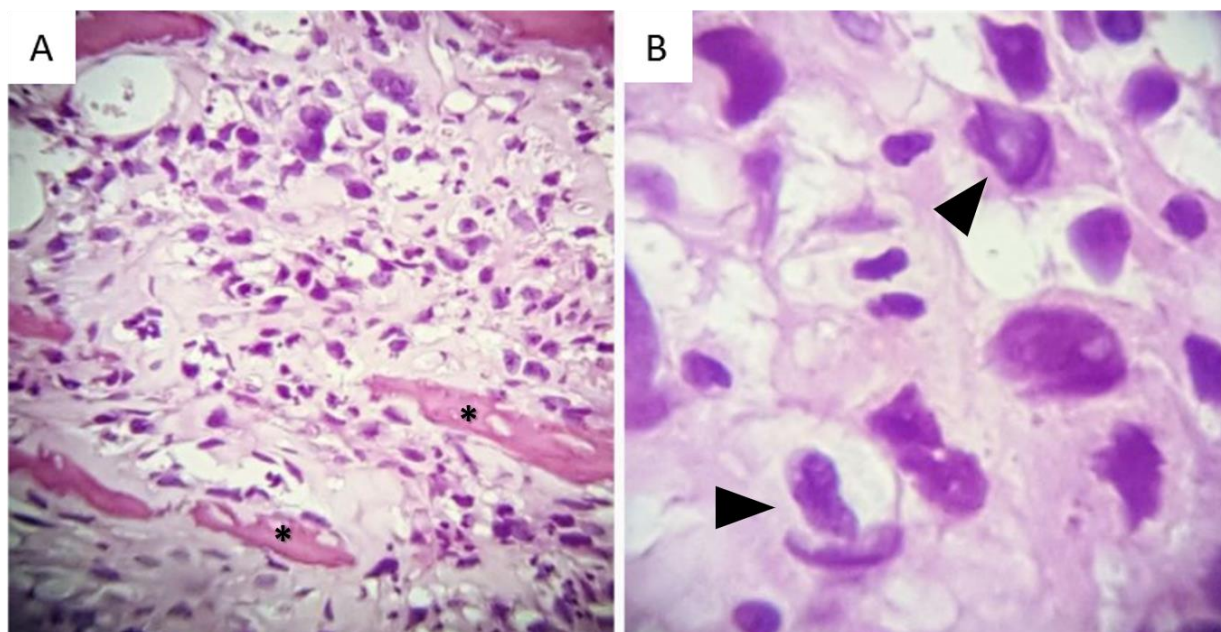


Figura 1-6 Aspecto microscópico do osteossarcoma evidenciando pela matriz osteóide (\*) e atipia celular. As setas indicam núcleos atípicos. Microscopia óptica. Aumento de 20x (A) e 40x (B). Coloração com hematoxilina e eosina. Imagem gentilmente cedida pela Dra. Anabela Caruso da Unidade de Anatomia Patológica do INTO.

A classificação em subtipos histológicos se baseia na morfologia celular e, como auxílio ao diagnóstico, esses subtipos podem também ter relação com a localização anatômica e com a apresentação radiográfica. Nos tumores de alto grau, o subtipo histológico mais comum, o OS osteoblástico, comumente ocorre nas extremidades do esqueleto, enquanto o subtipo condroblástico ocorre com maior frequência na cabeça, pescoço e no tronco (DURNALI et al.,2013).

De acordo com sua apresentação histológica os osteossarcomas podem ser agrupados em tumores de alto ou baixo grau. Os de alto grau são caracterizados por maior celularidade, atipia nuclear, altas taxas de mitoses e células pouco diferenciadas. São considerados de pior prognóstico, pois há relação com maior ocorrência de metástases (KUNDU, 2014). Dentre esses, há o osteossarcoma convencional que ainda pode ser subdividido em osteoblástico, fibroblástico e condroblástico, o osteossarcoma superficial de alto grau, o de pequenas células

e o telangectásico. Já os osteossarcomas de baixo grau são bem diferenciados, apresentam baixa taxa de mitose e pouca atipia nuclear. Dentre eles estão o osteossarcoma central de baixo grau, parosteal e periosteal (WHO, 2013; DURFEE et al., 2016; LINDSEY et al., 2017). Essa classificação é importante para a definição do tratamento, uma vez que nos tumores de baixo grau histológico não há resposta à quimioterapia, enquanto nos de alto grau o efeito da quimioterapia é evidenciado através da necrose tecidual no tumor ressecado cirurgicamente (WHO, 2013).

### **1.3 Tratamento do osteossarcoma**

A abordagem terapêutica se baseia no diagnóstico histológico, no estadiamento clínico, na idade e nas condições gerais do paciente. Atualmente o tratamento padrão consiste na realização de quimioterapia nos períodos pré e pós-operatórios definidos, respectivamente, como neoadjuvante e adjuvante, associados à cirurgia de ressecção (ANDO et al., 2013). O osteossarcoma é considerado um tumor radio resistente e, assim, a experiência com radioterapia no tratamento local é limitada e frequentemente não é utilizada como primeira escolha (SCHWARZ et al., 2009). Estudos sugerem que a radioterapia pode ser paliativa (para controle dos sintomas) para pacientes tratados com quimioterapia e para aqueles com tumores irresssecáveis ou ainda inacessíveis, como por exemplo, tumores na pelve ou coluna vertebral; ou ainda naqueles pacientes que tenham focos tumorais residuais microscópicos após ressecção com pouca margem cirúrgica (DELANEY et al., 2005; RITTER; BIELACK, 2010).

### 1.3.1 Tratamento cirúrgico

A cirurgia é indispensável no tratamento do osteossarcoma e seu objetivo é a remoção completa do tumor com ampla margem de tecido normal (margem cirúrgica), a fim de evitar a recorrência local e melhorar a sobrevida global (ANDO et al., 2013). Quando as margens cirúrgicas adequadas não podem ser acessadas, a amputação deve ser considerada, pois a recidiva local está associada com o comprometimento das margens excisadas (GRIMER, 2005).

A escolha do procedimento cirúrgico depende do tipo e grau histológicos, topografia, resposta à quimioterapia neoadjuvante, resultado funcional e preferência dos pacientes (MARINA et al., 2004; MARULANDA et al., 2008). A cirurgia consiste em amputação do membro ou ressecção ampla que é seguida de reconstrução biológica ou colocação de endoprótese. As técnicas de preservação dos membros evoluíram muito nos últimos anos e a reconstrução biológica do membro pode ser realizada com aloenxerto, auto-enxerto ou pela técnica de rotação do membro (GRIMER, 2005).

Apesar das avançadas técnicas cirúrgicas, a taxa de recorrência local em pacientes com osteossarcoma não metastático é de 46% (BACCI et al., 2006). Os procedimentos cirúrgicos devem ser realizados em conjunto com a quimioterapia convencional, tanto para o controle local do tumor como para o controle da doença sistêmica (BRULAND et al., 2005).

### 1.3.2 Tratamento quimioterápico

Atualmente os pacientes diagnosticados com osteossarcoma de alto grau recebem quimioterapia neoadjuvante intravenosa, que consiste na combinação de cisplatina (CIS), adriamicina ou doxorubicina (DOX) e metotrexato (MTX) (BOTTER et al., 2014; FERRARI e SERRA, 2015). No Brasil, o protocolo quimioterápico consiste em administração da

quimioterapia MAP (Metotrexato, Adriamicina e Cisplatina) de 1 a 10 semanas, seguida pela cirurgia na 11<sup>a</sup> ou 12<sup>a</sup> semana. Frequentemente são 2 ciclos de 5 semanas com administração de DOX e CIS nas semanas 1 e 6 e MTX nas semanas 4, 5, 9 e 10, variando de acordo com a resposta dos pacientes (SENERCHIA et al., 2017). O propósito desse tratamento, nos tumores de alto grau, é induzir à necrose tumoral e controlar micrometástases que possam estar presentes no momento do diagnóstico (BACCI e LARI, 2001; WITTIG et al., 2002).

A necrose tumoral, provocada pela quimioterapia neoadjuvante, é avaliada através da ressecção cirúrgica do tumor. Essa análise quantifica macroscopicamente o percentual de tumor viável e com necrose e classifica os pacientes em bons e maus respondedores. Grau I são pacientes cuja quimioterapia não foi eficiente e possuem muito tumor viável; Grau II houve uma resposta parcial com mais de 50 % de necrose tumoral; Grau III mais de 90% do tumor apresenta necrose mas ainda existe tumor viável e no Grau IV não existe tumor viável, apenas áreas de necrose. Apenas graus III e IV são bons respondedores à quimioterapia (HUVOS et al., 1977; ROSEN et al., 1982). Entretanto, o tratamento quimioterápico não tem indicação nos tumores de baixo grau histológico (GRIMER et al., 2005; HANG e CHEN, 2014), cuja taxa de sobrevida é alta, variando de 89 a 91%, sem tratamento sistêmico (WHO, 2013).

#### 1.3.2.1 Aspectos históricos

A quimioterapia foi introduzida com sucesso na pediatria oncológica nas décadas de 50 e 60, e consistia no uso de DOX, ciclofosfamida, vincristina, actinomicina, fluorouracil e MTX (SINKS; MINDELL, 1975; SUTOW et al., 1975).

No início dos anos 70 foi iniciado o esquema de quimioterapia neoadjuvante e adjuvante para o tratamento do osteossarcoma. No final de década de 80 um estudo publicado no *New England Journal of Medicine* mostrou que menos de 20% dos pacientes tratados

apenas com cirurgia sobreviviam sem recorrência da doença, enfatizando o papel da quimioterapia no tratamento. Nesse trabalho, a quimioterapia resultou em taxa de recidiva de 44% em dois anos versus 80% no grupo de pacientes que não foram tratados (LINK, 1986). Na época o tratamento consistia basicamente em DOX e MTX em altas doses, e começaram a surgir trabalhos incorporando a CIS ao tratamento (CHUANG et al., 1981; JAFFE et al., 1983). Na década de 90 se iniciou a poliquimioterapia com a associação de CIS, DOX e MTX, a chamada quimioterapia MAP que é utilizada atualmente (ABARRATEGI et al., 2016), antes e após o tratamento cirúrgico. Assim, muitos estudos mostraram benefício da incorporação da quimioterapia, com aumento da sobrevida livre da doença não metastática para cerca de 70% (FERRARI et al., 2005; MEYERS et al., 2005; BACCI et al., 2006;; JAFFE, 2009; MIRABELLO; TROISI; SAVAGE, 2009b).

Posteriormente, a incorporação de ifosfamida e etoposídeo se mostrou efetiva em pacientes com a doença metastática, no entanto estão associados a outras complicações clínicas como mielossupressão, toxicidade renal e infecções (GOORIN et al., 2002). Mais recentemente, um estudo clínico randomizado com 618 pacientes que apresentaram má resposta à quimioterapia MAP neoadjuvante contraindicou o uso de etoposídeo e ifosfamida. Neste estudo, os pacientes foram divididos em dois grupos após a cirurgia: aqueles que receberam CIS, DOX e MTX (n=310) e aqueles nos quais também foram administrados ifosfamida e etoposídeo (n=308) no período pós-operatório, com acompanhamento médio de 62,1 meses. A sobrevida livre de evento em três anos (55% vs 53%, p=0,86) e a sobrevida global (77% vs 87%, p=0,0024) não diferiram. Além disso, o grupo que recebeu etoposídeo e ifosfamida apresentou maior toxicidade não hematológica (qualquer toxicidade, excluindo neutropenia, trombocitopenia, anemia e leucopenia) (MARINA et al., 2016).

A adição da poliquimioterapia ao tratamento cirúrgico aumentou significativamente a sobrevida, entretanto, quase 40% dos pacientes com a doença localizada ainda apresentam

recidiva (CASALI et al., 2014). A recorrência geralmente ocorre nos três primeiros anos após o término do tratamento, mas recidivas tardias são relatadas após dez anos (LUETKE, MEYERS et., 2014). Além da taxa de sobrevida de pacientes com doença metastática ainda ser baixa, em torno de 25% (SPRINGFIELD et al., 1988; MERCURI et al., 1991; BIELACK et al., 2009; LEWIS, 2009; LI et al., 2011; JAFFE, 2014), infere-se que 46,9% dos pacientes apresentam má resposta à quimioterapia neoadjuvante (MARINA et al., 2016).

A toxicidade não seletiva, para células não tumorais, é uma grande limitação dos medicamentos (WU, X. R. et al., 2014). Apesar das suas propriedades antitumorais, a ação desses agentes quimioterápicos não é específica, provocando efeitos em células não tumorais. A DOX pode causar cardiotoxicidade, com efeito dose cumulativo e os sintomas variam desde descompensação clínica (2-4 %) até alteração de biomarcadores (30-35%) (MCGOWAN et al., 2017). O MTX causa nefrotoxicidade em 1,8% dos pacientes, mesmo quando é feito o tratamento de suporte para sua inativação (WIDEMANN et al., 2004). O tratamento com CIS é associado a diversos efeitos, como nefrotóxico (BARTON et al., 2017; MANOHAR; LEUNG, 2017), cardiotóxico (VARGA et al., 2015), ototóxico, gastrotóxico, hepatotóxico e mielossupressor (TSANG; AL-FAYEA; AU, 2009).

Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novos protocolos e novos fármacos para o tratamento do osteossarcoma.

#### 1.3.2.2 Mecanismo de ação dos quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do osteossarcoma

A DOX é também conhecida como adriamicina, pois foi isolada de uma cepa de bactéria do solo da costa do mar Adriático no sudeste da Itália. Pertence à classe das

antraciclinas e foi descoberta em 1969 por Arcamone e colaboradores (1969)<sup>1</sup> a partir de uma mutação na cepa da bactéria *Streptomyces peucetis*, que produzia daunorrubicina, o primeiro composto da classe descrito (KIM, 2016). Alguns mecanismos de ação já foram propostos para explicar a indução de morte celular mediada pela DOX. O modelo mais aceito envolve a ligação deste composto com a topoisomerase II resultando na quebra da dupla-hélice de DNA (Figura 7-1), permitindo a passagem de outra dupla hélice pela abertura e levando à interrupção do ciclo celular. Outros mecanismos independentes da ligação com a topoisomerase II também já foram propostos. Dentre eles, a formação de adutos no DNA através da ligação com uma guanina que impede a replicação do DNA e induz a morte celular; a indução de estresse oxidativo; a indução da síntese de ceramida, que atua na parada do ciclo celular, apoptose e senescência celular (revisado por YANG et al., 2014).

