Dayane Alcântara

**Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de
osteossarcoma canino**

São Paulo

2010

Dayane Alcântara

**Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de osteossarcoma
canino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Anatomia dos Animais
Domésticos e Silvestres da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Prof. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2380
FMVZ

Alcântara, Dayane

Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de osteossarcoma canino
/ Dayane Alcântara. -- 2010.
97 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Osteossarcoma. 2. Neoplasias ósseas. 3. Metástases. 4. Sarcoma. Citometria de
fluxo. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de Osteossarcoma canino", protocolado sob o nº 1654/2009, utilizando 10 (dez) cães e 10 (dez) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/05/2009.

We certify that the Research "Obtention and characterization of canine osteosarcoma primary cell line", protocol number 1654/2009, utilizing 10 (ten) dogs and 10 (ten) mice, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/20/2009.

São Paulo, 30 de setembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALCÂNTARA, Dayane

Título: Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de osteossarcoma canino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, que trabalharam insistentemente para que eu pudesse chegar até aqui, por mais que fosse difícil suportar a saudade, sempre me apoiaram em cada passo desta caminhada...

*Dedico este trabalho á minha avó Purcina (in memorian), que sempre me deu apoio, e orou a
Deus por mim até o último dia de sua vida...*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me deu força e serenidade para que conseguisse chegar até o final desta etapa.

Aos meus pais, Mauro e Alvarina, que me ensinaram a humildade, a serenidade, a ser uma pessoa justa, e sempre trabalharam e investiram em meus estudos. Eu sei que é muito difícil pra vocês aceitar e suportar a distância, mas mesmo assim não deixam de me apoiar em todas as decisões. A família é a essência de tudo, sem vocês eu não teria chegado até aqui. AMO VOCÊS!!!

Ao meu irmão Edney, que é um capítulo à parte da minha vida, com ele eu aprendi a respeitar as diferenças e a enfrentar as dificuldades, aprendi também o amor incondicional, na sua forma mais pura e simples. Agradeço também pelas orações, e pelo enorme carinho.

À minha avó Purcina (*in memoriam*) pelas orações, que me sempre me fortaleciam não deixando que eu desanimasse nem desistisse por mais que as dificuldades aparecessem.

Ao meu namorado, Jeferson, pelas palavras de incentivo e pelo apoio nas horas mais difíceis. Por compreender a grandiosidade e importância deste trabalho e por entender a minha ausência e principalmente a falta de tempo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Durvanei, por ter me recebido em seu laboratório e me fazer sentir parte dele. Agradeço também pela paciência, ensinamentos, e pelas contribuições extremamente enriquecedoras, pelas risadas, e pelo apoio nos momentos difíceis. Gostaria de dizer que sinto muito orgulho de poder aprender um pouquinho com você, e de poder trabalhar com alguém tão competente, dedicado e que ama realmente o que faz.

À minha orientadora, Prof. Dra. Maria Angélica Miglino, pelos ensinamentos e pelo apoio, por ter me recebido e me dado a oportunidade de iniciar a vida científica no departamento, pois, poucos são àqueles que nos dão oportunidade de começar, sem ao menos nos conhecer.

À minha irmãzinha Loris e aos amigos Álvaro e Lázaro, pelo companheirismo, acolhimento, amizade sincera, pelos puxões de orelha, e principalmente, pelo incentivo e sábias palavras nas horas de dificuldade.

À minha “mãezinha postiça”, Norma, pela amizade, compreensão, companheirismo, carinho, preocupações, pelo cuidado e pela “ajudinha” nas horas de aperto.

Às companheiras de laboratório, Fernanda, Myriam e Ana Rita, pela amizade e por toda ajuda, principalmente quando iniciei os experimentos e as atormentava o tempo todo com medo de fazer algo de errado.

Ao meu amigo, André, que me ajudou muito desde o começo e principalmente durante as coletas inesperadas, sempre de bom humor, mesmo que fosse um calo ósseo “fora de hora”.

À minha amiga Drica, que me acolheu, me ajudou muito e ofereceu sua sincera amizade.

À amiga Cristiane Wenceslau, pelas dicas e pela ajuda com os experimentos de diferenciação.

Aos amigos de Departamento, Matheus, Fabiele, Ana Luiza, Dilayla, Marina, Renatinha, Thaís, Sarmento, Rafael Agopian e João, grandes colaboradores deste trabalho, que me ajudaram antes, durante e após as coletas, sempre dispostos a ajudar, com muita competência e bom humor fazendo assim com que as horas de trabalho fossem menos cansativas.

Aos amigos Isa, Cris, Amanda, Elaine, Sônia, Patrícia, Michele, Juliana, Érika e Márcia pela amizade sincera, pelos bons momentos de descontração, pelos passeios à cantina, e pelo companheirismo nas horas de estudo.

À amiga Carolina Costola, pela agradável companhia durante as muitas horas de processamento de material.

Aos amigos Alícia, Aninha, Felipinho e Maria Eugênia pela amizade e pela agradável companhia durante as viagens.

Aos Profs. Drs. Carlos Eduardo Ambrósio, Daniele Matins, Paula Papa, Pedro Bombonato, pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr., e às pós-doutorandas Janaína e Rose Bosch, pela disponibilidade de uso do laboratório, LTIAM, para realização das análises em citômetro de fluxo.

Ao Prof. Dr. Paulo Maiorca, pela enorme colaboração nas análises dos exames histopatológicos.

Às Profas. Dras. Ana Flávia e Celina, que muito colaboraram e me incentivaram para que hoje eu estivesse aqui. Quero agradecer pela amizade, companheirismo, ensinamentos, pela oportunidade das monitorias na faculdade, quando tudo isto começou!

Aos técnicos de laboratório, Ronaldo, Diogo e Índio, pelo auxílio durante os processamentos dos materiais.

À Prof. Dra. Rose Eli Grassi Ricci, pela colaboração nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Aos secretários da Anatomia, Jaqueline, Tatiana, Maicon e Fabiana, pela colaboração, pelos trabalhos prestados e por toda ajuda nos momentos de correria.

A todos os funcionários da Anatomia, pela limpeza e organização das salas e laboratórios para que pudéssemos trabalhar com tranquilidade.

Ao colega Rodrigo, mestrando da biotecnologia que sempre ajudou com os experimentos em camundongos NUDE.

Aos proprietários dos cães utilizados neste trabalho, pela compreensão da importância do mesmo.

Ao Dr. Jorge Moraes, proprietário da Clínica Animal Place, que colaborou e acreditou muito neste trabalho, sempre comunicando os casos que apareciam e ajudando nos procedimentos.

Aos professores da UNIP, que se dispuseram a ajudar prontamente, nos cedendo o material sempre que possível.

À CAPES pelo apoio financeiro.

"Tudo que é verdadeiramente grande é obra do amor "

(Mons. Carlos Henrique Neto)

RESUMO

ALCÂNTARA, D. **Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de osteossarcoma canino.** [Obtention and characterization of canine osteosarcoma primary cell line]. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno comum em cães, com preferência por raças de grande porte, tem alto potencial metastático e ocorre frequentemente no esqueleto apendicular. O diagnóstico é baseado na história clínica, exame físico, achados radiológicos e histopatológicos. O tratamento consiste na ressecção cirúrgica do tumor e o protocolo de tratamento de escolha é a amputação associada à quimioterapia. O osteossarcoma apresenta semelhanças em cães e humanos, portanto o osteossarcoma canino pode ser um modelo útil para estudar esta doença em humanos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e caracterizar a linhagem celular primária de osteossarcoma canino. Os fragmentos tumorais foram obtidos por meio de biópsias e excêrises cirúrgicas do osteosarcoma, a confirmação diagnóstica realizada pelo exame histopatológico. Os fragmentos foram cultivados em meios de cultura DMEM-H, DMEM-Low, RPMI-1640 e MEM para obtenção das linhagens. Para análise da morfologia celular foi realizada a fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida, microscopia eletrônica de transmissão e varredura. A caracterização dos marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares, análise das fases do ciclo celular e potencial elétrico mitocondrial foram realizados por citometria de fluxo. Foram obtidos 6 tumores, sendo 5 osteossarcomas e um condrossarcoma, dos quais foram obtidas 3 linhagens OST-1, OST-3, e CDS1. Os meios de cultivo DMEM-H e MEM foram eficientes para obtenção e manutenção das linhagens. Morfologicamente as células OST-1, apresentaram aspecto fusiforme enquanto as células OST-3 apresentaram pleomorfismo celular. Os marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares nas células de osteossarcoma canino OST-3 apresentaram-se diferencialmente expressos, como os marcadores de origem mesenquimal, o marcador de reparo de DNA, P53, não foi expresso como também é encontrado em inúmeras linhagens de osteossarcoma.

