



Titolo: Tumore a cellule giganti dell'osso: report di un caso clinico.

Autore: Grosso, F.;¹ * Crivellari, S.;² Trincheri, N.F.;³ Ugo, F.;² Candeo, M.G.;⁴ Pertino, A.;⁵
Zai, S.;¹ Aurelio, A.;⁶ Mariani, N.;³ Mancuso, M.;⁷

Tipo: Case report

Keywords: tumore a cellule giganti dell'osso; denosumab;

¹ Unità Funzionale Interaziendale Mesotelioma – S.C. Oncologia
ASO SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

* Autore per la corrispondenza: fgrosso@ospedale.al.it

² S.S.A. S.P.S. – Clinical Trial Center
ASO SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

³ S.O.C. Anatomia Patologica
ASO SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

⁴ S.S.D. Day Hospital Onco-Ematologico
ASO SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

⁵ S.C. Oncologia
ASO SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

⁶ S.C. Radiologia
ASO SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

⁷ S.C. Chirurgia Toracica
ASO SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria



ABSTRACT

Obiettivi/Methodologia: Si presenta la storia di una paziente che all'epoca dell'esordio della malattia aveva 47 anni, con diagnosi istologica di tumore a cellule giganti dell'osso (radio distale) e con riscontro di lesioni parenchimali polmonari. La situazione clinica della paziente era tale da arrivare a considerare l'ipotesi dell'amputazione dell'arto interessato. La paziente invece ha subito resezione chirurgica con asportazione del radio distale, ricostruzione e, dopo insorgenza di recidiva del tumore, trattamento prolungato con denosumab (per un totale di 44 somministrazioni, ancora in corso).

Risultati/Conclusioni: Il trattamento della recidiva con denosumab ha portato ad un'ottima risposta di malattia con beneficio clinico, recupero funzionale di notevole rilevanza, e con stabilità di malattia a livello delle lesioni polmonari.



1. Background

Il tumore a cellule giganti dell'osso (GCTB) è una neoplasia caratterizzata da cellule istio-fibroblastiche che si fondono e formano grandi cellule multinucleate, con un ampio ed imprevedibile spettro di aggressività biologica. Il WHO (World Health Organization) lo classifica come un'aggressiva lesione potenzialmente maligna con tassi di recidiva e di metastasi non sottovalutabili; nella pratica infatti viene classificato all'interno di una classe intermedia (Osaka et al, 1997).

Questa patologia rappresenta il 5% dei tumori primitivi dell'apparato scheletrico ed il 21% dei tumori benigni dell'osso (Kivioja et al. 2008, Lackman et al., 2005).

Si localizza più frequentemente nella metafisi-metaepifisi delle ossa lunghe (50% dei casi attorno al ginocchio), ma può insorgere in tutti i distretti scheletrici (ossa piatte, brevi, vertebre) (Werner et al., 2006, Unni, 1996, Ippolito et al., 2011). Il GCTB generalmente si manifesta in soggetti nella seconda, terza o quarta decade di vita ed è il più comune tumore osseo che colpisce i pazienti più giovani. Il sintomo principale è il dolore, associato a volte a limitazione articolare; rara e tardiva è la frattura patologica. Generalmente i siti primari d'insorgenza includono il femore distale, la tibia prossimale e il radio distale (Osaka et al., 2004, Yu et al., 2013). I GCTBs ha una lieve prevalenza nel sesso femminile, con un rapporto femmina-maschio di 1.3-1.5:1.0 (Harness et al., 2004, Moon et al., 2012). Basandosi sulla letteratura, approssimativamente il 3% dei GCTBs origina metastasi polmonari (Muheremu et al., 2014, 2015, Chan et al., 2015).

Radiograficamente appare come un'area osteolitica, intramidollare, eccentrica, a volte con completa erosione della corticale ed espansione nelle parti molli (Muheremu et al., 2015). Macroscopicamente, GCTB è vascolarizzato e contiene strati di tessuto cellulare e fibroso e possono essere osservate aree emorragiche, depositi di emosiderina e di macrofagi schiumosi. Sono inoltre comuni emorragie e necrosi particolarmente estesi. Nei GCTBs primari associati a noduli polmonari si evidenziano comunemente larghe aree di emorragia e formazione di trombi, non frequenti nei tumori primari privi di recidive locali o distanti (Alberghini et al., 2010).

Microscopicamente, GCTB è costituito da popolazioni cellulari neoplastiche e reattive; la popolazione di cellule neoplastiche include istiociti mononucleari o precursori cellulari degli

osteoclasti "macrophage-like" (Hemingway et al., 2011, Athanasou et al., 2013).

Le cellule stromali hanno un citoplasma scarsamente definito e nuclei dalla forma allungata con tassi di attività mitotica variabili; inoltre esprimono l'actina del muscolo liscio, che può essere utile nel diagnosticare in modo corretto le lesioni ossee ricche in cellule giganti, in quanto l'espressione è differente nella maggior parte degli alti tumori primari dell'osso (Hemingway et al., 2012).

La popolazione di cellule reattive include numerose cellule giganti "osteoclast-like", multinucleate, con citoplasma eosinofilo e nuclei vescicolari (20-50 nuclei per cellula) con nucleoli prominenti e spesso di dimensioni maggiori rispetto agli osteoclasti normali, capaci di provocare il riassorbimento delle lacune ossee (van der Heijden et al., 2014).

Alla base di questo meccanismo vi è il pathway molecolare RANKL/RANK/OPG.

RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) è una proteina transmembrana o solubile, prodotta dalle cellule della linea stromale-osteoblastica e dai linfociti T attivati, che lega il recettore cellulare RANK, espresso dagli osteoclasti e dai loro precursori, e dalle cellule dendritiche. L'osteoprotegerina (OPG) è una molecola solubile, anch'essa prodotta dalle cellule della linea stromale-osteoblastica e dai linfociti T attivati, che agisce come "falso" recettore di RANKL, impedendo cioè l'interazione di RANKL con RANK. Nel microambiente osseo il legame di RANKL con RANK stimola la differenziazione, la fusione, l'attivazione e la sopravvivenza degli osteoclasti, con un conseguente aumento del riassorbimento osseo. OPG, impedendo tale legame, sortisce effetti opposti. Il bilancio tra RANKL ed OPG rappresenta il principale determinante del numero e dell'attività osteoclastica, e la via finale comune alla maggior parte dei fattori modulanti il riassorbimento osseo (Hofbauer et al., 2000; Khosla et al., 2001).

Dal punto di vista citogenetica, invece, le associazioni telomeriche sono le aberrazioni cromosomiche più comuni (Rao et al., 2005, Gorunova et al., 2009); il mantenimento della lunghezza dei telomeri è infatti un fattore chiave nella patogenesi del GCTB. Una mutazione driver è stata individuata nel 92% dei casi di GCTBs a carico del gene H3F3A, codificante la proteina istonica H3, appartenente alla famiglia 3A, coinvolta nella regolazione della trascrizione, del riparo, della replicazione del DNA e nella stabilità cromosomica.

Questa alterazione è stata evidenziata esclusivamente nelle cellule stromali e non negli osteoclasti (maturi e precursori) (Behjati et al., 2013). L'instabilità cromosomica può essere causata da anomalie dei centrosomi, attraverso errori nella segregazione dei cromosomi durante la mitosi cellulare (Moskovszky et al., 2010). L'amplificazione dei centrosomi e



l'aneuploidia sono frequenti nei casi di GCTB recidivanti e metastatici (Moskovszky et al., 2009, Antal et al., 1999). La perdita di alleli (1p, 9q e 19q) è comune nei GCTB primari, recidivanti e metastatici (Rao et al., 2005). Mutazioni di TP53, MDM2 e HRAS sono state osservate in GCTB secondari maligni e quindi possono giocare un ruolo nella progressione del tumore (Oda et al., 2001, Saito et al., 2011).

Di recente alcuni gruppi scientifici hanno focalizzato la loro attenzione su circa 70 miRNAs espressi in modi differenti. Sono stati effettuati in silico analisi che hanno permesso di rilevare quali miRNAs sono espressi nei pathway molecolari TGF- β (Transforming growth factor beta) e Wnt dipendenti, che regolano il riassorbimento dell'osso e l'osteogenesi. Infatti l'inibizione di tali meccanismi sembrano essere coinvolti nella crescita e nel processo di metastatizzazione. E' stato dimostrato come il mir-18/C abbia una correlazione con la riduzione della crescita e con la vitalità cellulare (Mori et al., 2015); potrebbe, in futuro, essere considerato un utile indicatore di monitoraggio per i pazienti.

Un recente studio di Wang et al. (2015) ha evidenziato come miR-106b sia down-regolato nel GCTB; RANKL è il target di questo miRNA, che sopprime l'espressione di IL-8, TWIST e MMP2. Negli esperimenti *in vitro* ed *in vivo* l'overespressione di miR-106b ha indotto una soppressione dell'osteoclastogenesi, dell'osteolisi, dell'espressione di RANKL e della formazione delle cellule giganti (Wang et al., 2015); potrebbe rappresentare quindi un nuovo possibile target per la diagnosi ed il trattamento del GCTB.

La procedura standard per il trattamento della patologia è la resezione chirurgica. Il trattamento tipico è il curettage. La radioterapia, spesso utilizzata in passato, oggi trova applicazione solo sporadicamente come adiuvante dopo il curettage, per lesioni di grandi dimensioni, localizzate in sedi difficili (vertebre, bacino, sacro) o nel trattamento di casi inoperabili (Enneking, 1983, Ippolito et al., 2011). Per quanto concerne la terapia sistemica, i bifosfonati trovano impiego nel trattamento del GCTB: i bifosfonati infatti legano la parte minerale dell'osso ed inibiscono la formazione degli osteoclasti, la loro migrazione e l'attività oncolitica sui siti di riassorbimento osseo promuovendo l'apoptosi degli osteoclasti. Negli ultimi anni è stata valutata l'efficacia dell'acido zoledronico nella terapia sistemica per GCTB (Balke et al., 2010, Tse et al., 2008, Yu et al., 2013). In molti casi inoperabili, è stata raggiunta la stabilizzazione della malattia (locale e metastatica). Si tratta comunque di serie retrospettive di limitate dimensioni, con acido zoledronico in aggiunta ad altri trattamenti, quindi l'evidenza terapeutica è molto bassa.

La scoperta dell'elevata espressione sulle cellule stromali di TCG del fattore di

differenziazione degli osteoclasti, il ligando del "receptor activator of nuclear factor kappa B", RANKL, ha permesso lo sviluppo di fattori specifici agenti contro di esso (Thomas et al., 2009).