O MTX é um fármaco análogo aos folatos usado no tratamento de doenças autoimunes (5- 10 mg semanais), quando geralmente é administrado por via oral ou subcutânea, e de tumores, onde concentrações de até 12 g/m<sup>2</sup> são administradas por via oral, intratecal, intramuscular ou endovenosa. O perfil farmacodinâmico do MTX pode ser explicado, em parte, pela sua interação com enzimas na via do folato (Figura 1-7). O MTX é carregado para o interior da célula tumoral por transporte ativo mediado pelo carreador de folato reduzido. Na célula, a ação da enzima sintetase poliglutamato forma o MTX poliglutamato ativo que é o principal metabólito, através da adição de resíduos de glutamato. Este metabólito inibe a ação da enzima dihidrofolatoredutase que converte o dihidrofolato em tetrahidrofolato que, por sua vez, é essencial para a síntese das purinas. Assim, seus subprodutos inibem as enzimas

---

<sup>1</sup>ARCAMONE F, CASSINELLI G, FANTINI G, GREIN A, OREZZI P, POL C, SPALLA C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969).

dependentes de folato que atuam na síntese das purinas e pirimidinas (revisado por MIKKELSEN et al., 2011).

A CIS foi inicialmente sintetizada em 1844 por Michel Peyrone e sua estrutura química foi elucidada em 1893 por Alfred Werner. Porém, sua atividade biológica foi descrita pela primeira vez na década de 60<sup>2</sup>, quando foi observada a inibição da proliferação celular de *Escherichia coli* (KIM, 2016). Diversos mecanismos moleculares que levam à apoptose e morte celular já foram relacionados à ação da CIS e compilados por Dasariand e Tchounwou em 2014 na Revista Europeia de Farmacologia. A CIS é transportada para o interior da célula através do transportador de cobre e, no citoplasma, os átomos de cloro são deslocados pelas moléculas de água. A principal causa da citotoxicidade da CIS é a formação de adutos através da reação desse produto hidrolizado com resíduos de purina (Figura 1-7). Esses adutos são predominantemente (90%) ligados entre duas guaninas adjacentes e secundariamente (10%) também podem se ligar entre uma guanina e uma adenina adjacentes. O estresse oxidativo é outro mecanismo de ação da CIS e ocorre através da desregulação da atividade mitocondrial pela perda do grupo sulfidril. As espécies reativas de oxigênio podem também induzir a apoptose ou autofagia, que é um processo que envolve o sequestro de conteúdo citoplasmático para degradação em lisossomas. Adicionalmente, a CIS pode provocar efluxo de cálcio da mitocôndria com consequente aumento do cálcio intracelular interrompendo a homeostase de cálcio. Em consequência, há peroxidação lipídica e inibição de enzimas e da função mitocondrial, depleção de ATP e de outros cofatores levando, por fim, à apoptose e necrose tecidual. Outro mecanismo de ação citado ocorre através da ativação de quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), que por sua vez promove fosforilação da p53 levando ao aumento da expressão de p21 com consequente interrupção do ciclo celular. Adicionalmente, outras vias como c-JunN-terminal quinases, proteínas quinases da família p38 e de quinases

---

<sup>2</sup>ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**.1965; 205:698–699.

da família serina/treonina também podem ser ativadas levando à apoptose (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

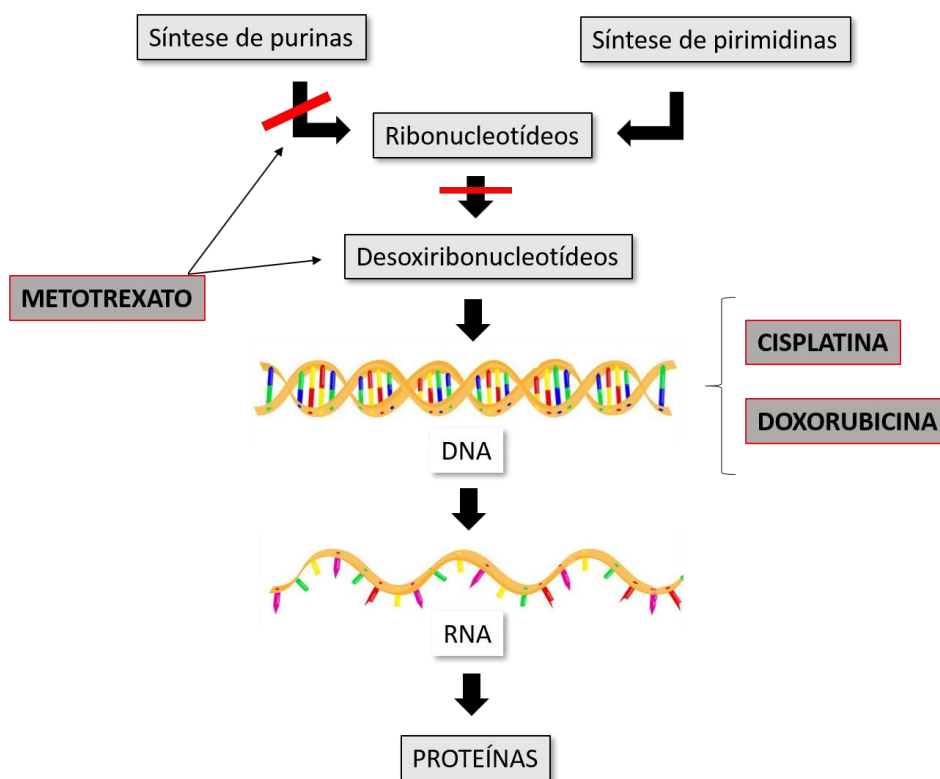


Figura 1-7 Mecanismo de ação dos quimioterápicos mais comumente utilizados no tratamento do osteossarcoma. A doxorubicina se liga a topoisomerase II resultando na quebra da dupla-hélice de DNA e consequentemente na interrupção do ciclo celular. A Cisplatina forma adutos no DNA através da reação de seus metabólitos intracelulares com resíduos de purina. Os subprodutos do Metotrexato inibem as enzimas dependentes de folato que atuam na síntese das purinas e pirimidinas

#### 1.4 Compostos mesoiônicos

“Um composto pode ser apropriadamente classificado como mesoiônico quando for constituído por um anel heterocíclico de 5 membros, o qual não pode ser representado satisfatoriamente por uma estrutura covalente ou polar, e que possua um sexteto de elétrons  $\pi$  associados aos 5 átomos que formam o anel”(OLLIS; RAMSDEN, 1976<sup>3</sup>apud RIBEIRO, 2004) (Figura 1-8).

<sup>3</sup>OLLIS, W.D.; RAMSDEN, C.A. Mesoionic compounds. Adv. Heterocycl. Chem., San Diego, v. 19, p. 1-121, 1976.

O nome mesoiônico é dado a uma classe de compostos heterocíclicos (ciclo com heteroátomos) penta-atômicos (cinco membros), com característica planar. Esses compostos possuem regiões contendo carga positiva e negativa, associadas a um sistema aromático poliheteroatômico, que favorecem sua interação com biomoléculas. Além disso, a ausência de carga líquida na molécula facilita a sua passagem através de membranas biológicas (NEWTON E RAMSDEN, 1982<sup>4</sup>apud RIBEIRO (2004).

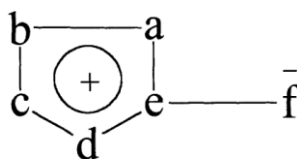


Figura 1-8 Estrutura química básica dos compostos mesoiônicos. Os átomos constituintes indicados pelas letras a-f podem ser: carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre, com seus respectivos substituintes específicos para cada tipo de composto. Fonte: RIBEIRO (2004).

Diversas atividades biológicas dos compostos mesoiônicos já foram descritas tais como antifúngica (PAIVA et al., 2015), anti-inflamatória, anticonvulsivante, hipoglicêmica e analgésica (JAIN ET AL., 2003). Além disso, foi verificado que esses compostos apresentam atividade antitumoral em diferentes tumores como o tumor de Ehrlich, o tumor murino Sarcoma 180 (GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA, 1997), melanoma (RIBEIRO, 2004; SENFF-RIBEIRO et al., 2003), hepatocarcinoma (GOZZI et al., 2015) e carcinossarcoma (GALUPPO et al., 2016).

Mais especificamente, a atividade antimelanoma do composto cloreto de 4-fenil-5-(4-nitrocinaoil) -1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MIC-NO<sub>2</sub>)<sup>5</sup> foi testada *in vitro* e *in vivo*. O sal mesoiônico reduziu a viabilidade celular em 80% após a exposição a 25 µM por 24 h e interferiu com a proliferação celular, sendo citotóxico para as linhagens celulares B16-F10. A

<sup>4</sup>NEWTON O.N.; RAMSDEN, C.A. Mesoionic heterocycles. Tetrahedron, Kindlington, v. 38, p. 2965-3011, 1982

<sup>5</sup>C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>CIN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

atividade *in vivo* do fármaco foi avaliada usando modelo de tumor subcutâneo em camundongos C57BL/6. Os animais receberam MIC-NO<sub>2</sub> por via intraperitoneal em dose única de 57 µmol/kg, 24 horas após a inoculação de células. Controles positivos foram tratados com fotemustina e dacarbazina, que possuem efeitos conhecidos sobre células de melanoma; e os controles negativos foram tratados apenas com o veículo. No 17º dia após a inoculação das células, os tumores foram retirados e seus pesos foram determinados. O MIC-NO<sub>2</sub> foi capaz de inibir o crescimento dos tumores em 85% ( SENFF-RIBEIRO et al., 2003; SENFF-RIBEIRO et al., 2004) .

Em células de hepatocarcinoma, os sais MIC-F<sup>6</sup> e MIC-NO<sub>2</sub> reduziram em 50% a viabilidade celular nas concentrações de 25 µM e 50 µM, respectivamente, como demonstrado nos ensaios de MTT. Entretanto, em células não tumorais, como hepatócitos de camundongos, esses sais não foram citotóxicos (GOZZI et al., 2015).

*In vivo* o MIC-NO<sub>2</sub> demonstrou atividade antitumoral para tumor de Ehrlich e no tumor murino Sarcoma 180. Células tumorais foram inoculadas em camundongos e estes foram tratados com esse sal. Nenhuma mudança significativa foi avaliada quanto à toxicidade hematológica entre o controle e os animais tratados com o sal (GRYNBERG; SANTOS; ECHEVARRIA, 1997).

Os principais mecanismos de ação dos compostos mesoiônicos estão relacionados à interferência na atividade mitocondrial. Eles têm capacidade de inibir a cadeia respiratória, promover colapso do potencial elétrico transmembrana e interferir com a atividade ATPase em mitocôndrias (CADENA et al., 1998). Eles também reduzem a peroxidação lipídica em membranas mitocondriais através da sua ação desacopladora de elétrons (MENDEZ-SANCHEZ et al., 2009). Além disso, sua natureza lipofílica altera a permeabilidade da membrana mitocondrial interna, alterando sua fluidez e levando à apoptose

---

<sup>6</sup>C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>ClFN<sub>3</sub>S

celular (CADENA et al., 2002; PIRES et al., 2010; PIRES et al., 2011). A apoptose pode também ser induzida por fragmentação do DNA e alguns compostos, como o MI-J, têm a capacidade de inibir a glicoproteína P, relacionada ao efluxo de drogas e quimioresistência (GOZZI et al., 2015).

Morfologicamente, foram descritas mudanças significativas nas células tratadas com os compostos, tornando-se redondas quando comparadas ao controle, com protrusões da membrana plasmática e intensa vacuolização do citoplasma. Além disso, foi mostrado que o tratamento promove desorganização do citoesqueleto através da análise das fibras de actina (SENFF-RIBEIRO et al., 2004).

Estes são resultados promissores no que diz respeito à possibilidade dos compostos mesoiônicos se tornarem uma nova ferramenta para pesquisa e tratamento de neoplasias e abre também perspectiva para sua aplicação em outros tumores. O osteossarcoma é o tumor maligno mais comum do osso, frequentemente desenvolve metástases e recidivas e acomete principalmente crianças e adolescentes. O tratamento consiste em cirurgia associada à quimioterapia, porém há poucas opções de fármacos e os disponíveis causam muitos efeitos adversos. Além disso, a taxa de sobrevida de pacientes com osteossarcoma ainda é baixa, apesar do tratamento quimioterápico. A identificação de novos compostos com aplicação promissora no osteossarcoma é fundamental para aumentar as possibilidades de tratamento dessa doença. A pesquisa da atividade biológica antineoplásica dos sais mesoiônicos é motivada pelos resultados promissores encontrados em estudos com outras neoplasias.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo Principal

Avaliar o efeito antitumoral e citotóxico dos sais mesoiônicos MIC-NO<sub>2</sub>, MIC-F, MI-4F e MI-3,4-F na linhagem celular de osteossarcoma, MG-63.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a sensibilidade das células de osteossarcoma aos sais mesoiônicos através do ensaio de viabilidade celular relativa;
2. Calcular a concentração dos sais capaz de inibir o metabolismo de 50% das células (IC<sub>50</sub>);
3. Verificar a citotoxicidade induzida pelos sais mesoiônicos em células de osteossarcoma;
4. Avaliar a indução de apoptose celular pelos sais mesoiônicos em células de osteossarcoma.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1 Sais mesoiônicos

Os quatro sais (ou cloretos) mesoiônicos foram sintetizados no Núcleo de Síntese e Química Medicinal – NUSQUIMED da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e foram obtidos através de colaboração com a Dra. Aurea Echevarria. As quatro estruturas possuem em comum o núcleo mesoiônico central de cinco membros. Contudo, os cloretos mesoiônicos MIC-NO<sub>2</sub> e MIC-F são compostos derivados de ácidos cinâmicos devidamente substituídos. Já os sais mesoiônicos MI-4F e o MI-3,4-F são oriundos dos respectivos aldeídos benzoicos (Figura 3-1).