Palavras-chave: Osteossarcoma. Neoplasias. Metástases.

ABSTRACT

ALCÂNTARA, D. **Obtention and characterization of canine osteosarcoma primary cell line.** [Obtenção e caracterização de linhagem celular primária de osteossarcoma canino]. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Osteosarcoma is a common malignant bone tumor in dogs, with a preference for large breeds, has a high metastatic potential and occurs often in the appendicular skeleton. Diagnosis is based on clinical history, physical examination, radiological and histopatological findings. The treatment consists in surgical tumor resection, and treatment protocol choice is amputation associated with chemotherapy. Osteosarcoma has many similarities in dogs and humans, thus the canine osteosarcoma can be a usefull model to study this disease in humans. The aim of this work was to establish and characterize the canine osteosarcoma primary cell line. Tumor samples were obtained by surgical biopsy and the osteosarcoma confirmation was made by histopathological examination. Tumor fragments were cultured in DMEM-H, DMEM- LOW, RPMI-1640 and MEM culture media to establish the cell lines. Cell morphology analysis was carried out by photodocumentation in inverted microscopy and in transmission electron microscopy. The characterization of surface, cytoplasmic and nuclear markers and cell cycle phases, and mitochondrial electric potential analysis were performed by flow cytometry and analyzed with the Win MDI 2.8. Five osteosarcomas, 1 chondrosarcoma, and three cancer cell lines, OST-1, OST-3, and CDS1, were obtained. DMEM-H and MEM culture medium were efficient in cell lines establishing and maintenance. OST-1 cell line showed spindle shaped and OST-3 cell line showed pleomorphism. Surface, cytoplasmic and nuclear markers in the OST-3 canine osteosarcoma cell line were differentially expressed as mesenchimal origin markers, the DNA repair marker, P53, it was not expressed, it is also found in other osteossarcoma lines.

Keywords: Osteosarcoma. Neoplasms. Metastasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagens radiográficas de osteossarcoma. A: Imagem adquirida no momento do diagnóstico. B: evolução do tumor, 6 meses após o diagnóstico.....	34
Figura 2 -	Esquema representativo das regiões de inoculação das células de osteossarcoma canino em camundongos NUDE. A: OST-1 e B: OST-3.....	42
Figura 3 -	Fotomicrografia de cão da raça labrador. Observa-se impotência funcional do membro torácico direito.....	50
Figura 4 -	Fotomicrografia do tumor de osteossarcoma canino. A: Observa-se edema e ulceração do membro. B: Aspecto macroscópico do tumor.....	51
Figura 5 -	Análise microscópica de osteossarcoma canino. A: Grande quantidade de vasos irregulares, alta celularidade, e matriz osteóide (setas); B: Alta celularidade e matriz osteóide (círculos); C: Aumento na densidade celular em resposta à capacidade proliferativa, e pouca deposição da matriz osteóide; D: Observa-se pleomorfismo celular	52
Figura 6 -	Fotomicrografias de microscopia invertida representativas das células de osteossarcoma canino (OST-1). A: Aspecto da cultura após explante. B: Aspecto fusiforme das células OST-1 após 7 dias de cultivo.....	55
Figura 7 -	Aspecto microscópico, obtido em microscopia invertida, da linhagem celular OST-3. A e B: 5 dias após obtenção da mesma, nota-se explante aderido à placa (seta) poucas células aderidas com morfologia fusiforme. B: 10 dias após obtenção da linhagem (4x). C: 15 dias após obtenção, nota-se aspecto semelhante à trabéculas ósseas (seta) (4x). D: Nota-se pleomorfismo celular, núcleos irregulares, pouco conteúdo citoplasmático, granulação nuclear e nucléolos evidentes (40x).....	56
Figura 8 -	Fotomicrografia obtida em microscópio invertido, das células de osteossarcoma canino (OST-3). A: Aspecto microscópico da cultura celular (4x); B: Pleomorfismo celular; C e D: Pleomorfismo celular, irregularidade nuclear, granulação citoplasmática, presença de 2 nucléolos (setas), e 2 núcleos (círculo).....	57

- Figura 9 - Fotomicrografia obtida em microscópio invertido, das células de osteossarcoma canino (OST-3). A: pleomorfismo celular (10x); B: irregularidade nuclear, granulação citoplasmática (40x); C: aspecto celular semelhante ao fibroblástico; D: pleomorfismo celular. Em A e B: Coloração Azul de toluidina; C e D: Coloração Hematoxilina- eosina..... 58
- Figura 10 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão das células de osteossarcoma canino. A e B: Observa-se irregularidade da membrana nuclear, quantidade de nucléolos (setas); C: Observa-se junção célula-célula, irregularidade nuclear, edema mitocondrial. D: Nota-se edema mitocondrial e muitos ribossomos livres (círculo). E: Nota-se edema mitocondrial, irregularidade nuclear. E: Nota-se deformação da membrana mitocondrial 59
- Figura 11 - Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura das células de osteossarcoma canino (OST-3). A: Observa-se pleomorfismo celular, B: Detalhe da célula envolta por matriz extracelular, C e D: Desprendimento celular, E: Aspecto irregular da membrana celular, constituída por reentrâncias e sulcos; F: Aspecto das fibras da matriz extracelular 60
- Figura 12 - Aspecto macroscópico do tumor implantado após 20 dias de inoculação das células de osteossarcoma canino (OST-1), na concentração de 10^6 células/ml em camundongos Balb-c NUDE 61
- Figura 13 - Aspecto macroscópico do camundongo Balb-c NUDE; A: após inoculação das células de osteossarcoma canino (OST-3), B: Aspecto do animal 25 dias após inoculação das células observa-se caquexia e baço aumentado..... 62
- Figura 14 - Fotomicrografia representativa da diferenciação osteogênica realizada nas células de osteossarcoma canino (OST-3), observa-se produção de matriz óssea e áreas de calcificação (setas) 63
- Figura 15- Histogramas representativos dos marcadores expressos em células de osteossarcoma canino (OST-3). Em A: expressão do marcador CD34; B: expressão do marcador CD44; C: CD90; D: expressão do marcador CD 105 64

