UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RODRIGO GUEDES HAKIME

**HOXD10 em osteossarcoma pediátrico: análise do seu valor prognóstico
e envolvimento nos processos de invasão e metástase**

Ribeirão Preto – SP
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RODRIGO GUEDES HAKIME

**HOXD10 em osteossarcoma pediátrico: análise do seu valor prognóstico
e envolvimento nos processos de invasão e metástase**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Biológicas e da Saúde

Orientador: María Sol Brassesco Annichini

Ribeirão Preto – SP
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Hakime, Rodrigo Guedes

HOXD10 em osteossarcoma pediátrico: análise do seu valor prognóstico e envolvimento nos processos de invasão e metástase. Ribeirão Preto, 2020.

81 f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciências Biológicas e da Saúde.

Orientador: Brassesco, María Sol.

1. HOXD10. 2. Osteossarcoma. 3. Metástase.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo n° 16/19226-7);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP;
- Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FAEPA;

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Rodrigo Guedes Hakime

Título: HOXD10 em osteossarcoma pediátrico: análise do seu valor prognóstico e envolvimento nos processos de invasão e metástase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Biológicas e da Saúde

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*À todos os professores que já tive, e que me
permitiram estar onde estou hoje.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dra María Sol Brassesco Annichini, grande responsável por todo meu crescimento profissional desde a iniciação científica. Obrigado por acreditar em mim e me incentivar, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao Prof^o Dr Luiz Gonzaga Tone por ceder o espaço e infraestrutura para o desenvolvimento de parte dos experimentos do meu projeto.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e a Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto pela oportunidade e por todo o aprendizado científico.

Ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio prestado ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, onde realizei grande parte dos meus experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à secretária do programa, Gabriela Bunhotto Zamonier, por toda a paciência em resolver minhas dúvidas.

À Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado e apoio financeiro.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FAEPA pelo apoio financeiro.

Ao serviço de Ortopedia Oncológica HC - FMRP do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FMRP - USP, por auxiliar na coleta das amostras tumorais aqui analisadas.

Ao Prof. Dr Oswaldo Keith Okamoto do Instituto de Biociências da USP e à Prof^a Dra Leticia Fröhlich Archangelo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por gentilmente cederem as linhagens celulares utilizadas para este trabalho.

Ao Leo Batista Cruz, técnico temporário do Laboratório de Biologia Celular e Oncogenética, por toda a organização e facilitação do nosso trabalho durante o tempo que esteve conosco.

À bióloga Rosane de Paula Gomes Queiroz, e as técnicas Veridiana Kill Suazo e Beth Perna, por toda ajuda e paciência durante os experimentos no Departamento de Puericultura e Pediatria do HC.

À Profª Dra Enilza Maria Espreafico da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por nos ceder o espaço de seu laboratório para o desenvolvimento de parte dos nossos experimentos.

À Barbara Yasmin Garcia Andrade, por nos auxiliar com os protocolos e procedimentos de transdução lentiviral.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto - HCFMRP-USP, e à técnica Patrícia Vianna Bonini Palma, por nos disponibilizar o aparelho e nos auxiliar nas análises.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em avaliar meu trabalho.

Aos meus amigos membros do Laboratório de Biologia Celular e Oncogenética ou egressos: Marcela de Oliveira Silva, Gabriela Molinari, Marina Cândido, Larusk Hayann, Mariana Medeiros, Vitor Piotto, Cecília Fagundes, Larissa Aine e, em especial, ao Gabriel Baldissera, com quem compartilhei a mesma rotina de experimentos durante todos estes anos. Agradeço pelo companheirismo e apoio de vocês, além de todas as lembranças que levarei comigo dos momentos juntos.

À todas as pessoas com quem dividi espaços de trabalho em outros laboratórios: Gabriela Vieira, Lara Alberici, Lenisa Geron, Karina Salomão, Graziella Souza, Caio Cesar Damasceno Régia Peixoto, Carolina Alves, Pablo Chagas, Mirella Baroni, Luciana Veronez, Ricardo Bonfim, Gustavo Cruzeiro, Taciane Magalhães, Keterine Rodrigues, Kleiton Borges e Luís Nagano. Agradeço pela amizade e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos meus pais, Antônio e Lúcia, e à minha irmã, Larissa, por todo o apoio, paciência e incentivo em minhas decisões, e por nunca me deixarem desistir.

À minha companheira Thais Pinheiro, por toda a compreensão, apoio e amor durante os momentos mais difíceis, e por comemorar as conquistas ao meu lado.

Ao meu grande amigo Gabriel Brandani, que me abriu as portas de sua casa nestes anos de Mestrado. Obrigado pela companhia diária e por todas as conversas.

À todos os meus familiares que torcem pela minha felicidade e sucesso.

À todos que de algum modo me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

HAKIME, R. G. “**HOXD10 em osteossarcoma pediátrico: análise do seu valor prognóstico e envolvimento nos processos de invasão e metástase**”. 2020, 81f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

O osteossarcoma (OS) é o tumor maligno ósseo de maior incidência em crianças e adolescentes, ocorrendo principalmente nas metáfises dos ossos longos. Apesar de tumores primários responderem bem ao tratamento, apenas 20% dos pacientes com metástases sobrevivem após 5 anos. Deste modo, a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos invasivos e metastáticos desse tipo tumoral torna-se imprescindível. A família de fatores de transcrição HOX, especificamente os clusters HOXA e HOXD, participam no desenvolvimento do tecido ósseo de forma normal, e quando alterados geram complicações nos membros posteriores de camundongos, além de serem associados à promoção de migração e proliferação celular. Estudos preliminares do nosso grupo mostraram que o gene *HOXD10* se apresenta hiperexpresso em amostras de OS. Dessa forma, o presente estudo visou verificar o papel de *HOXD10* na manutenção de processos celulares envolvidos na metástase (migração e invasão celular) através da sua modulação gênica *in vitro* em linhagens de OS (SaOS-2 e U2-OS), além de avaliar seu perfil de expressão em amostras tumorais por imunohistoquímica e sua associação com características clínicas. Nossos resultados sugerem um envolvimento importante de *HOXD10* na capacidade migratória e invasiva das células, possivelmente devido à regulação da expressão de genes como *MMP9* e *PLAU*, associados à manutenção destes processos. Este envolvimento, porém, parece variar entre linhagens de OS. Também foi possível observar uma associação significativa entre menores níveis de expressão de *HOXD10* e maior volume tumoral, menor sobrevida, e pior resposta Huvos. De maneira geral, é possível sugerir que, como acontece em outros tumores de origem mesenquimal, a expressão de *HOXD10* seja uma característica comum dos OS, mas seu papel nos processos invasivos pode variar, refletindo a expressiva heterogeneidade deste tipo tumoral. Os dados ainda sugerem que menores níveis de *HOXD10* implicariam em piores prognósticos, o que o torna um alvo interessante que merece ser melhor investigado neste tumor ósseo.

Palavras-chave: Osteossarcoma, *HOXD10*, metástase, migração celular, invasão celular.

ABSTRACT

HAKIME, R. G. “**HOXD10 in pediatric osteosarcoma: analysis of its prognostic value and involvement in the invasion and metastasis processes.** 2020, 81f. Master’s degree dissertation - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Osteosarcoma (OS) is the most common bone malignant tumor in children and adolescents, occurring mainly in the metaphyses of long bones. Even though primary tumors respond well to treatment, only 20% of patients with metastases survive after 5 years. Therefore, the elucidation of molecular mechanisms underneath the invasive and metastatic processes becomes essential. The HOX family of transcription factors, specifically the HOXA and HOXD clusters, participate during normal bone development, but when altered, they generate complications in the hind limbs of mice, beside being associated with the promotion of cell migration and proliferation. Preliminary results from our group described the *HOXD10* gene as overexpressed in OS. Thus, the present study aimed to verify the role of this transcriptoion factor in maintaining cellular processes involved in metastasis (cell migration and invasion) through its *in vitro* modulation in OS cell lines (SaOS-2 and U2-OS), in addition to evaluate its expression profile by immunohistochemistry, and its possible associations with clinical features. Our results suggest an important involvement of *HOXD10* in the migratory and invasive capacity of cells, possibly regulating the expression of genes such as *MMP9* and *PLAU*, This involvement, however, seems to vary between OS cell lines. Moreover, associations between lower levels of *HOXD10* and higher tumor volume, lower survival, and worse Huvos response were depected. In general, we suggest that, as in other tumors of mesenchymal origin, the *HOXD10* expression is a common feature of OS, but its role may vary, refelcting the expressive heterogeneity of this tumor type. The data algo suggests that lower levels of *HOXD10* would imply worse prognosis in OS, what makes this protein an interesting target that deserves to be further investigated in this tumor type.

Keywords: Osteosarcoma, *HOXD10*, metastasis, cell migration, cell invasion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do osteossarcoma por sítio de lesão, gerado a partir de dados provenientes de 1274 pacientes, e evidenciando a predileção de incidência na região do joelho (em vermelho). Imagem e dados retirados de Dahlin & Unni (1986)	21
Figura 2. A grande família dos genes HOX é composta por 39 genes, distribuídos em 4 clusters (HOXA, HOXB, HOXC e HOXD). A) Organização e o posicionamento dos genes HOX em cada um dos clusters presentes no genoma humano. B) Representação do padrão de expressão dos genes HOX ao longo dos eixos de formação do embrião humano. Note que a sequência dos genes nos clusters reflete o padrão de expressão encontrado ao longo do eixo do embrião. Esta característica é denominada de colinearidade espacial, e evidencia a função dos genes HOX na distinção das diferentes regiões do corpo durante o período embrionário. Imagem retirada do livro Emery's Elements of Medical Genetics (Turnpenny & Ellard, 2016. p.111, 15ª ed)	24
Figura 3. Padrões de expressão de <i>HOXD10</i> já relatados na literatura em diferentes tipos tumorais. A expressão varia de forma aberrante dependendo do tecido acometido pela neoplasia (CARRIO et al., 2005; GABRIELY et al., 2011; SUN et al., 2011; RODINI et al., 2012; WANG et al., 2012; HAKAMI et al., 2014; LI et al., 2014b; LIAO et al., 2014; SVOBODA et al., 2014; XIAO et al., 2014; SHARMA et al., 2015; YANG et al., 2015a; MO et al., 2017; WANG et al., 2017b; CAO et al., 2018; LI et al., 2018)	26
Figura 4. Expressão relativa do <i>HOXD10</i> em amostras de tecido ósseo não neoplásico e amostras tumorais de OS. O <i>HOXD10</i> foi encontrado hiperexpresso nas amostras tumorais em relação ao tecido ósseo normal. Gráfico gerado a partir de dados de RT qPCR produzidos por Roberto (2017). O traço representa a média dos valores	27
Figura 5. Esquema evidenciando possíveis atuações de <i>HOXD10</i> na regulação de fatores envolvidos na manutenção da migração e invasão celular em OS	28
Figura 6. Expressão relativa de <i>HOXD10</i> entre as linhagens celulares selvagens de OS disponíveis em nosso laboratório (HOS, MG63, SaOS-2 e U2-OS). Os valores de expressão foram obtidos através de RT qPCR e normalizados em relação à linhagem HOS (expressão = 1)	33
Figura 7. Mapa do plasmídeo pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>hHOXD10[shRNA#3]. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191209-2164njv	36
Figura 8. Mapa do plasmídeo pLV[shRNA]-EGFP/Puro-U6>Scramble_shRNA. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB151023-10034	36

Figura 9. Mapa do plasmídeo pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro EF1A>hHOXD10[NM_002148.3]. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191003-1112wns	37
Figura 10. Mapa do plasmídeo pLV[Exp]-EGFP/Puro-CMV>Stuffer300. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB181209-1075efx	37
Figura 11. Imagens da linhagem celular de osteossarcoma U2-OS após a transdução com o vetor pLV shRNA HOXD10/Control Vector (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191209-2164njv/VB151023-10034) (A); ou pLV [Exp] HOXD10/Control Vector (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191003-1112wns/VB181209-1075efx) (B), evidenciando a expressão de GFP. Os mesmos resultados foram verificados na linhagem SaOS-2 (não mostrado)	44
Figura 12. Gráficos com níveis de expressão de GFP gerados por citometria de fluxo na linhagem SaOS-2 modulada para o gene <i>HOXD10</i> após transdução viral. A) SaOS-2 <i>Wild-Type</i> ; B) SaOS-2 pLV [Exp] Control Vector; C) SaOS-2 pLV [Exp] HOXD10; D) SaOS-2 pLV sh Control Vector; E) SaOS-2 pLV shHOXD10	45
Figura 13. Gráficos com níveis de expressão de GFP gerados por citometria de fluxo na linhagem U2-OS modulada para o gene <i>HOXD10</i> após transdução viral. A) U2-OS-2 <i>Wild-Type</i> ; B) U2-OS-2 pLV [Exp] Control Vector; C) U2-OS pLV [Exp] HOXD10; D) U2-OS pLV sh Control Vector; E) U2-OS pLV shHOXD10	45
Figura 14. Expressão relativa de <i>HOXD10</i> nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 e U2-OS selvagens (wild-type, WT), ou transduzidas com pLV controle (vetor vazio, V.V.), pLV [Exp]HOXD10 (hiperexpressão, HIPER), ou pLV shHOXD10 (<i>knockdown</i> , KD). Dados obtidos por RT-qPCR realizados no aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). No gráfico estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1)	46
Figura 15. Expressão proteica de HOXD10 verificada por Western-blot nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 e U2-OS selvagens (wild-type, WT), ou transduzidas com pLV [Exp]HOXD10 (hiperexpressão, HIP), ou pLV shHOXD10 (<i>knockdown</i> , KD), e seus respectivos vetores controle (CT). A expressão proteica de Vinculina foi utilizada como controle positivo. kDa = quilodalton (peso molecular)	46

Figura 16. Quantificação das bandas obtidas no experimento de Western-blot, referentes à expressão proteica de HOXD10 nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 e U2-OS selvagens (wild-type, WT), ou transduzidas com pLV [Exp]HOXD10 (hiperexpressão, HIPER), ou pLV shHOXD10 (<i>knockdown</i> , KD), e seus respectivos vetores controle (CT). No gráfico estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação às células <i>wild-type</i> para cada linhagem (expressão = 1)	47
Figura 17. Taxa de invasão relativa nas linhagens SaOS-2 (A, B) e U2-OS (C, D) transduzidas com vetor vazio (V.V.), shHOXD10 (<i>knockdown</i> , KD), ou pLV[Exp] HOXD10 (hiperexpressão, HIP). Imagens de microscopia de campo claro, objetiva de 40x. Nos gráficos estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1)	48
Figura 18. Taxa de migração relativa nas linhagens SaOS-2 (A, B) e U2-OS (C, D) transduzidas com vetor vazio (V.V.), shHOXD10 (<i>knockdown</i> , KD), ou pLV[Exp] HOXD10 (hiperexpressão, HIP). Imagens de microscopia de campo claro, objetiva de 40x. Nos gráficos estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1)	49
Figura 19. Expressão gênica relativa de alvos descritos de HOXD10 e envolvidos nos processos de invasão e migração celular nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 (A) e U2-OS (B) selvagens (wild-type, WT), ou transduzidas com pLV controle (vetor vazio, V.V.), pLV [Exp]HOXD10 (hiperexpressão, HIPER), ou pLV shHOXD10 (<i>knockdown</i> , KD). Nos gráficos estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1)	51
Figura 20. Fotografias representativas das reações de imunohistoquímica para HOXD10 em amostras de osteossarcoma. A) Marcação nuclear de HOXD10 (em marrom); B) Marcação de baixa intensidade; C) Marcação de alta intensidade; D) Marcação de distribuição focal; E) Marcação de distribuição difusa	52
Figura 21. Gráficos evidenciando a relação entre menores níveis de expressão de HOXD10 e maior volume tumoral. A) Comparação entre todas as amostras primárias. B) Comparação dentro do grupo com marcação focal	54

Figura 22. Curvas de sobrevida global e livre de eventos de pacientes de osteossarcoma com baixa ou alta marcação imunohistoquímica para HOXD10. Foi visto uma relação entre menor expressão de HOXD10 e pior sobrevida global quando comparadas todas as amostras **(A)** ou apenas entre aquelas com expressão difusa da proteína **(B)**. As sobrevidas livre de eventos também se mostraram menores quando há menor expressão de HOXD10 **(C)**, ou ainda em amostras com distribuição focal da marcação **(D)** **57**

Figura 23: Análise de correlação entre a expressão de *HOXD10* e *RhoC* em amostras de OS primários. Não houve correlação estatística entre os níveis de expressão dos genes. Dados de expressão de *HOXD10* e *RhoC* produzidos por RT-qPCR e gerados por ROBERTO (2017) e DE OLIVEIRA (2019), respectivamente **62**

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Perfis de <i>Short Tandem Repeats</i> (STRs) apresentados pela ATCC (<i>American Type Culture Collection</i>) e encontrados em nossas análises das linhagens SaOS-2, U2-OS, HeLa e HEK293T	34
Tabela II. Comparação entre a expressão proteica qualitativa de HOXD10 em amostras primárias e metastáticas com alta e baixa intensidade de marcação, e marcação com distribuição focal e difusa. Foi utilizado o teste estatístico chi-quadrado (Chi)	53
Tabela III: Análise qualitativa da expressão HOXD10 em amostras pareadas de tumores primários e metastáticos. Em alguns casos, foram avaliadas mais de uma amostra metastática por paciente. Foi utilizado o teste estatístico chi-quadrado (Chi)	53
Tabela IV. Análise qualitativa da intensidade e distribuição de células marcadas nas amostras de osteossarcoma submetidas à imunohistoquímica. As amostras foram categorizadas em grupos de acordo com os parâmetros clínico-patológicos. Em cinza, valores estatisticamente significativos	55
Tabela V. Análise quantitativa da porcentagem de células marcadas nas amostras de osteossarcoma primário submetidas à imunohistoquímica. As amostras foram categorizadas em grupos de acordo com os parâmetros clínico-patológicos. Em cinza, valores estatisticamente significativos	56
Tabela VI. Análises estatísticas de sobrevida global e sobrevida livre de eventos, entre amostras de osteossarcoma com baixa e alta marcação de HOXD10, e com padrões de marcação focal e difusa	57

LISTA DE SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATRX	<i>Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>
BSP	Sialoproteína óssea
CDK4	Quinase-4 dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar
CO₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAB	Diaminobenzidina
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium / HAM F-12; meios de cultivo celular
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino
GFP	Proteína verde fluorescente
GUS	Beta glucuronidase
HEK293T	Células 293 de rim embrionário humano
HeLa	Henrietta Lacks (linhagem celular derivada de câncer cervical)
HOS	Linhagem celular de osteossarcoma humano
HOX	Genes homeobox
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HRP	Horseradish peroxidase
HSV-1	Vírus da herpes simples 1
IGFBP3	Proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	c-Jun N-terminal cinase
LB	Luria Bertani; meio de cultivo
MEC	Matriz extracelular
MG63	Linhagem celular de osteossarcoma humano
miR	Micro RNA
MMP	Metaloproteinase da matriz
mRNA	RNA mensageiro

MT1-MMP	Metaloproteíase da matriz-tipo 1 de membrana
OC	Osteocalcina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Osteossarcoma
p38	Proteínas quinases ativadas por mitogênio p38
p53	Proteína de tumor p53
PBS	Tampão salina fosfato
PEI	Polietilenoimina
PLAU	Uroquinase Ativadora de plasminogênio (gene)
pLV	Puma lentivirus
RAFLS	sinoviócitos tipo fibroblásticos de artrite reumatóide
pRb	Proteína Retinoblastoma
RhoC	<i>Ras Homolog Family, Member C</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROCK	Proteína quinase associada a Rho
RPMI	Roswell Park Memorial Institute; meio de cultivo
RT qPCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa
S.O.C.	<i>Super Optimal broth with Catabolites repression</i>
SaOS-2	Linhagem celular de osteosarcoma humano
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
SHH	Sonic Hedgehog
shRNA	Short hairpin RNA
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline - Tween</i>
U2-OS	Linhagem celular de osteosarcoma humano
uPA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
uPAR	Receptor do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SIGLAS

cm²	Centímetro quadrado
cm³	Centímetro cúbicos
°C	Graus Celsius
h	Horas
L	Litro
®	Marca registrada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
kDa	Quilodalton
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1.Introdução	19
1.1 Osteossarcoma	20
1.2 A família HOX e o processo de tumorigênese	23
2. Objetivos	30
2.1 Objetivos Gerais	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3. Material e Métodos	32
3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura	33
3.2 Modulação gênica de <i>HOXD10</i> por vetores lentivirais	35
3.3 Extração de RNA e RT-qPCR	38
3.4 Extração de proteínas e Western Blot	39
3.5 Ensaio de migração por <i>wound healing</i>	40
3.6 Ensaio de Invasão em Matrigel	40
3.7 Amostras de pacientes e análise de prognósticos clínicos	41
3.8 Imunohistoquímica	41
3.9 Análise estatística	42
4. Resultados	43
4.1 Modulação gênica de <i>HOXD10</i> em linhagens de osteossarcoma	44
4.2 Influência da modulação de <i>HOXD10</i> na invasão celular de linhagens de osteossarcoma	47
4.3 Influência da modulação de <i>HOXD10</i> na migração celular de linhagens de osteossarcoma	48
4.4 Avaliação da expressão de alvos de <i>HOXD10</i> após modulação gênica	50
4.5 Expressão proteica de <i>HOXD10</i> em amostras de osteossarcoma	51
4.6 Associação entre níveis de expressão de <i>HOXD10</i> e características clínicas	53
5. Discussão	58
6. Conclusões	68
6.1 Conclusão geral	69
6.2 Conclusões pontuais	69
7. Referências Bibliográficas	70

Introdução

1.1 Osteossarcoma

O osteossarcoma (OS) é uma neoplasia maligna de origem mesenquimal que se desenvolve a partir de células precursoras do tecido ósseo. Apesar de compreender menos de 1% dos cânceres em geral (ANDERSON, 2016), o Instituto Nacional do Câncer (INCA) evidencia que o OS corresponde ao tumor maligno ósseo de maior ocorrência na população pediátrica (0 a 19 anos de idade) (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2005).