As quatro estruturas possuem em comum o núcleo mesoiônico, identificado por um quadrado azul na figura 3-1. MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> são compostos derivados de aldeídos ou ácidos cinâmicos sendo, portanto, aldeído *para*-nitro-cinamaldeído quando associados a um grupo nitro (NO<sub>2</sub>) ou *para*-F-cinamaldeído quando associado a um átomo de flúor (F). O MI-4F possui um átomo de flúor (F) em posição *para* enquanto o MI-3,4-F possui dois átomos de flúor (F), um no carbono 3 e o outro no carbono 4, ambos derivados de aldeídos benzoicos.

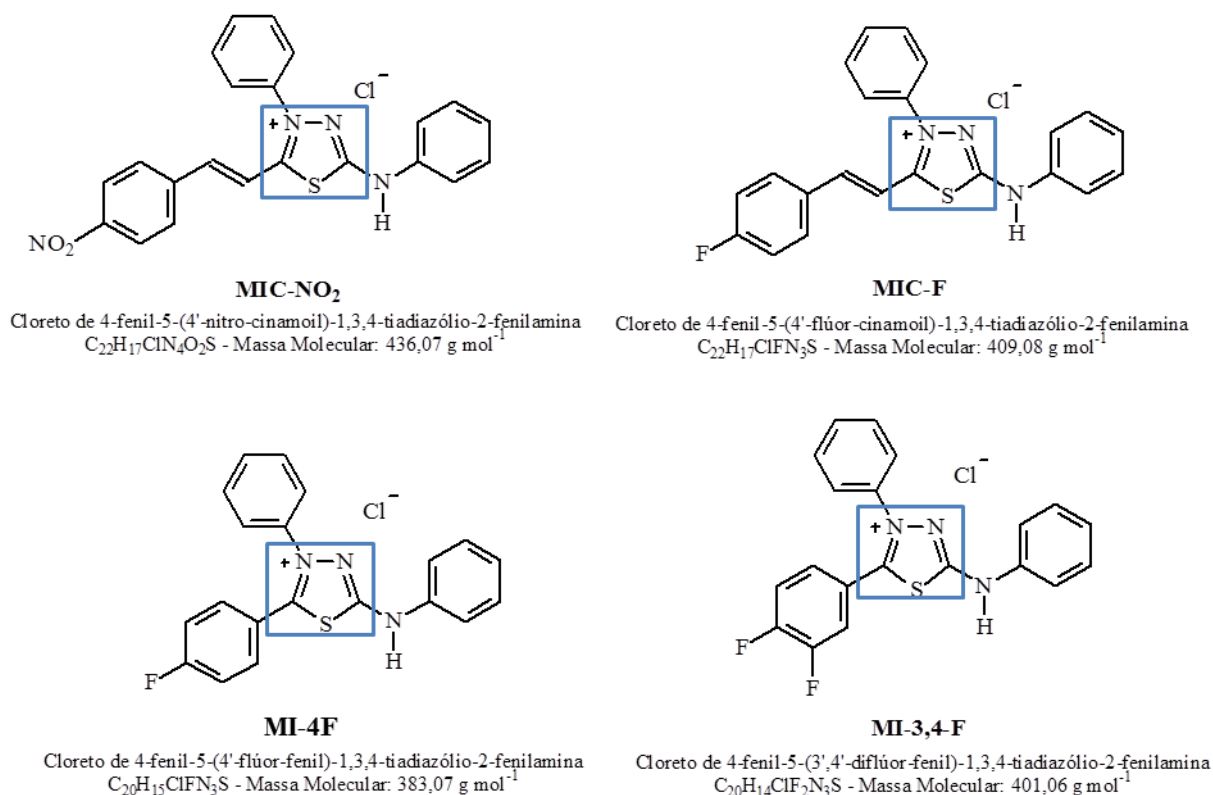


Figura 3-1. Estrutura química dos sais mesoiônicos utilizados no estudo. Núcleo mesoiônico identificado por um quadrado azul.

### 3.2 Cultura das células

A linhagem celular de osteossarcoma humano, MG-63, foi isolada em 1978 na Divisão de Ortopedia da Universidade de Leuven a partir da biópsia de um paciente de 14 anos, do sexo masculino e caucasiano, com osteossarcoma osteogênico justacortical no fêmur (HEREMANS, BILLIAU et al., 1978). Para o presente estudo, essa linhagem celular foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro. O meio de cultura utilizado foi DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium com nutriente F-12, Gibco, Grand Island, NY, EUA) tamponado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco), penicilina G sódica a 100UI/mL, estreptomicina a 100 µg/ml e anfotericina a 0,25 µg/ml (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.3 Tratamento *in vitro* com os sais mesoiônicos**

Para a realização dos ensaios, as células foram semeadas em placas de cultura com meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após alcançarem cerca de 70% de confluência, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos sais mesoiônicos previamente diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), misturados ao meio DMEM-F12 isento de soro. As células foram então incubadas por mais 24 ou 48 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em cada ensaio foram incluídos poços com células tratadas com o veículo (DMSO) no volume correspondente ao utilizado na concentração do composto e poços com células não tratadas (controle negativo), cultivadas apenas com meio de cultura isento de SFB. As replicatas técnicas dos ensaios realizadas em semanas distintas foram feitas com alíquotas recém-diluídas dos compostos.

### **3.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT**

Neste ensaio foi utilizada a quantidade inicial de  $5 \times 10^3$  células da linhagem MG-63 por poço, em triplicata técnica, em placas de 96 poços contendo 100µL de meio de cultura, nas condições citadas no item 3.3. Após o período de incubação (24h e 48h) com os sais mesoiônicos, foram adicionados 10µL/poço de uma solução de 5mg/mL de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl) -2,5- Brometo de Difeniltetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich), a placa foi então incubada em estufa a 37°C durante 2 horas. Foram adicionados 50 µl/poço de DMSO e a placa foi mantida sob agitação durante 15 minutos. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (GloMax<sup>®</sup> Promega, Madison, WI, EUA) com filtro de referência de 620 nm e filtro de leitura a 570nm. Para a leitura, foram incluídos poços contendo apenas DMSO como branco, para desconto da absorbância obtida em cada poço. O valor do branco foi descontado da média das absorbâncias de cada condição. Os resultados foram expressos sob a

forma de percentual em relação ao controle, considerado como 100% de viabilidade. Foram realizados três experimentos independentes.

### **3.5 Ensaio de citotoxicidade**

Neste ensaio foi utilizada a quantidade inicial de  $25 \times 10^4$  células da linhagem MG-63 por poço, em duplicata técnica, em placas de 24 poços contendo 500 $\mu$ L de meio de cultura, nas condições citadas no item 3.3. Após os períodos de incubação (24 e 48h) com os sais mesoiônicos, os poços foram lavados com solução tampão salina fosfato (PBS) e dissociadas com solução de tripsina a 0,25% e ácido etilenodiamino tetra-acético a 0,04% (EDTA, Sigma-Aldrich) por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao fim da incubação, todo o conteúdo foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 300 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1mL de meio de cultura e mantidas em gelo até a contagem. A contagem das células mortas e vivas foi realizada em câmara de Neubauer pelo método de exclusão por azul de tripan a 0,4% (Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos sob a forma de percentual em relação ao controle, considerado como 100%. Foram realizados três experimentos independentes.

### **3.6 Citometria de fluxo**

Neste ensaio foi utilizada a quantidade inicial de  $1,5 \times 10^5$  células da linhagem MG-63 por poço, em triplicata técnica, em placas de 6 poços contendo 3mL de meio de cultura por poço, de acordo com as condições citadas no item 3.3. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com PBS e incubadas com uma solução de tripsina a 0,25% e EDTA a 0,04% (Sigma-Aldrich) por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao fim da incubação, todo o conteúdo foi transferido para um tubo cônico e

centrifugado a 300 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS com 3% de SFB. A contagem das células vivas foi realizada em câmara de Neubauer pelo método de exclusão por azul de tripan a 0,4% (Sigma-Aldrich). Um total de  $1,0 \times 10^5$  células de cada condição foram separadas, novamente centrifugadas, ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS e armazenadas em gelo por 30 minutos para recuperação da membrana. Após esse período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 200  $\mu$ L de solução tampão (Annexin V Binding Buffer, Biolegend, San Diego, CA, EUA) e incubadas por 15 minutos sob proteção da luz e temperatura ambiente com 5  $\mu$ L de Anexina V conjugada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Thermo Fischer Scientific) e com 10  $\mu$ L de iodeto de propídeo (PI) (Biolegend). Após a incubação, foram adicionados 300  $\mu$ L do tampão de anexina e as células foram centrifugadas a 1.500 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200  $\mu$ L de solução tampão para leitura. A leitura foi realizada no citômetro BD Accuri C6® (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Foram adquiridos 50.000 eventos por condição. A análise dos resultados foi feita no *software* do equipamento. Foram realizados três experimentos independentes.

### 3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Resultados de pelo menos três experimentos independentes foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por pós-teste de Bonferroni para os ensaios de viabilidade celular por redução do MTT e de citotoxicidade; e pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's para o ensaio de citometria. O cálculo da IC<sub>50</sub> foi realizado com a ferramenta de regressão não linear (curva de dose-resposta inibitória) do programa GraphPadPrism. Os dados estão representados como

média  $\pm$  desvio padrão. Foi considerado o intervalo de confiança de 95% e os valores de  $p < 0,05$  significativos.

## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 Efeito dos sais mesoiônicos na viabilidade celular

Inicialmente o efeito dos sais mesoiônicos sobre a viabilidade relativa das células de osteossarcoma da linhagem MG-63 foi avaliado 24 e 48 horas após o tratamento com 1, 2,5, 5, 10, 20 e 25  $\mu\text{M}$  pelo ensaio de redução do MTT.

Foi verificado que o MIC-F reduziu a viabilidade relativa das células a partir da concentração de 5  $\mu\text{M}$  em 24 horas de tratamento e a partir da concentração de 1  $\mu\text{M}$  com 48 horas de tratamento (Figuras 4-1 A e 4-2 A). Houve diferença estatística na redução da viabilidade entre 24 e 48 horas de tratamento com a concentração de 1 $\mu\text{M}$  de MIC-F ( $p<0,05$ ). De forma semelhante, o composto MIC-NO<sub>2</sub> reduziu a viabilidade relativa das células a partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$  e de 2,5  $\mu\text{M}$  após 24 e 48 horas, respectivamente, sem diferença em relação ao tempo (Figuras 4-1 B e 4-2 B). Contudo, não foi observada redução da viabilidade relativa das células tratadas com os compostos MI 4-F e MI-3,4 em nenhuma das concentrações e tempos avaliados (Figuras 4-1 C e D e 4-2 C e D).

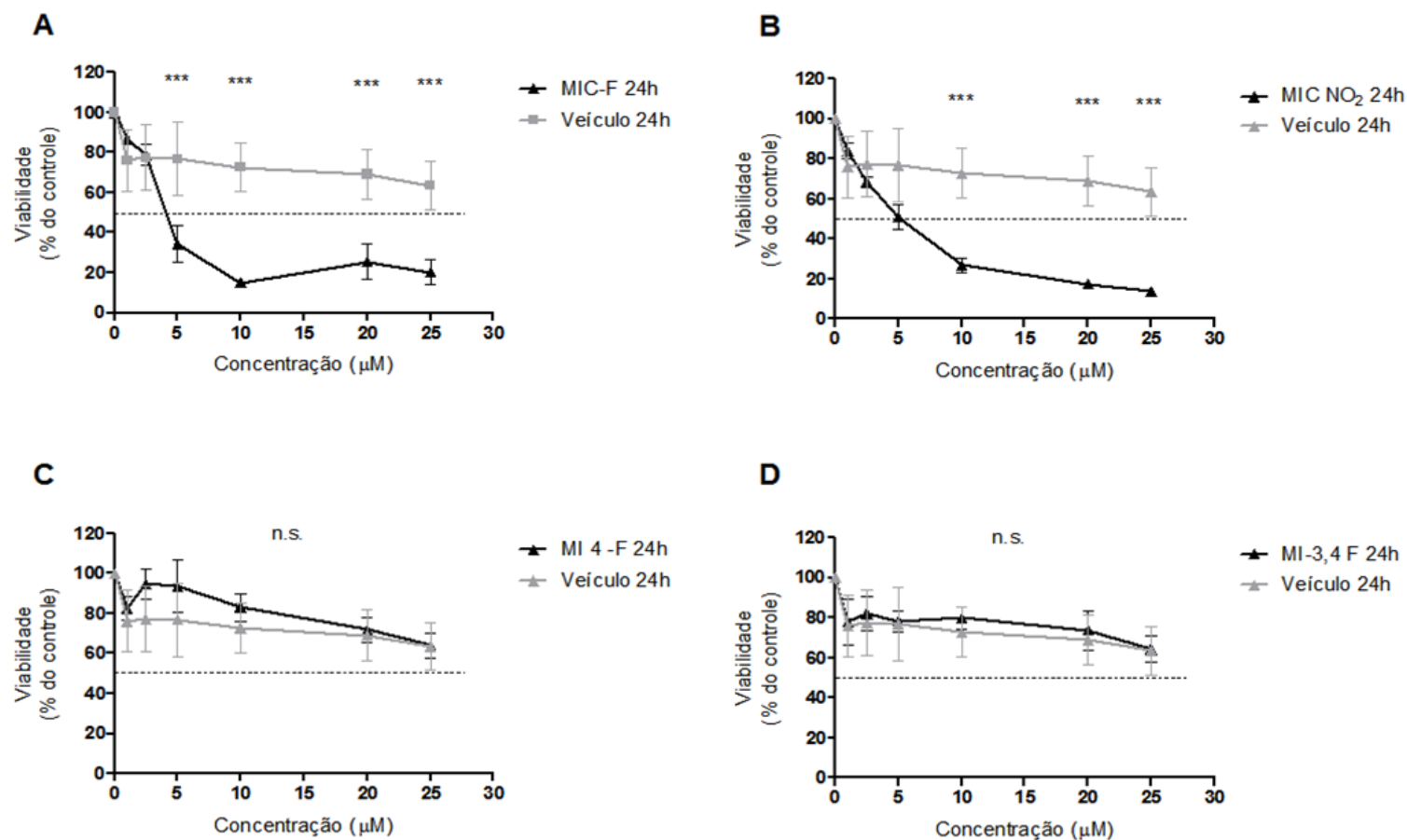


Figura 4-1 Efeito dos sais mesoiônicos na viabilidade de células de osteossarcoma após 24 horas de incubação. A linhagem celular MG-63 foi tratada com 1, 2,5, 5, 10, 20 e 25 μM dos sais MIC-F, MIC-NO<sub>2</sub>, MI 4-F e MI-3,4 F e então foi realizado o ensaio de redução do MTT. Os dados representam a média de três experimentos independentes em triplicata. Resultados expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle (células cultivadas apenas com meio de cultura). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como veículo. Valores representativos da média e desvio padrão. \*p<0,05; \*\*p<0,001 e \*\*\*p<0,0001 denotam valores com diferença estatística significativa entre o composto e o veículo n.s.: não significativo. ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. A linha pontilhada representa 50% de viabilidade celular.