Figura 16 - Histogramas representativos dos marcadores expressos em células mesenquimais. A: expressão do marcador Stro-1; B: expressão do marcador OCT-4; C: expressão do marcador Nanog; D: expressão do marcador VEGF.....	65
Figura 17 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP para os marcadores de diferenciação celular expressos em células de osteossarcoma canino (OST-3) obtidos por citometria de fluxo	66
Figura 18 - Histogramas representativos dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular. Expressão do marcador P21; B: expressão do marcador P27; C: expressão do marcador P53; D: expressão do marcador Ciclina D1; E: expressão do marcador Ki-67; F: expressão do marcador PCNA.....	68
Figura 19 - Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP de expressão dos marcadores envolvidos na checagem e progressão do ciclo celular e na proliferação celular das células de osteossarcoma canino (OST-3) obtidos por citometria de fluxo.....	69
Figura 20 - Histograma representativo dos marcadores das vias de morte celular. A: expressão do marcador Bax; B: curva expressão do marcador Bad; C: expressão do marcador Bcl-2; D: expressão do marcador TNF α ; E: expressão do marcador Caspase- 3. F: Expressão do marcador Anexina V e marcador PI.....	71
Figura 21 - Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP dos diferentes marcadores de vias de morte celular. Nota-se maior expressão dos marcadores Bcl-2 (anti-apoptótico) e TNF α (necrose) obtidos por citometria de fluxo	72
Figura 22 - Histograma representativo da potencial elétrico mitocondrial. Curva em preto- controle negativo isotípico, curva em vermelho- expressão do marcador Rh123.....	73
Figura 23 - Histograma representativo das diferentes fases do ciclo celular das células de osteossarcoma canino (OST-3).....	74
Figura 24 - Gráfico de barras representando as médias e desvio padrão das diferentes fases do ciclo celular das populações de células de osteossarcoma canino (OST-3). Nota-se maior número de células em fase de síntese	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados representativos da casuística dos tumores obtidos, demonstrando identificação, tipos tumorais, raça, sexo, idade e localização do tumor.....	53
Tabela 2 - Padronização dos meios de cultivo utilizados para as células de osteossarcoma canino (OST-1 e OST-3), demonstrando morfologia e resposta proliferativa para cada um deles.....	54
Tabela 3 - Valores de média de expressão dos marcadores de diferenciação celular para células de osteossarcoma canino (OST-3).....	66
Tabela 4 - Valores de média e desvio padrão da expressão de marcadores envolvidos na checagem e progressão do ciclo celular, em células de osteossarcoma canino (OST-3).....	69
Tabela 5 - Valores de média e desvio padrão de marcadores das vias de morte celular expressos nas células de osteossarcoma canino.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 GENÉTICA DO CÂNCER	25
3.1.1 Oncogenes e Genes de Supressão Tumoral	26
3.1.2 Angiogênese Tumoral	27
3.2 OSTEOSARCOMA	28
3.2.1 Etiologia	30
3.2.2 Epidemiologia	31
3.2.3 Classificação	31
3.2.4 Diagnóstico	33
3.2.5 Prognóstico	35
3.2.6 Tratamento	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 DIAGNÓSTICO E CASUÍSTICA	39
4.2 OBTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR PRIMÁRIA DE OSTEOSARCOMA DE CANINO	39
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS	40
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão	40
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	41
4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO	42
4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	43
4.6 ANÁLISES DE MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO	43
4.6.1 Marcadores de Diferenciação Celular	44
4.6.2 Marcadores Envolvidos na Checagem e Progressão do Ciclo Celular	45
4.6.3 Marcadores Envolvidos na Morte Celular	45
4.6.4 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial	46
4.6.5 Análise das Fases do Ciclo Celular	47
4.6.5.1 Incorporação do Iodeto de Propídio (PI) e Leitura das Amostras	47

4.6.5.2 Interpretação dos Resultados.....	47
5. RESULTADOS.....	50
5.1 DIAGNÓSTICO E CASUÍSTICA	50
5.2 OBTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR PRIMÁRIA DE OSTEOSSARCOMA CANINO	53
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	54
5.3.1 Fotodocumentação do Cultivo Celular.....	55
5.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	58
5.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	60
5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO	61
5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	62
5.6 ANÁLISES DOS MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	63
5.6.1 Marcadores de Diferenciação Celular	63
5.6.2 Marcadores Envolvidos na Progressão do Ciclo Celular	67
5.6.3 Marcadores Envolvidos na Morte Celular	70
5.6.4 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial	72
5.6.5 Análise das Fases do Ciclo Celular	73
6 DISCUSSÃO.....	76
7 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	88

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O osteossarcoma é um tumor ósseo primário e maligno muito comum em crianças e adolescentes em fase de crescimento em cães, principalmente adultos, e de raças de grande porte, representando de 3 a 4% dos tumores malignos, e 85% dos tumores ósseos na espécie canina, ocorrendo também em felinos (THOMSON, 1983; DALECK, 1996; LINK; EILBER, 2002). Foi classificado por Thomson (1983) como mesenquimal podendo conter tecido conjuntivo, cartilagem, osso imaturo e osteóide. Podem ser simples quando o tecido ósseo é formado em uma matriz cartilaginosa, compostos quando osso e cartilagem estão presentes, ou pleomórficos, anaplásicos, quando tem apenas algumas áreas isoladas de osteóide.

O osteossarcoma é localmente invasivo, e potencialmente metastático, o que os torna particularmente difíceis de serem tratados. Sendo, a enfermidade metastática a causa mais comum de morte do paciente. As metástases ocorrem precocemente e o órgão preferencialmente afetado é o pulmão, em torno de 90%, e de 10% em outros órgãos, como fígado, rim, tecido ósseo, baço, miocárdio, gânglios linfáticos, diafragma, mediastino, medula, intestinos e tecido subcutâneo (SPODNICK; BERG; RAND, 1992; COSTA et al., 2001).

Os osteossarcomas originam-se, mais frequentemente nas metáfises rádio distal, tíbia distal e úmero proximal, cujo crescimento tumoral é frequentemente rápido e doloroso. Macroscopicamente, o tumor, têm aspecto branco-acinzentado e contêm quantidades variáveis de osso mineralizado. Histologicamente, o osteossarcoma canino pode ser subdividido de acordo com o tipo de células e sua atividade sendo os tipos: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, osteoclástico, pobremente diferenciado, telangiectásico e tipo células gigantes (COSTA et al., 2001).

Nas duas últimas décadas foram feitos progressos no tratamento de cães com osteossarcoma, dando opções que podem prolongar a sobrevida e manter um membro funcional sem dor (JOHNSON; WATSON, 2004).

A radioterapia é um método bastante útil para o tratamento de osteossarcoma. Pode ocasionar alívio ou até remissão da dor e retardo na progressão tumoral, sendo, portanto o procedimento indicado em casos em que há impossibilidade de excisão cirúrgica tumoral. Apesar de existirem casos de osteossarcoma induzidos por radiação ionizante em animais, a

combinação entre a radioterapia e a cirurgia pode prolongar significativamente a sobrevida dos pacientes, podendo, às vezes, ser curativa (KLEINER; SILVA, 2003).

A combinação da quimioterapia com as técnicas cirúrgicas ou radioterapia em protocolos de tratamento são vitais para aumentar o tempo de sobrevida e diminuir a ocorrência de metástase (WITHROW et al., 1991).

Apesar das duas últimas décadas terem sido promissoras nos tratamentos neoadjuvantes no tratamento de cães com osteossarcoma, e mesmo as novas estratégias terapêuticas em pacientes portadores de osteossarcoma, dando opções e informações complementares para prolongar a sobrevivência e manter um membro funcional sem dor e sem metástases, as expectativas são raras. Existem várias semelhanças entre o osteossarcoma humano e o canino, dessa forma, o osteossarcoma canino pode ser um modelo útil para a descoberta de novas abordagens terapêuticas e para uma melhor compreensão da biologia dos tumores ósseos. Portanto este trabalho tem como objetivo obter e caracterizar a linhagem celular primária de osteossarcoma canino, com a finalidade de auxiliar no estudo de abordagens terapêuticas mais adequadas e eficientes.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo estabelecer e caracterizar a linhagem celular primária de osteossarcoma canino, obtida por meio de ressecção ou biópsia tumoral de osteossarcoma canino, utilizado como modelo experimental, como uma ferramenta de estudo da biologia celular para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas quimioterápicas e terapias gênicas e celular com células tronco, para o tratamento do osteossarcoma canino.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram utilizadas os seguintes procedimentos experimentais e metodológicos no estabelecimento da cultura primária de osteossarcoma:

- manutenção e expansão de culturas primárias das espécimes biológicas de osteossarcoma canino e estabelecimento de banco de células tumorais tumorais;
- caracterizar os aspectos morfológicos do tumor e das células de osteossarcoma canino mantidas em cultura e seu potencial tumorigênico in vivo;
- avaliar a expressão de marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares nas diferentes passagens da cultura in vitro;
- analisar as vias de morte das células de osteossarcoma canino e de progressão e fases do ciclo celular por citometria de fluxo;
- analisar o potencial elétrico mitocondrial das células de osteossarcoma canino, como um teste de viabilidade celular.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

A carcinogênese é um processo dependente de diversos fatores como os genéticos e epigenéticos, que atuam sobre células com certo grau de susceptibilidade, onde a célula dos mecanismos de controle, ocorrendo proliferação. Além de proliferar, o tumor promove uma neovascularização, para suprir sua demanda nutricional. Ocorrem também alterações na membrana celular, levando a uma perda da adesão intercelular e maior adesão com os tecidos vizinhos, o que permite o desenvolvimento de metástases (INOUE; AMAR; CERVANTES, 2005).