In relazione alla biologia molecolare e funzionale del GCTB, infatti RANKL è altamente espresso dalle cellule neoplastiche stromali (Thomas et al., 2012, Roux et al., 2002, Morgan et al., 2005). L'interazione RANK-RANKL ed il fattore stimolante le colonie macrofagiche (M-CSF) giocano un ruolo importante nell'osteoclastogenesi attraverso la stimolazione del recruitment degli osteoclasti derivanti dai precursori che differenziano in cellule giganti osteoclast-like (Hemingway et al., 2011, Liao et al., 2005, Clézardin et al., 2011). Ciò è evidente anche dalla valutazione dell'espressione fenotipica, simile a quella degli osteoclasti (CD45+, CD68+, CD33+, CD14-, CD51+, CD163-, HLA-DR-) (Forsyth et al., 2009, Maggiani et al., 2011). CD33+, antigene caratteristico del GCTB, può rappresentare un nuovo target terapeutico, analogo al trattamento della leucemia mieloide acuta con gemtuzumab, un anticorpo anti-CD33 (Forsyth et al., 2009).

Recentemente è stato sviluppato un nuovo modello *in vivo* per l'ottenimento di linee cellulari di GCTB che potrà offrire nuove prospettive per lo studio e la sperimentazione di agenti terapeutici (Balke et al., 2011).

Negli ultimi anni denosumab è diventato una nuova opzione per il trattamento del GCTB locale avanzato; denosumab è un inibitore di RANKL in grado di bloccare la maturazione degli osteoclasti (Branstetter et al., 2012, Xu et al., 2013) [figura 1]. Si tratta di un anticorpo monoclonale umano (Kostenuik et al., 2009), approvato per il trattamento dell'osteoporosi, per l'incremento della massa ossea nei pazienti con tumore della prostata o della mammella a rischio di frattura a causa della terapia di deprivazione androgenica e della terapia a base di inibitori dell'aromatasi, e per alcuni individui con metastasi ossee. Denosumab è stato approvato dalla U.S. Food and Drug Administration per il trattamento dei pazienti adulti e di adolescenti selezionati con GCTB non resecabile o qualora la resezione chirurgica possa essere associata ad alta morbilità (Chawla et al., 2013).

Uno studio di fase II ha mostrato chiaramente i benefici clinici del trattamento per GCTB (Thomas et al., 2010). Nell'86% dei pazienti (30 su 35) si è osservata una risposta oggettiva, definita come un'eliminazione delle cellule giganti pari o superiore al 90% o per assenza di progressione radiografica della lesione. Non è ancora noto se il tasso di recidiva locale possa essere influenzato dal trattamento con denosumab. L'analisi ad interim di un secondo studio (n = 282) è stata recentemente pubblicata ed ha confermato l'alta efficacia del denosumab nei

casi di GCTB (Chawla et al., 2013). Il 96% dei pazienti non ha presentato progressione della malattia (follow-up di 13 mesi); 74 pazienti su 100 con tumore richiedente chirurgia al momento dell'ingresso nello studio non si sono poi dovuti sottoporre ad intervento e 16 su 26 pazienti sono stati sottoposti a intervento di minor estensione dopo il primo follow-up di 9.2 mesi. Il trattamento a lungo termine può essere richiesto per un controllo del tumore localizzato.