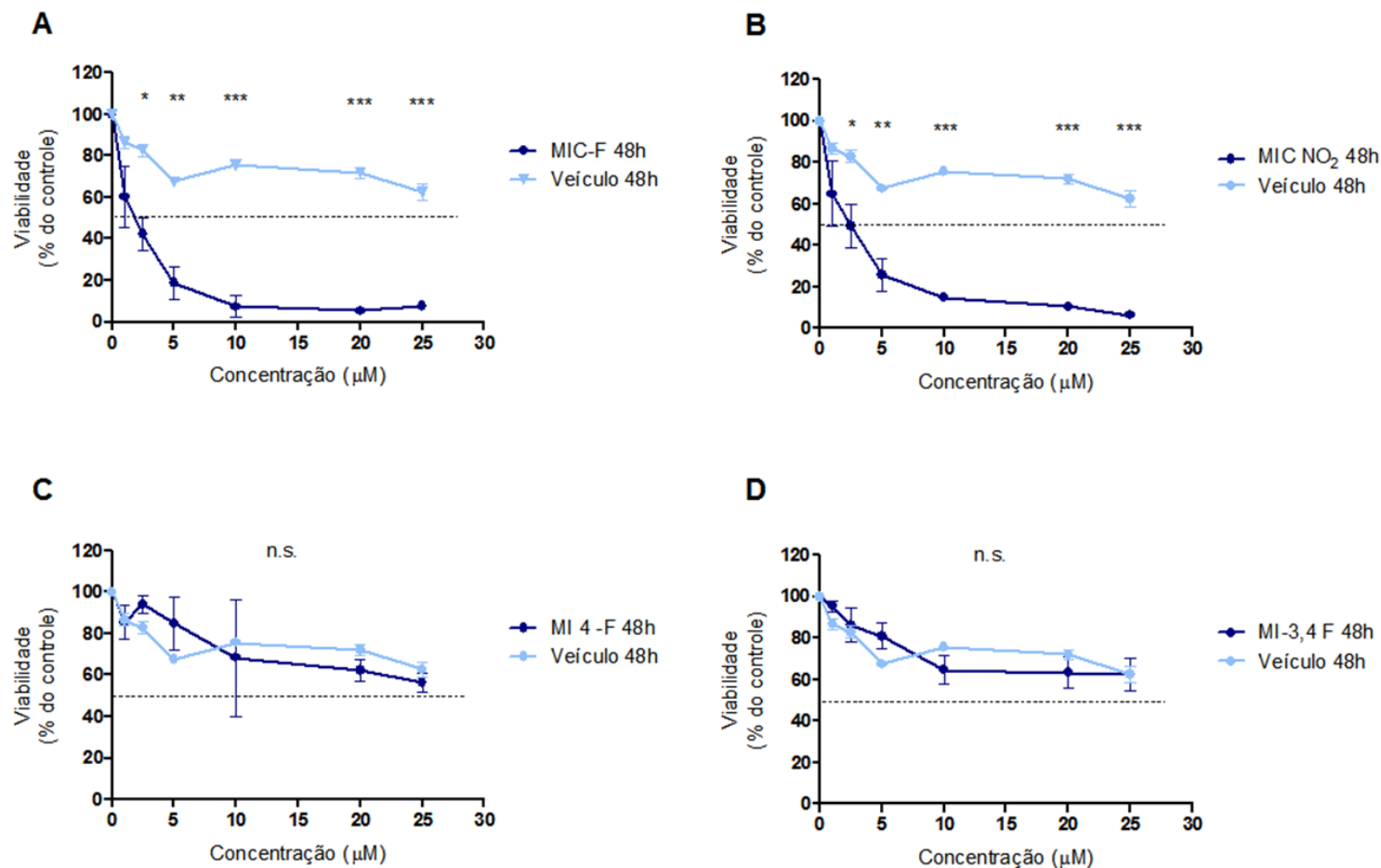


Figura 4-2 Efeito dos sais mesoiônicos na viabilidade de células de osteossarcoma após 48 horas de incubação. A linhagem celular MG-63 foi tratada com 1, 2,5, 5, 10, 20 e 25 μM dos sais MIC-F, MIC-NO<sub>2</sub>, MI 4-F e MI-3,4 F por 48 horas e então foi realizado o ensaio de redução do MTT. Os dados representam a média de três experimentos independentes em triplicata. Resultados expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle (células cultivadas apenas com meio de cultura). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como veículo. Valores representativos da média e desvio padrão. \*p<0,05; \*\*p<0,001 e \*\*\*p<0,0001 denotam valores com diferença estatística significativa entre o composto e o veículo no tempo de 48h. n.s. : não significativo. ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. A linha pontilhada representa 50% de viabilidade celular.

As concentrações mínimas capazes de inibir a funcionalidade de 50% das células ( $IC_{50}$ ) foram determinadas através da curva dose-resposta. A concentração necessária para interferir com o metabolismo de 50% das células está representada na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 Concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) dos sais mesoiônicos sobre a linhagem celular de osteossarcoma MG-63. Os valores de  $IC_{50}$  foram obtidos pelo ensaio de redução do MTT após 24 e 48 horas de tratamento nas concentrações de 1, 2,5, 5, 10, 20 e 25  $\mu$ M. Os dados representam a média ( $\mu$ M)  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes onde cada condição foi realizada em triplicata.

| <b>Composto/<math>IC_{50}</math> (<math>\mu</math>M)</b> | <b>24 horas</b>  | <b>48 horas</b>  |
|----------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| <b>MIC-F</b>                                             | 4,36 $\pm$ 0,08  | 1,93 $\pm$ 0,20  |
| <b>MIC-NO<sub>2</sub></b>                                | 4,78 $\pm$ 0,02  | 2,02 $\pm$ 0,05  |
| <b>MI-4F</b>                                             | 61,19 $\pm$ 0,27 | 36,49 $\pm$ 0,17 |
| <b>MI 3,4-F</b>                                          | 1674 $\pm$ 1,77  | 45,59 $\pm$ 0,13 |

#### 4.2 Citotoxicidade dos sais mesoiônicos sobre as células de osteossarcoma

Para investigar se a redução da viabilidade celular relativa induzida pelos sais MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> estaria relacionada com citotoxicidade, a viabilidade de células de osteossarcoma foi avaliada por meio do ensaio de exclusão com azul de tripan. As células foram tratadas com as concentrações de 1, 2,5, 5, 10 e 25  $\mu$ M dos sais por 24 e 48 horas e as células viáveis e não viáveis foram contadas. O composto MIC-F foi citotóxico em todas as concentrações utilizadas após 24 horas de tratamento reduzindo progressivamente a viabilidade de 66,7% com 1  $\mu$ M até 4,02% com 25  $\mu$ M. Com 48 horas de tratamento, esse efeito foi significativo a partir da concentração de 2,5  $\mu$ M, que correspondeu a 64,1% de viabilidade e chegou a citotoxicidade máxima (100%) com 25  $\mu$ M (Figura 4-3 A). Para o composto MIC-NO<sub>2</sub>, foi observada citotoxicidade significativa após 24 horas de tratamento com as concentrações de 5, 10 e 25  $\mu$ M, com viabilidade respectiva de 54,6%, 23,3% e 3,1%. Após 48 horas, observou-se redução da viabilidade para 53,5%, 24,8%, 7,1% e 1,7% com as concentrações de 2,5, 5, 10 e 25  $\mu$ M, respectivamente (Figura 4-3 B).

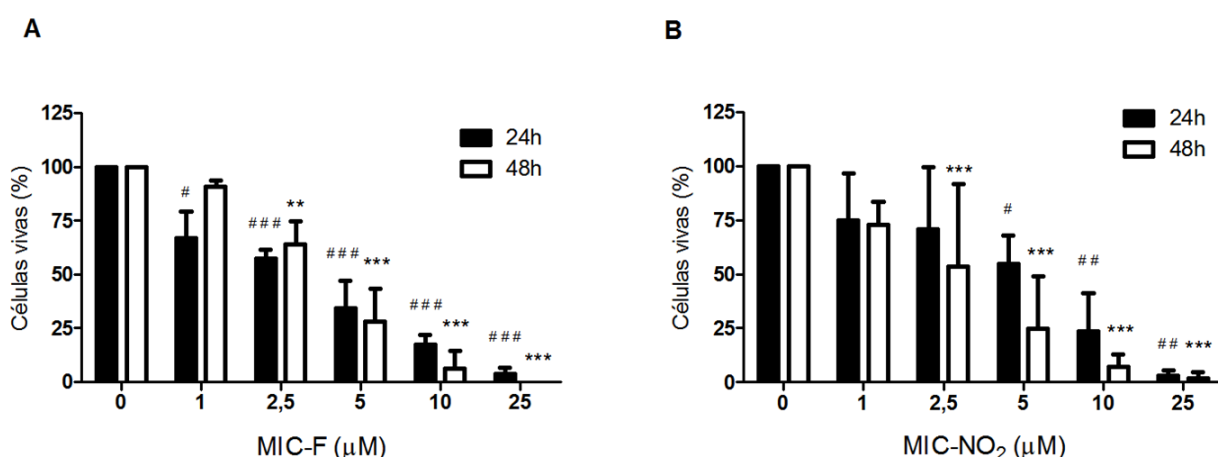


Figura 4-3 Citotoxicidade dos sais MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> sobre as células de osteossarcoma. A linhagem celular MG-63 foi tratada com 1, 2,5, 5, 10 e 25 μM dos sais MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> por 24 e 48 horas e então foi realizada contagem de células viáveis por meio do método de coloração com azul de tripan. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes em duplicata. Resultados expressos em percentual em relação ao controle. Valores representativos da média e desvio padrão. #p<0,05; ##p<0,001 e ###p<0,0001 denotam valores com diferença estatística significativa entre o composto e o veículo no tempo de 24h e \*p<0,05; \*\*p<0,001 e \*\*\*p<0,0001 no tempo de 48h. ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni.

#### 4.3 Indução da morte celular por apoptose

Uma vez que os compostos MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> foram capazes de induzir a morte das células de osteossarcoma, resolvemos investigar se estes compostos estariam induzindo apoptose nestas células. Para isso, realizamos um ensaio de citometria de fluxo com Anexina V e PI. Para tal, as células foram tratadas com os compostos MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> nas concentrações de 1 e 5 μM por 24 horas e o percentual de células apoptóticas foi quantificado por citometria de fluxo. Para esta análise, consideramos como percentual de apoptose o somatório do percentual de células Anexina V positivas (+) PI negativas (-) mais o percentual de células Anexina V<sup>+</sup> PI<sup>+</sup>.

No tratamento das células MG-63 com o composto MIC-F a 1 e 5 μM, o percentual de células em apoptose foi de 29,3 ± 11,4% e 35,9 ± 16,3% (média ± desvio padrão), respectivamente. Para o composto MIC-NO<sub>2</sub>, esse percentual foi de 35,3 ± 12,1 e de 42,9 ± 4,2% para as concentrações de 1 e 5 μM, respectivamente. Houve diferença estatisticamente

significativa ( $p=0,046$ ) entre as células tratadas com o sal mesoiônico MIC-NO<sub>2</sub> ( $42,8 \pm 4,1$ ) e com o veículo correspondente a concentração de 5  $\mu$ M ( $8,5 \pm 1,7\%$ ) (Figuras 4-4 e 4-5).