3.1 GENÉTICA DO CÂNCER

A transformação neoplásica pode se originar de danos aos genes presentes no DNA, estes genes especificam sequência de aminoácidos que formam determinadas proteínas que realizam o efeito biológico do gene. A ativação de um gene gera uma resposta celular de síntese da proteína codificada, portanto, mutações genéticas alteram a produção e/ou a função de determinadas proteínas. Essas alterações podem ocorrer por falhas durante a replicação do DNA ou por deficiências no mecanismo de reparo. O aumento dessas falhas está relacionado à ligação de determinadas substâncias ao DNA, interferindo com a leitura correta da sequência de DNA, durante a replicação (SZYFTER et al., 1996; RIVOIRE, et al.; 2001).

As alterações do DNA são responsáveis pelo aparecimento do câncer, geralmente, ocorrem em oncogenes e genes supressores de tumor, que estão envolvidos com proteínas que regulam o ciclo celular, o crescimento e a diferenciação celular (JORDE et al., 2000; KOCH, 1998).

3.1.1 Oncogenes e Genes de Supressão Tumoral

Nas duas últimas décadas, ocorreram avanços importantes para identificação das bases do processo de transformação neoplásica (PINTO; CRUM, 2000).

Mediante a ocorrência de mutações, proto-oncogenes tornam-se oncogenes, que são carcinogênicos e causam multiplicação celular em excesso, o que faz com que o proto-oncogene aumente a expressão da proteína estimuladora do crescimento ou a produção de uma forma mais ativa. Já os genes de supressão de tumoral contribuem para a carcinogênese quando são inativados por mutações, portanto, quando os genes supressores funcionais param de agir, ocorre uma inibição inapropriada do crescimento, resultando em proliferação celular descontrolada (RIVOIRE et al., 2006).

Os genes que realizam a supressão tumoral codificam proteínas bloqueadoras da proliferação celular descontrolada, que levam ao câncer. Isto é realizado através das vias reguladoras do ciclo celular. Vários desses genes codificam proteínas inibidoras das ciclinas dependentes de kinase (CDKs) e a proteína do retinoblastoma (pRb), que é o principal freio do ciclo celular (MC KAIG; BARIC; OLSHAN, 1998).

São encontradas mutações nos genes Rb1 e p53, em pacientes com osteossarcoma, entretanto não existem alterações genéticas únicas no osteossarcoma (SU et. al., 2009). Estes genes codificados por proteínas com funções inibitórias na regulação da diferenciação da proliferação celular. Em osteossarcoma humano, 60% das anormalidades estão relacionadas a inativação da via Rb. Esta via regula a transcrição do gene E2F, que controlam a progressão das fases G1-S do ciclo celular (CHUN; DE LORIMIER, 2003).

Portanto, se a via pRb for inativada, a célula se torna sensível a fatores que bloqueiam o anticrescimento envolvidos no avanço para a fase G1, resultando em proliferação celular descontrolada. O papel do gene Rb nas anormalidades da tumorigênese do osteossarcoma canino podem não ser tão importantes como na doença humana. Ao passo que, linhagens de células caninas podem conter mutações que indiretamente inativam os membros da família pRb (MUELLER; FUCHS; KASER-HOTZ, 2007).

O gene supressor de tumor p53 codifica uma fosfoproteína P53, que é componente de uma das vias responsáveis pelo controle da apoptose e do ciclo celular, agindo como regulador da replicação celular. A ativação do gene supressor de tumor p53 leva a parada do

crescimento e/ou apoptose, desempenhando um importante papel na prevenção do câncer. Na ocorrência de danos ao DNA observa-se um acúmulo da proteína P53 na células para efetuar o reparo do DNA lesado, caso estes danos não possam ser reparados, a proteína enviará sinais para outras proteínas pró-apoptóticas que irão induzir a morte celular, portanto a perda funcional de p53 confere vantagens ao crescimento seletivo de células danificadas (CHUN; DE LORIMIER, 2003; KERBAUY, 2008).

A progressão do ciclo celular depende de ciclinas e ciclinas dependente de quinases (CDKs) que agem em conjunto no início das fases G1-S e G2-M. Para evitar a proliferação anormal, os complexos ciclinas-CDK são precisamente regulados por duas famílias inibidoras do ciclo celular que impedem a sua atividade catalítica, que incluem as proteínas INK4 α , vinculada somente as quinases CDK-4 e CDK-6, que são específicas para o início da fase G1. A segunda família de inibidores é composta por proteínas Cip/Kip, como P21 e P27 que inibem todos os complexos ciclina-CDK e não são fase-específicas (COQUERET, 2003).

3.1.2 Angiogênese Tumoral

A angiogênese é o processo de formação e crescimento de novos vasos sanguíneos, que tem como consequência a neovascularização. A indução da angiogênese constitui um fator importante na carcinogênese. Portanto, para que o tumor prolifere é necessário que ocorra angiogênese local. A neo- angiogênese ocorre na transição do processo hiperplásico para neoplasia, portanto antes da formação tumoral propriamente dita (CALUX et al., 2001; GRAÇA et al., 2004).

O rápido desenvolvimento de vasos sanguíneos em tumores sólidos favorece o rápido crescimento tumoral. Os cortes histológicos de osteossarcoma podem apresentar um grande número de vasos sanguíneos patológicos que suprem nutricionalmente o tumor (WU et al., 2000). A complexa rede de microvasos tumorais garante adequado suprimento de nutrientes e oxigênio e fornece drenagem eficiente de metabólitos (EICHHORN et al., 2007).

A angiogênese e a formação de metástases são processos funcionalmente relacionados, pois ambos envolvem uma tríade de eventos fisiopatológicos como mobilidade celular,

proteólise tecidual e proliferação celular (LIOTTA; STEEG; STELLER-STEVENSON, 1991).

As células endoteliais do vaso-mãe são estimuladas pelas citocinas angiogênicas. A lâmina basal é degradada pela ação de proteases da matriz extracelular e liberadas pelo endotélio. As células endoteliais migram para o estroma perivascular, proliferam e iniciam o brotamento capilar. A direção da migração é apontada para a fonte dos estímulos angiogênicos. O broto formado expande e assume a forma tubular e uma nova lâmina basal se desenvolve. A proliferação endotelial permite a extensão dos túbulos microvasculares que se unem por anastomose e dão origem à cadeia circulatória funcional (LIOTTA; STEEG; STELLER-STEVENSON, 1991; GIANNIS; RÜBSAN, 1997).

Os eventos adesivos requeridos na angiogênese são rigorosamente regulados. Eles são limitados às células afetadas, ativados por um curto período de tempo e, logo após, suprimidos completamente (BROOKS, 1996; LIEKENS; DE CLERCQ; NEYTS, 2001).

Numerosos estudos tem sido realizados para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas antiangiogênicas, combinadas com outros tipos de tratamento, e a quimioterapia é um deles (EICHHORN et al., 2007).

3.2 OSTEOSSARCOMA

O osteossarcoma é o tumor ósseo primário de maior frequência em cães e humanos, representando de 80 a 95% das neoplasias ósseas e 4% a 6% de todos os tumores malignos em cães (DALECK et al., 2006; OLIVEIRA; SILVEIRA, 2008; SILVEIRA et al., 2008).

Em humanos, se observa maior incidência na infância e adolescência, representando 5% das doenças malignas neste grupo (RECH et al., 2004; VAN DEN BERG, 2006). Embora rara, é a neoplasia óssea mais comum e a segunda maior causa de morte por câncer em crianças, com o pico de incidência correspondente ao período de rápido crescimento esquelético (EK; DASS; CHOONG, 2006).