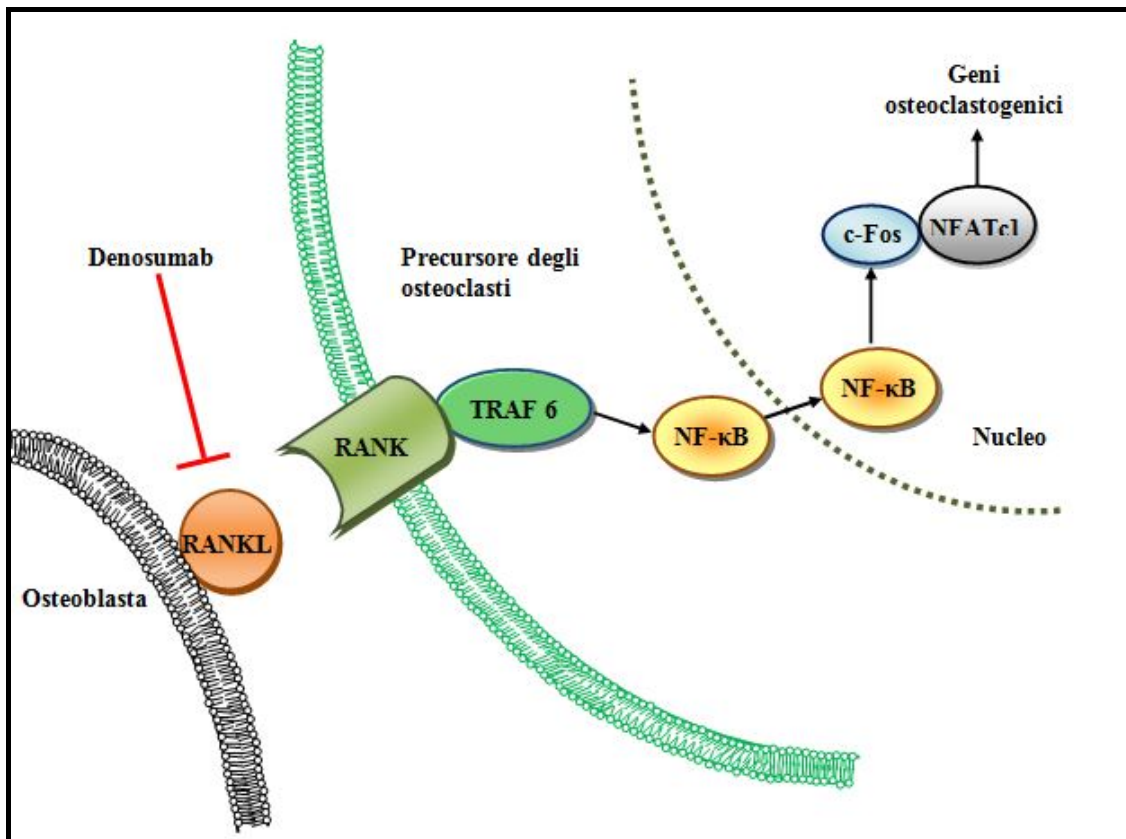


Figura 1. Il pathway dell'osteoclastogenesi fisiologica. In condizioni fisiologiche, gli osteoclasti sintetizzano RANKL, che lega RANK presente sulla superficie dei precursori degli osteoclasti e ciò induce il recruitment della proteina TRAF6, che consente l'attivazione di NF-κB e la sua traslocazione nel nucleo. NF-κB fa aumentare l'espressione di c-Fos, che interagisce a sua volta con NFATc1 per innescare la trascrizione dei geni osteoclastogenici. Denosumab in questo contesto è un inibitore di RANKL.

Un forte decremento delle cellule giganti osteoclast-like reattive ($\geq 90\%$) ed un ridotto numero di cellule stromali neoplastiche sono stati osservati dopo trattamento con denosumab, in associazione alla neoformazione di tessuto fibroso denso non proliferante e tessuto osseo (Branstetter et al., 2012). Gli effetti collaterali più comuni sono mal di testa e dolore osseo (1%-10%), osteonecrosi della mascella (1%-2%), ipocalcemia ed ipofosfatemia (<0.01%) (Thomas et al., 2010, Chawla et al., 2013, Adler et al., 2011, Cavalli et al., 2012); è stata



inoltre riscontrata in rari casi ipocalcemia e per questa ragione il monitoraggio della calcemia e la supplementazione di calcio per os sono consigliati per tutta la durata della terapia.

Denosumab è chiaramente un farmaco attivo nel trattamento di GCTB e presenta un profilo di tossicità accettabile. Conseguentemente potrebbe rappresentare lo standard per la patologia non resecabile, per facilitare la chirurgia negli ultimi stadi ed evitare così una chirurgia più invasiva.

Il principale problema nella gestione del GCTB è la recidiva locale dopo il trattamento chirurgico: 27-65% dopo il curettage isolato (Balke et al., 2008, Campanacci et al., 1987); 12%-27% dopo il curettage con adiuvanti quali fenolo, azoto liquido, polimetilmetacrilato (PMMA) (Balke et al., 2008, Becker et al., 2008, Kivioja et al., 2008, Algawahmed et al., 2010); 0%-12% dopo resezione (Balke et al., 2008, Errani et al., 2010).

Conseguentemente è richiesto un approccio valutativo multidisciplinare, che includa gli aspetti radiologici, istopatologici e clinici.

Di seguito riportiamo un caso clinico d'interesse, presentatosi all'Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria.

2. Presentazione del caso

Il caso clinico riguarda una donna che all'epoca della diagnosi aveva 47 anni e che nel maggio 2011 ha iniziato a manifestare dolore a livello del polso destro, inizialmente trattato come tendinite, a cui è seguita tumefazione nella stessa sede con il riscontro radiografico di un'area osteolitica a livello del radio distale, a destra.

Nel mese di novembre del 2011 all'Ospedale Galeazzi di Milano è stato quindi effettuato un intervento di asportazione della malattia in blocco, con resezione del radio distale e ricostruzione tramite innesto da donatore in associazione a tessuto autologo (ala iliaca) e posizionamento della placca. La diagnosi istologica ha rivelato la presenza di tumore a cellule giganti dell'osso.

L'anamnesi familiare della paziente ha reso noto che il padre è deceduto di neoplasia testicolo, la madre e due zie sono state affette da carcinoma mammario, lo zio materno ha sviluppato un tumore alla prostata ed il cugino è stato affetto da leucemia.

La paziente nel 2009 ha sviluppato un tumore vescicale (pT1G3) trattato con asportazione

completa (a livello macroscopico) con resezione transuretrale della vescica (TURV) a cui sono seguite delle instillazioni endovesicali con il bacillo di Calm ette-Guerin (BCG), in follow-up negativo.

Un'ulteriore revisione del materiale biologico effettuata dal Dipartimento di Patologia Diagnostica dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano ha confermato la diagnosi: nei campioni analizzati si   evidenziato tumore a cellule giganti con indice mitotico 21/10 HPF, assenza di necrosi, presenza di focale componente osteocartilaginea.

Per quanto riguarda il profilo di reattivit  immunocitochimica sono stati evidenziati CD68+ e p63+, SMA+, desmina positiva, cheratine AE1/AE3, EMA e proteina S100 negative.

Nel marzo del 2012   stata confermata istologicamente una recidiva locale, valutata anche tramite RNM, non resecabile, ai limiti dell'ulcerazione, in progressione e con riscontro di lesioni parenchimali polmonari in progressione.



Figura 2. Obiettivit  clinica. Tumefazione bozzuta del braccio destro di 15-20 cm, prima della resezione chirurgica ed antecedente al trattamento con denosumab (a). Situazione osservata dopo resezione chirurgica e 40 somministrazioni di denosumab (b).