Embora o câncer nessa faixa etária seja considerado raro quando comparado com tumores que acometem adultos (compreende cerca de 1% de todos os casos de tumores malignos), mundialmente cerca de 300.000 crianças e adolescentes são diagnosticadas com neoplasias a cada ano, representando a segunda causa de mortalidade infantojuvenil (MALOGOLOWKIN et al., 2006; STELIAROVA-FOUCHER et al., 2017). Entre as neoplasias mais frequentes na infância estão as leucemias, linfomas, tumores do sistema nervoso central, retinoblastomas, e sarcomas, dentre os quais o osteossarcoma é o mais frequente, e representa a oitava malignidade mais comum na infância (OTTAVIANI & JAFFE, 2009).

O maior pico de incidência de OS se dá na segunda década de vida, com uma ligeira predominância de casos em indivíduos do sexo masculino (NIE & PENG, 2018). No Brasil, estima-se que anualmente são diagnosticados 350 novos casos de OS em indivíduos de até 19 anos (PETRILLI, 2006). Pode-se observar, porém, um segundo pico de incidência em pacientes com mais de 60 anos, principalmente como consequência de condições predisponentes, como por exemplo a doença de Paget (MIRABELLO et al., 2009).

A maior incidência de OS durante a adolescência, junto com a tendência de aparecimento da doença em meninas antes do que em meninos (NIE & PENG, 2018), têm associado a doença ao rápido crescimento ósseo observado durante a puberdade (MARINA et al., 2004; GILL et al., 2013).

Esta neoplasia pode ocorrer em qualquer região do esqueleto, sendo mais comum no espaço intramedular das metáfises de ossos longos, como na extremidade distal do fêmur (42% dos casos) e extremidade proximal da tíbia (19% dos casos), evidenciando uma predileção de incidência na região do joelho (**Figura 1**). Outras localizações comuns incluem a extremidade proximal do úmero (10%), crânio ou mandíbula (8%) e pelvis (8%). Tumores axiais são mais frequentes em pacientes acima de 60 anos, e o prognóstico é mais desfavorável para tumores do esqueleto apendicular (BIELACK et al., 2002).

Figura 1. Distribuição do osteossarcoma por sítio de lesão, gerado a partir de dados provenientes de 1274 pacientes, e evidenciando a predileção de incidência na região do joelho (em vermelho). Imagem e dados retirados de Dahlin & Unni (1986).

A principal característica do OS é uma proliferação indiscriminada de células mesenquimais malignas, capazes de produzir uma substância osteóide neoplásica e matriz mineralizada (MARINA et al., 2004; FEDERMAN et al., 2009; GILL et al., 2013). Isso resulta em um tumor com grande volume e crescimento radial, que frequentemente rompe o córtex e se associa a tecidos moles, pressionando o tecido muscular ao redor e causando dor na região tumoral (FLETCHER et al., 2002; FEDERMAN et al., 2009). A presença e a composição da matriz celular predominante no tumor é o principal critério utilizado para sua classificação histológica. Assim, atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece uma variedade de tipos: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, de pequenas células, telangiectásio, justacortical, extraesquelético, ou ainda formas de menor grau como periosteal e parosteal (LINDSEY et al., 2017).

Os fatores prognósticos comuns incluem dados demográficos como sexo e idade, além da localização do tumor, tamanho, análise do grau de necrose tumoral após o tratamento (escala Huvos), presença de metástase e resposta à quimioterapia, sendo que um diagnóstico em idades menos avançadas, localização axial do tumor, maior volume tumoral, maior grau de necrose, presença de metástase primária, níveis altos de fosfatase alcalina (ALP) e uma resposta pobre à quimioterapia pré-operatória neoadjuvante são considerados fatores de pior prognóstico (BIELACK et al., 2002; CLARK et al., 2007).

O tratamento utilizado até a década de 1970 era estritamente cirúrgico e praticamente limitado à amputação do membro acometido, uma vez que estes tumores são extremamente resistentes à radioterapia (SCHWARZ et al., 2009). Foi apenas com a incorporação da quimioterapia neoadjuvante ao tratamento deste tipo de tumor que observou-se um aumento de 17% para 70% na sobrevida livre de eventos até cinco anos em pacientes com tumores localizados (LINK et al., 1986). Atualmente, o tratamento consiste na quimioterapia neoadjuvante (pré-operatória), remoção cirúrgica do tumor e quimioterapia adjuvante (pós-operatória) (BIELACK et al., 2002; HAYDEN & HOANG, 2006). Os principais quimioterápicos administrados são metotrexato, doxorubicina, cisplatina e, mais recentemente, etoposídeo e ifosfamida (GILL et al., 2013). As terapias, porém, pouco evoluíram para o tratamento de pacientes diagnosticados com OS nos últimos 30 anos, o que aponta uma necessidade de identificação de marcadores preditivos para este tipo de tumor, que possam vir a ser utilizados em novas abordagens terapêuticas (BRAMWELL, 1997; BACCI et al., 2000; ISAKOFF et al., 2015).

Grande parte das dificuldades ainda encontradas no tratamento do OS se deve ao seu caráter heterogêneo e de alta instabilidade genômica. Anormalidades cromossômicas envolvendo ganhos, perdas ou rearranjos são encontradas em cerca de 70% dos tumores (FLETCHER et al., 2002; GORLICK & KANNA, 2010). Além disso, os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento deste tumor ainda não estão elucidados e, apesar de ser comum a desregulação dos diferentes componentes de vias de desenvolvimento embrionário na tumorigênese dos tumores pediátricos (REYA & CLEVERS, 2005; DELLOVADE et al., 2006; KELLEHER et al., 2006; STRAHM, B. & MALKIN, 2006), encontramos apenas algumas associações de OS com mutações em genes específicos, como *p53*, *pRb*, *FOS* e *CDK4* (HAYDEN & HOAGAN, 2006; GORLICK & KHANNA, 2010).

Mas sem dúvidas o maior empecilho no tratamento de OS compreende os casos de tumores metastáticos. Aproximadamente 20% dos pacientes com OS já apresentam metástases detectáveis ao diagnóstico (BIELACK et al., 2002), enquanto um terço daqueles com tumores localizados experimentam episódios de recorrência local e metástase após o tratamento (LIU et al., 2011). Cerca de 80% dos casos metastáticos acometem os pulmões, seguido de 15% dos

casos em ossos (KEMPF-BIELACK et al., 2005; HAYDEN & HOANG, 2006; ISAKOFF et al., 2015). Mesmo sob quimioterapia, apenas 20% dos pacientes que apresentam metastase sobrevivem cinco anos, uma diferença expressiva em relação a sobrevida de 70% observados em casos não-metastáticos (GORLICK & KHANNA, 2010; BRENNECKE et al., 2013).

Dessa forma, estudos mais aprofundados sobre os mecanismos moleculares envolvidos nas capacidades invasivas e metastáticas do OS se tornam imprescindíveis na busca por novos alvos terapêuticos, visando melhorar a resposta ao tratamento neste tipo de tumor.

O processo de metástase envolve a disseminação de células de um tumor para outros órgãos ou regiões do corpo, o que resulta no surgimento de novos focos tumorais nestes locais. As células tumorais se desprendem do seu tecido primário, invadem a matriz extracelular (MEC) e atingem o sistema vascular ou linfático, onde circulam até se estabelecerem e colonizarem um tecido secundário (CROFT & OLSON, 2008; KUMAR, 2012). Já é conhecida uma enorme quantidade de proteínas envolvidas na promoção e regulação deste processo, incluindo moléculas que participam da interação célula-célula e célula-matriz como integrinas e caderinas (CANEL et al., 2013), moléculas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, como as metaloproteinases (MMPs) e o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) (BLASI et al., 1987; DUFFY et al., 1994). STAMENKOVIC, 2000), fatores envolvidos em processos angiogênicos como VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e interleucinas (DESAI et al., 2013), além de proteínas responsáveis pelo controle do citoesqueleto, capazes de promover forças propulsoras do processo invasivo, como as quinases ROCK1 e ROCK2 (*Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 e 2*) e a GTPase RhoC (MORGAN-FISHER et al., 2013; GUAN et al., 2017).

Neste contexto, a desregulação de genes da grande família HOX também vem sendo associada ao desenvolvimento da capacidade de invasão e migração de diversas células tumorais, e se apresentam como promissores alvos de estudo.

1.2 A família HOX e o processo de oncogênese

A família dos genes HOX codifica fatores de transcrição altamente conservados que atuam durante o desenvolvimento embrionário, principalmente na manutenção da pluripotência ou diferenciação celular, e na regulação do processo de migração celular (HOMBRIA et al., 2003; SEIFERT et al., 2015). Ao longo do desenvolvimento, esses genes são cruciais para a organização dos eixos corporais antero-posterior e proximal-distal, interagindo com outros componentes moleculares já conhecidos por seus papéis na distinção das diferentes

regiões do corpo do embrião, como a proteína Sonic Hedgehog (SHH) (LOPEZ-RIOS, 2016).

Em humanos, a família HOX é composta por 39 genes, derivados de duas duplicações genômicas ocorridas na base evolutiva dos vertebrados, e que por sua vez se encontram subdivididos em 4 clusters genômicos nomeados de acordo com a similaridade de sequência - HOXA, HOXB, HOXC e HOXD – localizados respectivamente nas regiões cromossômicas 7p15.3, 17q21.3, 12q13.3 e 2q31 (APIOU et al., 1996) (**Figura 2A**).

Os genes HOX são transcritos espacialmente de forma marcante e curiosa: a sequência dos genes nos clusters reflete o padrão de expressão encontrado ao longo do eixo do embrião (**Figura 2B**). Esta característica é denominada colinearidade espacial, sendo ela uma grande responsável pela distinção das diferentes regiões do corpo durante o período embrionário (KRUMLAUF, 1994; DUBOULE, 2007; TSCHOPP et al., 2009). Essa distribuição colinear axial dos transcritos HOX é fruto de marcações epigenéticas diferenciadas ao longo do eixo, o que resulta em padrões distintos de remodelamento da cromatina que afetam a transcrição de cada gene de acordo com sua posição dentro do cluster (SOSHNIKOVA & DUBOULE, 2009; NOORDERMEER et al., 2011).

Figura 2. A grande família dos genes HOX é composta por 39 genes, distribuídos em 4 clusters (HOXA, HOXB, HOXC e HOXD). **A)** Organização e o posicionamento dos genes HOX em cada um dos clusters presentes no genoma humano. **B)** Representação do padrão de expressão dos genes HOX ao longo dos eixos de formação do embrião humano. Note que a sequência dos genes nos clusters reflete o padrão de expressão encontrado ao longo do eixo do embrião. Esta característica é denominada de colinearidade espacial, e evidencia a função dos genes HOX na distinção das diferentes regiões do corpo durante o período embrionário. Imagem retirada do livro Emery's Elements of Medical Genetics (Turnpenny & Ellard, 2016. p.111, 15ª ed).

Apesar de mais comumente envolvidos no desenvolvimento embrionário, alguns genes HOX são encontrados expressos em tecidos adultos, o que sugere uma contribuição na manutenção da homeostase celular (MILLER et al., 2001). É esperado, portanto, que a expressão desregulada destes genes possa comprometer a estabilidade de tecidos maduros ao ativar vias de desenvolvimento embrionários que interrompem as rotas de crescimento e diferenciação normais, podendo contribuir para desenvolvimento de uma neoplasia (SHAH & SUKUMAR, 2010).

De fato, tanto o aumento quanto a diminuição na expressão de diferentes membros dessa família parecem ser críticos para o desenvolvimento de tumores adultos, como câncer de cólon, pulmão, bexiga, próstata, ovário, câncer de mama, entre outros (OMATU, 1999; MAKIYAMA et al., 2005; KANAI et al. 2010; BHATLEKAR et al., 2014). Sabe-se ainda que, dependendo do tipo de câncer, um mesmo gene HOX pode se comportar como oncogene ou supressor tumoral (ABATE-SHEN, 2002). A presença de diferentes cofatores e a variação de vias de sinalização encontradas ativas em diferentes tecidos poderiam explicar tal comportamento (PLATAIS et al., 2016).

No caso do OS, estudos recentes apontam a hiper-regulação de *HOXB3*, *HOXB4*, *HOXB7*, *HOXC6* e *HOXC10*, além da atuação de alguns destes genes como fatores contribuintes para a proliferação, invasão, migração e inibição de apoptose e capacidade metastática das células (BODEY et al., 2000; XIONG et al., 2017; YANG et al., 2017). O silenciamento de *HOXC8* levou a inibição do crescimento do OS *in vivo*, e da proliferação e migração das células tumorais *in vitro*, através da inibição de MMP-9 (CHENG et al., 2016c). É notável, portanto, uma atuação oncogênica de genes HOX neste tipo tumoral. Porém, existem genes HOX cujos papéis na tumorigênese do OS permanecem desconhecidos.

Neste contexto, genes dos clusters HOXA e HOXD se tornam alvos interessantes a serem investigados, uma vez que ensaios de perda e ganho de função mostraram que genes destes dois clusters atuam no processo de ossificação endocondral, sendo essenciais para a formação e desenvolvimento dos membros (ZAKANY & DUBOULE, 2007). Embora os mecanismos pelos quais os produtos dos genes HOX contribuem para a osteogênese não estejam completamente elucidados, a ausência de expressão dos mesmos é descrita como um fator que leva a complicações no processo de ossificação (DAVIS & CAPECCHI, 1994; DAVIS & CAPECCHI, 1996; ZAKANY & DUBOULE, 1996; WELLIK & CAPECCHI, 2003; BOULET & CAPECCHI 2004; GROSS et al., 2012).

Carpenter e colaboradores (1997) mostraram que alterações no gene *HOXD10*, especificamente, geraram complicações na adução de membros posteriores, dificultando o caminhar de camundongos. Estes mesmos animais também apresentaram alterações nos

esqueletos axial e apendicular, principalmente na região do joelho, o que é consistente com a alta expressão deste gene no desenvolvimento desta região (**Figura 2B**), e poderia estar relacionado com a enorme incidência de casos de OS envolvendo esta área (**Figura 1**).

A expressão de *HOXD10* varia de forma aberrante entre diferentes tipos de tumores (**Figura 3**). Alguns estudos apontam o gene como supressor tumoral, por atuar na inibição de processos invasivos e proliferativos em casos de gliomas (GABRIELY et al., 2011; SUN et al., 2011), câncer de mama (CARRIO et al., 2005), carcinoma de bexiga (XIAO et al., 2014), câncer de próstata (MO et al., 2017), câncer de tireóide (CAO et al., 2018), câncer de pulmão (LI et al., 2018), carcinoma gástrico (WANG et al., 2012), hepatocelular (LI et al., 2014b; LIAO et al., 2014), e colangiocelular (YANG et al., 2015a). Contudo, também é relatado sua atuação como oncogene em outros tipos de tumor, como carcinoma de cabeça e pescoço (HAKAMI et al., 2014), câncer cervical (SHARMA et al., 2015), câncer colorretal (WANG et al., 2017b), carcinoma de células escamosas bucal (RODINI et al., 2012), e Sarcoma de Ewing, outra neoplasia que acomete o tecido ósseo (SVOBODA et al., 2014; VON HEYKING et al., 2016). Isso evidencia que, assim como outros genes desta família, o papel do *HOXD10* na tumorigênese parece ser dependente do tipo de tecido acometido pelo tumor.

Figura 3. Padrões de expressão de *HOXD10* já relatados na literatura em diferentes tipos tumorais. A expressão varia de forma aberrante dependendo do tecido acometido pela neoplasia (CARRIO et al., 2005; GABRIELY et al., 2011; SUN et al., 2011; RODINI et al., 2012; WANG et al., 2012; HAKAMI et al., 2014; LI et al., 2014b; LIAO et al., 2014; SVOBODA et al., 2014; XIAO et al., 2014; SHARMA et al., 2015; YANG et al., 2015a; MO et al., 2017; WANG et al., 2017b; CAO et al., 2018; LI et al., 2018)

Um estudo preliminar de nosso grupo encontrou que os níveis de *HOXD10* (mRNA) estão significativamente elevados em amostras tumorais de OS (**Figura 4**), sugerindo um papel oncogênico deste gene neste tipo tumoral. Observou-se ainda que a expressão sua expressão na maioria das amostras não neoplásicas, assim como em cultivos primários de osteoblastos normais, foi praticamente nula, o que pode sugerir que *HOXD10* esteja ausente no tecido ósseo maduro (ROBERTO, 2017).

Figura 4. Expressão relativa do *HOXD10* em amostras de tecido ósseo não neoplásico e amostras tumorais de OS. O *HOXD10* foi encontrado hiperexpresso nas amostras tumorais em relação ao tecido ósseo normal. Gráfico gerado a partir de dados de RT qPCR produzidos por Roberto (2017). O traço representa a média dos valores.