Altamente agressivo e metastático, em sua natureza neoplásica, 80% de todos os osteossarcomas clinicamente apresentam micrometástases no momento do seu diagnóstico, entretanto menos de 10% dos casos são diagnosticados (SU et al., 2009).

Esta neoplasia têm uma alta capacidade metastática, sendo o pulmão o órgão mais comumente afetado (OYA et al., 2001). As principais manifestações dos osteossarcomas são a claudicação, que pode ocorrer devido à inflamação do periósteo, microfraturas ou fraturas ósseas patológicas, que podem ser observadas durante o desenvolvimento da doença. O inchaço ocorre devido à extensão do tumor para os tecidos moles circundantes (DALECK et al., 2002; MARTELLI; TEIXEIRA; SANTOS JR., 2007).

As manifestações sistêmicas como febre, anorexia, perda de peso são raras nos estágios agudos da doença. Anormalidades respiratórias associadas às metástases pulmonares, também podem ser observadas em alguns animais (MORAES et al., 2006).

As características desta neoplasia são semelhantes em cães e humanos, tanto clinicamente quanto histologicamente, entretanto a incidência em cães é 40 a 50 vezes maior que em humanos, porém o modelo canino têm sido utilizado como modelo para a doença em humanos, tanto para o estudo da neoplasia quanto para o desenvolvimento de melhores alternativas de tratamento (LOUKOPOULOS et al., 2004; OLIVEIRA; SILVEIRA, 2008).

Em humanos, jovens, as regiões mais afetadas pelo tumor são as áreas de rápido crescimento ósseo como fêmur distal, tíbia proximal, e úmero proximal. Em adultos, há grande ocorrência no esqueleto axial e ocorre em áreas que foram previamente irradiadas ou que tenham anomalias subjacentes como a doença de Paget (HAYDEN, 2006). Em cães, também observa-se maior frequência de acometimento do esqueleto apendicular, sendo o membro torácico mais comumente afetado que o pélvico. Em 60% dos casos, há acometimento das porções distal do rádio, mais frequentemente afetada, e porção proximal do úmero, outras regiões afetadas são porções distais da tíbia e do úmero e proximal da tíbia (SILVEIRA et al., 2008).

A prevalência de cânceres de ocorrência espontânea em cães é semelhante à ocorrência em humanos, e alguns cânceres caninos são modelos para a doença em humanos. O osteossarcoma canino é semelhante ao humano, apresentando alto grau de semelhança histológica, predileções anatômicas e responsividade à quimioterapia (KRUTH, 1996; VAN LEEUWEN, 1996).

3.2.1 Etiologia

A etiologia do osteossarcoma canino é desconhecida, sabe-se que os fatores genéticos desempenham um importante papel no desenvolvimento dos cânceres. Existem teorias baseadas na evidência de que o osteossarcoma tende a ocorrer nos ossos que sustentam os maiores pesos e em sítios adjacentes as fises de fechamento tardio, os animais de grande porte são predispostos a pequenos e múltiplos traumas nas regiões metafisárias, as quais são as de maior atividade celular. A sensibilização de células nesta região pode iniciar a doença pela indução da proliferação celular, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de uma linhagem mutante (STRAW, 1996).

Outros fatores podem ser prováveis causas de osteossarcoma, como a radiação ionizante experimental ou terapêutica, que pode induzir efeitos mutagênicos devido ao uso de frações excessivas, resultando no aparecimento do tumor posteriormente (WITHROW et al., 1991).

O desenvolvimento do osteossarcoma secundário á infartos ósseos é raramente encontrado. Além disso, animais submetidos à gonadectomia precoce podem estar mais suscetíveis ao desenvolvimento desta neoplasia (CHUN; DE LORIMIER, 2003).

Há hipóteses sobre a origem viral desta neoplasia, já que pode ocorrer em ninhadas e pode ser induzido experimentalmente pela injeção de células neoplásicas em fetos caninos. Porém, ainda não se isolou nenhum vírus responsável pelo surgimento do osteosarcoma canino (STRAW, 1996).

Existem relatos de OSA apendicular em fraturas não tratadas, em especial as que passaram por processos de atraso na consolidação ou não união óssea e osteomielite crônica. Alterações genéticas foram observadas em cães com OSA e relatadas como um importante fator de risco para o desenvolvimento do tumor (BRAMWELL, 1995; OLIVEIRA; SILVEIRA, 2008).

3.2.2 Epidemiologia

O osteosarcoma é representado tanto em seres humanos quanto em espécies domésticas, sendo principalmente encontradas em caninos (POOL, 1990). As raças que apresentam com mais frequência a neoplasia são o São Bernardo, Dinamarquês, Setter Irlandês, Dobermann, Pastor Alemão, Rottweiler e Golden Retriever (SPODNICK; BERG; RAND, 1992; LIU, 1996; RU; TERRACINI; GLICKMAN 1998).

Na maioria dos casos os machos são mais afetados pela doença (FOSSUM et al., 2001), exceto nas raças São Bernardo, Rottweiler e Dinamarquês (POOL, 1990; DALECK, FONSECA e CANOLA, 2002). No Brasil alguns estudos demonstram que as raças mais acometidas são aquelas de maior porte como Doberman, Fila brasileiro, Pastor Alemão e Rottweiler. Além disso, demonstram também que os ossos mais afetados são tíbia e úmero (DALECK, 1996).

Em 75% dos casos acomete o esqueleto apendicular (FOSSUM et al., 2001) ou membros pélvicos e torácicos e nos 25% restantes, afeta o esqueleto axial ou ossos chatos (KLEINER; SILVA, 2003; JOHNSON; WATSON, 2004).

3.2.3 Classificação

Os osteosarcomas foram divididos de acordo com sua localização em esqueléticos e extra-esqueléticos. Os esqueléticos são mais comuns, e o esqueleto apendicular é mais frequentemente acometido comparado ao axial, representando cerca de 75% a 85%. A região metafisária é afetada com maior frequência e o tumor raramente cruza a articulação. Radiologicamente apresentam lesão na superfície externa da cortical e áreas de calcificação celular, microscopicamente estão presentes nódulos de cartilagem envoltos por células fusiformes atípicas e pouca formação de osteóide e osso tumoral, podendo ainda ser subclassificados em periosteais e justacorticais:

- Periosteais ou centrais: originam-se com maior frequência na superfície da diáfise, sendo consideradas neoplasias de diferenciação intermediárias. Radiologicamente podem apresentar Triângulo de Codman sólido, com focos

de calcificação nodular, e a lesão ocorre na superfície externa da cortical. Possui um padrão predominantemente cartilaginoso, pouca produção de matriz osteóide e neoformação óssea, são raras metástases nesses casos.

- Justacorticais ou paraosteais: origem na superfície óssea, sem acometimento do canal medular, não tendem a formar metástase, não são invasivos, pois o tumor é envolvido por uma cápsula fibrosa (WHITROW; DOIGE, 1980; JONES, 2000; CHUN; DE LORIMIER, 2003; MUNDAY et al., 2004).

Os tumores extra-esqueléticos são tumores raros, que representam apenas 1,2% dos sarcomas em geral, e 4% dos osteossarcomas, afetam frequentemente as vísceras e são altamente malignos, observa-se a produção de osteóides e/ou matriz cartilaginosa, porém sem envolvimento ósseo ou periosteal. Ou seja, no local de surgimento do tumor não há nem perióstio nem osso que justifique o aparecimento do tumor (LARUE; WITHROW; WRIGLEY, 1986; LANGEBANBACH et al., 1998; LIMA et al., 2002).

Os osteossarcomas podem ser classificados de acordo com Doige e Weisbroge (1998) em simples quando há formação de tecido ósseo em matriz cartilaginosa; composto quando osso e cartilagem estão presentes e pleomórficos quando tem características anaplásicas, com apenas algumas ilhas de osteóides presentes.