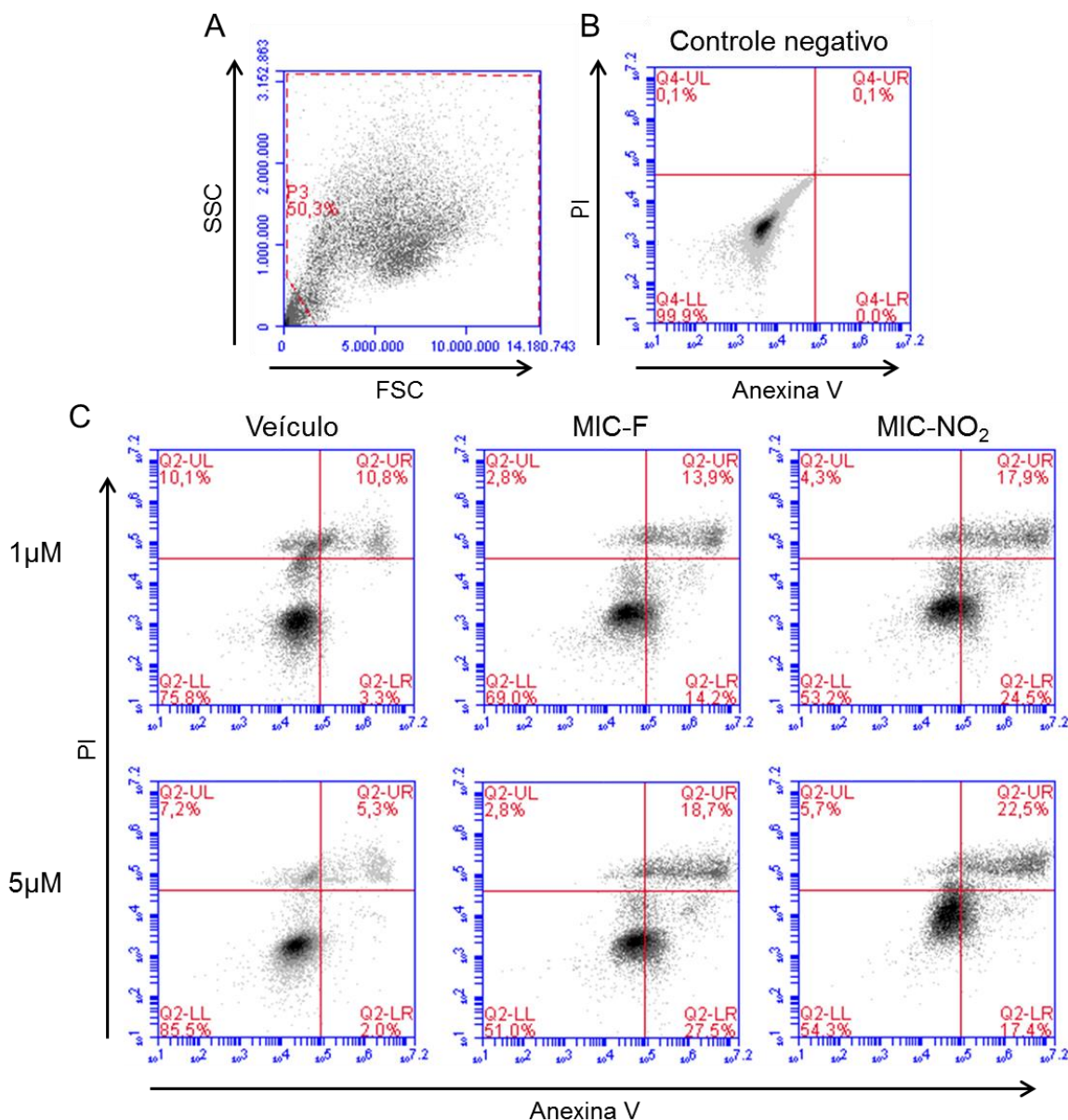


Figura 4-4 Avaliação da indução de apoptose por citometria de fluxo. As células MG-63 foram tratadas com 1 e 5  $\mu$ M dos compostos MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> por 24 horas. (A) Dot-plot mostrando perfil SSC x FSC (*Side scattering x forward scattering*) das células MG-63. A região delimitada (linha vermelha pontilhada) representa a população selecionada para avaliação. (B) Imagem representativa do perfil de Annexina V x PI do controle negativo (células incubadas com os compostos que não foram incubadas com Annexina V e PI). (C) As células foram tratadas com veículo (dimetilsulfóxido - DMSO), MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> por 24 horas nas concentrações indicadas e avaliadas quanto à exposição a fosfatidil serina e permeabilidade ao PI. Annexina V-FITC: Annexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína. PI: iodeto de propídeo.

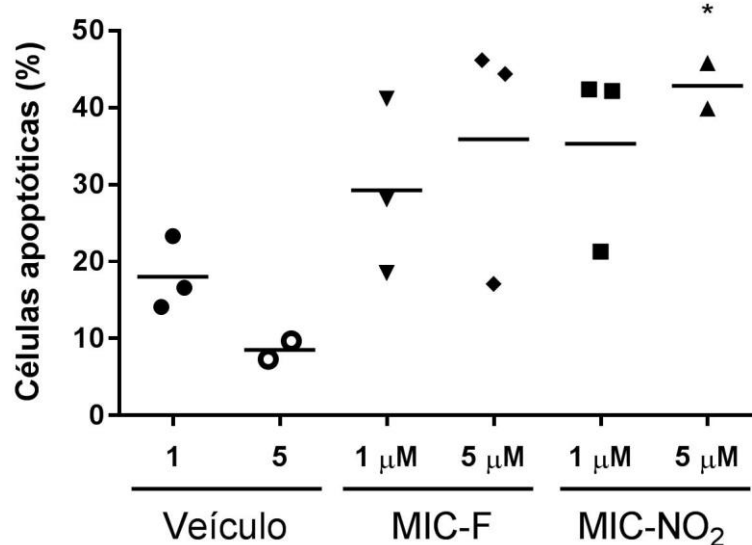


Figura 4-5 Percentual de células MG-63 tratadas com as concentrações de 1 e 5  $\mu$ M dos sais MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub>. As células foram tratadas com as concentrações de 1 e 5  $\mu$ M dos sais MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> por 24 horas. Quantificação dos resultados de três experimentos independentes (citometria de fluxo). (N=2) para a concentração de 5  $\mu$ M do composto MIC-NO<sub>2</sub>. Tratamento com o veículo (dimetilsulfóxido) no mesmo volume correspondente ao volume utilizado para ambas as concentrações. P valor = 0,05, ANOVA seguido de pós-teste de Sidak's\*P valor = 0,046 denota diferença significativa entre veículo 5 e MICNO<sub>2</sub> 5 $\mu$ M.

## 5 DISCUSSÃO

---

O osteossarcoma é o tumor ósseo maligno mais comum, altamente metastático que acomete principalmente crianças e adolescentes. O tratamento consiste em cirurgia associada a quimioterapia que induz a morte de células do tumor primário, porém não impede a recorrência do tumor ou a ocorrência de focos metastáticos. As opções de tratamento quimioterápico não tiveram alterações significativas nos últimos 30 anos e não são absolutamente efetivas, sendo estimada falha terapêutica em cerca de 46% dos pacientes (MARINA et al., 2016) e muitas vezes causam efeitos colaterais que impedem a continuidade de seu uso. Além disso, existem poucas opções de agentes terapêuticos e também de agentes específicos para os tumores metastáticos ou refratários à quimioterapia atual, criando uma necessidade real para o desenvolvimento de regimes mais específicos biologicamente. Nesse contexto, emerge a busca por novas opções de tratamento para a doença.

Na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, inicialmente são realizados ensaios pré-clínicos, que consistem na detecção da atividade biológica *in vitro* a fim de selecionar compostos, seguida da análise da atividade em modelos *in vivo* apropriados. Se o composto for selecionado como o candidato, segue para a fase de desenvolvimento em fármaco e deve ser submetido à agência reguladora do país antes de seguir para os testes clínicos. Aproximadamente um de cada 15 a 25 candidatos progride para os testes de segurança e eficácia (em animais e humanos) e apenas 4% a 7% chegam a ser distribuídos aos pacientes (LOMBARDINO; LOWE, 2004). O presente trabalho consistiu na fase inicial de um ensaio pré-clínico *in vitro* em que reportamos o efeito dos sais mesoiônicos sobre o metabolismo e apoptose de células de OS.

Inicialmente o efeito de quatro sais mesoiônicos foi testado sobre a viabilidade da linhagem celular MG-63 através do ensaio colorimétrico de redução do MTT. O MIC-F e o

MIC-NO<sub>2</sub> foram os únicos que reduziram a viabilidade celular. Os compostos MI-4F e MI3,4-F não reduziram a viabilidade celular na linhagem testada, tendo sido decidido, portanto, descontinuar suas análises.

O composto MIC-NO<sub>2</sub> é um nitro cinamaldeído e sua caracterização foi feita em 1997 no trabalho de Grynberg e colaboradores. Neste trabalho também foi mostrada sua capacidade de inibição do crescimento do sarcoma-180 em camundongos sem provocar efeitos colaterais concomitantes. Em nosso estudo, este composto mostrou-se citotóxico com valores de IC<sub>50</sub> de apenas  $4,78 \pm 0,02 \mu\text{M}$  (ou 0,002 g/L) em 24 horas e  $2,02 \pm 0,05 \mu\text{M}$  (ou 0,0008 g/L) em 48 horas. O MIC-F também é derivado de aldeídos (ou ácidos) cinâmicos porém é associado a um átomo de flúor. Sua atividade foi primeiramente demonstrada em um estudo com as formas promastigota e amastigota do protozoário *Leishmania amazonensis*, causador da Leishmaniose cutânea, em 2002 (DA SILVA et al., 2002). Em nosso estudo, os valores de IC<sub>50</sub> foram de  $4,36 \pm 0,08 \mu\text{M}$  (ou 0,0017 g/L) em 24 horas e  $1,93 \pm 0,20 \mu\text{M}$  (ou 0,00078 g/L) em 48 horas. Comparativamente, são descritas concentrações inibitórias (IC<sub>50</sub>) de 0,03g/L a 0,15g/L para cisplatina (WU, W. et al., 2014; SONG et al., 2017) e de 4  $\mu\text{M}$  (HE et al., 2015) e 0,00002 g/L (RONCUZZI et al., 2014) para doxorrubicina. Dessa forma, a atividade inibitória *in vitro* do MIC-NO<sub>2</sub> e do MIC-F é tão ou mais eficaz do que aquela provocada pelos quimioterápicos comerciais já utilizados para o tratamento do OS.

A ação de ambos os sais também já foi demonstrada sobre células de hepatocarcinoma (HepG2) nas quais, em 24 horas, o MIC-F reduziu em 50% a viabilidade celular a partir de 25 $\mu\text{M}$ . Já o MIC-NO<sub>2</sub> provocou esse efeito a partir de 50 $\mu\text{M}$  (GOZZI et al., 2015). Apesar dos autores não terem feito curva dose-resposta e o cálculo de IC<sub>50</sub>, esses sais parecem ser mais efetivos sobre as células de osteossarcoma da linhagem MG-63.

Estruturalmente, os quatro compostos possuem em comum o núcleo mesoiônico, porém MIC-NO<sub>2</sub> e MIC-F possuem dupla ligação com o anel aromático do núcleo

mesoiônico. Essa dupla ligação é derivada do aldeído cinâmico e é um dos fatores que colaboram para a maior lipossolubilidade das moléculas, o que poderia explicar seu maior efeito sobre as células de OS. Além disso, a presença de um átomo de flúor no grupo cinamaldeído intensifica o efeito dos compostos mesoiônicos na função mitocondrial, provocando maior redução do consumo de oxigênio, diminuindo a eficácia do controle respiratório e diminuindo significativamente a atividade de enzimas da cadeia respiratória (PIRES ADO et al., 2010).

Uma vez que o ensaio do MTT infere apenas metabolismo celular, a fim de confirmar o potencial citotóxico, realizamos a análise da atividade dos compostos sobre a viabilidade celular. No ensaio de viabilidade celular, na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , ambos os sais reduziram a viabilidade celular em cerca de 75% em 24 horas e em mais de 90% em 48 horas, alcançando citotoxicidade máxima (98,3% a 100%) com 25  $\mu\text{M}$  no tratamento em 48 horas. No estudo de Senff -Ribeiro de 2003, também através do ensaio de exclusão pelo azul de tripan, os autores mostraram que em células de melanoma murino (B16-F10) o composto MIC-NO<sub>2</sub> reduziu a viabilidade celular, em 24 e 48 horas, a partir de 10  $\mu\text{M}$ , alcançando citotoxicidade máxima com cerca de 75  $\mu\text{M}$ . Em 2004, os mesmos autores, trabalhando com diversas linhagens celulares de melanoma humano, mostraram resultados semelhantes, porém com algumas particularidades em relação às linhagens. Na maior parte das linhagens testadas, a concentração de 10  $\mu\text{M}$  em 24 horas variou a redução da viabilidade entre 23% e 56%. Em 48 horas essa redução variou entre 13% e 30%. Nesse estudo a citotoxicidade máxima em 24 horas só foi atingida com a concentração de 75  $\mu\text{M}$  e em 48 horas com 50  $\mu\text{M}$  para duas das quatro linhagens testadas (SENFF-RIBEIRO et al., 2004). Esses resultados reforçam que no nosso estudo as células MG-63 parecem ser mais sensíveis aos sais mesoiônicos MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub>.

O composto MIC-F foi citotóxico em todas as concentrações utilizadas após 24 horas de tratamento reduzindo progressivamente a viabilidade celular para 66,7% com 1  $\mu$ M até 4,02% com 25  $\mu$ M. Com 48 horas de tratamento, esse efeito foi significativo a partir da concentração de 2,5  $\mu$ M, que correspondeu a 64,1% de viabilidade e chegou a citotoxicidade máxima (100%) com 25  $\mu$ M. Para o composto MIC-NO<sub>2</sub>, foi observada citotoxicidade significativa após 24 horas de tratamento com as concentrações de 5, 10 e 25  $\mu$ M, com viabilidade respectiva de 54,6%, 23,3% e 3,1%. Após 48 horas observou-se redução da viabilidade para 53,5%, 24,8%, 7,1% e 1,7% com as concentrações de 2,5, 5, 10 e 25  $\mu$ M, respectivamente.

Com intuito de explorar os mecanismos envolvidos com a citotoxicidade, realizamos o ensaio de citometria de fluxo com iodeto de propídeo e anexina-V nas células tratadas com concentrações de 1 e 5  $\mu$ M, mais baixas do que a IC<sub>50</sub>, por 24h. A indução da apoptose é um dos mecanismos de inibição tumoral promovido por quimioterápicos (RAYCHAUDHURI, 2010). *In vivo*, o índice de apoptose está diretamente relacionado à eficácia da quimioterapia. Em pacientes com câncer gástrico, foi demonstrado que a quimioterapia pré-operatória promove inibição do crescimento tumoral e apoptose de células tumorais em comparação com os pacientes que foram submetidos apenas à cirurgia sem quimioterapia (WU, A. et al., 2014). *In vitro*, o tratamento de células MG-63 com doxorrubicina induz a apoptose celular através da ativação das caspases-3 e 8 (YANG et al., 2017). Da mesma forma, o tratamento com cisplatina induz a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e inibe a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Isso resulta na alteração da razão Bax/Bcl-2, na liberação de citocromo-c e na ativação de vias mitocondriais apoptóticas que levam à ativação das caspases-9 e 3 e a clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase-1 (ZHANG et al., 2017), uma proteína nuclear relacionada a reparo de danos ao DNA (CHAITANYA et al., 2010).