As formas pelas quais o *HOXD10* atua no desenvolvimento e progressão tumoral não estão totalmente claras, mas alguns estudos já oferecem informações interessantes (**Figura 5**). É relatado um aumento nos níveis de expressão de *MMP-2* e *MMP-9* após o *knockdown* de *HOXD10* em células de carcinoma hepatocelular (GUO et al., 2017), sugerindo uma regulação negativa deste último sobre as duas MMPs. Sabe-se que *HOXD10* é responsável pela regulação de MT1-MMP (*MMP14*), que por sua vez cliva a forma inativa pró-MMP2, mas não pró-MMP9 (SATO et al., 1994).

Além disso, o estudo de Xue e colaboradores (2013) mostrou que *HOXD10* regula indiretamente uPA (gene *PLAU*) em câncer gástrico através da indução da expressão da proteína

3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP3). Contudo, não existem dados sobre o papel de HOXD10 na regulação desta uroquinase em OS.

Sabe-se ainda que a supressão de HOXD10 por miR-10b permite a expressão da GTPase RhoC (MA et al., 2007, YANG et al., 2015a), envolvida na reorganização citoesquelética (GUAN et al., 2017). Na literatura, o eixo mir-10b/HOXD10/RhoC parece ter um papel importante na remodelação da matriz extracelular, invasão, migração e progressão tumoral (MYERS et al., 2002; MA et al., 2007; SASAYAMA et al., 2009; LIU et al., 2012; NAKAYAMA et al., 2013; WANG et al., 2015b; KNIRSH et al., 2016; WANG et al., 2016). Diferentes estudos mostraram que a superexpressão de *RhoC* acarreta em uma maior motilidade celular em melanoma, e também tem mostrado estimular a motilidade e invasão *in vitro* em células de carcinoma de mama (BORA & SHRIVASTAVA, 2017). Por outro lado, a inibição da expressão de *RhoC* previniu a metástase pulmonar a partir de células cancerosas de bexiga (GRINER et al., 2014), e reduziu o crescimento de linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço (ISLAM et al., 2014).

Figura 5. Esquema evidenciando possíveis atuações de HOXD10 na regulação de fatores envolvidos na manutenção da migração e invasão celular em OS.

Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar a participação de *HOXD10* nos processos de invasão e migração celular em linhagens celulares de OS, assim como verificar os efeitos da modulação deste gene nos níveis de expressão de fatores envolvidos na regulação destes processos e potenciais alvos, como *MMP-2*, *MMP-9*, *MMP-14*, *RhoC* e *PLAU* (uPA). Além disso, pretendeu-se verificar se existe uma relação entre níveis proteicos de *HOXD10* e piores prognósticos clínicos em amostras de OS. Dessa forma, é possível ampliar nosso conhecimento sobre a manutenção de processos celulares envolvidos na osteossarcomagênese, em busca de novas abordagens de combate à metástase.

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho pretendeu analisar o papel da expressão desregulada de HOXD10 em OS, focando principalmente no envolvimento com processos celulares responsáveis pela capacidade metastática do tumor, e evolução clínica em pacientes acometidos pela doença.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar os efeitos da modulação *in vitro* por vetores lentivirais da expressão de *HOXD10* em linhagens de OS em relação à processos envolvidos no processo metastática (migração e invasão celular);
2. Analisar os níveis de expressão gênica de alvos de HOXD10 envolvidos nos processos de migração e invasão celular nas linhagens celulares após transdução lentiviral;
3. Comparar os níveis de expressão proteica do HOXD10 entre amostras primárias e metastáticas de OS através de imunohistoquímica;
4. Analisar a associação entre os níveis de expressão proteica de HOXD10 nas amostras e fatores de prognóstico clínico dos pacientes.

Material e Métodos

3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultura

As linhagens celulares de osteossarcoma disponíveis em nosso laboratório (HOS, MG63, SaOS-2 e U2-OS) expressam níveis distintos de *HOXD10* (**Figura 6**). A linhagem MG63 é a que apresenta maior expressão de *HOXD10*, com níveis cerca de 8 vezes maiores do que a linhagem U2-OS, que apresenta a menor expressão entre as quatro. Para escolher as linhagens celulares de osteossarcoma que seriam utilizadas neste estudo, optamos por aquelas com capacidade tumorigênica conhecida, o que permitiria uma eventual continuação do estudo em modelos *in vivo* futuramente. No ATCC (*American Type Culture Collection*, Virgínia, EUA), somente a linhagem U2-OS é caracterizada como tumorigênica, enquanto não há relatos dessa característica para as linhagens HOS, MG-63 e SaOS-2. Apesar de ser possível encontrar estudos mostrando a indução de tumores com as 4 linhagens celulares citadas anteriormente, as referências com o uso de SaOS-2 e U2-OS são muito mais frequentes (HUANG et al., 2014; NI et al., 2015; TU et al., 2016; MAYR et al., 2017; PAN et al., 2019).

Figura 6. Expressão relativa de *HOXD10* entre as linhagens celulares selvagens de OS disponíveis em nosso laboratório (HOS, MG63, SaOS-2 e U2-OS). Os valores de expressão foram obtidos através de RT qPCR e normalizados em relação à linhagem HOS (expressão = 1).

Dessa maneira, as linhagens celulares de osteossarcoma utilizadas para ensaios funcionais *in vitro* após modulação gênica de *HOXD10* foram SaOS-2 (gentilmente cedida pelo Prof. Oswaldo Keith Okamoto do Instituto de Biociências da USP) e U2-OS (gentilmente cedida pela Prof. Leticia Fröhlich Archangelo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP). Entre elas, SaOS-apresenta níveis de *HOXD10* cerca de quatro vezes maiores do que os níveis de U2-OS. Além das linhagens de OS, foi utilizada a linhagem derivada de câncer cervical HeLa como amostra controle para os experimentos de análise proteica por *Western Blot*, e a linhagem de células embrionárias de rim humano (HEK293T) como empacotadora para produção lentiviral.

Para confirmar a autenticidade das linhagens celulares SaOS-2, U2-OS, HeLa e HEK293T, foi realizada uma análise de microssatélites - *Short Tandem Repeats* (STRs). Amostras de DNA das linhagens celulares foram enviadas ao laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Genética da FMRP-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, e os resultados comparados aos referenciais do ATCC (*American Type Culture Collection*, Virgínia, EUA). Os resultados obtidos para cada uma das linhagens foram congruentes com o relatado (**Tabela I**).

Todas as linhagens foram cultivadas em garrafas de 75cm², incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Utilizou-se meio de cultivo apropriado a cada linhagem (RPMI para SaOS-2, ou DMEM/F12 para U2-OS) complementados com 60mg/L de penicilina, 100mg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (pH entre 7,2 e 7,4). As células em cultura, quando confluentes, foram desprendidas através do uso de 0,05 % da enzima tripsina (Gibco BRL, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), e expandidas para novas garrafas ou congeladas com SBF e 10% DMSO a -80°C.

Tabela I. Perfis de *Short Tandem Repeats* (STRs) apresentados pela ATCC (*American Type Culture Collection*) e encontrados em nossas análises das linhagens SaOS-2, U2-OS, HeLa e HEK293T.

Linhagem	Perfil STR							
	CSF1PO	D13S317	D16S539	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	Vwa
Ref ATCC	10	12;13	12;13	12	8;10	6;9	8	18
SAOS-2	10	12;13	12;13	12	8;10	6;9	8	18
Ref ATCC	13	13	11;12	11	11;12	6;9.3	11;12	14;18
U-2OS	13	13	11;12	11	12	6;9.3	11;12	14;18
Ref ATCC	9;10	12;13.3	9;10	11;12	8;12	7	8;12	16;18
HeLa	9;10	12;13.3	9;10	11;12	8;12	7	8;12	16;18
Ref ATCC	11;12	12;14	9;13	8;9	11	7;9.3	11	16;18;19
HEK 293-T	11;12	12;14	9;13	8;9	11	7;9.3	11	16;18;19

3.2 Modulação gênica de HOXD10 por vetores lentivirais

O silenciamento de *HOXD10* foi obtido por meio do uso dos vetores pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>hHOXD10[shRNA#3] (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191209-2164njv) (**Figura 7**) ou pLV[shRNA]-EGFP/Puro-U6>Scramble_shRNA como controle (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB151023-10034) (**Figura 8**). Para a expressão induzida de *HOXD10*, utilizamos os plasmídeos pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>hHOXD10[NM_002148.3] (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191003-1112wns) (**Figura 9**) ou pLV[Exp]-EGFP/Puro-CMV>Stuffer300 como controle (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB181209-1075efx) (**Figura 10**).

Para a expansão dos plasmídeos, as bactérias foram semeadas em placas de petri contendo meio LB (#L2897; Sigma) suplementado com 100µg/mL de Ampicilina, e incubadas overnight em estufa à 37°C. Em seguida, coletou-se uma colônia da placa de cada vetor, transferiu-se para tubos individuais de cultura, cada um contendo 6mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As culturas foram incubadas overnight em estufa à 37°C, sob agitação.

Os plasmídeos foram purificados utilizando o protocolo QIAprep Spin Midprep Kit (#12145; Qiagen Company, Hilden, Alemanha), segundo instruções do fabricante. Incluindo solução de ressuspensão, solução de lise, solução neutralizante, solução preparadora da coluna, coluna e solução de eluição. Após esse procedimento a solução eluída foi estocada a -20°C. Para analisar o rendimento e a pureza dos plasmídeos, foi utilizado o aparelho NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, DE, EUA).

Figura 7. Mapa do plasmídeo pLV[shRNA]-EGFP:T2A:Puro-U6>hHOXD10[shRNA#3]. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191209-2164njv.

Figura 8. Mapa do plasmídeo pLV[shRNA]-EGFP/Puro-U6>Scramble_shRNA. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB151023-10034.

Figura 9. Mapa do plasmídeo pLV[Exp]-EGFP:T2A:Puro-EF1A>hHOXD10[NM_002148.3]. VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191003-1112wns.

Figura 10. Mapa do plasmídeo pLV[Exp]-EGFP/Puro-CMV>Stuffer300 VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB181209-1075efx.

Para inserção desses vetores nas linhagens celulares SaOS-2 e U2-OS de forma a obter respostas duradouras, optamos pela produção de partículas lentivirais. Para tal, os vetores de interesse, juntamente com vetores empacotadores específicos (pCMV- Δ 8.9 e pCMV-VSVG) e o otimizador de transfecção Polietilenoimina - PEI (Sigma-Aldrich® #306185), foram adicionados sobre cultura de células HEK293T com 50% de confluência em placa de 6 poços, contendo em cada poço 3mL de meio MEM sem soro bovino fetal (SBF) e sem antibiótico. Após 24h, o meio foi substituído por um novo suplementado com 30% de SBF para intensificar a proliferação celular, juntamente com o aumento da produção e liberação das partículas lentivirais. O sobrenadante contendo estas partículas foi coletado 72 horas após transfecção. O conteúdo foi filtrado através de poros de 0,45 μ m com o objetivo de remover quaisquer possíveis resíduos celulares e criopreservado a -80°C até momento da infecção.

Em seguida, procedeu-se a transdução em ambas as linhagens (SaOS-2 e U2-OS). Com esse objetivo, foram semeadas $4,0 \times 10^5$ células por poço em placas de seis poços contendo 2mL de meio de cultivo livre de antibióticos e soro bovino fetal, para que estes não interferissem no processo de transdução. Após o período de aderência, as células foram expostas a 1mL de suspensão viral e centrifugadas por 30min a 2200rpm, sendo posteriormente incubadas por 48 horas à 37°C com 5% de CO₂ em estufa úmida. Decorrido este tempo, o procedimento foi repetido. Após mais 48 horas, o sobrenadante foi apropriadamente descartado e foi adicionado 2mL de meio suplementado. Ao atingir a confluência, as células foram transferidas para garrafas de 25cm³ e posteriormente, de 75cm³. Após aproximadamente um mês de cultivo de expansão foi realizada a seleção positiva através da administração de puomicina (2,5ug/uL). A validação das células transduzidas foi realizada no laboratório de Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto - HCFMRP-USP, através da detecção da expressão de GFP por citometria de fluxo no aparelho FACSÁria III (BD. Bioscience, San Diego, CA, EUA).

3.3 Extração de RNA e RT-qPCR

Esta etapa foi utilizada para confirmação da modulação gênica de *HOXD10* nas linhagens de osteossarcoma e validação de sua atuação em determinados genes alvos. O mRNA foi extraído das culturas celulares por meio do Trizol Reagent (Invitrogen Inc, Carsdab, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida foi quantificado e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização. Sintetizou-se o cDNA dos mRNA-alvos por meio do *kit* High capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para as reações de RT-qPCR, utilizou-se o aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o *kit* SYBR Green

PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific®) ou o kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, #4304437), conforme as instruções dos fabricantes. Foram utilizados como controles endógenos os genes *GUS* (beta glucuronidase) e *HPRT* (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase). A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $2^{\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Para expressão do gene *HOXD10*, utilizamos primers SyBR adquiridos pela Exxtend Biotecnologia Ltda. (Paulínia/SP – Brasil) e desenhados da seguinte maneira: 5' AGTGCAGGAGAAGGAAAGCA 3' (F) e 5' TTCTGCCACTCTTTGCAGTG 3' (R) para *HOXD10*; 5' CCGAGTGAAGATCCCCTTTT 3' (F) e 5' GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT 3' (R) para o endógeno *GUS*; e 5' GCTATTCTTGCCTTTCATTTCAGAA 3' (F) e 5' ACTCTCATCTTAGGCTTTGTATTTTGC 3' (R) para o endógeno *HPRT*.

Para a expressão de potenciais alvos de *HOXD10*, as sondas TaqMan® [MMP2 (Hs01548727_m1), MMP9 (Hs00234579_m1), MMP14 (Hs00237119_m1), RHOC (Hs00237129_m1), PLAU (Hs01547054_m1), *GUS* (4326320E) e *HPRT* (4326321E)] foram adquiridas pelo sistema *by-demand* da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA).

3.4 Extração de Proteínas e Western blot

Mediante essa metodologia é possível confirmar a modulação proteica de *HOXD10*. A extração das proteínas das culturas celulares foi realizada utilizando-se o tampão de lise RIPA® (Thermo Scientific, CA, USA), juntamente com inibidores de protease e fosfatase, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se uma solução de albumina bovina sérica (BSA, 0,1 mg/mL) como padrão. Os valores de absorbância foram obtidos através da leitura em espectrofotômetro (leitor de microplacas) utilizando-se o comprimento de onda de 595nm, no leitor iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA). Para a análise proteica, cada fração (50µg) foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (LAEMMLI, 1970), utilizando-se o sistema Mini Protean II Dual Slab Cell (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e subsequentemente passaram pelo processo de imunodeteção. Para tanto, as membranas foram bloqueadas em leite em pó desnatado 5% (BioRad Laboratories, Inc, CA, EUA #170-6404) diluído em TBS-T 1% por 2 horas e meia em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* em geladeira com os anticorpos primários de *HOXD10* (Abcam®, ab138508) ou *vinculina* (Santa Cruz, sc-55465) diluídos à 1:1000 e 1:10000, respectivamente, em leite desnatado 5%. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes

(5 minutos cada) com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário adequado (mouse ou rabbit) por 1 hora em temperatura ambiente, seguindo-se mais um ciclo de lavagem. O anticorpo secundário foi visualizado através da utilização do substrato quimioluminescente ECL™ Western blotting Analysis System (Abcam®; Cambridge, MA, EUA).

3.5 Ensaio de migração por *wound healing*

Os ensaios de migração *in vitro* foram realizados com as linhagens SaOS-2 e U2-OS de acordo com LIANG et al. (2007), com pequenas alterações. As células transduzidas foram mantidas em condições de cultivo até confluência de 100% em placa de 12 poços e então foi realizado um risco central em cada poço através da retirada mecânica das células nesta região com o auxílio de uma ponteira de 200µl. Assim que realizado este procedimento, isto é, no tempo zero, o risco central foi fotografado. Após 24h a partir do processo de lesão mecânica, as células foram fotografadas, e o software ImageJ® v1.47t (NIH, USA) foi utilizado para calcular a área livre de células. A taxa de migração foi calculada então como a distância em nanômetros migrada ao longo do tempo. Os experimentos foram repetidos três vezes, em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

3.6 Ensaio de Invasão em Matrigel

Para o ensaio de invasão em matrigel, foi adicionado 100µL de matriz de matrigel do *kit* BD Biocoat™ Matrigel™ Matrix–24 well plate (Becton, Dickinson and Company, NJ, EUA) na concentração de 3%, sob os insertos correspondentes a placa de 24 poços. Posteriormente, 5×10^5 células foram plaqueadas no topo da matriz de matrigel em meio apropriado para cada linhagem, sem SBF. Na parte inferior do inserto foi adicionado meio de cultura com 10% de SBF. Após incubadas a 37°C por 24 horas, as células que não invadiram foram removidas da parte superior do inserto com o uso de um *swab* (tipo de haste flexível com algodão na ponta). As células que invadiram foram fixadas com uso de metanol 100% por 15 minutos e coradas com uma solução de Giemsa (3%). As membranas dos insertos foram posteriormente removidas, montadas em lâminas de vidro com Entellan (Merk®) e fotografadas no microscópio de luz clara (magnificação de 40x), para contabilização das células com o auxílio do software ImageJ® v1.47t (NIH, USA) (ABRAMOFF et al., 2004). Os experimentos foram repetidos três vezes, em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão.

3.7 Amostras de pacientes e análise de prognósticos clínicos

A observação de uma possível correlação entre a expressão de HOXD10 e características clínicas de pacientes com OS foi realizada mediante o uso de amostras de OS coletadas pelo serviço de Ortopedia Oncológica HC-FMRP do Departamento de Ortopedia e Anestesiologia FMRP-USP. Imediatamente após a cirurgia, as amostras de tumor foram congeladas a -80°C e estocadas no Banco de Tumores do Laboratório de Oncologia Pediátrica do Hospital das Clínicas (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Proc. 9373/2003) da FMRP-USP. O uso das amostras teve aprovação do respectivo Comitê de Ética (CAAE nº85756218.7.0000.5407) e todas as coletas foram realizadas após assinatura do termo de consentimento pelos pacientes ou seus responsáveis.

Utilizamos um total de 69 amostras, sendo 48 amostras primárias e 21 amostras metastáticas. Dentre esse grupo, todas as amostras neoplásicas eram provenientes de pacientes com idades entre 5 e 26 anos, sendo a idade média de 15 anos, configurando assim um grupo de incidência infanto-juvenil.

Nas análises das associações clínicas foram considerados os seguintes aspectos: idade ao diagnóstico, volume, localização, grau de malignidade, ocorrência de eventos como metástase, óbito, recidiva, e resposta Huvos. Esta última corresponde ao grau de necrose encontrado na peça tumoral após o tratamento neoadjuvante. Esta é classificada em graus de I a IV, sendo os dois primeiros considerados maus respondedores a quimioterapia pré-cirúrgica (necrose tumoral abaixo de 90%) e os dois últimos classificados como bons respondedores (necrose tumoral acima de 90%) (HUVOS et al., 1977). O grau de malignidade tumoral também é classificado de I a IV, sendo os dois primeiros considerados tumores de baixo grau, apresentando baixo nível de atipia nuclear, MEC abundante e concentração celular baixa ou moderada, enquanto que III e IV são tidos como tumores de alto grau, por apresentar alta concentração celular, irregularidades nos contornos nucleares e MEC anormal, imatura e desorganizada (DAMJANOV, 2013). As demais características clínicas foram classificadas quanto a ausência e presença. Infelizmente nem todas as amostras apresentavam todas as informações clínicas e, portanto, o número de amostras varia para cada fator prognóstico analisado.