Quanto ao aspecto radiográfico os osteossarcomas podem ser osteolíticos, escleróticos e mistos. Nos tumores osteolíticos há destruição da matriz óssea. Em tumores escleróticos ou osteoblásticos há uma grande produção de matriz osteóide. Nos mistos podem ocorrer concomitantemente lise e produção óssea (PALMER, 1992; THOMPSON; POOL, 2002; MUNDAY et al., 2004).

Histologicamente classifica-se o osteossarcoma em seis categorias, ou subtipos histológicos, determinados com base na caracterização das células, bem como o tipo e quantidade de matriz. Esta classificação divide o osteossarcoma nos subtipos osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, pobremente diferenciados ou indiferenciados, telangiectásicos e tipo de células gigantes, no entanto, não há nenhuma evidência de comportamento biológico diferente entre as subclasses (MARTELLI; TEIXEIRA; SANTOS JR, 2007):

- osteossarcoma pobremente diferenciado: caracterizado por pouca produção de matriz osteóide e produção de tecido ósseo neoformado. As células podem ter

tamanho variado, e células pleomórficas sarcomatosas indiferenciadas (THOMPSON; POOL, 2002).

- osteossarcoma osteoblástico: formados por osteoblastos anaplásicos, células com bordas angulares, citoplasma escurecido, núcleo hipercromático e posicionado excêntricamente (THOMPSON; POOL, 2002);
- osteossarcoma condroblástico: caracterizado pela produção de matrizes condróide e osteóide, com presença de cartilagem e osteóide tumorais, osso neoformado e predomínio de componentes cartilaginosos (PALMER, 1992; THOMPSON; POOL, 2002);
- osteossarcoma fibroblástico: forma mista do tumor, caracterizado pela presença de células fusiformes capazes de produzir matriz óssea mineralizada e também estroma conjuntivo com presença de osteóide e neoformação óssea (THOMPSON; POOL, 2002);
- osteossarcoma teleangectásico: este subtipo é muito agressivo, possui espículas ósseas entre as células tumorais e espaços preenchidos com sangue e circundados por células neoplásicas e não por células endoteliais (PALMER, 1992; DOIGE; WEISBRODE, 1998; THOMPSON; POOL, 2002);
- osteossarcoma de células gigantes: caracterizado por produção escassa de matriz óssea e presença de células tumorais gigantes e multinucleadas (PALMER, 1992; THOMPSON; POOL, 2002).

3.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico é baseado na história clínica, exame físico, achados radiológicos e cintilográficos, sendo, a confirmação, feita por biópsia e exame histopatológico (DALECK; FONSECA; CANOLA, 2002; JOHNSON; HULSE, 2005).

Os sinais radiográficos incluem a perda de osso cortical, proliferação periosteal, triângulo de Codman, perda do padrão trabecular fino no osso metafisário, colapso metafisário e presença de fraturas patológicas (GOMES et al., 2006).

Um dos métodos mais utilizados é o exame citológico, com base nos achados por aspiração com agulha fina ou um aspirado na área acometida, pode ser realizada rapidamente sem anestesia (MAHAFFEY, 1999), porém pode não fornecer informação definitiva (REINHARDT, et al., 2005). As células do osteossarcoma são circulares ou ovais, possuem bordas citoplasmáticas distintas, com citoplasma azul brilhante granular e exibem núcleos excêntricos com ou sem nucléolos (NELSON; COUTO, 2001).

Contudo, é muito difícil identificar o tipo exato de sarcoma baseado somente na citologia, portanto, quando o diagnóstico citológico for inconclusivo, necessita-se da confirmação histopatológica (WHITE et al., 1988; KLEINER; SILVA, 2003; REINHARDT et al., 2005). Observar na figura 1 os aspectos radiográficos do osteossarcoma.

As biópsias ósseas do osteossarcoma podem ser realizadas com técnicas abertas ou fechadas. Seja qual for a técnica utilizada, várias amostras devem ser coletadas a partir do centro e as margens da lesão para um diagnóstico mais preciso (LONGHI et al., 2006; GOMES; BRANDÃO; RANZANI, 2008).

Histologicamente, o osteossarcoma consiste em células mesenquimais malignas, que aparecem nas formas alargadas e poligonais e produzem uma matriz osteóide. Esta matriz osteóide é uma característica distintiva dos osteossarcomas, tumores ósseos não osteogênicos não produzem esta matriz (STRAW et al., 1990; THOMPSON; POOL, 2002).

No momento do diagnóstico, deve ser realizada uma avaliação completa de metástases por radiografias incluindo as vistas torácicas laterais direita e esquerda e vista ventrodorsal para que todos os campos pulmonares possam ser avaliados com precisão. Apenas 10 dos casos, terão metástases detectáveis no momento do diagnóstico, apesar de 80% dos cães apresentarem micrometástases no momento do diagnóstico. Para avaliar a presença de comprometimento ósseo em outras regiões anatômicas, cintilografia ou radiografias do esqueleto completo podem ser executadas (BERG, 1996; STRAW, 1996; SU et al., 2009).

Fonte: Policlínica Veterinária de Cotia (<http://www.policlinicaveterinaria.com.br>)

Figura 1- Imagens radiográficas de osteossarcoma. A: Imagem adquirida no momento do diagnóstico. B: evolução do tumor, 6 meses após o diagnóstico

3.2.5 Prognóstico

O prognóstico do osteossarcoma depende de inúmeros fatores incluindo idade, gênero, tumor localizado ou metastático, sítio tumoral (esqueleto axial ou apendicular), margens cirúrgicas, volume tumoral, e necrose após quimioterapia pré-operatória, tipo de tratamento escolhido, níveis séricos de fosfatase alcalina e subtipos do tumor. Em cães, além destes fatores descritos acima são incluídos também peso corporal e raça (LONGHI et al., 2006; LOUKOPOULOS; ROBINSON, 2007).

Em humanos, muitos pacientes morrem um ano após o diagnóstico, quando o tratamento de escolha é constituído apenas por cirurgia. Além disso, 80% dos casos em humanos apresentam metástases e em cães essa taxa aumenta para 90% (WITHROW et al., 1991; LONGHI et al., 2006).

Pacientes com presença de metástases ou micrometástases, tem um prognóstico pior, cerca de 80% dos pacientes apresentam metástases ou micrometáses no momento do diagnóstico, porém apenas 10% são diagnosticadas (SU et al., 2009).

Fatores indicadores de prognóstico desfavorável incluem animais com idade inferior a 4 anos, por apresentarem grau de malignidade, escore e índice mitótico mais elevados que os cães mais velhos (FOSSUM et al., 2001).

Outros fatores importantes são o volume tumoral, localização mais proximal do tumor, elevação dos níveis de fosfatase alcalina, tumor de alto grau, e presença de metástases. O tempo de sobrevida após os tratamentos variam muito. A média de sobrevida em cães tratados com cirurgia e quimioterapia neoadjuvante ou coadjuvante é de 272 dias em comparação aos tratados apenas com cirurgias que apresentam uma sobrevida média de 119 dias (WHITROW et al., 1991).

3.2.6 Tratamento

Os tratamentos atuais para osteossarcoma incluem cirurgia e quimioterapia. Em cães o tratamento cirúrgico de escolha é a amputação e em humanos frequentemente envolve a preservação do membro. A taxa de sobrevida, atualmente, aumentou de 65-75% quando comparado há três décadas (WITHROW et al., 1991; SU et al., 2009).

Uma vez que a metástase é a causa mais comum de morte em cães com osteossarcoma, e 90% dos cães morrem ou são eutanasiados em decorrência das complicações associadas às metástases pulmonares. A utilização de quimioterapia em protocolos de intenção curativa é vital para a sobrevida a longo prazo, eles são utilizados em combinação com cirurgia ou radioterapia, na tentativa de diminuir a ocorrência de metástase. A quimioterapia adjuvante tem demonstrado aumento dos intervalos livre de doença. As drogas mais utilizadas para o tratamento em humanos são a cisplatina, doxorrubicina e metotrexato. Em cães utiliza-se a cisplatina ou associação da cisplatina e doxorrubicina (WITHROW et al., 1991; SILVEIRA et al., 2008).