Nel maggio del 2012 la paziente   stata sottoposta a resezione in videotorascopia di due delle lesioni polmonari, con successiva conferma diagnostica. Nello stesso mese, la paziente ha avviato il trattamento con denosumab (Prolia ). Il farmaco   stato somministrato attraverso iniezioni sottocutanee, alla dose di 120 mg ad iniezione. Le somministrazioni sono state effettuate nel giorno 1, 8 e 16 durante le prime 4 settimane, poi alla settimana 5 (giorno 28) e successivamente ogni 4 settimane. Il trattamento   stato ben tollerato, non si sono infatti verificati episodi di ipocalcemia n  infezioni cutanee. Le visite odontostomatologiche sono state effettuate con regolarit  e non   mai stato necessario interrompere il trattamento. La

paziente sta tuttora proseguendo la terapia, sono state effettuate 44 somministrazioni di denosumab che hanno dato un'ottima risposta locale e notevoli risultati clinico-funzionali con significativo recupero della mobilità dell'arto e con il raggiungimento della stazionarietà della malattia a livello polmonare [figura 3].

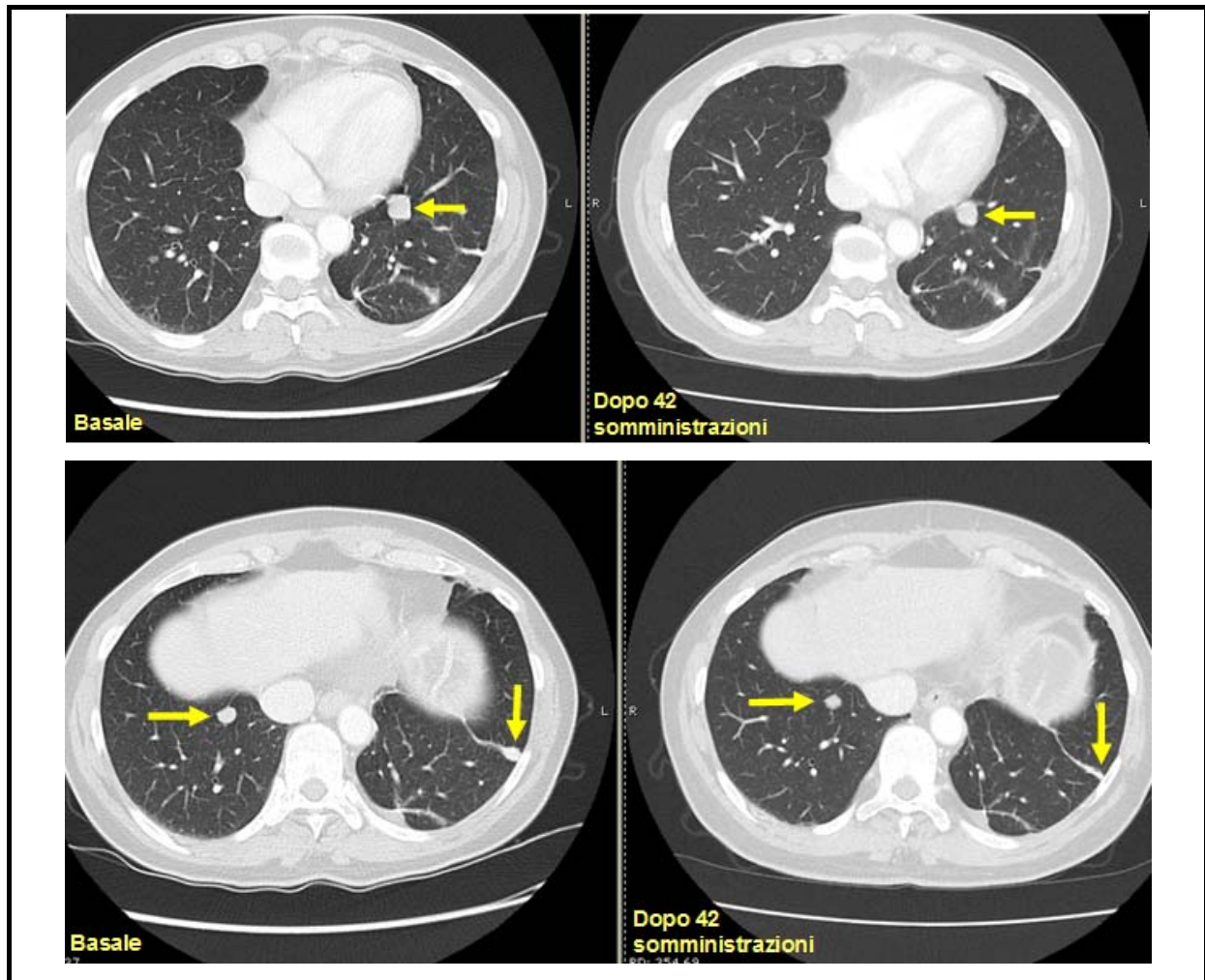


Figura 3. Lesioni polmonari al basale e dopo 42 somministrazioni di denosumab.

3. Conclusioni

GCTB è un tumore localmente aggressivo, ma raramente metastatizzante. Le decisioni riguardanti il trattamento devono essere definite all'interno di un team multidisciplinare costituito da esperti nel campo dell'oncologia del sistema muscolo scheletrico, in radiografia, MRI, istopatologia, chirurgia. Idealmente, tutti i pazienti dovrebbero essere trattati con



escissione con trattamento adiuvante locale (fenolo, azoto liquido, PMMA), con l'obiettivo di raggiungere un outcome funzionale ottimale.