Aqui mostramos que os compostos (MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub>) apresentam tendência em induzir apoptose celular, porém, observamos redução significativa apenas para o composto MIC-NO<sub>2</sub> quando utilizado a 5µM. É possível que as vias de indução da apoptose sejam semelhantes às observadas por Gozzi e colaboradores (2015), os autores observaram que o tratamento de células de hepatocarcinoma com 25 µM dos compostos MIC-NO<sub>2</sub> e MIC-F resultaram, respectivamente, em 11% e 36% das células duplo-positivas (Anexina V e PI). Esse percentual é menor do que a média observada no nosso estudo que foi realizado com concentrações inferiores. Dessa forma, futuramente cabe investigar as vias que levam à apoptose induzida pelos sais mesoiônicos em células de osteossarcoma.

As alterações morfológicas provocadas por esses compostos já foram reportadas na literatura, porém ainda não foram alvo de observação pelo nosso grupo. No estudo de Gozzi e colaboradores (2015), os compostos provocaram perda da organização celular, vacuolização do citoplasma, contração celular, picnose nuclear e presença de corpos apoptóticos (*blebs*). O tratamento *in vitro* de linhagens celulares de melanoma por 2 horas com altas concentrações (25 e 50µM) do composto MIC-NO<sub>2</sub> também provocou essas alterações morfológicas sugestivas de apoptose. Os autores observaram ainda alterações morfológicas como redução do alongamento, aumento do arredondamento celular e completa desorganização do citoesqueleto através da marcação dos filamentos de actina com faloidina conjugada com FITC (SENFF-RIBEIRO et al., 2004).

Da mesma forma, a atividade *in vivo* dos sais mesoiônicos em modelos animais de osteossarcoma ainda não foi investigada pelo nosso grupo. O efeito antitumoral do composto MIC-NO<sub>2</sub> em modelo murino de melanoma já foi demonstrado após tratamento com dose única de 57µmol/Kg por via intraperitoneal. Foi reportada inibição do crescimento do tumor em 80% em comparação aos fármacos já utilizados para o tratamento do melanoma, como a fotemustina (40%) e a dacarbazina (30%). Além disso, houve diminuição do tamanho e do

peso do tumor, em relação aos fármacos supracitados. O efeito foi relacionado às alterações nas funções mitocondriais e à apoptose celular (SENFF-RIBEIRO et al., 2003).

É importante ressaltar (considerar) que as avaliações apresentadas neste estudo foram realizadas em uma única linhagem celular, sendo importante a realização de estudos complementares que corroborem estes dados em outras linhagens de osteossarcoma. Pontuamos que a avaliação das vias de sinalização afetadas pelos compostos, bem como seu efeito no ciclo celular, os danos ao DNA, o seu efeito antitumoral *in vivo* e as características físico-químicas que determinam as suas propriedades *in vivo* e *in vitro* são perspectivas relevantes desse estudo. Acreditamos ainda que a avaliação da sinergia desses compostos com os outros fármacos já utilizados no tratamento do OS, como a doxorrubicina, o metotrexato e a cisplatina, pode ser promissora, uma vez que a sinergia entre compostos pode diminuir os efeitos colaterais indesejáveis, pois possibilitaria a diminuição da dose de cada fármaco, como já demonstrado (YANG et al., 2017).

Outro ponto a ser considerado é a avaliação da atividade *in vivo* em modelo murino de osteossarcoma. Essa avaliação permitiria observar o efeito antitumoral em um modelo complexo e também a toxicidade inespecífica dos compostos, que está relacionada aos efeitos adversos comumente observados na quimioterapia. No contexto dos ensaios pré-clínicos *in vivo*, após a identificação química de um composto candidato, são realizados estudos de segurança farmacológica (ensaio de toxicidade de doses única e repetida, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local, carcinogenicidade) e de toxicocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) (BARBERATO FILHO, 2006; BRASIL, 2013).

Outra perspectiva desse estudo seria investigar se há a especificidade biológica. Novas estratégias como terapias combinadas, imunoterapia e/ou terapia direcionada ao microambiente tumoral estão emergindo no contexto da terapia do câncer (ABARRATEGI et

al., 2016). Mais especificamente, os organosulfurados mostraram efeitos inibitórios específicos para células-tronco no OS (LI et al., 2009) e a metformina, fármaco utilizado para tratamento do diabetes, inibiu o crescimento e a proliferação de células de OS e de células-tronco tumorais do OS (CHEN et al., 2015).

Considerando-se o *status quo* do tratamento do osteossarcoma e os efeitos adversos, os resultados deste estudo podem fazer destes sais mesoiônicos potenciais candidatos para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos para o controle dessa doença.

## 6 CONCLUSÕES

---

- Os sais mesoiônicos MI-4F e MI<sub>3,4</sub>-F não interferem com a viabilidade de células MG-63;
- Os sais mesoiônicos MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> reduzem a viabilidade celular e são citotóxicos para células de osteossarcoma da linhagem MG-63;
- Os sais mesoiônicos MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> induzem a apoptose em células de osteossarcoma da linhagem MG-63;
- Os sais mesoiônicos MIC-F e MIC-NO<sub>2</sub> são moléculas promissoras para pesquisa e desenvolvimento de fármacos para o tratamento do osteossarcoma. Apontamos esses compostos como promissores para aplicação futura no tratamento deste tumor.

## 7 REFERÊNCIAS

---

- ABARRATEGI, A.; TORNIN, J.; MARTINEZ-CRUZADO, L.; HAMILTON, A.; MARTINEZ-CAMPOS, E.; RODRIGO, J. P.; GONZALEZ, M. V.; BALDINI, N.; GARCIA-CASTRO, J.; RODRIGUEZ, R. Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. **Stem Cells Int**, v. 2016, p. 3631764, 2016.
- ALFRANCA, A.; MARTINEZ-CRUZADO, L.; TORNIN, J.; ABARRATEGI, A.; AMARAL, T.; DE ALAVA, E.; MENENDEZ, P.; GARCIA-CASTRO, J.; RODRIGUEZ, R. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 16, p. 3097-113, Aug 2015.
- ANDO, K.; HEYMANN, M. F.; STRESING, V.; MORI, K.; REDINI, F.; HEYMANN, D. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. **Cancers (Basel)**, v. 5, n. 2, p. 591-616, May 24 2013.
- BACCI, G.; FERRARI, S.; MERCURI, M.; LONGHI, A.; FABBRI, N.; GALLETTI, S.; FORNI, C.; BALLADELLI, A.; SERRA, M.; PICCI, P. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities in patients aged 41-60 years: outcome in 34 cases treated with adriamycin, cisplatin and ifosfamide between 1984 and 1999. **Acta Orthop**, v. 78, n. 3, p. 377-84, Jun 2007.
- BACCI, G.; LARI, S. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy in osteosarcoma. **Chir Organi Mov**, v. 86, n. 4, p. 253-68, Oct-Dec 2001.
- BACCI, G.; LONGHI, A.; VERSARI, M.; MERCURI, M.; BRICCOLI, A.; PICCI, P. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. **Cancer**, v. 106, n. 5, p. 1154-61, Mar 01 2006.
- BARBERATO FILHO, S. **Pesquisa e desenvolvimento de fármacos no Brasil: estratégias de fomento**. São Paulo, Brasil: Faculdade de Ciências Farmacêuticas: 192 p. 2006.
- BARTON, C. D.; PIZER, B.; JONES, C.; ONI, L.; PIRMOHAMED, M.; HAWCUTT, D. B. Identifying cisplatin-induced kidney damage in paediatric oncology patients. **Pediatr Nephrol**, Aug 18 2017.
- BERGOVEC, M.; KUBAT, O.; SMERDELJ, M.; SEIWERTH, S.; BONEVSKI, A.; ORLIC, D. Epidemiology of musculoskeletal tumors in a national referral orthopedic department. A study of 3482 cases. **Cancer Epidemiol**, Feb 18 2015.
- BIELACK, S.; JURGENS, H.; JUNDT, G.; KEVRIC, M.; KUHNE, T.; REICHARDT, P.; ZOUBEK, A.; WERNER, M.; WINKELMANN, W.; KOTZ, R. Osteosarcoma: the COSS experience. **Cancer Treat Res**, v. 152, p. 289-308, 2009.
- BIELACK, S. S.; HECKER-NOLTING, S.; BLATTMANN, C.; KAGER, L. Advances in the management of osteosarcoma. **F1000Res**, v. 5, p. 2767, 2016.
- BIELACK, S. S.; KEMPF-BIELACK, B.; DELLING, G.; EXNER, G. U.; FLEGE, S.; HELMKE, K.; KOTZ, R.; SALZER-KUNTSCHEK, M.; WERNER, M.; WINKELMANN, W.; ZOUBEK, A.; JURGENS, H.; WINKLER, K. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 3, p. 776-90, Feb 01 2002.

BOTTER, S. M.; NERI, D.; FUCHS, B. Recent advances in osteosarcoma. **Curr Opin Pharmacol**, v. 16, p. 15-23, Jun 2014.

BRASIL. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 31 de janeiro de 2013 Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.

BROWN, K. T.; KATTAPURAM, S. V.; ROSENTHAL, D. I. Computed tomography analysis of bone tumors: patterns of cortical destruction and soft tissue extension. **Skeletal Radiol**, v. 15, n. 6, p. 448-51, 1986.

BRULAND, O. S.; HOIFODT, H.; SAETER, G.; SMELAND, S.; FODSTAD, O. Hematogenous micrometastases in osteosarcoma patients. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 13, p. 4666-73, Jul 01 2005.

CADENA, S. M.; CARNIERI, E. G.; ECHEVARRIA, A.; DE OLIVEIRA, M. B. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS Lett**, v. 440, n. 1-2, p. 46-50, Nov 27 1998.

CADENA, S. M.; CARNIERI, E. G.; ECHEVARRIA, A.; DE OLIVEIRA, M. B. Interference of MI-D, a new mesoionic compound, on artificial and native membranes. **Cell Biochem Funct**, v. 20, n. 1, p. 31-7, Mar 2002.

CASALI PG, B. J., BERTUZZI A, ET AL. . Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v. 25 Suppl 3, p. iii113-23, Sep 2014.

CEYLAN, N.; BAYRAKTAROGLU, S.; SAVAS, R.; ALPER, H. CT findings of high-attenuation pulmonary abnormalities. **Insights Imaging**, v. 1, n. 4, p. 287-292, Sep 2010.

CHAITANYA, G. V.; STEVEN, A. J.; BABU, P. P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Commun Signal**, v. 8, p. 31, Dec 22 2010.

CHEN, X.; HU, C.; ZHANG, W.; SHEN, Y.; WANG, J.; HU, F.; YU, P. Metformin inhibits the proliferation, metastasis, and cancer stem-like sphere formation in osteosarcoma MG63 cells in vitro. **Tumour Biol**, v. 36, n. 12, p. 9873-83, Dec 2015.

CHUANG, V. P.; WALLACE, S.; BENJAMIN, R. S.; JAFFE, N.; AYALA, A.; MURRAY, J.; ZORNOZA, J.; PATT, Y.; MAVLIGIT, G.; CHARNSANGAVEJ, C.; SOO, C. S. The therapy of osteosarcoma by intraarterial cis-platinum an limb preservation. **Cardiovasc Intervent Radiol**, v. 4, n. 4, p. 229-35, 1981.

CHUNG, L. H.; WU, P. K.; CHEN, C. F.; WENG, H. K.; CHEN, T. H.; CHEN, W. M. Pathological fractures in predicting clinical outcomes for patients with osteosarcoma. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 17, n. 1, p. 503, Dec 28 2016

CICCARESE, F.; BAZZOCCHI, A.; CIMINARI, R.; RIGHI, A.; ROCCA, M.; RIMONDI, E.; PICCI, P.; BACCHI REGGIANI, M. L.; ALBISINNI, U.; ZOMPATORI, M.; VANEL, D. The many faces of pulmonary metastases of osteosarcoma: Retrospective study on 283 lesions submitted to surgery. **Eur J Radiol**, v. 84, n. 12, p. 2679-85, Dec 2015.

CORRADI, D.; WENGER, D. E.; BERTONI, F.; BACCHINI, P.; BOSIO, S.; GOLDONI, M.; UNNI, K. K.; SIM, F. H.; INWARDS, C. Y. Multicentric osteosarcoma: clinicopathologic and radiographic study of 56 cases. **Am J Clin Pathol**, v. 136, n. 5, p. 799-807, Nov 2011.

DA SILVA, E. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; BRAZ, V. R.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. L.; ECHEVARRIA, A. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-

phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **Eur J Med Chem**, v. 37, n. 12, p. 979-84, Dec 2002.

DAHAN, M.; ANRACT, P.; BABINET, A.; LAROUSSERIE, F.; BIAU, D. Proximal femoral osteosarcoma: Diagnostic challenges translate into delayed and inappropriate management. **Orthop Traumatol Surg Res**, Jun 21 2017.

DAMRON, T. A.; WARD, W. G.; STEWART, A. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma: National Cancer Data Base Report. **Clin Orthop Relat Res**, v. 459, p. 40-7, Jun 2007.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, v. 740, p. 364-78, Oct 05 2014.

DELANEY, T. F.; PARK, L.; GOLDBERG, S. I.; HUG, E. B.; LIEBSCH, N. J.; MUNZENRIDER, J. E.; SUIT, H. D. Radiotherapy for local control of osteosarcoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 61, n. 2, p. 492-8, Feb 01 2005

DENDULURI, S. K.; WANG, Z.; YAN, Z.; WANG, J.; WEI, Q.; MOHAMMED, M. K.; HAYDON, R. C.; LUU, H. H.; HE, T. C. Molecular pathogenesis and therapeutic strategies of human osteosarcoma. **J Biomed Res**, v. 30, Aug 30 2015.

DURFEE, R. A.; MOHAMMED, M.; LUU, H. H. Review of Osteosarcoma and Current Management. **Rheumatol Ther**, v. 3, n. 2, p. 221-243, Dec 2016.