O tratamento do osteossarcoma canino tem dois objetivos: tratamento paliativo da dor e claudicação, ou intenção curativa. O tratamento paliativo da dor é realizado nos casos em que a metástase já é evidente ou para cumprir com os desejos do proprietário. Isso inclui o uso de analgésicos, terapia de radiação, amputação de membros e quimioterapia. O tratamento com intenção curativa inclui a combinação de diferentes modalidades de terapia, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, não importa a combinação utilizada, 80%

dos cães com OSA morrem devido ao elevado potencial metastático do tumor (LIPTACK et al., 2004^a; MUELLER; FUCHS; KASER-HOTZ, 2007).

Os procedimentos cirúrgicos com preservação dos membros estão sendo realizados, atualmente, com o tempo de sobrevida comparáveis as cirurgias de amputação. Nas técnicas de preservação de membros, o tumor é retirado com ressecção do tecido mole marginal e um enxerto cortical é colocado no local do osso (LIPTACK et al., 2004b).

Nos tratamentos com intenção curativa, em humanos, 60% dos pacientes sobrevivem por um período de 5 anos e 75% dos pacientes com doença localizada tem uma sobrevida maior que 5 anos, na presença de doença metastática essa taxa cai para 15 a 20%. Em cães, a ressecção cirúrgica do tumor primário seguido por ciclos de cisplatina ou doxorrubicina, considerados como terapia padrão, resultam em 50% de sobrevida após um ano e 20% após dois anos (MUELLER; FUCHS; KASER-HOTZ, 2007).

Segundo os mesmos autores, a radioterapia é eficiente contra o tratamento sintomático da dor óssea local em humanos e cães, reduz a inflamação e resulta em necrose de células tumorais e substituição por tecido fibroso, bem como formação e calcificação de tecidos ósseos. A radioterapia deve ser usada em humanos quando há uma lesão inacessível ou incontrolável cirurgicamente, como pelve e coluna vertebral. As taxas de resposta ao tratamento variam de 74% a 92%, com intervalo médio de duração de 73 a 130 dias e a média de sobrevida varia entre 122 e 313 dias.

Material e Métodos

“As oportunidades normalmente se apresentam disfarçadas de trabalho árduo e é por isso que
muitos não as reconhecem”

(Ann Landers)

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas amostras de osteossarcoma caninos, obtidas de hospitais e clínicas veterinárias do estado de São Paulo e o diagnóstico foi realizado por análise histológica feita por microscopia de luz.

4.1 DIAGNÓSTICO E CASUÍSTICA

Os fragmentos de osteossarcoma foram fixados, desidratados em série de etanóis em concentrações crescentes, diafanizados em xilol, seguido de inclusão em similar de parafina (Histosec®).

Os blocos contendo o osteossarcoma foram submetidos à microtomia em micrótomo automático (Leica, RM2165) obtendo-se cortes de 5µm. Os cortes foram desparafinizados e corados seguindo as técnicas de Hematoxilina e Eosina – HE. O material processado foi analisado e as características morfológicas encontradas foram fotodocumentadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

Foram analisados aspectos de casuística, como quantidade de tumores e de linhagens obtidas, subtipos histológicos, localização do tumor, raça e idade do animal.

4.2 OBTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR PRIMÁRIA DE OSTEOSSARCOMA DE CANINO

Foram utilizadas biópsias e exéreses cirúrgicas do osteosarcoma. Após a lavagem em solução salina contendo 10% de antibióticos (Garamicina e Estreptomicina), os tumores foram processados retirando-se inicialmente todo o tecido gorduroso e hemorrágico contido no espécime clínico. O tecido tumoral foi dividido em três porções: a primeira, recortada com o auxílio de um bisturi, em pequenos fragmentos de 0,01 cm² e aderidos a placas de Petri, por 1

hora em soro fetal bovino em estufa de cultura a 37° C e 5% de CO². E a segunda porção reservada para o exame histopatológico.

As culturas iniciais e sub-cultivos foram mantidos em garrafas de cultura de 25cm² e mantidos em meios de cultivo celular de DMEM-H, DMEM-low, MEM e RPMI-1640 suplementados com 10% de soro fetal de bovino, 1% de antibióticos (Garamicina e Streptomycina) 1% de ácido pirúvico, pH =7.4, em estufa a 37 ° com CO² a 5% umidificada.

As células crescem em monocamada, aderentes à superfície da placa de cultura. A sub-cultura das células foi realizada habitualmente a partir de culturas confluentes, em torno de 3 dias e, expandidas após a tripsinização das células da monocamada.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Todos os aspectos de crescimento celular foram acompanhados pela fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida acopladas a um sistema de captura de imagem CCD- Sony.

As células, cultivadas em placas de petri sobre lamínulas, foram fixadas em paraformol 4% por 2h e coradas com Azul de Toluidina e Hematoxilina-eosina, e fotografadas em microscópio invertido, acoplado a um sistema de captura de imagem CCD-Sony.

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

O tecido tumoral coletado em pequenos fragmentos foi fixado em solução Glutaraldeído (2,5%). Após fixação, o material foi inserido em microtubos e lavado em PBS 1X. Em seguida, o microtubo envolvido por papel alumínio foi deixado no misturador rotatório por uma hora em tetróxido de ósmio 1% (pós-fixação).

Para retirada do excesso de resíduos do pós-fixador, foram realizadas três lavagens em PBS 1X, cada uma de 10 minutos. Para o processo de desidratação, o material foi deixado

cinco minutos em cada álcool 70°, 80° e 90° respectivamente e duas vezes de 10 minutos no álcool absoluto (100°). Para finalizar a etapa de desidratação foi trocado o álcool absoluto por óxido de propileno.

Para inclusão, a resina foi misturada ao óxido de propileno na proporção 1:1, e o material foi deixado em misturador rotatório, por um período de quatro horas. Em seguida, a mistura foi trocada por resina pura, e deixada no misturador rotatório de 12 a 18 horas.

A resina foi substituída por uma nova resina pura e deixada em estufa a 37°C por uma hora, com tampa aberta para a evaporação dos resíduos de óxido de propileno que estiverem presentes na amostra.

Após uma hora, o material foi incluído em um molde adicionando uma nova resina, e para finalização do processo de inclusão do material, a bandeja com o material foi colocada à 60°C por um período de cinco dias.

Foram obtidos, em Ultramicrotomo, cortes semi-finos de 400nm, com navalha de vidro, corados com azul de toluidina para observação de estruturas em Microscópio Óptico. Após a observação, cortes ultrafinos do material de 50nm foram obtidos. O material foi inserido em tela de metal de 3mm e contrastado com acetato de uranila 2% por 10 minutos, lavado em água destilada e, em seguida, em citrato de chumbo 0,5% por oito minutos com subsequente lavagem em água destilada.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As células foram cultivadas em placas de petri de 3cm de diâmetro. Após a confluência, o meio de cultivo foi retirado, e realizada uma lavagem com PBS (0,1M), e então colocado o fixador glutaraldeído (3%). Após o tempo de fixação necessário (2 às 24h), as placas foram lavadas em PBS (0,1M) e água destilada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) e desidratadas em série gradual de etanóis. Foi realizada então a secagem do material em aparelho de ponto crítico usando CO₂. Após a secagem, as placas receberam o recobrimento metálico com ouro por sputtering, terminado o processamento o material estará pronto para observação no microscópio eletrônico de varredura.

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Para avaliação do potencial tumorigênico, foram utilizados 9 camundongos Balb-c^{nu/nu}. Após o crescimento celular adequado, 1×10^6 , as células foram injetadas no tecido subcutâneo da região dorsal, em seguida foram avaliados o potencial tumorigênico dessas células observando e fotodocumentando o crescimento do tecido tumoral formado. Após o crescimento tumoral, o tumor foi retirado, fixado em paraformaldeído (4%), para posterior análise histológica. Observar a figura 2.