3.8 Imunohistoquímica

O nível proteico de HOXD10 nas amostras tumorais foi observado por reações de imunohistoquímica realizadas com anticorpo específico (ab172865, Abcam®) e com o kit EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC (Abcam® - ab80436; Cambridge, MA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras de

tumores foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 12 horas e emblocadas em parafina a fim de serem obtidos cortes histológicos de 4µm. Os cortes histológicos foram então submetidos a banhos de xilol e álcool para a completa desparafinização e posterior hidratação. A recuperação antigênica foi realizada em panela à vapor durante 35 minutos em tampão Tris-EDTA pH 9,0, ou tampão específico recomendado pelo datasheet do anticorpo. O bloqueio da peroxidase endógena e das ligações inespecíficas foram realizados, respectivamente, com peróxido de hidrogênio e solução de bloqueio do *kit* por 10 minutos cada. Os anticorpos primários foram diluídos de acordo com o recomendado pelo fabricante e incubados em temperatura ambiente por cerca de duas horas. Após lavagens, os cortes foram incubados com a solução complemento do *kit* por 10 minutos e, em seguida, com o conjugado HRP por 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com solução de diaminobenzidina (DAB) por tempo padronizado para cada anticorpo e contracoradas com Hematoxilina de Harris. Utilizou-se tecidos-controle específicos para o anticorpo, e para controle negativo da reação o anticorpo primário foi substituído por tampão PBS. Finalmente, as lâminas foram avaliadas ao microscópio (Zeiss® modelo AxioPhot) e fotografadas com o auxílio da câmera AxioCam ERc 5 (Zeiss®). Os resultados das imunohistoquímicas foram obtidos de maneira semi-quantitativa, considerando a distribuição e intensidade da imunomarcacão. Para a análise quantitativa, utilizou-se o IHC Image Analysis Toolbox, um *plugin* do software ImageJ. Com ele é possível reconhecer e delimitar a imunomarcacão de HOXD10, o que permite a contagem semiautomática de células marcadas e não marcadas de cada imagem capturada (5 imagens por amostra, magnificacão 400x), que foi usada posteriormente para inferir a porcentagem média de células marcadas de cada uma das amostras. Finalmente, comparou-se a porcentagem de células marcadas entre as amostras com marcacão focal e difusa, e entre as amostras com baixa e alta intensidade de marcacão.

3.9 Análise estatística

Para análise dos ensaios funcionais foram utilizados os testes T-Student ou one-way ANOVA. Para análise da dinâmica de expressão de HOXD10 e sua associacão com os dados clínicos dos pacientes, realizou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney, e para análise da curva de sobrevida o teste de Log-Rank representado sob curvas de Kaplan-Meier. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California EUA), considerando-se o nível de significância de $p = 0,05$.

Resultados

4.1 Modulação gênica de *HOXD10* em linhagens de osteossarcoma

A fim de iniciar os estudos sobre o papel do gene *HOXD10* nos processos de migração e invasão celular em OS, optamos por modular sua expressão em linhagens celulares deste tumor. A transdução dos vetores lentivirais para hiperexpressão e *knockdown* de *HOXD10* nas linhagens SaOS-2 e U2-OS foi confirmada mediante expressão do reporter GFP (**Figura 11**). A fluorescência foi confirmada e utilizada para seleção de células transduzidas através de citometria de fluxo, obtendo um nível de células positivas acima de 97% para Sa-OS e 90% para U2-OS em ambas as modulações (silenciamento e hiperexpressão) (**Figuras 12 e 13**).

Figura 11. Imagens da linhagem celular de osteossarcoma U2-OS após a transdução com o vetor pLV shRNA *HOXD10*/Control Vector (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191209-2164njv/VB151023-10034) (**A**); ou pLV [Exp] *HOXD10*/Control Vector (VectorBuilder Inc, Chicago IL, EUA, #ID VB191003-1112wns/VB181209-1075efx) (**B**), evidenciando a expressão de GFP. Os mesmos resultados foram verificados na linhagem SaOS-2 (não mostrado).

Figura 12. Gráficos com níveis de expressão de GFP gerados por citometria de fluxo na linhagem SaOS-2 modulada para o gene *HOXD10* após transdução viral. **A)** SaOS-2 *Wild-Type*; **B)** SaOS-2 pLV [Exp] Control Vector; **C)** SaOS-2 pLV [Exp] HOXD10; **D)** SaOS-2 pLV sh Control Vector; **E)** SaOS-2 pLV shHOXD10.

Figura 13. Gráficos com níveis de expressão de GFP gerados por citometria de fluxo na linhagem U2-OS modulada para o gene *HOXD10* após transdução viral. **A)** U2-OS-2 *Wild-Type*; **B)** U2-OS-2 pLV [Exp] Control Vector; **C)** U2-OS pLV [Exp] HOXD10; **D)** U2-OS pLV sh Control Vector; **E)** U2-OS pLV shHOXD10.

A modulação gênica de *HOXD10* foi verificada utilizando-se reações de RT-qPCR. Ambas as linhagens apresentaram alteração nos níveis de expressão do gene de estudo (**Figura 14**), sendo possível observar o *knockdown* do gene de maneira mais drástica na linhagem SaOS-2 (expressão 83% menor de *HOXD10* em relação ao vetor vazio; $p = 0,0002$) do que em U2-OS (expressão 55% menor de *HOXD10* em relação ao vetor vazio; $p = 0,0425$). Já a hiperexpressão de *HOXD10* se mostrou mais eficaz em células U2-OS (fold change = 60,6; $p = 0,0026$) do que em SaOS-2 (fold change = 1,88; $p = 0,003$).

Os efeitos da modulação gênica de *HOXD10* na síntese proteica foram observados por Western-Blot. Nesta etapa, porém, não observamos quaisquer diferenças de expressão proteica em ambas as linhagens, sugerindo que a modulação gênica não estaria interferindo na expressão global final de *HOXD10* nestas células (**Figuras 15 e 16**).

Figura 14. Expressão relativa de *HOXD10* nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 e U2-OS selvagens (wild-type, WT), ou transduzidas com pLV controle (vetor vazio, V.V.), pLV [Exp]*HOXD10* (hiperexpressão, HIPER), ou pLV sh*HOXD10* (*knockdown*, KD). Dados obtidos por RT-qPCR realizados no aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). No gráfico estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1).

Figura 15. Expressão proteica de *HOXD10* verificada por Western-blot nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 e U2-OS selvagens (wild-type, WT), ou transduzidas com pLV [Exp]*HOXD10* (hiperexpressão, HIP), ou pLV sh*HOXD10* (*knockdown*, KD), e seus respectivos vetores controle (CT). A expressão proteica de Vinculina foi utilizada como controle positivo. kDa = quilodalton (peso molecular)

Figura 16. Quantificação das bandas obtidas no experimento de Western-blot, referentes à expressão proteica de HOXD10 nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 e U2-OS selvagens (wild-type, WT), ou transduzidas com pLV [Exp]HOXD10 (hiperexpressão, HIPER), ou pLV shHOXD10 (*knockdown*, KD), e seus respectivos vetores controle (CT). No gráfico estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação às células *wild-type* para cada linhagem (expressão = 1).

Contudo a observação da expressão bem sucedida do GFP presente nos plasmídeos em ambas as linhagens abre uma discussão sobre a fidelidade de nossos resultados de Western-blot. Para sanar nossas dúvidas, optamos por realizar os ensaios funcionais com estas células e observar se há diferenças fenotípicas em termos de invasão e migração celular nas linhagens após modulação gênica.

4.2 Influência da modulação de *HOXD10* na invasão celular

No ensaio funcional que buscou avaliar a capacidade invasiva das células em Matrigel®, células SaOS-2 transduzidas com o pLV shHOXD10 apresentaram maiores taxas de invasão ($p=0,024$), enquanto a mesma linhagem transduzida com o vetor de expressão pLV [Exp] HOXD10 teve uma diminuição desta taxa ($p=0,035$) (**Figura 17A e B**). Na linhagem U2-OS, a transdução com o vetor de silenciamento levou a um resultado inverso, diminuindo a capacidade invasiva ($p=0,0447$). Já a transdução com o vetor de expressão não surtiu efeito neste processo para esta linhagem (**Figura 17C e D**).

Figura 17. Taxa de invasão relativa nas linhagens SaOS-2 (**A, B**) e U2-OS (**C, D**) transduzidas com vetor vazio (V.V.), shHOXD10 (*knockdown*, KD), ou pLV[Exp] HOXD10 (hiperexpressão, HIP). Imagens de microscopia de campo claro, objetiva de 40x. Nos gráficos estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1).

4.3 Influência da modulação de *HOXD10* na migração celular

Através do ensaio de migração *Wound Healing* foi possível observar um aumento nas taxas de migração de células SaOS-2 transduzidas com o pLV shHOXD10 ($p=0,0159$), enquanto células da mesma linhagem transduzidas com o vetor de expressão pLV [Exp] HOXD10 tiveram uma diminuição desta taxa ($p=0,0349$) (**Figura 18A e B**). Na linhagem U2-OS, apesar de ser possível notar uma diminuição da capacidade migratória após transdução com o vetor de silenciamento, o resultado não foi estatisticamente significativo ($p=0,2132$), devido ao alto desvio padrão entre as triplicatas experimentais (**Figura 18C e D**).

A **B** **C** **D**

Figura 18. Taxa de migração relativa nas linhagens SaOS-2 (**A, B**) e U2-OS (**C, D**) transduzidas com vetor vazio (V.V.), shHOXD10 (*knockdown*, KD), ou pLV[Exp] HOXD10 (hiperexpressão, HIP). Imagens de microscopia de campo claro, objetiva de 40x. Nos gráficos estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1).

4.4 Avaliação da expressão de alvos de HOXD10 após modulação gênica

Os resultados obtidos a partir dos ensaios funcionais nos levam a crer que, apesar de não termos visto uma alteração nos níveis proteicos de HOXD10 por Western-Blot, é possível que essa alteração tenha de fato ocorrido e seja responsável pelas alterações nas capacidades invasivas e migratórias das células.

Para averiguar esta hipótese, buscamos analisar os níveis de expressão de genes alvo de HOXD10 que codificam proteínas envolvidas nesses processos, como *RhoC*, *MMP2*, *MMP9*, *MMP14* e uPA (*PLAU*), nas linhagens SaOS-2 e U2-OS após a modulação de *HOXD10*.

Nossos resultados em SaOS-2 evidenciam uma alteração no perfil de expressão destes alvos nas células transduzidas de forma a corroborar o papel de HOXD10 descrito na literatura como regulador negativo destes genes. Nestas células, a transdução com o vetor shHOXD10 induziu um aumento de cerca de seis vezes na expressão gênica de *PLAU* ($p=0,0032$), enquanto que a transdução com o vetor de expressão levou a uma diminuição de aproximadamente 60% nos níveis deste mesmo gene ($p=0,0125$). O mesmo padrão foi encontrado para o gene *MMP9* (aumento em 4.62x após o *knockdown* de *HOXD10*, $p=0,0284$; redução de 40% após hiperexpressão de *HOXD10*, $p=0,0312$) (**Figura 19A**). Já a linhagem U2-OS apresentou novamente resultados contrários após o silenciamento de *HOXD10*, quando os genes *PLAU* e *MMP9* tiveram níveis de expressão diminuídos em 30% ($p=0,0425$) e 65% ($p=0,0212$), respectivamente (**Figura 19B**).

Os níveis de *RhoC* não foram alterados após as modulações em U2-OS, enquanto que em SaOS-2, apenas a hiperexpressão de *HOXD10* levou à uma diminuição em 53% dos níveis de *RhoC* ($p=0,0452$). Os níveis de *MMP2* e *MMP14* também foram reduzidos em SaOS-2 de forma sutil em cerca de 30% e 50% (respectivamente) após o silenciamento ($p=0,0218$ para *MMP2* e $p=0,0127$ para *MMP14*) ou hiperexpressão ($p=0,0173$ para *MMP2* e $p=0,0074$ para *MMP14*) de *HOXD10*. O mesmo padrão foi encontrado na linhagem U2-OS após *knockdown* do fator de transcrição ($p=0,0392$ para *MMP2* e $p=0,002$ para *MMP14*) e também após sua hiperexpressão ($p=0,005$ para *MMP2* e $p=0,0139$ para *MMP14*).

Figura 19. Expressão gênica relativa de alvos descritos de HOXD10 e envolvidos nos processos de invasão e migração celular nas linhagens celulares de osteossarcoma SaOS-2 (A) e U2-OS (B) selvagens (wild-type, WT), ou transduzidas com pLV controle (vetor vazio, V.V.), pLV [Exp]HOXD10 (hiperexpressão, HIPER), ou pLV shHOXD10 (knockdown, KD). Nos gráficos estão representadas a média e o desvio-padrão. Os valores de expressão foram normalizados em relação aos respectivos vetores controle para cada linhagem (expressão = 1).

4.5 Expressão proteica de HOXD10 em amostras de osteossarcoma

A fim de verificar de que forma os efeitos de HOXD10 nas capacidades invasivas e migratórias de células de osteossarcoma se refletem na progressão metastática em pacientes com este tipo tumoral, comparamos os níveis de expressão proteica de HOXD10 em amostras

de OS primário e metastático. Como esperado, HOXD10 apresentou marcação nuclear após imunohistoquímica (**Figura 20A**). As amostras foram classificadas de maneira semi-quantitativa de acordo com a intensidade da marcação de HOXD10 (baixa ou alta intensidade), e a distribuição desta marcação ao longo dos cortes histológicos (marcação focal ou difusa) (**Figura 20B-E**).

Figura 20. Fotografias representativas das reações de imunohistoquímica para HOXD10 em amostras de osteossarcoma. **A)** Marcação nuclear de HOXD10 (em marrom); **B)** Marcação de baixa intensidade; **C)** Marcação de alta intensidade; **D)** Marcação de distribuição focal; **E)** Marcação de distribuição difusa.

Encontramos marcações de alta intensidade em 41 das 48 amostras de tumores primários, e em 11 de 21 amostras metastáticas ($p=0,0034$). Já em relação à distribuição focal ou difusa da marcação, não houve diferenças significativas entre os grupos (**Tabela II**). Quantitativamente, contudo, observamos que os níveis de marcação de HOXD10 não variam entre as amostras primárias e metastáticas ($p= 0,8660$).

Em análise pareada (tumor primário e metástase de um mesmo paciente) (**Tabela III**), observou-se que todas as amostras primárias apresentam alta intensidade de marcação, enquanto apenas 50% das amostras metastáticas apresentam este padrão ($p=0,0154$). Em relação à distribuição de marcação, a grande maioria das amostras primárias apresentou marcação focal, enquanto as amostras metastáticas apresentam marcação difusa ($p=0,0306$).

Tabela II. Comparação entre a expressão proteica qualitativa de HOXD10 em amostras primárias e metastáticas com alta e baixa intensidade de marcação, e marcação com distribuição focal e difusa. Foi utilizado o teste estatístico chi-quadrado (Chi).

Análise qualitativa			
	Baixa Expressão	Alta Expressão	Valor p
Natureza			
Primários	7	41	$p = 0,0034$ (Chi)
Metástase	10	11	
	Focal	Difusa	
Natureza			
Primários	25	23	$p = 0,4806$ (Chi)
Metástase	9	12	

Tabela III: Análise qualitativa da expressão HOXD10 em amostras pareadas de tumores primários e metastáticos. Em alguns casos, foram avaliadas mais de uma amostra metastática por paciente. Foi utilizado o teste estatístico chi-quadrado (Chi).

Análise qualitativa			<i>p valor</i>
	Baixa Expressão	Alta Expressão	
Primários (pareado)	0	8	$p = 0,0154$ (Chi)
Metástase (pareado)	7	7	
	Focal	Difusa	
Primários (pareado)	6	1	$p = 0,0306$ (Chi)
Metástase (pareado)	5	9	

4.6 Associação entre níveis de expressão de HOXD10 e características clínicas

Finalmente, optamos por analisar se a regulação por HOXD10 de processos celulares tumorais sugerida até então se reflete em características prognósticas de pacientes. Ao avaliarmos as amostras de OS primário em relação aos parâmetros clínico-patológicos dos respectivos pacientes, algumas associações foram encontradas. Como observado na **tabela IV**, a maior parte dos tumores que acometeram o fêmur, por exemplo, apresentam alta intensidade de marcação ($p=0,0178$). Ainda, tumores com volume superior a 200 cm³ apresentam marcação focal em sua maioria, ($p=0,0130$). Nas amostras metastáticas por sua vez, aquelas classificadas como maus respondedores pelo grau Huvos apresentaram baixa intensidade de marcação ($p=0,0209$).

Em uma análise quantitativa, confirmamos a associação entre menores níveis de expressão do fator de transcrição e maior volume tumoral ($p=0,0388$) (**Figura 21A**). Essa associação aparece mais evidente ainda, quando comparado dentro do grupo de amostras com marcação focal ($p=0,036$) (**Figura 21B**) (**Tabela V**). Dentre as amostras metastáticas, não foi encontrado nenhuma associação com parâmetros clínico-patológicos.

Figura 21. Gráficos evidenciando a relação entre menores níveis de expressão de HOXD10 e maior volume tumoral. **A)** Comparação entre todas as amostras primárias. **B)** Comparação dentro do grupo com marcação focal.

Baseado nesses dados e na tendência observada por RT-qPCR, testamos a hipótese de que as amostras que expressam menos HOXD10 teriam uma pior sobrevida. Para isso, calculamos a mediana do valor de expressão de HOXD10 entre as 48 amostras primárias, e separamos estas amostras em dois grupos: um grupo com amostras cuja expressão é maior do que a mediana geral (Alta Marcação), e outro grupo com as amostras restantes (Baixa Marcação). Os dados de análise da sobrevida se encontram compilados na **Tabela VI**. Como podemos observar na **Figura 22A**, nossa hipótese foi confirmada, com somente cerca de 25% dos pacientes com menores níveis de HOXD10 permanecendo vivos após 5 anos, sendo que nesse mesmo período, a probabilidade dos pacientes com altos níveis de expressão de HOXD10 estarem vivos é de aproximadamente 80% ($p=0,0387$). A mesma situação foi observada ao comparar os níveis de expressão de HOXD10 entre as amostras com marcação difusa (**Figura 22B**).

Ao analisarmos a sobrevida livre de eventos dos pacientes, também encontramos diferenças significativas ao compararmos amostras com baixa e alta intensidade de marcação ($p=0,0191$), e ao compararmos amostras com marcação difusa e focal ($p=0,0224$) (**Figuras 22C e D**).

Tabela IV. Análise qualitativa da intensidade e distribuição de células marcadas nas amostras de osteossarcoma submetidas à imunohistoquímica. As amostras foram categorizadas em grupos de acordo com os parâmetros clínico-patológicos. Em cinza, valores estatisticamente significativos.