Il curettage associato ad adiuvanti però è sicuro in pazienti con GCTB confinato all'osso o con fratture patologiche in cui il recupero della giunzione sia fattibile. Per l'estensione ai tessuti molli, la fattibilità della chirurgia dipende dall'estensione della componente tissutale. Per quanto riguarda i GCTBs nello scheletro assile, la fattibilità dipende dal coinvolgimento delle strutture neurovascolari e dall'estensione ai tessuti molli.

Nei pazienti con GCTB ad alto rischio, tassi di recidiva accettabili non sono raggiungibili unicamente tramite l'operazione chirurgica e per questi soggetti è quindi indicata la terapia sistemica con inibitori di RANKL o con bifosfonati.

La terapia neoadiuvante con denosumab dovrebbe essere il trattamento standard per il tumore non resecabile, per facilitare la chirurgia negli ultimi stadi e per limitare l'invasività della chirurgia. Gli effetti a lungo termine della terapia devono ancora essere analizzati.

Come è stato riscontrato in questo caso clinico, denosumab ha agito efficacemente, permettendo il recupero clinico e funzionale dell'arto in una paziente che inizialmente era stata candidata all'amputazione.

Bibliografia

- 1) Osaka S, Toriyama M, Taira K et al., Analysis of giant cell tumor of bone with pulmonary metastases. *Clin Orthop* 1997; 335:253-261.
- 2) Ippolito V, Ferrari S, Ferraresi V, Palmerini E, Zoccali C, Biagini R. Nuove frontiere nel trattamento del tumore a cellule giganti dell'osso. *Lo Scalpello-OTODI Educational*. October 2011, Volume 25, Issue 3, pp 222-226.
- 3) Muheremu A, Huang Z, Niu X. Treatment for giant cell tumor of the spine metastasizing to the lung: A report of two cases and a literature review. *Oncol Lett*. 2015 Mar;9(3):1321-1326.
- 4) Muheremu A, Niu X. Pulmonary metastasis of giant cell tumor of bones. *World J Surg Oncol*. 2014 Aug 20;12:261. doi: 10.1186/1477-7819-12-261. Review.
- 5) Chan CM, Adler Z, Reith JD, Gibbs CP Jr. Risk factors for pulmonary metastases from giant cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg Am*. 2015 Mar 4;97(5):420-8. doi: 10.2106/JBJS.N.00678.
- 6) Lackman RD, Hosalkar HS, Ogilvie CM, Torbert JT, Fox EJ. Intralesional curettage for grades II and III giant cell tumors of bone. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Sep;438:123-7.
- 7) Werner M Giant cell tumour of bone: morphological, biological and histogenetical aspects. *Int Orthop*. 2006 Dec;30(6):484-9.
- 8) Unni KK (1996) Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 11087 cases, 5th edn. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- 9) Kivioja AH, Blomqvist C, Hietaniemi K, Trovik C, Walloe A, Bauer HC, Jorgensen PH, Bergh P, Follerås G. Cement is recommended in intralesional surgery of giant cell tumors: a Scandinavian Sarcoma Group study of 294 patients followed for a median time of 5 years. *Acta Orthop*. 2008 Feb;79(1):86-93. doi: 10.1080/17453670710014815.
- 10) Osaka S, Sugita H, Osaka E, Yoshida Y, Ryu J, Hemmi A, Suzuki K. Clinical and immunohistochemical characteristics of benign giant cell tumour of bone with pulmonary metastases: case series. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2004 Jun;12(1):55-62.



- 11) Yu X, Xu M, Xu S, Su Q. Clinical outcomes of giant cell tumor of bone treated with bone cement filling and internal fixation, and oral bisphosphonates. *Oncol Lett.* 2013 Feb;5(2):447-451. Harness NG, Mankin HJ. Giant-cell tumor of the distal forearm. *J Hand Surg Am.* 2004 Mar;29(2):188-93.
- 12) Harness NG, Mankin HJ. Giant-cell tumor of the distal forearm. *J Hand Surg Am.* 2004 Mar;29(2):188-93.
- 13) Moon JC, Kim SR, Chung MJ, Lee YC. Multiple pulmonary metastases from giant cell tumor of a hand. *Am J Med Sci.* 2012 Feb;343(2):171-3. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31823483e1.
- 14) Alberghini M, Kliskey K, Krenacs T, Picci P, Kindblom L, Forsyth R, Athanasou NA. Morphological and immunophenotypic features of primary and metastatic giant cell tumour of bone. *Virchows Arch.* 2010 Jan;456(1):97-103. doi: 10.1007/s00428-009-0863-2.
- 15) Hemingway F, Taylor R, Knowles HJ, Athanasou NA. RANKL-independent human osteoclast formation with APRIL, BAFF, NGF, IGF I and IGF II. *Bone.* 2011 Apr 1;48(4):938-44. doi: 10.1016/j.bone.2010.12.023.
- 16) Athanasou NA, Bansal M, Forsyth R, et al. Giant cell tumour of bone. In: World health organization classification of tumours of soft tissue and bone, 4th, Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F (Eds), IARC, Lyon 2013:321-324.
- 17) Hemingway F, Kashima TG, Mahendra G, Dhongre A, Hogendoorn PC, Mertens F, Athanasou NA. Smooth muscle actin expression in primary bone tumours. *Virchows Arch.* 2012 May;460(5):525-34. doi: 10.1007/s00428-012-1235-x.
- 18) van der Heijden L, Dijkstra PD, van de Sande MA, Kroep JR, Nout RA, van Rijswijk CS, Bovée JV, Hogendoorn PC, Gelderblom H. The clinical approach toward giant cell tumor of bone. *Oncologist.* 2014 May;19(5):550-61. doi: 10.1634/theoncologist.2013-0432.
- 19) Rao UN, Goodman M, Chung WW, Swalski P, Pal R, Finkelstein S. Molecular analysis of primary and recurrent giant cell tumors of bone. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Apr 15;158(2):126-36.
- 20) Behjati S, Tarpey PS, Presneau N, Scheipl S, Pillay N, Van Loo P, Wedge DC, Cooke SL, Gundem G, Davies H, Nik-Zainal S, Martin S, McLaren S, Goody V, Robinson B, Butler A, Teague JW, Halai D, Khatri B, Myklebost O, Baumhoer D, Jundt G, Hamoudi R, Tirabosco R, Amary MF, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Flanagan AM. Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma

- and giant cell tumor of bone. *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1479-82. doi: 10.1038/ng.2814.
- 21) Moskovszky L, Dezső K, Athanasou N, Szendrői M, Kopper L, Kliskey K, Picci P, Sági Z. Centrosome abnormalities in giant cell tumour of bone: possible association with chromosomal instability. *Mod Pathol.* 2010 Mar;23(3):359-66. doi: 10.1038/modpathol.2009.134.
 - 22) Moskovszky L, Szuhai K, Krenács T, Hogendoorn PC, Szendroi M, Benassi MS, Kopper L, Füle T, Sági Z. Genomic instability in giant cell tumor of bone. A study of 52 cases using DNA ploidy, relocalization FISH, and array-CGH analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009 Jun;48(6):468-79. doi: 10.1002/gcc.20656.
 - 23) Antal I, Sági Z, Szendrői M. The prognostic significance of DNA cytophotometry and proliferation index (Ki-67) in giant cell tumors of bone. *Int Orthop.* 1999;23(6):315-9.
 - 24) Oda Y, Sakamoto A, Saito T, Matsuda S, Tanaka K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Secondary malignant giant-cell tumour of bone: molecular abnormalities of p53 and H-ras gene correlated with malignant transformation. *Histopathology.* 2001 Dec;39(6):629-37. Review.
 - 25) Saito T, Mitomi H, Izumi H, Suehara Y, Okubo T, Torigoe T, Takagi T, Kaneko K, Sato K, Matsumoto T, Yao T. A case of secondary malignant giant-cell tumor of bone with p53 mutation after long-term follow-up. *Hum Pathol.* 2011 May;42(5):727-33. doi: 10.1016/j.humpath.2010.08.008.
 - 26) Enneking WF. *Musculoskeletal tumor surgery.* 1983, Churchill Livingstone, New York.
 - 27) Balke M, Campanacci L, Gebert C, Picci P, Gibbons M, Taylor R, Hogendoorn P, Kroep J, Wass J, Athanasou N. Bisphosphonate treatment of aggressive primary, recurrent and metastatic Giant Cell Tumour of Bone. *BMC Cancer.* 2010 Aug 29;10:462. doi: 10.1186/1471-2407-10-462.
 - 28) Tse LF, Wong KC, Kumta SM, Huang L, Chow TC, Griffith JF. Bisphosphonates reduce local recurrence in extremity giant cell tumor of bone: a case-control study. *Bone.* 2008 Jan;42(1):68-73.
 - 29) Yu X, Xu M, Xu S, Su Q. Clinical outcomes of giant cell tumor of bone treated with bone cement filling and internal fixation, and oral bisphosphonates. *Oncol Lett.* 2013 Feb;5(2):447-451.
 - 30) Thomas DM, Skubitz KM. Giant cell tumour of bone. *Curr Opin Oncol* 2009; 21:338-



- 344.
- 31) Thomas DM. RANKL, denosumab, and giant cell tumor of bone. *Curr Opin Oncol.* 2012 Jul;24(4):397-403. doi: 10.1097/CCO.0b013e328354c129.
 - 32) Roux S, Meignin V, Quillard J, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Ferman J, Milgrom E, Mariette X. RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANKL expression in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2002 Apr;117(1):86-92.
 - 33) Morgan T, Atkins GJ, Trivett MK, Johnson SA, Kansara M, Schlicht SL, Slavlin JL, Simmons P, Dickinson I, Powell G, Choong PF, Holloway AJ, Thomas DM. Molecular profiling of giant cell tumor of bone and the osteoclastic localization of ligand for receptor activator of nuclear factor kappaB. *Am J Pathol.* 2005 Jul;167(1):117-28.
 - 34) Liao TS, Yurgelun MB, Chang SS, Zhang HZ, Murakami K, Blaine TA, Parisien MV, Kim W, Winchester RJ, Lee FY. Recruitment of osteoclast precursors by stromal cell derived factor-1 (SDF-1) in giant cell tumor of bone. *J Orthop Res.* 2005 Jan;23(1):203-9.
 - 35) Clézardin P. The role of RANK/RANKL/osteoprotegerin (OPG) triad in cancer-induced bone diseases: physiopathology and clinical implications. *Bull Cancer.* 2011 Jul;98(7):837-46. doi: 10.1684/bdc.2011.1398.
 - 36) Forsyth RG, De Boeck G, Baelde JJ, Taminiou AH, Uyttendaele D, Roels H, Praet MM, Hogendoorn PC. CD33+ CD14- phenotype is characteristic of multinuclear osteoclast-like cells in giant cell tumor of bone. *J Bone Miner Res.* 2009 Jan;24(1):70-7. doi: 10.1359/jbmr.080905.
 - 37) Maggiani F, Forsyth R, Hogendoorn PC, Krenacs T, Athanasou NA. The immunophenotype of osteoclasts and macrophage polykaryons. *J Clin Pathol.* 2011 Aug;64(8):701-5. doi: 10.1136/jcp.2011.090852.
 - 38) Balke M, Neumann A, Szuhai K, Agelopoulos K, August C, Gosheger G, Hogendoorn PC, Athanasou N, Buerger H, Hagedorn M. A short-term in vivo model for giant cell tumor of bone. *BMC Cancer.* 2011 Jun 13;11:241. doi: 10.1186/1471-2407-11-241.
 - 39) Branstetter DG, Nelson SD, Manivel JC, Blay JY, Chawla S, Thomas DM, Jun S, Jacobs I. Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone. *Clin Cancer Res.* 2012 Aug 15;18(16):4415-24. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0578.