DURNALI, A.; ALKIS, N.; CANGUR, S.; YUKRUK, F. A.; INAL, A.; TOKLUOGLU, S.; SEKER, M. M.; BAL, O.; AKMAN, T.; INANC, M.; ISIKDOGAN, A.; DEMIRCI, A.; HELVACI, K.; OKSUZOGLU, B. Prognostic factors for teenage and adult patients with high-grade osteosarcoma: an analysis of 240 patients. **Med Oncol**, v. 30, n. 3, p. 624, 2013.

ENDO, M.; YOSHIDA, T.; YAMAMOTO, H.; ISHII, T.; SETSU, N.; KOHASHI, K.; MATSUNOBU, T.; IWAMOTO, Y.; ODA, Y. Low-grade central osteosarcoma arising from bone infarct. **Hum Pathol**, v. 44, n. 6, p. 1184-9, Jun 2013.

FAHEY, F. H.; TREVES, S. T.; ADELSTEIN, S. J. Minimizing and communicating radiation risk in pediatric nuclear medicine. **J Nucl Med Technol**, v. 40, n. 1, p. 13-24, Mar 2012.

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

FERRARI, S.; SMELAND, S.; MERCURI, M.; BERTONI, F.; LONGHI, A.; RUGGIERI, P.; ALVEGARD, T. A.; PICCI, P.; CAPANNA, R.; BERNINI, G.; MULLER, C.; TIENGHI, A.; WIEBE, T.; COMANDONE, A.; BOHLING, T.; DEL PREVER, A. B.; BROSOJO, O.; BACCI, G.; SAETER, G. Neoadjuvant chemotherapy with high-dose Ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the extremity: a joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 34, p. 8845-52, Dec 01 2005.

FRIEBELE, J. C.; PECK, J.; PAN, X.; ABDEL-RASOUL, M.; MAYERSON, J. L. Osteosarcoma: A Meta-Analysis and Review of the Literature. **Am J Orthop (Belle Mead NJ)**, v. 44, n. 12, p. 547-53, Dec 2015.

FRIEND, S. H.; BERNARDS, R.; ROGELJ, S.; WEINBERG, R. A.; RAPAPORT, J. M.; ALBERT, D. M.; DRYJA, T. P. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. **Nature**, v. 323, n. 6089, p. 643-6, Oct 16-22 1986.

FUCHS, B.; PRITCHARD, D. J. Etiology of osteosarcoma. **Clin Orthop Relat Res**, n. 397, p. 40-52, Apr 2002.

GALUPPO, L. F.; DOS REIS LIVERO, F. A.; MARTINS, G. G.; CARDOSO, C. C.; BELTRAME, O. C.; KLASSEN, L. M.; CANUTO, A. V.; ECHEVARRIA, A.; TELLES, J. E.; KLASSEN, G.; ACCO, A. Sydnone 1: A Mesoionic Compound with Antitumoral and Haematological Effects In Vivo. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 119, n. 1, p. 41-50, Jul 2016.

GERMAN, J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 93, n. 1, p. 100-6, Jan 1997.

GIBBS, C. P.; KUKEROV, V. G.; REITH, J. D.; TCHIGRINOVA, O.; SUSLOV, O. N.; SCOTT, E. W.; GHIVIZZANI, S. C.; IGNATOVA, T. N.; STEINDLER, D. A. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. **Neoplasia**, v. 7, n. 11, p. 967-76, Nov 2005.

GOORIN, A. M.; HARRIS, M. B.; BERNSTEIN, M.; FERGUSON, W.; DEVIDAS, M.; SIEGAL, G. P.; GEBHARDT, M. C.; SCHWARTZ, C. L.; LINK, M.; GRIER, H. E. Phase II/III trial of etoposide and high-dose ifosfamide in newly diagnosed metastatic osteosarcoma: a pediatric oncology group trial. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 2, p. 426-33, Jan 15 2002.

GOZZI, G. J.; PIRES ADO, R.; VALDAMERI, G.; ROCHA, M. E.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R.; ACCO, A.; ALVES DE SOUZA, C. E.; ECHEVARRIA, A.; MORETTO DOS REIS, C.; DI PIETRO, A.; SUTER CORREIA CADENA, S. M. Selective Cytotoxicity of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Derivatives on Hepatocarcinoma Cells (HepG2). **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130046, 2015.

GRIMER, R. J. Surgical options for children with osteosarcoma. **Lancet Oncol**, v. 6, n. 2, p. 85-92, Feb 2005.

GRIMER, R. J.; BIELACK, S.; FLEGE, S.; CANNON, S. R.; FOLERAS, G.; ANDREEFF, I.; SOKOLOV, T.; TAMINIAU, A.; DOMINKUS, M.; SAN-JULIAN, M.; KOLLENDER, Y.; GOSHEGER, G. Periosteal osteosarcoma--a European review of outcome. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 18, p. 2806-11, Dec 2005.

GRUENER, G.; CAMACHO, P. Paget's disease of bone. **Handb Clin Neurol**, v. 119, p. 529-40, 2014.

GRYNBERG, N.; SANTOS, A.C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and in vivo antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. **Anticancer Drugs**.8(1):88-91. Jan 1997.

HANG, J. F.; CHEN, P. C. Parosteal osteosarcoma. **Arch Pathol Lab Med**, v. 138, n. 5, p. 694-9, May 2014.

HAO, H.; CHEN, L.; HUANG, D.; GE, J.; QIU, Y.; HAO, L. Meta-analysis of alkaline phosphatase and prognosis for osteosarcoma. **Eur J Cancer Care (Engl)**, v. 26, n. 5, Sep 2017.

HAYNES, L.; KASTE, S. C.; NESS, K. K.; WU, J.; ORTEGA-LAUREANO, L.; BISHOP, M.; NEEL, M.; RAO, B.; FERNANDEZ-PINEDA, I. Pathologic fracture in childhood and adolescent osteosarcoma: A single-institution experience. **Pediatr Blood Cancer**, v. 64, n. 4, Apr 2017.

HE, Z.; HU, B.; TANG, L.; ZHENG, S.; SUN, Y.; SHENG, Z.; YAO, Y.; LIN, F. The overexpression of MRP4 is related to multidrug resistance in osteosarcoma cells. **J Cancer Res Ther**, v. 11, n. 1, p. 18-23, Jan-Mar 2015.

HEREMANS, H., A. BILLIAU, J. J. CASSIMAN, J. C. MULIER AND P. DE SOMER. "In vitro cultivation of human tumor tissues. II. Morphological and virological characterization of three cell lines." **Oncology** 35(6): 246-252, 1978

HUVOS, A. G.; ROSEN, G.; MARCOVE, R. C. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. **Arch Pathol Lab Med**, v. 101, n. 1, p. 14-8, Jan 1977.

INCA. CÂNCER NA CRIANÇA E NO ADOLESCENTE NO BRASIL - DADOS DOS REGISTROS DE BASE **POPULACIONAL E DE MORTALIDADE**. Brasil: 2008. ISBN 978-85-7318-139-5.

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

JAFFE, N. Osteosarcoma: review of the past, impact on the future. The American experience. **Cancer Treat Res**, v. 152, p. 239-62, 2009.

JAFFE, N.; KNAPP, J.; CHUANG, V. P.; WALLACE, S.; AYALA, A.; MURRAY, J.; CANGIR, A.; WANG, A.; BENJAMIN, R. S. Osteosarcoma: intra-arterial treatment of the primary tumor with cis-diammine-dichloroplatinum II (CDP). Angiographic, pathologic, and pharmacologic studies. **Cancer**, v. 51, n. 3, p. 402-7, Feb 01 1983.

JAIN, A. K.; VAIDYA, A.; RAVICHANDRAN, V.; KASHAW, S. K.; AGRAWAL, R. K. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: a review. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 11, p. 3378-95, Jun 1 2012.

KIM, K.-W., ROH, J.K., WEE, H.-J., KIM, C. **Cancer Drug Discovery**. 1a. Springer, 2016. ISBN 9789402408447.

KIM, S. H.; SHIN, K. H.; MOON, S. H.; JANG, J.; KIM, H. S.; SUH, J. S.; YANG, W. I. Reassessment of alkaline phosphatase as serum tumor marker with high specificity in osteosarcoma. **Cancer Med**, v. 6, n. 6, p. 1311-1322, Jun 2017a.

KUBO, T.; FURUTA, T.; JOHAN, M. P.; OCHI, M.; ADACHI, N. Value of diffusion-weighted imaging for evaluating chemotherapy response in osteosarcoma: A meta-analysis. **Mol Clin Oncol**, v. 7, n. 1, p. 88-92, Jul 2017

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

LEWIS, V. O. What's new in musculoskeletal oncology. **J Bone Joint Surg Am**, v. 91, n. 6, p. 1546-56, Jun 2009.

LI, J.; LIU, W.; ZHAO, K.; ZHANG, Y.; LI, X.; YANG, Q.; LI, Z.; LI, J. Diallyl trisulfide reverses drug resistance and lowers the ratio of CD133+ cells in conjunction with methotrexate in a human osteosarcoma drug-resistant cell subline. **Mol Med Rep**, v. 2, n. 2, p. 245-52, Mar-Apr 2009.

LI, X.; ASHANA, A. O.; MORETTI, V. M.; LACKMAN, R. D. The relation of tumour necrosis and survival in patients with osteosarcoma. **Int Orthop**, v. 35, n. 12, p. 1847-53, Dec 2011.

LINDSEY, B. A.; MARKEL, J. E.; KLEINERMAN, E. S. Osteosarcoma Overview. **Rheumatol Ther**, v. 4, n. 1, p. 25-43, Jun 2017.

LINK, M. P.; GOORIN, A. M.; MISER, A. W.; GREEN, A. A.; PRATT, C. B.; BELASCO, J. B.; PRITCHARD, J.; MALPAS, J. S.; BAKER, A. R.; KIRKPATRICK, J. A.; ET AL. The effect of

adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. **N Engl J Med**, v. 314, n. 25, p. 1600-6, Jun 19 1986

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A., 3RD. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 10, p. 853-62, Oct 2004.

LONGHI, A.; PASINI, A.; CICOGNANI, A.; BARONIO, F.; PELLACANI, A.; BALDINI, N.; BACCI, G. Height as a risk factor for osteosarcoma. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 27, n. 6, p. 314-8, Jun 2005.

LUETKE, A., P. A. MEYERS, I. LEWIS AND H. JUERGENS. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. **Cancer Treat Rev** 40(4): 523-532, May 2014.

MAI, P. L.; KHINCHA, P. P.; LOUD, J. T.; DECASTRO, R. M.; BREMER, R. C.; PETERS, J. A.; LIU, C. Y.; BLUEMKE, D. A.; MALAYERI, A. A.; SAVAGE, S. A. Prevalence of Cancer at Baseline Screening in the National Cancer Institute Li-Fraumeni Syndrome Cohort. **JAMA Oncol**, Aug 03 2017.

MANOHAR, S.; LEUNG, N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. **J Nephrol**, Apr 05 2017.

MARINA, N.; GEBHARDT, M.; TEOT, L.; GORLICK, R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. **Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 422-41, 2004.

MARINA, N. M.; SMELAND, S.; BIELACK, S. S.; BERNSTEIN, M.; JOVIC, G.; KRAILO, M. D.; HOOK, J. M.; ARNDT, C.; VAN DEN BERG, H.; BRENNAN, B.; BRICHARD, B.; BROWN, K. L. B.; BUTTERFASS-BAHLOUL, T.; CALAMINUS, G.; DALDRUP-LINK, H. E.; ERIKSSON, M.; GEBHARDT, M. C.; GELDERBLUM, H.; GERSS, J.; GOLDSBY, R.; GOORIN, A.; GORLICK, R.; GRIER, H. E.; HALE, J. P.; HALL, K. S.; HARDES, J.; HAWKINS, D. S.; HELMKE, K.; HOGENDOORN, P. C. W.; ISAKOFF, M. S.; JANEWAY, K. A.; JÜRGENS, H.; KAGER, L.; KÜHNE, T.; LAU, C. C.; LEAVEY, P. J.; LESSNICK, S. L.; MASCARENHAS, L.; MEYERS, P. A.; MOTT, H.; NATHRATH, M.; PAPAI, Z.; RANDALL, R. L.; REICHARDT, P.; RENARD, M.; SAFWAT, A. A.; SCHWARTZ, C. L.; STEVENS, M. C. G.; STRAUSS, S. J.; TEOT, L.; WERNER, M.; SYDES, M. R.; WHELAN, J. S. Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial. **The Lancet. Oncology**, v. 17, n. 10, p. 1396-1408, 2016.

MARULANDA, G. A.; HENDERSON, E. R.; JOHNSON, D. A.; LETSON, G. D.; CHEONG, D. Orthopedic surgery options for the treatment of primary osteosarcoma. **Cancer Control**, v. 15, n. 1, p. 13-20, Jan 2008.

MCGOWAN, J. V.; CHUNG, R.; MAULIK, A.; PIOTROWSKA, I.; WALKER, J. M.; YELLON, D. M. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 31, n. 1, p. 63-75, Feb 2017.

MENDEZ-SANCHEZ, S. C.; MARTINEZ, G. R.; ROMAO, S.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; ROCHA, M. E.; NOLETO, G. R.; CARNIERI, E. G.; CADENA, S. M.; DE OLIVEIRA, M. B. The inhibition of lipoperoxidation by mesoionic compound MI-D: a relationship with its uncoupling effect and scavenging activity. **Chem Biol Interact**, v. 179, n. 2-3, p. 125-30, May 15 2009.

MERCURI, M.; CAPANNA, R.; MANFRINI, M.; BACCI, G.; PICCI, P.; RUGGIERI, P.; FERRUZZI, A.; FERRARO, A.; DONATI, D.; BIAGINI, R.; ET AL. The management of malignant bone tumors in children and adolescents. **Clin Orthop Relat Res**, n. 264, p. 156-68, Mar 1991.