Padrão de Expressão		AMOSTRAS PRIMÁRIAS				AMOSTRAS METASTÁTICAS			
INTENSIDADE DA MARCAÇÃO				DISTRIBUIÇÃO DA MARCAÇÃO		INTENSIDADE DA MARCAÇÃO		DISTRIBUIÇÃO DA MARCAÇÃO	
Classificação	Grupos	Baixa (n)	Alta (n)	Focal (n)	Difusa (n)	Baixa (n)	Alta (n)	Focal (n)	Difusa (n)
Grau de Malignidade	Baixo Grau	0	7	2	4	1	1	0	2
	Alto Grau	8	31	21	15	6	6	4	8
	valor p	0,1761		0,2547		1,0000		0,3340	
Huvos	Bom respondedor	2	11	8	5	1	5	2	4
	Mau respondedor	2	17	12	5	5	1	2	4
	valor p	0,6832		0,6023		0,0209		1,0000	
Metástase	Ausência	3	32	8	6	0	0	0	0
	Presença	7	26	17	14	12	11	10	13
	valor p	0,1413		0,8855		-		-	
Recidiva	Ausência	7	25	20	12	5	7	5	7
	Presença	3	12	6	6	7	2	5	6
	valor p	0,8836		0,4526		0,0980		0,8548	
Evento	Ausência	2	13	7	8	1	2	0	3
	Presença	7	24	17	12	8	7	6	9
	valor p	0,4586		0,4503		0,5271		0,1797	
Óbito	Ausência	4	24	16	12	1	4	1	4
	Presença	5	13	8	8	8	5	5	8
	valor p	0,2603		0,6471		0,1144		0,4568	
Idade	< ou igual a 15 anos	3	23	13	13	7	8	6	9
	> do que 15 anos	7	18	13	10	5	3	4	4
	valor p	0,1388		0,6480		0,4691		0,6450	
Volume	< ou igual a 200 cm³	1	12	2	5	3	3	3	2
	> que 200 cm³	7	18	16	4	6	3	3	6
	valor p	0,1452		0,0130		0,5186		0,3340	
Localização	Fêmur	4	23	15	12	7	8	7	8
	Tíbia	0	8	3	5	4	2	1	5
	Tornozelo	0	1	0	1	0	0	0	0
	Fíbila	1	2	2	1	0	1	1	0
	Joelho	1	1	2	0	0	0	0	0
	Íliaco	3	0	2	1	0	0	0	0
	Úmero	0	1	1	0	1	0	1	0
	Maxila	0	3	1	2	0	0	0	0
	Mastóide	0	1	0	1	0	0	0	0
	valor p	0,0178		0,5721		0,4411		0,2198	

Tabela V. Análise quantitativa da porcentagem de células marcadas nas amostras de osteossarcoma primário submetidas à imunohistoquímica. As amostras foram categorizadas em grupos de acordo com os parâmetros clínico-patológicos. Em cinza, valores estatisticamente significativos.

Nível de Expressão				HOXD10			FOCAL			DIFUSA		
Classificação		Grupos		Mediana	Min-Max		Mediana	Min-Max		Mediana	Min-Max	
Grau de Malignidade	Baixo Grau (n=6)		0,4967742	0,4425957 - 0,8016878		n= 2	0,4862512	0,4757282 - 0,4967742		n= 4	0,6454545	0,4425957 - 0,8016878
	Alto Grau (n=37)		0,4293785	0,02497599 - 0,8599752		n= 21	0,3896991	0,02497599 - 0,8139535		n= 15	0,5711253	0,06852792 - 0,8599752
	valor p		0,3653					0,6933			0,6923	
Huvos	Bom respondedor (n=13)		0,4757282	0,024976 - 0,6444834		n= 8	0,6107163	0,02497599 - 0,6444834		n= 5	0,4293785	0,3063063 - 0,4425957
	Mau respondedor (n=17)		0,3705584	0,123386 - 0,8599752		n= 12	0,29680885	0,1233859 - 0,8139535		n= 5	0,6454545	0,2117117 - 0,8599752
	valor p		0,2333					0,1174			0,7531	
Metástase	Ausência (n=14)		0,5218509	0,162531 - 0,859975		n= 8	0,442284	0,162531 - 0,6189736		n= 6	0,6751012	0,4425957 - 0,8599752
	Presença (n=31)		0,43412565	0,024976 - 0,9925		n= 17	0,40012295	0,02497599 - 0,6444834		n= 14	0,6082899	0,2117117 - 0,9925
	valor p		0,9662					0,8401			0,8440	
Recidiva	Ausência (n=32)		0,4862745	0,02497599 - 0,859975		n= 20	0,45270785	0,02497599 - 0,8139535		n= 12	0,5711253	0,2117117 - 0,8599752
	Presença (n=12)		0,4385638	0,1233859 - 0,812968		n= 6	0,3705584	0,1233859 - 0,4967742		n= 6	0,8073277	0,3063063 - 0,8191126
	valor p		0,3735					0,7022			0,1411	
Evento	Ausência (n=15)		0,52592995	0,162531 - 0,859975		n= 7	0,442284	0,162531 - 0,6189736		n= 8	0,72455625	0,4425957 - 0,8599752
	Presença (n=29)		0,43412565	0,024976 - 0,9925		n= 17	0,40012295	0,02497599 - 0,6444834		n= 12	0,6082899	0,2117117 - 0,9925
	valor p		0,3047					0,4274			0,7752	
Óbito	Ausência (n=28)		0,4967742	0,024976 - 0,9925		n= 16	0,4088398	0,02497599 - 0,631016		n= 12	0,78784955	0,4425957 - 0,9925
	Presença (n=16)		0,4293785	0,211712 - 0,8191126		n= 8	0,4296875	0,2473573 - 0,6444834		n= 8	0,3678424	0,2117117 - 0,8191126
	valor p		0,7644					0,4372			0,1076	
Idade	< ou igual a 15 anos (n=26)		0,4237018	0,024976 - 0,9925		n= 13	0,3462604	0,02497599 - 0,8139535		n= 13	0,6751012	0,3063063 - 0,9925
	> do que 15 anos (n=23)		0,5489913	0,1233859 - 0,812968		n= 13	0,53645295	0,1233859 - 0,6444834		n= 10	0,5836527	0,2117117 - 0,8129676
	valor p		0,6999					0,7913			0,5370	
Volume	< ou igual a 200 cm³ (n=7)		0,7740113	0,2117117 - 0,859975		n= 2	0,71646355	0,6189736 - 0,8139535		n= 5	0,7740113	0,2117117 - 0,8599752
	> que 200 cm³ (n=20)		0,48100135	0,02497599 - 0,819113		n= 16	0,4237018	0,02497599 - 0,6444834		n= 4	0,6082899	0,5218509 - 0,8191126
	valor p		0,0388					0,0360			0,8803	
Localização	Fêmur (n=25)		0,457827	0,024976 – 0,859975		n=	0,389699	0,024976 – 0,631016		n=	0,660278	0,211712 – 0,859975
	Tíbia (n=8)		0,620093	0,224924 – 0,9925		n=	0,618974	0,224924 – 0,621212		n=	0,801688	0,442596 – 0,9925
	Tornozelo (n=1)		-	0,571125		n=	-	-		n=	-	0,571125
	Fíbila (n=3)		0,521851	0,438564 – 0,602459		n=	0,520511	0,438564 – 0,602459		n=	-	0,521851
	Joelho (n=2)		0,452708	0,429688 – 0,475728		n=	0,452708	0,429688 – 0,475728		n=	-	-
	Íliaco (n=3)		0,242424	0,123386 – 0,644483		n=	0,383935	0,123386 – 0,644483		n=	-	0,242424
	Úmero (n=1)		-	0,185542		n=	-	0,185542		n=	-	-
	Maxila (n=3)		0,793982	0,774011 – 0,813954		n=	-	0,813953		n=	-	0,774011
	Mastóide (n=1)		0,628571	0,628571		n =	0,628571	0,628571			0,628571	0,628571
	valor p		0,2440					0,4793			0,6897	

Tabela VI. Análises estatísticas de sobrevida global e sobrevida livre de eventos, entre amostras de osteossarcoma com baixa e alta marcação de HOXD10, e com padrões de marcação focal e difusa.

			p valor
Sobrevida Global	Todas as amostras	Baixa marcação X Alta marcação (n=49)	0,0387
		Marcação difusa X Marcação Focal (n=53)	0,3421
	Amostras com marcação focal	Baixa marcação X Alta marcação (n=24)	0,5703
	Amostras com marcação difusa	Baixa marcação X Alta marcação (n=25)	0,0279
Sobrevida Livre de Eventos	Todas as amostras	Baixa marcação X Alta marcação (n=52)	0,0191
		Marcação difusa X Marcação Focal (n=56)	0,0224
	Amostras com marcação focal	Baixa marcação X Alta marcação (n=27)	0,1646
	Amostras com marcação difusa	Baixa marcação X Alta marcação (n=25)	0,2431

Figura 22. Curvas de sobrevida global e livre de eventos de pacientes de osteossarcoma com baixa ou alta marcação imunohistoquímica para HOXD10. Foi visto uma relação entre menor expressão de HOXD10 e pior sobrevida global quando comparadas todas as amostras (A) ou apenas entre aquelas com expressão difusa da proteína (B). As sobrevidas livre de eventos também se mostraram menores quando há menor expressão de HOXD10 (C), ou ainda em amostras com distribuição focal da marcação (D).

Discussão

A incorporação da quimioterapia neoadjuvante como parte do tratamento do OS causou um avanço significativo nas taxas de sobrevivência de pacientes. Desde então, a evolução no tratamento deste tipo de tumor atingiu um platô, não havendo opção para casos que não apresentam uma boa resposta ao tratamento padrão (ZHANG et al., 2015). A situação é ainda mais preocupante quando olhamos para os casos que apresentam metástase, onde a sobrevivência livre de eventos em cinco anos cai para 20%, em contrapartida com os 70% alcançados quando a doença se mantém localizada (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2005; GORLICK & KHANNA, 2010; BRENNECKE et al., 2013). Deste modo, é essencial a procura por novos alvos terapêuticos relacionados à processos celulares reguladores da capacidade metastática de OS.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa encontrou níveis elevados de *HOXD10* (mRNA) em amostras de OS, enquanto que em cultivos primários de osteoblastos normais ou tecido ósseo não-neoplásico maduro, este gene é pouquíssimo expresso (ROBERTO, 2017), sugerindo um papel importante no estabelecimento e/ou progressão dessa doença.

O gene *HOXD10* faz parte de uma família de importantes reguladores celulares que atuam no controle da transcrição gênica, ativando ou reprimindo genes fundamentais para os processos de crescimento e diferenciação celular (HOMBRIA et al., 2003; SEIFERT et al., 2015). Estudos apontam que a maioria dos genes HOX normalmente expressos em um órgão adulto, responsáveis por manter sua homeostase, encontram-se pouco expressos em tumores que incidem nestes mesmos locais (ABATE-SHEN, 2002).

Ao mesmo tempo, genes HOX encontrados hiper-regulados em um determinado tumor, aparentemente são expressos apenas durante o desenvolvimento do órgão acometido (ABATE-SHEN, 2002). Este parece ser o caso do *HOXD10* em OS, uma vez que este gene possui um papel importante durante o desenvolvimento normal do tecido ósseo (CARPENTER, 1997; DLUGASZEWSKA et al., 2006).

Curiosamente, a expressão elevada deste gene promoveu a capacidade invasiva *in vitro* de linhagens celulares de Sarcoma de Ewing, outra neoplasia que acomete o tecido ósseo. O silenciamento deste gene nestas linhagens resultou em supressão de metástase para o pulmão, o que dá suporte à atuação do gene *HOXD10* no potencial metastático deste tipo tumoral (SVOBODA et al., 2014; VON HEYKING et al., 2016).

Diante destes dados, é racional hipotetizarmos um papel oncogênico de *HOXD10* em OS, regulando processos celulares envolvidos na promoção da metástase neste tumor. Desta forma, o presente trabalho teve como primeiro objetivo mostrar os efeitos *in vitro* da modulação gênica de *HOXD10* na capacidade migratória e invasiva de linhagens celulares de OS.

A modulação gênica foi bem sucedida em ambas as linhagens. É notável, porém, a expressiva diferença no *fold change* obtido para cada linhagem após a transdução do vetor de

hiperexpressão. A linhagem U2-OS apresentou níveis de *HOXD10* 600% maiores após a transdução, enquanto a linhagem SaOS-2 obteve um aumento de apenas 88% destes níveis.

Sabe-se que células SaOS-2 são menos permissivas em relação à processos de transdução viral do que células U2-OS (YAO & SCHAFFER, 1995; DESCHAMPS & KALAMVOKI, 2017). Isso porque células U2-OS parecem apresentar modulações em componentes moleculares que facilitam a reprodução viral. Por outro lado, SaOS-2 pode apresentar menos defeitos nestes componentes, o que ofereceria uma barreira para o vírus. A proteína p53, por exemplo, que facilita a infecção viral pelo vírus da herpes simples 1 (HSV-1) (MARUZURU et al., 2013), está ausente em células SaOS-2 mas não totalmente em U2-OS (YAO & SCHAFFER, 1995). Já a proteína ATRX, que contribui para a repressão transcricional e tem um impacto negativo na eficiência de infecção por HSV-1, está ausente em U2-OS (NEWHART et al., 2012).

Paradoxalmente, o *knockdown* de *HOXD10* foi mais eficiente na linhagem SaOS-2, que apresentou uma diminuição de 83% na expressão deste gene em relação à diminuição de 55% obtida em U2-OS. É possível que isto seja efeito dos níveis de expressão selvagem de *HOXD10* nestas linhagens. Células U2-OS apresentam baixíssimos níveis de *HOXD10*, cerca de 4 vezes menores do que SaOS-2 (**Figura 6**), e comparáveis aos níveis praticamente inexistentes encontrados em amostras ósseas não neoplásicas. É compreensível, portanto, que o *knockdown* deste gene nestas células leve à alterações menores de sua expressão.

Células SaOS-2 apresentaram uma maior taxa de migração e invasão celular após o *knockdown* de *HOXD10*, enquanto a hiperexpressão do fator de transcrição nesta linhagem levou à taxas menores destes processos. É sugerido, portanto, que *HOXD10* tenha um papel de supressor de migração e invasão nestas células.

Resultados similares foram vistos com linhagens de carcinoma gástrico, onde a expressão induzida de *HOXD10* resultou em uma diminuição nas taxas de invasão e migração celular (WANG et al., 2012). Da mesma maneira, a expressão induzida de *HOXD10* foi responsável por reestabelecer um padrão não invasivo/progresivo a uma linhagem de câncer de mama altamente metastática (CARRIO et al., 2005). Já o *knockdown* de *HOXD10* ou sua regulação negativa por miR-224 em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular também levou a um aumento nas taxas de invasão e migração (GUO et al., 2017; LI et al., 2014b).

Nossas análises por RT-qPCR mostram maiores níveis de *MMP-9* e *PLAU* (uPA) após o *knockdown* de *HOXD10* em SaOS-2, e menores níveis após a hiperexpressão do fator de transcrição. O ensaio de invasão utilizado neste trabalho requer que as células consigam digerir o Matrigel®, uma substância extraída do tumor Englebreth-Holm-Swarm de camundongo, composto principalmente de proteínas estruturais da MEC como laminina, colágeno IV e enactina (HUGHES et al., 2010). A *MMP-9* integra uma classe de metaloproteinases de matriz

que degradam principalmente colágeno IV (MURPHY et al., 1991), enquanto a proteína uPA é responsável por catalisar a conversão do plasminogênio em sua forma ativa, plasmina, que por sua vez degrada proteínas como laminina (BLASI et al., 1987; DUFFY et al., 1994). Além disso, a plasmina ativa formas latentes de outras proteases, como a própria MMP-9 (MAZZIERI et al., 1997; CHOONG & NADESAPILLAI, 2003; PILLAY et al., 2006). É esperado, portanto, que estas duas proteínas tenham um papel importante na degradação do Matrigel e, por isso, sugerimos que estes sejam os principais responsáveis pelas alterações na capacidade invasiva destas células.

O uPA, juntamente com seu receptor uPAR, desempenham um papel significativo na progressão e metástase de uma série de tumores sólidos, incluindo mama, pulmão, próstata, pâncreas, ovário, rim e cólon (HILDENBRAND et al., 2010). Em OS, níveis elevados de uPA são secretados majoritariamente por células metastáticas, estimulando a taxa de migração destas células (FISHER et al., 2001). Ainda, a inibição desta proteína reduziu a metástase pulmonar em modelos *in vivo* de OS (ENDO-MUNOZ et al., 2015), sendo descrita uma relação inversa entre as taxas de sobrevida e os níveis de uPA neste tumor (CHOONG et al., 1996).

Ainda de maneira consistente, foi descrito que a inibição de HOXD10 por miR-10b em células de glioblastoma aumenta os níveis do gene *PLAU* (LIN et al., 2012). XUE et al. (2013) também mostraram que HOXD10 pode regular indiretamente uPA em câncer gástrico através da indução da expressão da proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP3).

Por sua vez, o aumento nos níveis de expressão de MMP-9 após o *knockdown* de *HOXD10* foi visto em células de carcinoma hepatocelular, acompanhado também pelo aumento de MMP-2 (GUO et al., 2017). A hiperexpressão de *HOXD10* inibiu estas duas metaloproteinases em células de colangiocarcinoma (YANG et al., 2015a), sugerindo uma regulação negativa deste último sobre as duas MMPs.

De forma geral, as metaloproteinases da matriz (MMPs) permitem a migração das células epiteliais neoplásicas por romperem o limite com o tecido conjuntivo, um acontecimento fundamental para o processo de invasão (STAMENKOVIC, 2000; STERNLICHT & WERB, 2001; LI & ANDERSON, 2003; VISSE & NAGASE, 2003). Estudos utilizando as linhagens SaOS-2 e U2-OS mostram que a inibição das metaloproteinases da matriz MMP-2 ou MMP-9 nestas linhagens suprime processos celulares de invasão e migração, além de inibir proliferação e aumentar a apoptose em alguns casos (BJØRNLAND et al., 2005; LEE et al., 2007; DENG et al., 2013; KOJIMA et al., 2014; LI et al., 2014a; SHANG et al., 2014; WANG & WANG, 2014; YUE et al., 2014; MA et al., 2015; WANG et al., 2015a; YANG et al., 2015b; CHENG et al., 2016a; CHENG et al., 2016b; GUO et al., 2016; POHLIG et al., 2016; YU et al., 2016; WANG et al., 2017a; TANG et al., 2019). A

expressão positiva de *MMP9* também já foi associada com a capacidade metastática de OS e sobrevida em uma meta-análise com dados de 816 pacientes (ZHOU et al., 2018). Esta metaloproteinase, portanto, é sugerida como biomarcador para este tipo tumoral.

Ao contrário da maioria das MMPs, que são reguladas majoritariamente em níveis transcricionais, a atividade de MMP-2 é determinada também em níveis pós traducionais pela atividade de MT1-MMP (*MMP-14*), que por sua vez já é extensivamente descrita como alvo de HOXD10 (MYERS et al., 2002), e responsável por clivar a forma inativa pró-MMP-2 em sua forma ativa (STERNLICHT & WERB, 2001). Devido à essa cooperação, é sugerido que a expressão basal de *MMP-2* e *MMP-14* seja corregulada, sendo possível inclusive encontrar similaridades específicas nos promotores destes genes (LOHI et al., 2000). De maneira corroborativa, nós encontramos uma consistência entre os padrões de expressão destas duas metaloproteinases após ambas as transduções lentivirais. A expressão destes genes, porém, é reduzida tanto após o *knockdown* quanto após a hiperexpressão de HOXD10 em ambas as linhagens. Apesar de ser um dado curioso que merece ser melhor investigado, este padrão de expressão de *MMP-2* e *MMP-14* não justifica as diferenças encontradas nas taxas de migração ou invasão de SaOS-2.