- 40) Balke M, Schremper L, Gebert C. Giant cell tumor of bone: treatment and outcome of 214 cases. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Sep;134(9):969-78. doi: 10.1007/s00432-008-0370-x.
- 41) Xu W, Li X, Huang W, Wang Y, Han S, Chen S, Xu L, Yang X, Liu T, Xiao J. Factors affecting prognosis of patients with giant cell tumors of the mobile spine: retrospective analysis of 102 patients in a single center. *Ann Surg Oncol*. 2013 Mar;20(3):804-10. doi: 10.1245/s10434-012-2707-6.
- 42) Chawla S, Henshaw R, Seeger L, Choy E, Blay JY, Ferrari S, Kroep J, Grimer R, Reichardt P, Rutkowski P, Schuetze S, Skubitz K, Staddon A, Thomas D, Qian Y, Jacobs I. Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013 Aug;14(9):901-8. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70277-8.
- 43) Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, Warmington KS, Kurahara C, Sun N, Chen C, Li L, Cattley RC, Van G, Scully S, Elliott R, Grisanti M, Morony S, Tan HL, Asuncion F, Li X, Ominsky MS, Stolina M, Dwyer D, Dougall WC, Hawkins N, Boyle WJ, Simonet WS, Sullivan JK. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res*. 2009 Feb;24(2):182-95. doi: 10.1359/jbmr.081112.
- 44) Adler RA, Gill RS. Clinical utility of denosumab for treatment of bone loss in men and women. *Clin Interv Aging*. 2011;6:119-24. doi: 10.2147/CIA.S14565. Epub 2011 May 24. Review.
- 45) Cavalli L, Brandi ML. Targeted approaches in the treatment of osteoporosis: differential mechanism of action of denosumab and clinical utility. *Ther Clin Risk Manag*. 2012;8:253-66. doi: 10.2147/TCRM.S7688.
- 46) Errani C, Ruggieri P, Asenzio MA, Toscano A, Colangeli S, Rimondi E, Rossi G, Longhi A, Mercuri M. Giant cell tumor of the extremity: A review of 349 cases from a single institution. *Cancer Treat Rev*. 2010 Feb;36(1):1-7. doi: 10.1016/j.ctrv.2009.09.002.
- 47) Gorunova L, Vult von Steyern F, Storlazzi CT, Bjerkehagen B, Follerås G, Heim S, Mandahl N, Mertens F. Cytogenetic analysis of 101 giant cell tumors of bone: nonrandom patterns of telomeric associations and other structural aberrations. *Genes*



- Chromosomes Cancer. 2009 Jul;48(7):583-602. doi: 10.1002/gcc.20667.
- 48) Algawahmed H, Turcotte R, Farrokhyar F, Ghert M. High-Speed Burring with and without the Use of Surgical Adjuvants in the Intralesional Management of Giant Cell Tumor of Bone: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sarcoma*. 2010;2010. pii: 586090. doi: 10.1155/2010/586090.
 - 49) Campanacci M, Baldini N, Boriani S, Sudanese A. Giant-cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg Am*. 1987 Jan;69(1):106-14.
 - 50) Becker WT, Dohle J, Bernd L, Braun A, Cserhati M, Enderle A, Hovy L, Matejovsky Z, Szendroi M, Trieb K, Tunn PU. Local recurrence of giant cell tumor of bone after intralesional treatment with and without adjuvant therapy. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 May;90(5):1060-7. doi: 10.2106/JBJS.D.02771.
 - 51) Thomas D, Henshaw R, Skubitz K, Chawla S, Staddon A, Blay JY, Roudier M, Smith J, Ye Z, Sohn W, Dansey R, Jun S. Denosumab in patients with giant-cell tumour of bone: an open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2010 Mar;11(3):275-80. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70010-3.
 - 52) Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 2-12.
 - 53) Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-5.
 - 54) Mori F, Sacconi A, Canu V, Ganci F, Novello M, Anelli V, Covello R, Ferraresi V, Muti P, Bigini R, Blandino G and Strano S. miR-181c associates with tumor relapse of high grade osteosarcoma. *Oncotarget*, Vol. 6, No. 16, 2015.
 - 55) Wang T, Yin H, Wang J, et al. MicroRNA-106b inhibits osteoclastogenesis and osteolysis by targeting RANKL in giant cell tumor of bone. *Oncotarget*. 2015 May 22.