MEYERS, P. A.; SCHWARTZ, C. L.; KRAILO, M.; KLEINERMAN, E. S.; BETCHER, D.; BERNSTEIN, M. L.; CONRAD, E.; FERGUSON, W.; GEBHARDT, M.; GOORIN, A. M.; HARRIS, M. B.; HEALEY, J.; HUVOS, A.; LINK, M.; MONTEBELLO, J.; NADEL, H.; NIEDER, M.; SATO, J.; SIEGAL, G.; WEINER, M.; WELLS, R.; WOLD, L.; WOMER, R.; GRIER, H. Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 9, p. 2004-11, Mar 20 2005

MIKKELSEN, T. S.; THORN, C. F.; YANG, J. J.; ULRICH, C. M.; FRENCH, D.; ZAZA, G.; DUNNENBERGER, H. M.; MARSH, S.; MCLEOD, H. L.; GIACOMINI, K.; BECKER, M. L.; GAEDIGK, R.; LEEDER, J. S.; KAGER, L.; RELLING, M. V.; EVANS, W.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. PharmGKB summary: methotrexate pathway. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 10, p. 679-86, Oct 2011.

MIRABELLO, L.; TROISI, R. J.; SAVAGE, S. A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. **Int J Cancer**, v. 125, n. 1, p. 229-34, Jul 01 2009a.

MIRABELLO, L.; TROISI, R. J.; SAVAGE, S. A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer**, v. 115, n. 7, p. 1531-43, Apr 01 2009b.

MUTSAERS, A. J.; WALKLEY, C. R. Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? **Bone**, v. 62, p. 56-63, May 2014.

PAIOLI, A.; ROCCA, M.; CEVOLANI, L.; RIMONDI, E.; VANEL, D.; PALMERINI, E.; CESARI, M.; LONGHI, A.; ERALDO, A. M.; MARCHESI, E.; PICCI, P.; FERRARI, S. Osteosarcoma follow-up: chest X-ray or computed tomography? **Clin Sarcoma Res**, v. 7, p. 3, 2017.

PAIVA RDE, O.; KNEIPP, L. F.; DOS REIS, C. M.; ECHEVARRIA, A. Mesoionic compounds with antifungal activity against *Fusarium verticillioides*. **BMC Microbiol**, v. 15, p. 11, Feb 04 2015.

PARKIN, D. M.; STILLER, C. A.; NECTOUX, J. International variations in the incidence of childhood bone tumours. **Int J Cancer**, v. 53, n. 3, p. 371-6, Feb 01 1993.

PASS, H. I.; DWYER, A.; MAKUCH, R.; ROTH, J. A. Detection of pulmonary metastases in patients with osteogenic and soft-tissue sarcomas: the superiority of CT scans compared with conventional linear tomograms using dynamic analysis. **J Clin Oncol**, v. 3, n. 9, p. 1261-5, Sep 1985.

PETRILLI, A. S.; BRUNETTO, A. L.; CYPRIANO MDOS, S.; FERRARO, A. A.; DONATO MACEDO, C. R.; SENERCHIA, A. A.; ALMEIDA, M. T.; COSTA, C. M.; LUSTOSA, D.; BORSATO, M. L.; CALHEIROS, L. M.; BARRETO, J. H.; EPELMAN, S.; CARVALHO, E.; ALVES, M. T.; PETRILLI MDE, T.; PENNA, V.; PERICLES, P.; DE CAMARGO, O. P.; GARCIA-FILHO ON BEHALF OF THE BRAZILIAN OSTEOSARCOMA TREATMENT GROUP, R. J. Fifteen Years' Experience of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group (BOTG): A Contribution from an Emerging Country. **J Adolesc Young Adult Oncol**, v. 2, n. 4, p. 145-52, Dec 2013.

PETRILLI, A. S.; DE CAMARGO, B.; FILHO, V. O.; BRUNIERA, P.; BRUNETTO, A. L.; JESUS-GARCIA, R.; CAMARGO, O. P.; PENA, W.; PERICLES, P.; DAVI, A.; PROSPERO, J. D.; ALVES, M. T.; OLIVEIRA, C. R.; MACEDO, C. R.; MENDES, W. L.; ALMEIDA, M. T.; BORSATO, M. L.; DOS SANTOS, T. M.; ORTEGA, J.; CONSENTINO, E. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 7, p. 1161-8, Mar 1 2006.

PIRES ADO, R.; DE OLIVEIRA, M. B.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; ROCHA, M. E.; CARNIERI, E. G.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R.; CADENA, S. M. Comparative study of the

effects of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **Chem Biol Interact**, v. 186, n. 1, p. 1-8, Jun 07 2010.

PIRES ADO, R.; NOLETO, G. R.; ECHEVARRIA, A.; DOS REIS, C. M.; ROCHA, M. E.; CARNIERI, E. G.; MARTINEZ, G. R.; CADENA, S. M. Interaction of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives with mitochondrial membrane and scavenging activity: Involvement of their effects on mitochondrial energy-linked functions. **Chem Biol Interact**, v. 189, n. 1-2, p. 17-25, Jan 15 2011.

POUDEL, R. R.; TIWARI, V.; KUMAR, V. S.; BAKHSHI, S.; GAMANAGATTI, S.; KHAN, S. A.; RASTOGI, S. Factors associated with local recurrence in operated osteosarcomas: A retrospective evaluation of 95 cases from a tertiary care center in a resource challenged environment. **J Surg Oncol**, v. 115, n. 5, p. 631-636, Apr 2017.

RAYCHAUDHURI, S. How can we kill cancer cells: Insights from the computational models of apoptosis. **World J Clin Oncol**, v. 1, n. 1, p. 24-8, Nov 10 2010.

RIBEIRO, A. S. **ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE COMPOSTOS 1,3,4-TIADIAZÓIS MESOIÔNICOS** 2004. 174 (Doutorado). Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RITTER, J.; BIELACK, S. S. Osteosarcoma. **Ann Oncol**, v. 21 Suppl 7, p. vii320-5, Oct 2010.

RONCUZZI, L.; PANCOTTI, F.; BALDINI, N. Involvement of HIF-1 $\alpha$  activation in the doxorubicin resistance of human osteosarcoma cells. **Oncol Rep**, v. 32, n. 1, p. 389-94, Jul 2014.

ROSEN, G.; CAPARROS, B.; HUVOS, A. G.; KOSLOFF, C.; NIRENBERG, A.; CACAVIO, A.; MARCOVE, R. C.; LANE, J. M.; MEHTA, B.; URBAN, C. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. **Cancer**, v. 49, n. 6, p. 1221-30, Mar 15 1982

SCHWARZ, R.; BRULAND, O.; CASSONI, A.; SCHOMBERG, P.; BIELACK, S. The role of radiotherapy in osteosarcoma. **Cancer Treat Res**, v. 152, p. 147-64, 2009.

SCULLY, S. P.; GHERT, M. A.; ZURAKOWSKI, D.; THOMPSON, R. C.; GEBHARDT, M. C. Pathologic fracture in osteosarcoma : prognostic importance and treatment implications. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84-a, n. 1, p. 49-57, Jan 2002.

SENERCHIA, A. A.; MACEDO, C. R.; FERMAN, S.; SCOPINARO, M.; CACCIAVILLANO, W.; BOLDRINI, E.; LINS DE MORAES, V. L.; REY, G.; DE OLIVEIRA, C. T.; CASTILLO, L.; ALMEIDA, M. T.; BORSATO, M. L.; LIMA, E.; LUSTOSA, D.; BARRETO, J. H.; EL-JAICK, T.; AGUIAR, S.; BRUNETTO, A.; GREGGIANI, L.; COGO-MOREIRA, H.; ATALLAH, A.; PETRILLI, A. S. Results of a randomized, prospective clinical trial evaluating metronomic chemotherapy in nonmetastatic patients with high-grade, operable osteosarcomas of the extremities: A report from the Latin American Group of Osteosarcoma Treatment. **Cancer**, v. 123, n. 6, p. 1003-1010, May 15 2017.

SENEFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; FRANCO, C. R.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **Br J Cancer**, v. 91, n. 2, p. 297-304, Jul 19 2004.

SENEFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; SANCHES VEIGA, S.; OLIVEIRA, M. B. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. **Melanoma Res**, v. 13, n. 5, p. 465-71, Oct 2003.

SHIVES, T. C.; DAHLIN, D. C.; SIM, F. H.; PRITCHARD, D. J.; EARLE, J. D. Osteosarcoma of the spine. **J Bone Joint Surg Am**, v. 68, n. 5, p. 660-8, Jun 1986.

SINKS, L. F.; MINDELL, E. R. Chemotherapy of osteosarcoma. **Clin Orthop Relat Res**, n. 111, p. 101-4, Sep 1975

SONG, L.; DUAN, P.; GAN, Y.; LI, P.; ZHAO, C.; XU, J.; ZHANG, Z.; ZHOU, Q. MicroRNA-340-5p modulates cisplatin resistance by targeting LPAATbeta in osteosarcoma. **Braz J Med Biol Res**, v. 50, n. 5, p. e6359, Apr 20 2017.

SPRINGFIELD, D. S.; SCHMIDT, R.; GRAHAM-POLE, J.; MARCUS, R. B., JR.; SPANIER, S. S.; ENNEKING, W. F. Surgical treatment for osteosarcoma. **J Bone Joint Surg Am**, v. 70, n. 8, p. 1124-30, Sep 1988.

STACY, G. S.; LO, R.; MONTAG, A. Infarct-Associated Bone Sarcomas: Multimodality Imaging Findings. **AJR Am J Roentgenol**, v. 205, n. 4, p. W432-41, Oct 2015.

SUTOW, W. W.; SULLIVAN, M. P.; FERNBACH, D. J.; CANGIR, A.; GEORGE, S. L. Adjuvant chemotherapy in primary treatment of osteogenic sarcoma. A Southwest Oncology Group study. **Cancer**, v. 36, n. 5, p. 1598-602, Nov 1975.

TARAN, S. J.; TARAN, R.; MALIPATIL, N. B. Pediatric Osteosarcoma: An Updated Review. **Indian J Med Paediatr Oncol**, v. 38, n. 1, p. 33-43, Jan-Mar 2017.

TSANG, R. Y.; AL-FAYEA, T.; AU, H. J. Cisplatin overdose: toxicities and management. **Drug Saf**, v. 32, n. 12, p. 1109-22, 2009.

VANEL, D.; HENRY-AMAR, M.; LUMBROSO, J.; LEMALET, E.; COUANET, D.; PIEKARSKI, J. D.; MASSELOT, J.; BODDAERT, A.; KALIFA, C.; LE CHEVALIER, T.; ET AL. Pulmonary evaluation of patients with osteosarcoma: roles of standard radiography, tomography, CT, scintigraphy, and tomoscintigraphy. **AJR Am J Roentgenol**, v. 143, n. 3, p. 519-23, Sep 1984.

VARGA, Z. V.; FERDINANDY, P.; LIAUDET, L.; PACHER, P. Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 9, p. H1453-67, Nov 2015.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 6, p. 717-28, Jun 14 2012.

WANG, J.; SUN, M.; LIU, D.; HU, X.; PUI, M. H.; MENG, Q.; GAO, Z. Correlation between apparent diffusion coefficient and histopathology subtypes of osteosarcoma after neoadjuvant chemotherapy. **Acta Radiol**, v. 58, n. 8, p. 971-976, Aug 2017.

WANG, L. L.; GANNAVARAPU, A.; KOZINETZ, C. A.; LEVY, M. L.; LEWIS, R. A.; CHINTAGUMPALA, M. M.; RUIZ-MALDANADO, R.; CONTRERAS-RUIZ, J.; CUNNIFF, C.; ERICKSON, R. P.; LEV, D.; ROGERS, M.; ZACKAI, E. H.; PLON, S. E. Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund-Thomson syndrome. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 9, p. 669-74, May 07 2003.

WHO. **Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone**. 4th. Lyon, France: 2013.

WIDEMANN, B. C.; BALIS, F. M.; KEMPF-BIELACK, B.; BIELACK, S.; PRATT, C. B.; FERRARI, S.; BACCI, G.; CRAFT, A. W.; ADAMSON, P. C. High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. **Cancer**, v. 100, n. 10, p. 2222-32, May 15 2004.

WU, A.; JIA, Y.; DONG, B.; TANG, L.; LIU, Y.; DU, H.; YUAN, P.; DONG, P.; JI, J. Apoptosis and KI 67 index correlate with preoperative chemotherapy efficacy and better predict the survival of gastric cancer patients with combined therapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 73, n. 5, p. 885-93, May 2014.

WU, W.; LI, W.; ZHOU, Y.; ZHANG, C. Inhibition of beclin1 affects the chemotherapeutic sensitivity of osteosarcoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 10, p. 7114-22, 2014.

WU, X. R.; LIU, L.; ZHANG, Z. F.; ZHANG, B.; SUN, H.; CHAN, G. L.; LI, N. Selective protection of normal cells during chemotherapy by RY4 peptides. **Mol Cancer Res**, v. 12, n. 10, p. 1365-76, Oct 2014.

XIAO, W.; MOHSENY, A. B.; HOGENDOORN, P. C.; CLETON-JANSEN, A. M. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. **Clin Sarcoma Res**, v. 3, n. 1, p. 10, Jul 23 2013.

YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochim Biophys Acta**, v. 1845, n. 1, p. 84-9, Jan 2014.

YANG, Q.; LI, S.; FU, Z.; LIN, B.; ZHOU, Z.; WANG, Z.; HUA, Y.; CAI, Z. Shikonin promotes adriamycin-induced apoptosis by upregulating caspase3 and caspase8 in osteosarcoma. **Mol Med Rep**, v. 16, n. 2, p. 1347-1352, Aug 2017.

ZHANG, F.; YU, X.; LIU, X.; ZHOU, T.; NIE, T.; CHENG, M.; LIU, H.; DAI, M.; ZHANG, B. ABT-737 potentiates cisplatin-induced apoptosis in human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway. **Oncol Rep**, v. 38, n. 4, p. 2301-2308, Oct 2017.

ZHANG, Y.; ROSENBERG, A. E. Bone-Forming Tumors. **Surg Pathol Clin**, v. 10, n. 3, p. 513-535, Sep 2017.

ZUMARRAGA, J. P.; BAPTISTA, A. M.; ROSA, L. P.; CAIERO, M. T.; CAMARGO, O. P. Serum values of alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase in osteosarcoma. **Acta Ortop Bras**, v. 24, n. 3, p. 142-6, May-Jun 2016.