Em nossa análise, o perfil de expressão de *RhoC* apresentou alteração apenas após a hiperexpressão de *HOXD10*, o que condiz com o papel apontado do fator de transcrição como regulador negativo de *RhoC* (MA et al., 2007). Contudo, seus níveis não foram alterados após *knockdown* de *HOXD10*, ou ainda nas células U2-OS transduzidas. Não é provável, portanto, que *RhoC* seja responsável pelos fenótipos observados nos ensaios funcionais. Resultados prévios de nosso grupo mostraram que não há uma correlação entre a expressão gênica de *HOXD10* e *RHO*C em amostras tumorais clínicas de OS (**Figura 23**). Estes resultados nos levam à hipótese de que o fator de transcrição não participaria na regulação da movimentação celular por essa via.

Figura 23: Análise de correlação entre a expressão de *HOXD10* e *RhoC* em amostras de OS primários. Não houve correlação estatística entre os níveis de expressão dos genes. Dados de expressão de *HOXD10* e *RhoC* produzidos por RT-qPCR e gerados por ROBERTO (2017) e DE OLIVEIRA (2019), respectivamente.

Em células U2-OS, contudo, observamos resultados distintos dos vistos em SaOS-2 após a modulação de *HOXD10*. Nesta linhagem, a hiperexpressão de *HOXD10* não alterou as taxas de migração ou invasão celular, nem os níveis de expressão dos genes alvo estudados. O silenciamento de *HOXD10*, por outro lado, apresentou resultados contrários aos observados em SaOS-2: houve diminuição da capacidade invasiva e migratória destas células, ainda que esta última não tenha apresentado significância estatística. Estes resultados foram acompanhados por uma redução nos níveis de *PLAU* e *MMP-9*. Sugere-se portanto que a expressão de *HOXD10* seja necessária para a manutenção destes processos celulares em U2-OS.

O mesmo foi sugerido pelo estudo de HAN et al. (2014), que evidenciou a hiperregulação de *HOXD10* em U2-OS correlacionada com a expressão elevada da enzima ciclo-oxygenase-2 (COX-2), que por sua vez leva à um aumento da migração e invasão destas células.

A supressão de processos metastáticos em U2-OS também foi observada após a inibição da via p38/JNK (CHEN et al., 2013), que levou à diminuição dos níveis de MMP-2, MMP-9 e uPA. Apesar da contribuição de *HOXD10* nesta supressão não ter sido avaliada, outro estudo com sinoviócitos tipo fibroblásticos de artrite reumatóide (RAFLS) aponta que a via p38/JNK pode ser afetada pelo silenciamento de *HOXD10* (LUAN et al., 2018), sugerindo que a expressão deste fator seja necessária para a capacidade metastática destas células.

Infelizmente, nossos resultados de migração de células U2-OS após *knockdown* de *HOXD10* não apresentaram valores significativos do ponto de vista estatístico. Isso provavelmente se deve ao grande desvio-padrão obtido neste experimento. Na técnica de *wound-healing*, é esperado que o risco central em cada poço feito através da retirada mecânica das células nesta região com o auxílio de uma ponteira de 200µl seja sempre do mesmo tamanho em todas as replicatas. Ao realizar manualmente o ensaio, porém, é possível que estes riscos fiquem com tamanhos distintos entre os poços, o que pode levar à variações nos resultados (MARTINOTTI & RANZATO, 2020). Um outro fator de variabilidade apontado na literatura é a redução da concentração de soro bovino fetal no meio de cultivo, o que reduz a taxa de proliferação celular durante o experimento. Contudo, a ausência de SBF pode desencadear efeitos imprevisíveis e dependentes do tipo celular (PIRKMAJER & CHIBALIN, 2001; GRADA et al., 2017). Atualmente existem muitos outros ensaios funcionais de avaliação de migração celular, incluindo ensaios utilizando culturas de células 3D, que podem minimizar este viés e oferecer resultados mais fidedignos.

Neste trabalho, portanto, propomos que *HOXD10* atua de formas distintas em SaOS-2 e U2-OS, levando à supressão ou aumento das taxas de invasão e migração, dependendo do tipo celular. O papel dúbio de *HOXD10* não é nenhuma novidade, como apontado anteriormente (Figura 3).

O osteossarcoma é um tumor conhecido por seu caráter heterogêneo e de alta instabilidade genômica. Dessa forma, as amostras neoplásicas tendem a apresentar grande variabilidade de perfil gênico (RIVIERA-VALENTIN et al., 2015). Não é surpresa, portanto, que entre as linhagens derivadas de osteossarcoma também exista uma grande heterogeneidade do ponto de vista molecular.

De fato, é possível encontrar caracterizações moleculares distintas entre SaOS-2 e U2-OS. Estas linhagens celulares foram extensivamente utilizadas para o estudo do perfil de ativação de proteínas como p53 e retinoblastoma (pRb). Células SaOS-2 apresentam uma forma truncada e funcionalmente inativa de pRb, além de uma deleção no gene codificante de p53. Já células U2-OS apresentam pRb funcional, e carregam um alelo de p53 (YAO & SCHAFFER, 1995; AKAN et al., 2012).

A caracterização destas linhagens em comparação à osteoblastos humanos revela sinais distintos de maturidade osteoblástica entre SaOS-2 e U2-OS (PAUTKE et al., 2004). Células SaOS-2 exibem fenótipos osteoblásticos mais maduros, evidenciado pela presença de fatores de diferenciação osteoblástica como ALP, OC, BSP, decorina e colágenos tipo I e III. Células U2-OS, por sua vez, apresentaram resultados negativos para quase todos os marcadores osteoblásticos, mas mostraram resultados positivos para marcadores de cartilagem como colágeno tipo II, IX, X e IV, este último encontrado em estágios iniciais de diferenciação (BECKER et al., 1986; CHICHESTER et al., 1993). Por essa razão, a linhagem U2-OS não é classificada de forma consistente como osteoblástica, mas também como fibroblástica (BOUTERFA et al., 1999). Considerando o envolvimento de HOXD10 na regulação da diferenciação osteoblástica (CHAE et al., 2008), é possível que estas diferenças na caracterização das linhagens estejam relacionadas com o contraste no papel de HOXD10 observado entre elas.

Uma outra diferença notável é que, apesar de MMP-9 ser expressa em ambas as linhagens de OS, mas não em osteoblastos (BORD et al., 1997; PAUTKE et al., 2004), estudos sugerem que a linhagem U2-OS secrete mais desta metaloproteínase em relação à SaOS-2 (BJØRNLAND et al., 2005), o que pode implicar em resultados distintos na expressão deste gene após modulação. Curiosamente, isto poderia inclusive justificar a maior capacidade invasiva de U2-OS em relação à SaOS-2 em nossos experimentos, evidenciada pelo seu maior número de células fotografadas após o experimento (**Figura 17**), embora ambas as linhagens tenham sido capazes de atravessar o Matrigel®.

Um outro fator que merece atenção na discussão de nosso trabalho é a falta de correlação entre a modulação gênica de *HOXD10* e seus níveis proteicos avaliados por Western-blot. Apesar de nossos resultados de expressão de *MMP-9* e *PLAU* pressuporem a alteração dos níveis proteicos de *HOXD10*, nossos resultados de Western-blot não apresentaram alterações

nestes níveis em ambas as linhagens. Este paradoxo abre uma discussão sobre a fidelidade de nossos resultados de Western-blot. LUO et al. (2019) apontam que a maioria dos anticorpos comerciais para as proteínas HOX são de qualidade muito baixa (talvez devido à forte conservação evolutiva) e apresentam dificuldades até mesmo para detectar altos níveis expressos exogenamente de proteínas HOX. A repetição da análise dos níveis proteicos de HOXD10 utilizando outros anticorpos se faz necessária, a fim de validar os resultados obtidos neste estudo.

É importante ressaltar que o anticorpo comercial para HOXD10 utilizado nos experimentos de Western-blot (Abcam®, ab138508) foi diferente do anticorpo utilizado para marcação desta proteína nas reações de imunohistoquímica (Abcam®, ab172865). Anticorpos diferentes para o mesmo gene HOXD10 costumam trazer pesos moleculares distintos em seus *data-sheets*, não só entre anticorpos de uma mesma empresa, mas principalmente entre anticorpos de empresas distintas. Consequentemente, a altura das bandas de HOXD10 ao longo do gel de poliacrilamida em experimentos de Western-blot variam muito dependendo do anticorpo, o que sugere uma grande dificuldade em se certificar que a mesma proteína está sendo detectada em todos os casos.

Finalmente, apesar de nossos resultados *in vitro* apontarem um importante papel de *HOXD10* em processos celulares envolvidos na capacidade metastática de OS, nossos resultados quantitativos de imunohistoquímica mostram que o número de células que apresentam marcação de HOXD10 não varia de maneira significativa entre as amostras primárias e metastáticas. Contudo, nossa análise qualitativa demonstra a alta marcação de HOXD10 em aproximadamente 85% das amostras primárias do tumor, (e na maior parte dos tumores que acometem o fêmur), enquanto apenas cerca de 52% das amostras metastáticas apresentaram esta intensidade de marcação. O mesmo padrão foi observado entre as amostras pareadas, onde 100% dos tumores primários apresentaram alta marcação, mas apenas 50% das amostras metastáticas dos mesmos pacientes exibem este perfil. Em congruência, a baixa intensidade de marcação em amostras metastáticas foi associada à uma pior resposta ao tratamento, mediante grau Huvos. Estes resultados dão suporte a hipótese de que são necessários menores níveis de expressão de HOXD10 para o estabelecimento de focos metastáticos em OS.

Ainda através da análise pareada entre amostras, foi possível notar uma predominância de distribuição focal de HOXD10 entre tumores primários, enquanto amostras metastáticas apresentam marcação difusa em sua maioria. Uma vez que os focos metastáticos são desenvolvidos a partir de uma ou poucas células, é compreensível que amostras de metástase apresentem maior homogeneidade de marcação.

Também confirmamos uma associação entre menores níveis de expressão do fator de

transcrição e maior volume tumoral em amostras primárias de OS. Modelos de estudo apontam o tamanho do tumor como um determinante crucial para a resistência à quimioterapia (KOMAROVA & WODARZ, 2005; BOZIC et al., 2012; BOZIC et al., 2014). De maneira congruente, uma menor sobrevida global e livre de eventos foi associada com expressão reduzida de HOXD10 em nosso estudo. Juntos, estes resultados reforçam a relação entre menores níveis do fator de transcrição e um pior prognóstico. Ainda, tumores com volume superior a 200 cm³ apresentam marcação focal em sua maioria. É possível, portanto, que a heterogeneidade do tumor primário seja um fator de agravamento de seu volume.

Uma das funções dos osteócitos é a produção de matriz extracelular para a formação óssea. Em células neoplásicas de osteossarcoma, porém, esta função é afetada, resultando na formação de uma matriz osteóide neoplásica característica deste tumor (MARINA et al., 2004; FEDERMAN et al., 2009; GILL et al., 2013). O volume do tumor depende, portanto, da quantidade de matriz formada pelas células neoplásicas. Apesar de contribuir para este contexto, a proliferação celular não é necessariamente um diferencial para o volume tumoral, que é mais amplamente dependente das células quiescentes de osteossarcoma e de sua capacidade de formação de matriz (SMEDS et al., 1991).

Apesar da capacidade de migração de células cancerosas ser frequentemente associada com eventos tardios na tumorigênese, como a invasão e dispersão celular que levam à metástase, estudos mostram que a movimentação celular localizada e dentro do sítio primário do tumor tem um papel no crescimento tumoral tão importante quanto o potencial replicativo das células (WACLAW et al., 2015). Assim, é possível traçar uma relação entre os efeitos *in vitro* da modulação de HOXD10 na migração celular e sua associação com maiores volumes tumorais em OS.

Resultados semelhantes foram vistos em estudos com carcinoma gástrico, onde a baixa expressão de HOXD10 foi associada a um maior grau de malignidade tumoral (WANG et al., 2012; VARDHINI et al., 2014). Já a expressão induzida deste gene resultou em uma diminuição no tamanho tumoral *in vivo* (WANG et al., 2012).

WANG et al. (2015B) também encontraram resultados de sobrevida similares aos nossos em câncer gástrico. Pacientes com tumores que apresentavam altos níveis de HOXD10 tiveram uma sobrevida após 5 anos de 54%, enquanto a sobrevida daqueles com níveis baixos de expressão do fator de transcrição foi significativamente inferior (somente 25%). Outros autores também têm demonstrado a relação entre baixos níveis de expressão de HOXD10 e menor sobrevida. Em carcinoma colangiocelular, por exemplo, pacientes com menor expressão de HOXD10 apresentaram pior prognóstico e sobrevida global significativamente reduzida (YANG et al., 2015a). Cabe ressaltar também que, em modelos animais de Sarcoma de Ewing, outra

neoplasia óssea, a inibição de HOXD10 por shRNA leva a formação de tumores pulmonares e nódulos no fígado com maior volume e necrose (VON HEYKING et al., 2016).

A baixa intensidade de HOXD10 em amostras metastáticas em contraste com maiores intensidades em tumores primários, aliado à indícios de menores níveis deste fator em casos de pior prognóstico, nos permite pensar que a alta expressão de HOXD10 seja necessária para o estabelecimento do tumor no sítio primário, mas que a posterior redução desta expressão levaria à um aumento do volume tumoral e um processo metastático. Uma hipótese semelhante foi levantada por HAKAMI et al (2014) ao mostrarem que, em amostras de carcinoma de cabeça e pescoço, *HOXD10* é encontrado hiperexpresso nos tumores primários, porém pouco expresso nas amostras de metástase em nódulos linfáticos. *In vitro*, a hiperexpressão deste gene foi capaz de aumentar a migração, adesão e proliferação celular, porém diminuiu a capacidade invasiva, o que evidencia um papel na auxílio do desenvolvimento tumoral até seu estabelecimento completo, ao mesmo tempo que impede o seu espalhamento e desenvolvimento em locais distantes.

Contudo, sugerimos que, assim como observado em linhagens celulares distintas de osteossarcoma, a grande heterogeneidade tumoral das amostras clínicas possa ser um fator limitante em nosso estudo. Nossas amostras englobam subtipos histológicos distintos de osteossarcoma (osteoblásticos, condroblásticos, fibroblásticos, entre outros), que por sua vez são classificados de acordo com a presença e composição da matriz celular predominante (FLETCHER et al., 2002; MARINA et al., 2004; HAYDEN & HOANG, 2006). Assim como o papel de HOXD10 varia entre linhagens frequentemente caracterizadas como osteoblástica (SaOS-2) e fibroblástica (U2-OS) (BOUTERFA et al., 1999; PAUTKE et al., 2004), é possível que uma análise da correlação entre HOXD10 e fatores clínicos dentro de subtipos específicos de OS apresente resultados mais verossímeis em relação ao papel desta proteína na capacidade tumorigênica deste câncer.

Conclusões

6.1 Conclusão geral

A expressão de *HOXD10* parece variar muito em amostras de osteossarcoma. Apesar disso, de maneira geral é possível observar que este gene se encontra hiperexpresso nestas amostras em relação ao tecido ósseo não neoplásico, o que inicialmente lhe sugere um papel como oncogene neste tumor.

Contudo, os resultados aqui encontrados evidenciam uma contribuição importante de *HOXD10* no controle de processos invasivos e migratórios de linhagens celulares de OS, possivelmente através da regulação de genes envolvidos nestes processos, como *PLAU* e *MMP-9*. Seu papel, porém, parece ser dependente do *background* molecular de cada tipo celular. Além disso, é sugerido que a diminuição dos níveis proteicos de *HOXD10* leve a características de pior prognóstico como maior volume tumoral e pior resposta a tratamento, afetando significativamente a sobrevida dos pacientes.

Portanto, é possível que, como acontece em outros tumores de origem mesenquimal, a expressão de *HOXD10* seja uma característica comum dos OS, mas seu papel possa variar entre as células deste tumor, contribuindo para sua expressiva heterogeneidade. O aprofundamento sobre o estudo dos possíveis alvos de *HOXD10*, bem como seu estudo em subtipos histológicos específicos de OS, ainda são necessários para entender que processos estão sendo controlados por este fator de transcrição neste tumor.

6.2 Conclusões pontuais

- O *knockdown* de *HOXD10* leva a um aumento na capacidade invasiva e migratória de células SaOS-2, possivelmente explicado pelo aumento nos níveis de expressão de *PLAU* e *MMP-9*. Em células U2-OS, contudo, o silenciamento deste gene levou a resultados contrários.
- A hiperexpressão de *HOXD10* leva a uma diminuição na capacidade invasiva e migratória de células SaOS-2, novamente acompanhado de forma consistente por uma diminuição dos níveis de expressão de *PLAU* e *MMP-9*. Em células U2-OS, não houve alterações na expressão destes genes ou nas taxas de migração e invasão celular após transdução.
- Amostras provenientes de OS com maior volume tumoral e grau HUVOS elevado apresentam menores níveis proteicos de *HOXD10*. Consistentemente, a sobrevida global e livre de eventos é menor em pacientes de OS com níveis reduzidos deste fator de transcrição.

Referências Bibliográficas

- ABATE-SHEN, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 10, p. 777-85, 2002.
- ABRAMOFF, M.D.; MAGALHAES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, p. 36-42, 2004.
- AKAN, P.; ALEXEYENKO, A.; COSTEA, P.I.; HEDBERG, L.; SOLNESTAM, B.W.; LUNDIN, S.; HÄLLMAN, J.; LUNDBERG, E.; UHLÉN, M.; LUNDEBERG, J. Comprehensive analysis of the genome transcriptome and proteome landscapes of three tumor cell lines. **Genome Med**, v. 4, 86, 2012.
- ANDERSON, M.E. Update on Survival in Osteosarcoma. **Orthop Clin North Am**, v.47(1), p. 283-92, 2016.
- APIOU, F.; FLAGIELLO, D.; CILLO, C.; MALFOY, B.; POUPON, M.F.; DUTRILLAUX, B. Fine mapping of human HOX gene clusters. **Cytogenet Cell Genet**, v. 73, p. 114–5, 1996.
- BACCI, G.; FERRARI, S.; BERTONI, F.; RUGGIERI, P.; PICCI, P.; LONGHI, A.; CASADEI, R.; FABBRI, N.; FORNI, C.; VERSARI, M.; CAMPANACCI, M. Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. **J Clin Oncol**, v. 18(24), p. 4016-27, 2000.
- BECKER, J.; SCHUPPAN, D.; BENZIAN, H.; BALS, T.; HAHN, E.G.; CANTALUPPI, C.; REICHART, P. Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V and VI and of pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine. **J Histochem Cytochem**, v. 34, p. 1417-29, 1986.
- BHATLEKAR, S.; FIELDS, J.Z.; BOMAN, B.M. HOX genes and their role in the development of human cancers. **J Mol Med**, v. 92(8), p. 811-23, 2014.
- 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.; JÜRGENS, 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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20(3), p. 776-790, 2002.
- BJØRNLAND, K.; FLATMARK, K.; PETTERSEN, S.; AAASEN, A.O.; FODSTAD, O.; MAELANDSMO, G.M. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. **J Surg Res**, v. 127(2), p. 151-6, 2005.
- BLASI, F.; VASSALLI, J.D.; DANØ, K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. **J Cell Biol**, v. 104(4), p. 801-4, 1987.
- BODEY, B.; BODEY B. Jr; SIEGEL, S.E.; LUCK, J.V.; KAISER, H.E. Homeobox B3, B4, and C6 gene product expression in osteosarcomas as detected by immunocytochemistry. **Anticancer Res**, v. 20, p. 2717–2721, 2000.
- BORA, I.; SHRIVASTAVA, N. ABCs of RhoGTPases indicating potential role as oncotargets. **J Cancer Res Ther**, v. 13(1), p. 2-8, 2017.
- BORD, S.; HORNER, A.; HEMBRY, R.M.; REYNOLDS, J.J.; COMPSTON, J.E. Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. **J Anat**, v. 191, p. 39-48, 1997.
- BOULET, A.M.; CAPECCHI, M.R. Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11 in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. **Development**, v. 131, p. 299–309, 2004.
- BOUTERFA, H.; DARLAPP, A.R.; KLEIN, E.; PIETSCH, T.; ROOSEN, K.; TONN, J.C. Expression of different extracellular matrix components in human brain tumor and melanoma cells in respect to

- variant culture conditions. **J Neurooncol**, v. 44, p. 23-33, 1999.
- BOZIC, I.; ALLEN, B.; NOWAK, M. A. Dynamics of targeted cancer therapy. **Trends Mol Med**, v. 18, p. 311–316, 2012.
- BOZIC, I.; NOWAK, M. A. Timing and heterogeneity of mutations associated with drug resistance in metastatic cancers. **Proc Natl Acad Sci**, v. 111, p. 15964–15968, 2014.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 7;72, p. 248-54, 1976.
- BRAMWELL, V.H. The role of chemotherapy in the management of non-metastatic operable extremity osteosarcoma. **Semin Oncol**, v. 24(5), p. 561-71, 1997.
- BRENNECKE, P.; ARLT, M.J.; CAMPANILE, C.; HUSMANN, K.; GVOZDENOVIC, A.; APUZZO, T.; THELEN, M.; BORN, W.; FUCHS, B. CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice. **Clin Exp Metastasis**, v. 31(3), p. 339-49, 2013.
- CANEL, M.; SERRELS, A.; FRAME, M.C.; BRUNTON, V.G. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. **J Cell Sci**, v. 126, p. 393-401, 2013.
- CAO, Y.M.; GU, J.; ZHANG, Y.S.; WEI, W.J.; QU, N.; WEN, D.; LIAO, T.; SHI, R.L.; ZHANG, L.; JI, Q.H.; WANG, Y.; SUN, G.H.; ZHAO, Y.X.; WANG, Y.J.; YU, J.; ZHU, Y.X. Aberrant hypermethylation of the HOXD10 gene in papillary thyroid cancer with BRAFV600E mutation. **Oncol Rep**, v. 39(1), p. 338-348, 2018.
- CARPENTER, E.M.; GODDARD, J.M.; DAVIS, A.P.; NGUYEN, T.P.; CAPECCHI, M.R. Targeted disruption of Hoxd-10 affects mouse hindlimb development. **Development**, v. 124(22), p. 4505- 14, 1997.
- CARRIO, M.; ARDERIU, G.; MYERS, C.; BOUDREAU, N.J. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. **Cancer Res**, v. 65(16), p. 7177-85, 2005.
- CHAE, S. W.; JEE, B. K.; LEE, J. Y.; HAN, C. W.; JEON, YW.; LIM, Y.; LEE, KH; RHA, H. K.; CHAE, GT. HOX gene analysis in the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31(4), p. 815-823, 2008.
- CHEN, H.J.; LIN, C.M.; LEE, C.Y.; SHIH, N.C.; PENG, S.F.; TSUZUKI, M.; AMAGAYA, S.; HUANG, W.W.; YANG, J.S. Kaempferol suppresses cell metastasis via inhibition of the ERK-p38-JNK and AP-1 signaling pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells. **Oncol Rep**, v. 30, p. 925–932, 2013.
- CHENG, H.L.; HSIEH, M.J.; YANG, J.S.; LIN, C.W.; LUE, K.H.; LU, K.H.; YANG, S.F. Nobiletin inhibits human osteosarcoma cells metastasis by blocking ERK and JNK-mediated MMPs expression. **Oncotarget**, v. 7, p. 35208- 35223, 2016a.
- CHENG, G.; GAO, F.; SUN, X.; BI, H.; ZHU, Y. Paris saponin VII suppresses osteosarcoma cell migration and invasion by inhibiting MMP-2/9 production via the p38 MAPK signaling pathway. **Mol Med Rep**, v. 14, p. 3199- 3205, 2016b.
- CHENG, L.; WEI, X.; ZHAO, K.; WU, F.; LU, W.; TONG, S.; YU, G. The predictive potential and oncogenic effects of HOXC8 expression on osteosarcoma. **Tumor Biol**, v. 37, p. 14961-14967, 2016c.
- CHICHESTER, C.O.; FERNANDEZ, M.; MINGUELL, J.J. Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. **Cell Adhes Commun**, v. 1, p. 93-9, 1993.

- CHOONG, P.F.; FERNÖ, M.; AKERMAN, M.; WILLÉN, H.; LÅNGSTRÖM, E.; GUSTAFSON, P.; ALVEGÅRD, T.; RYDHOLM, A. Urokinase-plasminogen-activator levels and prognosis in 69 soft-tissue sarcomas. **Int J Cancer**, v. 69(4), p. 268-72, 1996.
- CHOONG, P.F.; NADESAPILLAI, A.P. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. **Clin Orthop Relat Res**, v. 415, p. S46-58, 2003.
- CLARK, J.C.; DASS, C.R.; CHOONG, P.F. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 134(3), p. 281-97, 2008.
- CROFT, D.R.; OLSON, M.F. Regulating the conversion between rounded and elongated modes of cancer cell movement. **Cancer Cell**, v. 14(5), p. 349-51, 2008.
- DAHLIN, D.C.; UNNI, K.K. Bone Tumors: General Aspects and Data on 8,542 Cases. 4th ed. Charles C. Thomas. Springfield, IL; 1986.
- DAMJANOV, I. Cancer Grading Manual. 2nd ed. Springer Berlin-Heidelberg, 2013.
- DAVIS, A.P.; CAPECCHI, M.R. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. **Development**, v. 120, p. 2187–2198, 1994.
- DAVIS, A.P.; CAPECCHI, M.R. A mutational analysis of the 50 *HoxD* genes: dissection of genetic interactions during limb development in the mouse. **Development**, v. 122, p. 1175– 1185, 1996.
- DE OLIVEIRA, V. P. Análise da expressão de RhoC em osteossarcoma pediátrico e suas implicações clínicas. **Monografia** – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2019.
- DELLOVADE, T.; ROMER, J. T.; CURRAN, T.; RUBIN, L. L. The hedgehog pathway and neurological disorders. **Annual Review of Neuroscience**, v. 29, p. 539– 563, 2006.
- DENG, B.; FENG, Y.; DENG, B. TIPE2 mediates the suppressive effects of shikonin on MMP13 in osteosarcoma cells. **Cell Physiol Biochem**, v. 37, p. 2434- 2443, 2015.
- DESAI, S.; LASKAR, S.; PANDEY, B.N. Autocrine IL-8 and VEGF mediate epithelial-mesenchymal transition and invasiveness via p38/JNK-ATF-2 signalling in A549 lung cancer cells. **Cell Signal**, v. 25(9), p. 1780-91, 2013.
- DESCHAMPS, T.; KALAMVOKI, M. Impaired STING Pathway in Human Osteosarcoma U2OS Cells Contributes to the Growth of ICPO-Null Mutant Herpes Simplex Virus. **J Virol**, v. 91(9), p. 06-17, 2017.
- DLUGASZEWSKA, B.; SILAHTAROGLU, A.; MENZEL, C.; KÜBART, S.; COHEN, M.; MUNDLOS, S.; TÜMER, Z.; KJAER, K.; FRIEDRICH, U.; ROPERS, H.H.; TOMMERUP, N.; NEITZEL, H.; KALSCHUEUR, V.M. Breakpoints around the *HOXD* cluster result in various limb malformations. **J Med Genet**, v. 43, n. 2, p. 111-8, 2006.
- DUBOULE, D. The rise and fall of Hox gene clusters. **Development**, v. 134, p. 2549-2560, 2007.
- DUFFY, M.J.; MAGUIRE, T.M.; MCDERMOTT, E.W.; O'HIGGINS, N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. **J Surg Oncol**, v. 71(2) p. 130-5, 1999.
- ENDO-MUNOZ, L.; CAI, N.; CUMMING, A.; MACKLIN, R.; MERIDA DE LONG, L.; TOPKAS, E.; MUKHOPADHYAY, P.; HILL, M.; SAUNDERS, N. A. Progression of Osteosarcoma from a Non-Metastatic to a Metastatic Phenotype Is Causally Associated with Activation of an Autocrine and Paracrine uPA Axis. **PLoS One**, v. 10(8), e0133592, 2015.

- FEDERMAN, N.; BERNTHAL, N.; EILBER, F.C.; TAP, W.D. The multidisciplinary management of osteosarcoma. **Curr Treat Options Oncol**, v. 10(1-2), p. 82-93, 2009.
- FISHER, J.L.; MACKIE, P.S.; HOWARD, M.L.; ZHOU, H.; CHOONG, P.F. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: an in vivo mouse model. **Clin Cancer Res**, v. 7(6), p. 1654-60, 2001.
- FLETCHER, C.D.; UNNI, K.; MERTENS, F. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon, France, IARC Press, 2002.
- GABRIELY, G.; YI, M.; NARAYAN, R.S.; NIEERS, J.M.; WURDINGER, T.; IMITOLA, J.; LIGON, K.L.; KESARI, S.; ESAU, C.; STEPHENS, R.M.; TANNOUS, B.A.; KRICHEVSKY, A.M. Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. **Cancer**, v. 15;71(10), p. 3563-72, 2011.
- GILL, J.; AHLUWALIA, M.K.; GELLER, D.; GORLICK, R. New targets and approaches in osteosarcoma. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, p. 89–99, 2013.
- GORLICK, R.; KHANNA, C. Osteosarcoma. **J Bone Miner Res**, v. 25(4), p. 683-91, 2010.
- GRADA, A.; OTERO-VINAS, M.; PRIETO-CASTRILLO, F.; OBAGI, Z.; FALANGA, V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. **J Invest Dermatol**, v. 137(2), e11-e16, 2017.
- GRINER, E.M.; DANCIC, G.M.; COSTELLO, J.C.; OWENS, C.; GUIN, S.; EDWARDS, M.G.; BRAUTIGAN, D.L.; THEODORESCU, D. RhoC Is an Unexpected Target of RhoGDI2 in Prevention of Lung Colonization of Bladder Cancer. **Mol Cancer Res**, v. 13(3), p. 483-92, 2015.
- GROSS, S.; KRAUSE, Y.; WUELLING, M.; VORTKAMP, A. Hoxa11 and Hoxd11 regulate chondrocyte differentiation upstream of Runx2 and Shox2 in mice. **PLoS One**, v. 7, e43553, 2012.
- GUAN, X.; CHEN, S.; ZHAO, Y. The role of RhoC in malignant tumor invasion, metastasis and targeted therapy. **Histol Histopathol**, v. 33(3), p. 255-260, 2018.
- GUO, Y.; CHEN, Y.H.; CHENG, Z.H.; OU-YANG, H.N.; LUO, C.; GUO, Z.L. Tectorigenin inhibits osteosarcoma cell migration through downregulation of matrix metalloproteinases in vitro. **Anticancer Drugs**, v. 27, p. 540- 546, 2016.
- GUO, Y.; PENG, Y.; GAO, D.; ZHANG, M.; YANG, W.; LINGHU, E.; HERMAN, J. G.; FUKS, F.; DONG, G.; GUO, M. Silencing HOXD10 by promoter region hypermethylation activates ERK signaling in hepatocellular carcinoma. **Clin Epigenet**, v. 9, p. 116, 2017.
- HAKAMI, F.; DARDA, L.; STAFFORD, P.; WOLL, P.; LAMBERT, D.W.; HUNTER, K.D. The roles of HOXD10 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Br J Cancer**, v. 111(4), p. 807-16, 2014.
- HAN, J. A.; KIM, J.-Y.; KIM, J.-I. Analysis of Gene Expression in Cyclooxygenase-2-Overexpressed Human Osteosarcoma Cell Lines. **Genomics & Informatics**, v. 12(4), p. 247–253, 2014.
- HAYDEN, J.B.; HOANG, B.H. Osteosarcoma: Basic Science and Clinical Implications. **Orthop Clin N Am**, v. 37, p. 1– 7, 2006.
- HILDENBRAND, R.; ALLGAYER, H.; MARX, A.; STROEBEL, P. Modulators of the urokinase-type plasminogen activation system for cancer. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 19(5), p. 641-52, 2010.
- HOMBRIA, J.C.G.; LOVEGROVE, B. Beyond homeosis – HOX function in morphogenesis and organogenesis. **Differentiation**, v. 71, p. 461–76, 2003.

- HUANG, H.; WANG, L.; LI, M.; WANG, X.; ZHANG, L. Secreted clusterin (sCLU) regulates cell proliferation and chemosensitivity to cisplatin by modulating ERK1/2 signals in human osteosarcoma cells. **World J Surg Oncol**, v. 12, p. 255, 2014.
- HUGHES, C.S.; POSTOVIT, L.M.; LAJOIE, G.A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. **Proteomics**, v. 10(9), p. 1886-90, 2010.
- 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(1), p. 14-8, 1977.
- ISAKOFF, M.S.; BIELACK, S.S.; MELTZER, P.; GORLICK, R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. **J Clin Oncol**, v. 33(27), p. 3029-3035, 2015.
- ISLAM, M.; SHARMA, S.; TEKNOS, T.N. RhoC regulates cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma by overexpressing IL-6 and phosphorylation of STAT3. **PLoS One**, v. 9(2), e88527, 2014.
- KANAI, M.; HAMADA, J.; TAKADA, M.; ASANO, T.; MURAKAWA, K.; TAKAHASHI, Y.; MURAI, T.; TADA, M.; MIYAMOTO, M.; KONDO, S.; MORIUCHI, T. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. **Oncol Rep**, v. 23, nº 3, p. 843 – 851, 2010.
- KELLEHER, F. C.; FENNELLY, D.; RAFFERTY, M. Common critical pathways in embryogenesis and cancer. **Acta Oncologica**, v. 45, p. 375–388, 2006.
- KEMPF-BIELACK, B.; BIELACK, S.S.; JÜRGENS, H.; BRANSCHIED, D.; BERDEL, W.E.; EXNER, G.U.; GÖBEL, U.; HELMKE, K.; JUNDT, G.; KABISCH, H.; KEVRIC, M.; KLINGEBIEL, T.; KOTZ, R.; MAAS, R.; SCHWARZ, R.; SEMIK, M.; TREUNER, J.; ZOUBEK, A.; WINKLER K. Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). **J Clin Oncol**, v. 23(3), p. 559-68, 2005.
- KNIRSH, R.; BEN-DROR, I.; MODAI, S.; SHOMRON, N.; VARDIMON, L. MicroRNA 10b promotes abnormal expression of the proto-oncogene c-Jun in metastatic breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, p. 59932-59944, 2016.
- KOJIMA, T.; WANG, X.; FUJIWARA, K.; OSAKA, S.; YOSHIDA, Y.; OSAKA, E.; TANIGUCHI, M.; UENO, T.; FUKUDA, N.; SOMA, M.; TOKUHASHI, Y.; NAGASE, H. Inhibition of human osteosarcoma cell migration and invasion by a gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide, targeted at the human MMP9 NF- κ B binding site. **Biol Pharm Bull**, v. 37, p. 1460- 1465, 2014.
- KOMAROVA, N. L.; WODARZ, D. Drug resistance in cancer: principles of emergence and prevention. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, p. 9714–9719, 2005.
- KRUMLAUF, R. Hox genes in vertebrate development. **Cell**, v. 78(2), p. 191-201, 1994.
- KUMAR, S. Cell-Extracellular Matrix Mechanobiology in Cancer. **Elsevier**, p. 143-155, 2012.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227(5259), p. 680-5, 1970.
- LEE, E.J.; CHOI, E.M.; KIM, S.R.; PARK, J.H.; KIM, H.; HA, K.S.; KIM, Y.M.; KIM, S.S.; CHOE, M.; KIM, J.I.; HAN, J.A. Cyclooxygenase-2 promotes cell proliferation, migration and invasion in U2OS human osteosarcoma cells. **Exp Mol Med**, v. 39, p. 469- 476, 2007.
- LI, M.; ZHU, Y.; ZHANG, H.; et al. Delivery of inhibitor of growth 4 (ING4) gene significantly inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of human osteosarcoma cells. **Sci Rep**, v. 4,

p. 7380, 2014a.

- LI, Q.; DING, C.; CHEN, C.; ZHANG, Z.; XIAO, H.; XIE, F.; LEI, L.; CHEN, Y.; MAO, B.; JIANG, M.; LI, J.; WANG, D.; WANG, G. MiR-224 promotion of cell migration and invasion by targeting Homeobox D 10 gene in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 29, p. 835–42, 2014b.
- LI, S.; ZHANG, J.; ZHAO, Y.; WANG, F.; CHEN, Y.; FEI, X. miR-224 enhances invasion and metastasis by targeting HOXD10 in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Lett*, v. 15(5), p. 7069-7075, 2018.
- LI, W.P.; ANDERSON, C.J. Imaging matrix metalloproteinase expression in tumors. *Q J Nucl Med*, v. 47(3), p. 201-8, 2003.
- LIANG, C.; PARK, A.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, v. 2, n° 2, p. 329-33, 2007.
- LIAO, C.G.; KONG, L.M.; ZHOU, P.; YANG, X.L.; HUANG, J.G.; ZHANG, H.L.; LU, N. miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs. *J Transl Med*, v. 12, p. 234, 2014.
- LIN, J.; TEO, S.; LAM, D. H.; JEYASEELAN, K.; WANG, S. MicroRNA-10b pleiotropically regulates invasion, angiogenicity and apoptosis of tumor cells resembling mesenchymal subtype of glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis*, v. 3(10), e398, 2012.
- LINDSEY, B.A.; MARKEL, J.E.; KLEINERMAN, E.S. Osteosarcoma Overview. *Rheumatol Ther*, v. 4(1), p. 25-43, 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(25), p. 1600-6, 1986.
- LIU, X.; CHOY, E.; HORNICEK, F.J.; YANG, S.; YANG, C.; HARMON, D.; MANKIN, H.; DUAN, Z. ROCK1 as a Potential Therapeutic Target in Osteosarcoma. *Journal Of Orthopaedic Research*, v. 29(8), p. 1259-1266, 2011.
- LIU, Z.; ZHU, J.; CAO, H.; REN, H.; FANG, X. miR-10b promotes cell invasion through RhoC-AKT signaling pathway by targeting HOXD10 in gastric cancer. *Int J Oncol*, v. 40, p. 1553-60, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- Delta Delta C(T)) **Method. Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LOHI, J.; LEHTI, K.; VALTANEN, H.; PARKS, W. C.; KESKI-OJA, J. Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene*, v. 242, p. 75, 2000.
- LOPEZ-RIOS J. The many lives of SHH in limb development and evolution. *Semin Cell Dev Biol*, v. 49, p. 116-24, 2016.
- LUAN, L.; MA, Y.; ZHANG, L. HOXD10 silencing suppresses human fibroblast-like synoviocyte migration in rheumatoid arthritis via downregulation of the p38/JNK pathway. *Exp Ther Med*, v. 16, p. 1621-1628, 2018.
- LUO, Z.; RHIE, S.K.; FARNHAM, P.J. The Enigmatic HOX Genes: Can We Crack Their Code?. *Cancers (Basel)*, v. 11(3), p. 323, 2019.
- MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WEINBERG, R.A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-

- 10b in breast cancer. **Nature**, v. 449(7163), p. 682-8, 2007.
- MA, Y.; ZHU, B.; LIU, X.; YU, H.; YONG, L.; LIU, X.; SHAO, J.; LIU, Z. Inhibition of oleandrin on the proliferation show and invasion of osteosarcoma cells in vitro by suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 34, p. 115, 2015.
- MAKIYAMA, K.; HAMADA, J.; TAKADA, M.; MURAKAWA, K.; TAKAHASHI, Y.; TADA, M.; TAMOTO, E.; SHINDO, G.; MATSUNAGA, A.; TERAMOTO, K.; KOMURO, K.; KONDO, S.; KATOH, H.; KOIKE, T.; MORIUCHI, T. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. **Oncol Rep**, v. 13(4), p. 673–679, 2005.
- MALOGOLOWKIN, M.H.; QUINN, J.J.; STEUBER, C.P.; SIEGEL, S.E. Clinical assessment and differential diagnosis of the child with suspected cancer. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. **Principles & practice of pediatric oncology**. 5th Ed. Philadelphia: p. 165-81. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- MARINA, N.; GEBHARDT, M.; TEOT, L.; GORLICK, R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. **Oncologist**, v. 9(4), p. 422-41, 2004.
- MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Scratch Wound Healing Assay. **Methods Mol Biol**, v. 2109, p. 225-229, 2020.
- MARUZURU, Y.; FUJII, H.; OYAMA, M.; KOZUKA-HATA, H.; KATO, A.; KAWAGUCHI, Y. Roles of p53 in herpes simplex virus 1 replication. **J Virol**, v. 87, p. 9323–9332, 2013.
- MAYR, L.; PIRKER, C.; LÖTSCH, D.; VAN SCHOONHOVEN, S.; WINDHAGER, R.; ENGLINGER, B.; BERGER, W.; KUBISTA, B. CD44 drives aggressiveness and chemoresistance of a metastatic human osteosarcoma xenograft model. **Oncotarget**, v. ;8(69), p. 114095-114108, 2017.
- MAZZIERI, R.; MASIERO, L.; ZANETTA, L.; MONEA, S.; ONISTO, M.; GARBISA, S.; MIGNATTI, P. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. **EMBO J**, v. 16(9), p. 2319-32, 1997.
- MILLER, D.F.; HOLTZMAN, S.L.; KALKBRENNER, A.; KAUFMAN, T.C. Homeotic Complex (Hox) gene regulation and homeosis in the mesoderm of the Drosophila melanogaster embryo: the roles of signal transduction and cell autonomous regulation. **Mechanisms of development**, v. 102, p. 17-32, 2001.
- 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, p. 229–234, 2009.
- MO, R.J.; LU, J.M.; WAN, Y.P.; HUA, W.; LIANG, Y.X.; ZHUO, Y.J.; KUANG, Q.W.; LIU, Y.L.; HE, H.C.; ZHONG, W.D. Decreased HoxD10 Expression Promotes a Proliferative and Aggressive Phenotype in Prostate Cancer. **Curr Mol Med**, v. 17(1), p. 70-78, 2017.
- Morgan-Fisher M, Wewer UM, Yoneda A. Regulation of ROCK activity in cancer. **J Histochem Cytochem**. 2013;61(3):185-198. doi:10.1369/0022155412470834
- MURPHY, G.; DOCHERTY, A.J.; HEMBRY, R.M.; REYNOLDS, J.J. Metalloproteinases and tissue damage. **Br J Rheumatol**, v. 30(1), p. 25-31, 1991.
- MYERS, C.; CHARBONEAU, A.; CHEUNG, I.; HANKS, D.; BOUDREAU, N. Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 161(6), p. 2099-109, 2002.
- NAKAYAMA, I.; SHIBAZAKI, M.; YASHIMA-ABO, A.; MIURA, F.; SUGIYAMA, T.; MASUDA, T.; MAESAWA, C. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells. **Int J Oncol**, v. 43(1), p. 63-71, 2003.

- NEWHART, A.; RAFALSKA-METCALF, I.U.; YANG, T.; NEGOREV, D.G.; JANICKI, S.M. Single-cell analysis of Daxx and ATRX-dependent transcriptional repression. **J Cell Sci**, v. 125, p. 5489–5501, 2012.
- NI, M.; XIONG, M.; ZHANG, X.; CAI, G.; CHEN, H.; ZENG, Q.; YU, Z. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles conjugated with CD133 aptamers for targeted salinomycin delivery to CD133+ osteosarcoma cancer stem cells. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 2537-54, 2015.
- NIE, Z.; PENG, H. Osteosarcoma in patients below 25 years of age: An observational study of incidence, metastasis, treatment and outcomes. **Oncol Lett**, v. 16(5), p. 6502-6514, 2018.
- NOORDERMEER, D.; LELEU, M.; SPLINTER, E.; ROUGEMONT, J.; DE LAAT, W.; DUBOULE, D. The dynamic architecture of Hox gene clusters. **Science**, v. 334(6053), p. 222-5, 2011.
- OMATU, T. [Overexpression of human homeobox gene in lung cancer A549 cells results in enhanced motile and invasive properties]. **Hokkaido Igaky Zasshi**, v. 74(5), p. 367– 376, 1999.
- OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The epidemiology of osteosarcoma. **Cancer Treat Res**, v. 152, p. 3-13, 2009.
- PAN, P.J.; LIU, Y.C.; HSU, F.T. Protein Kinase B and Extracellular Signal-Regulated Kinase Inactivation is Associated with Regorafenib-Induced Inhibition of Osteosarcoma Progression In Vitro and In Vivo. **J Clin Med**, v. 8(6), p. 900, 2019.
- PAUTKE, C.; SCHIEKER, M.; TISCHER, T.; KOLK, A.; NETH, P.; MUTSCHLER, W.; MILZ S. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. **Anticancer Res**, v. 24(6), p. 3743-8, 2004.
- PETRILLI, A.S.; DE CAMARGO, B.; FILHO, V.O.; BRUNIERA, P.; BRUNETTO, A.L.; JESUS-GARCIA, R.; CAMARGO, O.P.; PENA, W.; PÉRICLES, 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. Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. **J Clin Oncol**, v. 24(7), p. 1161-8, 2006.
- PILLAY, V.; DASS, C.R.; CHOONG, P.F. The urokinase plasminogen activator receptor as a gene therapy target for cancer. **Trends Biotechnol**, v. 25(1), p. 33-9, 2007.
- PIRKMAJER, S.; CHIBALIN, A.V. Serum starvation: caveat emptor. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 301(2), p. 272-9, 2011.
- PLATAIS, C.; HAKAMI, F.; DARDA, L.; LAMBERT, D.W.; MORGAN, R.; HUNTER, K.D. The role of HOX genes in head and neck squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 45(4), p. 239- 47, 2016.
- POHLIG, F.; ULRICH, J.; LENZE, U.; MÜHLHOFER, H. M.; HARRASSER, N.; SUREN, C.; SCHAUWECKER, J.; MAYER-KUCKUK, P.; VON EISENHART-ROTHER, R. Glucosamine sulfate suppresses the expression of matrix metalloproteinase-3 in osteosarcoma cells in vitro. **BMC Complement Altern Med**, v. 16, p. 313, 2016.
- REYA, T.; CLEVERS, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature**, v. 434, p. 843–850, 2005.
- RIVERA-VALENTIN, R.K.; ZHU, L.; HUGHES, D.P. Bone Sarcomas in Pediatrics: Progress in Our Understanding of Tumor Biology and Implications for Therapy. **Paediatr Drugs**, v. 17(4), p. 257-271, 2015.
- ROBERTO G.M. Influência do miR-10b na proliferação e capacidade invasiva de osteossarcoma. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2017.

- RODINI, C. O.; XAVIER, F. C.; PAIVA, K. B.; DE SOUZA SETÚBAL DESTRO, M. F.; MOYSES, R. A.; MICHALUARTE, P.; CARVALHO, M. B.; FUKUYAMA, E. E. Head And Neck Genome Project Gencapo, Tajara, E. H., Okamoto, O. K., & Nunes, F. D. Homeobox gene expression profile indicates HOXA5 as a candidate prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 40(4), p. 1180-1188, 2012.
- SAHA, S.S.; CHOWDHURY, R.R.; MONDAL, N.R.; ROY, S.; SENGUPTA, S. Expression signatures of HOX cluster genes in cervical cancer pathogenesis: Impact of human papillomavirus type 16 oncoprotein E7. **Oncotarget**, v. 8(22), p. 36591-36602, 2017.
- SASAYAMA, T.; NISHIHARA, M.; KONDOH, T.; HOSODA, K.; KOHMURA, E. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. **Int J Cancer**, v. 125(6), p. 1407-13, 2009.
- SATO, H.; TAKINO, T.; OKADA, Y.; CAO, J.; SHINAGAWA, A.; YAMAMOTO, E.; SEIKI, M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. **Nature**, v. 370, p. 61–65, 1994.
- 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.
- SEIFERT, A.; WERHEID, D.F.; KNAPP, S.M.; TOBIASCH, E. Role of Hox genes in stem cell differentiation. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, p. 583-595, 2015.
- SHAH, N.; SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 10, p. 361–71, 2010.
- SHANG, H.S.; CHANG, J.B.; LIN, J.H.; LIN, J.P.; HSU, S.C.; LIU, C.M.; LIU, J.Y.; WU, P.P.; LU, H.F.; AU, M.K.; CHUNG, J.G. Deguelin inhibits the migration and invasion of U-2 OS human osteosarcoma cells via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 in vitro. **Molecules**, v. 19, p. 16588- 16608, 2014.
- SHARMA, S.; MANDAL, P.; SADHUKHAN, T. et al. Bridging Links between Long Noncoding RNA HOTAIR and HPV Oncoprotein E7 in Cervical Cancer Pathogenesis. **Sci Rep**, v. 5, p. 11724, 2015.
- SMEDS, S.; WALZ, T.; BLOMQUIST, L.; LARSSON, S.E. Cell proliferation rate and tumor volume in human osteosarcoma during exposure to methotrexate. A study on tissue transplants in nude mice. **APMIS**, v. 99(10), p. 898-904, 1991.
- SOSHNIKOVA, N.; DUBOULE, D. Epigenetic temporal control of mouse Hox genes in vivo. **Science**, v. 324(5932), p. 1320-3, 2009.
- STAMENKOVIC I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v. 10(6), p. 415-33, 2000.
- STELIAROVA-FOUCHER, E.; STILLER, C.; LACOUR, B.; KAATSCH, P. International Classification of Childhood Cancer, third edition. **American Cancer Society**, v.103, p. 1457-1467, 2005.
- STELIAROVA-FOUCHER, E.; COLOMBET, M.; RIES, L.A.G.; MORENO, F.; DOLYA, A.; BRAY, F.; HESSELING, P.; SHIN, H.Y.; STILLER, C.A. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. **Lancet Oncol**, v. 18(6), p. 719-731, 2017.
- STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001.
- STRAHM, B.; MALKI, D. Hereditary cancer predisposition in children: genetic basis and clinical implications.

International Journal of Cancer, v. 119, p. 2001–2006, 2006.

- SVOBODA, L. K.; HARRIS, A.; BAILEY, N. J.; SCHWENTNER, R.; TOMAZOU, E.; VON LEVETZOW, C.; LAWLOR, E. R. Overexpression of HOX genes is prevalent in Ewing sarcoma and is associated with altered epigenetic regulation of developmental transcription programs. **Epigenetics**, v. 9(12), p. 1613–1625, 2014.
- TANG, H.; TANG, Z.; JIANG, Y.; WEI, W.; LU, J. Pathological and therapeutic aspects of matrix metalloproteinases: Implications in osteosarcoma. **Asia Pac J Clin Oncol**, v. 15(4), p. 218–224, 2019.
- TSCHOPP, P.; TARCHINI, B.; SPITZ, F.; ZAKANY, J.; DUBOULE, D. Uncoupling time and space in the collinear regulation of Hox genes. **PLoS Genet**, v. 5(3), e1000398, 2009.
- TU, B.; ZHU, J.; LIU, S.; WANG, L.; FAN, Q.; HAO, Y.; FAN, C.; TANG, T.T. Mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell survival and drug resistance through activation of STAT3. **Oncotarget**, v. 7(30), p. 48296–48308, 2016.
- VARDHINI, N.V.; RAO, P.J.; MURTHY, P.B.; SUDHAKAR, G. HOXD10 expression in human breast cancer. **Tumour Biol**, v. 35(11), p. 10855–60, 2014.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**, v. 92(8), p. 827–39, 2003.
- VON HEYKING, K.; ROTH, L.; ERTL, M.; SCHMIDT, O.; CALZADA-WACK, J.; NEFF, F.; LAWLOR, E. R.; BURDACH, S.; RICHTER, G. H. The posterior HOXD locus: Its contribution to phenotype and malignancy of Ewing sarcoma. **Oncotarget**, v. 7(27), p. 41767–41780, 2016.
- WACLAW, B.; BOZIC, I.; PITTMAN, M.E.; HRUBAN, R.H.; VOGELSTEIN, B.; NOWAK, M.A. A spatial model predicts that dispersal and cell turnover limit intratumour heterogeneity. **Nature**, v. 525, p. 261–264, 2015.
- WANG, L.; CHEN, S.; XUE, M.; ZHONG, J.; WANG, X.; GAN, L.; LAM, E.K.; LIU, X.; ZHANG, J.; ZHOU, T.; YU, J.; JIN, H.; SI, J. Homeobox D10 gene, a candidate tumor suppressor, is downregulated through promoter hypermethylation and associated with gastric carcinogenesis. **Mol Med**, v. 18, p. 389–400, 2012.
- WANG, L.; LIU, W.; TANG, H.; XIE, X.; ZOU, C.; WANG, Y.; GAO, Z.; YIN, J. DRP5 is involved in cancer cell growth and predicts poor prognosis in human osteosarcoma. **Cancer Med**, v. 6, p. 982– 993, 2017a.
- WANG, S.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; QIAN, W.; SUN, Y.; JI, B.; ZHANG, Y.; ZHU, C.; JI, D.; WANG, Q.; SUN, Y. Transcriptome analysis in primary colorectal cancer tissues from patients with and without liver metastases using next-generation sequencing. **Cancer Med**, v. 6(8), p. 1976–1987, 2017b.
- WANG, S.T.; LI, D.Z.; LI, J.M.; FANG, J.; LI, H.Z.; TONG, P.J.; LIU, F.C. Lentivirus-mediated RNA interference targeting Ubch10 reduces cell growth and invasion of human osteosarcoma cells via inhibition of Ki-67 and matrix metalloproteinases. **Oncol Lett**, v. 9, p. 2171– 2176, 2015a.
- WANG, X.F.; WANG, J. Icaritin suppresses the proliferation of human osteosarcoma cells in vitro by increasing apoptosis and decreasing MMP expression. **Acta Pharmacol Sin**, v. 35, p. 531– 539, 2014.
- WANG, Y.; LI, Z.; ZHAO, X.; ZUO, X.; PENG, Z. miR-10b promotes invasion by targeting HOXD10 in colorectal cancer. **Oncol Lett**, v. 12(1), p. 488–494, 2016.

- WANG, Y. Y.; LI, L.; YE, Z. Y.; ZHAO, Z. S.; YAN, Z. L. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through Hoxd10 in human gastric cancer. **World J Surg Onc**, v. 13, p. 259, 2015b.
- WELLIK, D.M.; CAPECCHI, M.R. Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. **Science**, v. 301(5631), p. 363–367, 2003.
- XIAO, H.; LI, H.; YU, G.; XIAO, W.; HU, J.; TANG, K.; ZENG, J.; HE, W.; ZENG, G.; YE, Z.; XU, H. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 and HOXD10 in human bladder cancer. **Oncol Rep**, v. 31(4), p. 1832-8, 2004.
- XIONG, W.; ZHOU, Q.; LIU, G.; LIU, X-S.; LI, X. Homeodomain containing gene 10 inhibits cell apoptosis and promotes cell invasion and migration in osteosarcoma cell lines. *Tumor Biology*, 39(5), 1010428317697566, 2017.
- XUE, M.; FANG, Y.; SUN, G.; ZHUO, W.; ZHONG, J.; QIAN, C.; WANG, L.; WANG, L.; SI, J.; CHEN, S. IGFBP3, a transcriptional target of homeobox D10, is correlated with the prognosis of gastric cancer. **PLoS One**, 8(12), e81423, 2013.
- YANG, H.; ZHOU, J.; MI, J.; MA, K.; FAN, Y.; NING, J.; WANG, C.; WEI, X.; ZHAO, H.; LI, E. HOXD10 acts as a tumor-suppressive factor via inhibition of the RHOC/AKT/MAPK pathway in human cholangiocellular carcinoma. **Oncol Rep**, v. 34(4), p. 1681-91, 2015a.
- YANG, S.F.; LEE, W.J.; TAN, P.; TANG, C.H.; HSIAO, M.; HSIEH, F.K.; CHIEN, M.H. Upregulation of miR-328 and inhibition of CREB-DNA-binding activity are critical for resveratrol-mediated suppression of matrix metalloproteinase-2 and subsequent metastatic ability in human osteosarcomas. **Oncotarget**, v. 6, p. 2736-2753, 2015b.
- YANG, Y.; CHEN, J.; CHEN, Q. Upregulation of HOXB7 promotes proliferation and metastasis of osteosarcoma cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, nº 3, p. 2773-2778, 2017.
- YAO, F.; SCHAFFER, P.A. An activity specified by the osteosarcoma line U2OS can substitute functionally for ICP0, a major regulatory protein of herpes simplex virus type 1. **J Virol**, v. 69, p. 6249–6258, 1995.
- YU, X.; WANG, Q.; ZHOU, X.; FU, C.; CHENG, M.; GUO, R.; LIU, H.; ZHANG, B.; DAI, M. Celastrol negatively regulates cell invasion and migration ability of human osteosarcoma via downregulation of the PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway in vitro. **Oncol Lett**, v. 12, p. 3423- 3428, 2016.
- YUE, B.; REN, Q.X.; SU, T.; WANG, L.N.; ZHANG, L. ERK5 silencing inhibits invasion of human osteosarcoma cell via modulating the Slug/MMP-9 pathway. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 18, p. 2640- 2647, 2014.
- ZAKANY, J.; DUBOULE, D. Synpolydactyly in mice with a targeted deficiency in the HoxD complex. **Nature**, v. 384, p. 69–71, 1996.
- ZAKANY, J.; DUBOULE, D. The role of Hox genes during vertebrate limb development. **Curr Opin Genet Dev**, v. 17, p. 359–366, 2007.
- ZHANG, J.; YAN, Y.G.; WANG, C.; ZHANG, S.J.; YU, X.H.; WANG, W.J. MicroRNAs in osteosarcoma. **Clin Chim Acta**, v. 444, p. 9-17, 2015.
- ZHOU, J.; LIU, T.; WANG, W. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 9 expression in osteosarcoma: A meta-analysis of 16 studies. **Medicine**, v. 97(44), e13051, 2018.