Figura 2- Esquema representativo das regiões de inoculação das células de osteossarcoma canino em camundongos NUDE. A: OST-1 e B: OST-3

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Para avaliação do potencial de diferenciação osteogênica da linhagem celular primária de osteossarcoma canino (OST-3), foi realizada a coloração de Von Kossa. As células fixadas em paraformaldeído 4% foram lavadas com solução de PBS-L. Em seguida foi adicionado nitrato de prata a 1%, e mantido por 45 minutos exposto a luz UV. Após este procedimento, as células foram lavadas em água destilada. A seguir adicionamos a Safranina a 1% por 5 minutos e as células foram lavadas com água destilada.

Para a coloração foi adicionado o corante Von Gieson por 5 minutos. Por último, as células foram lavadas em álcool 70% e deixadas em temperatura ambiente para secagem e posterior fotodocumentação em Microscópio Leica.

4.6 ANÁLISES DE MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o crescimento e expansão celular, as células em cultura foram tripsinizadas e inativadas com soro fetal bovino, colocada em tubos de 15 mL em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e UV durante 20 minutos. Em seguida o material foi centrifugado à 1500rpm durante 10 minutos para a formação do precipitado celular. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e ressuspendido em 5 mL solução salina 0,9% para lavagem, centrifugado à 1500RPM durante 10 minutos. Após a centrifugação foi descartado novamente o sobrenadante e acrescentado o tampão FACs Flow, a suspensão foi transferida para tubos de citometria, e adicionados os anticorpos CD34, CD44, CD90, CD105, STRO-1, OCT4, Nanog, Ciclina D1, Ki-67, PCNA, VEGF, p53, p27, p21, Bax, Bad, Bcl-2, Caspase-3, AnexinaV/PI, TNF α , PI e Rh123 e incubados por 15 minutos a 4°C. As análises de expressão foram realizadas em Citômetro de Fluxo FACSCalibur em 10.000 eventos, e as aquisições analisadas pelo programa Win Mdi 2.8. A expressão de marcadores foi determinada pela comparação com um isotipo controle marcado com o fluorocromo FITC inespecífico.

A avaliação da expressão anticorpos citoplasmáticos e nucleares Ki-67, PCNA, Oct3/4, Stro-1, Nanog, Ciclina D1, Bax, Bad, P21, P27, P53 e CDK-1, as células foram permeabilizadas previamente com 10µl de Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos antes da adição dos anticorpos primários específicos.

4.6.1 Marcadores de Diferenciação Celular

Após o crescimento e expansão das culturas, as células OST-3 foram incubadas com os seguintes marcadores:

- CD34 (R&D Systems): É uma molécula de adesão, sialomucina, expressa em células endoteliais e células progenitoras hematopoéticas. Pode estar expressos em alguns tipos de tumor indicando potencial de angiogênese (BURDEN et al., 2009).
- CD44 FITC (Abcam): Molécula de adesão celular, envolvido na migração e formação de metástases (MA et al., 2010).
- CD90 (R&D Systems): Marcador expresso em uma série de linhagens celulares fibroblásticas e estromais, endotélio, e algumas linhagens celulares tumorais. Está envolvido na adesão e migração (SICLARI; QIN, 2010).
- CD105 (Santa Cruz): A endoglina ou CD105 é uma glicoproteína de membrana expressa na superfície de células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células músculo esqueléticas (SANZ-RODRIGUEZ et al., 2004cc).
- STRO-1 PE (Santa Cruz): Marcador de superfície expresso em células tronco mesenquimais (SICLARI; QIN, 2010).
- OCT3/4 e Nanog (Santa Cruz): determinante de células tronco embrionárias e germinativas são fatores de transcrição envolvidos na regulação da supressão de genes que levam a diferenciação e manutenção da pluripotência (SICLARI; QIN, 2010).
- VEGF (Santa Cruz): é uma proteína homodimérica, envolvida na angiogênese tumoral e metástase (Kaya et al., 2000).

4.6.2 Marcadores Envolvidos na Checagem e Progressão do Ciclo Celular

Após o crescimento e expansão das culturas, as células OST-3 foram incubadas com os seguintes marcadores reguladores dos pontos de checagem e progressão do ciclo celular:

- P21 e P27 FITC (Santa Cruz): Proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, reguladora da transição da fase G1-S e G2-M consecutivamente (COQUERET, 2003).
- P53 PE (Santa Cruz): Atua impedindo a progressão do ciclo celular na transição G1/S, na presença de danos à molécula de DNA. A expressão da proteína P53 e sua mutação estão associados com o pobre diagnóstico em neoplasias (TRIEB; KOTZ, 2000).
- Ciclina D1 (Santa Cruz): Proteína reguladora das CDK's (quinases dependente de ciclinas), envolvidas na fase G1/S. A amplificação ou aumento da expressão altera a progressão do ciclo celular (COQUERET, 2003).
- Ki-67 (Santa Cruz): Antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto G0 (PEÑA et al., 1998).
- PCNA (Santa Cruz): O PCNA ou antígeno nuclear de proliferação celular atua na replicação e no reparo de moléculas de DNA lesadas através da excisão de nucleotídeos, formando um complexo quaternário com a proteína P21, a ciclina D e a CDK, apresenta-se aumentada na fase S (ESPOSITO et al., 2000).

4.6.3 Marcadores Envolvidos na Morte Celular

Após o crescimento e expansão das culturas, as células OST-3 foram incubadas com os seguintes marcadores envolvidos nas vias de morte celular:

- Bax (Santa Cruz) e Bad (Cell Signaling): Proteínas pró-apoptóticas (CHORNA; DATSYUK; STOIK, 2005).
- Bcl-2 (Santa Cruz): Proteína anti-apoptótica, pois inibe a liberação do citocromo-c (CHORNA; DATSYUK; STOIK, 2005).

- TNF α (Santa Cruz): envolvidos na indução de apoptose pela via extrínseca, que também é capaz de ativar a cascata das caspases (GRIVICICHI; REGNER; ROCHA, 2007).
- AnexinaV/PI(Southern Biotech): indicam morte celular por apoptose (Anexina V) ou necrose (PI) (GRIVICICHI; REGNER; ROCHA, 2007).
- Caspase-3 FITC (Santa Cruz): Indicam morte celular por apoptose (GRIVICICHI; REGNER; ROCHA, 2007).

4.6.4 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi utilizado o fluorocromo Rodamina 123 (Invitrogen, EUA). A mitocôndria é uma organela citoplasmática relacionada ao metabolismo energético. Na membrana mitocondrial interna, está localizada a cadeia transportadora de elétrons que produz energia a partir do fluxo de elétrons e consequente fosforilação oxidativa. A Rodamina 123 é uma sonda fluorescente que é captado quando elétrons são doados para a cadeia respiratória. Quando o gradiente eletroquímico é formado, a Rodamina 123 é captada ocorrendo a diminuição da emissão de sua fluorescência. A Rodamina 123 permeia a membrana da mitocôndria e inibe processos de transporte, especialmente a cadeia transportadora de elétrons, retardando a respiração interna.

As células de osteossarcoma canino foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, e adicionados 5 μ L de Rodamina 123 (5 mg/mL). A seguir, as células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%), a 37°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 100 μ L de solução tampão para citometria, Fac'sFlow (BD). A análise da marcação com a Rodamina 123 nas células tumorais foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) pela aquisição de 10.000 eventos. Os dados foram analisados pelo programa Win MDI 2.8.

4.6.5 Análise das Fases do Ciclo Celular

As células em cultivo foram tripsinizadas, centrifugadas durante 10 minutos à 1500rpm, o sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em tampão para citometria (FACS FLOW- BD). As células foram centrifugadas novamente durante 3 minutos à 2000rpm e descartado o sobrenadante. As células foram cuidadosamente ressuspensas em 1ml de etanol 70% RNase, transferidas para microtubos e armazenadas à uma temperatura de -20° C.

4.6.5.1 Incorporação do Iodeto de Propídio (PI) e Leitura das Amostras

As amostras fixadas e armazenadas previamente foram centrifugadas à 2000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1ml de tampão de citometria e centrifugadas novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em solução de PI, preparada a partir de 5ml de PBS ao qual foram adicionados 5µl de triton 100 (0,01% v/v), 50µl de RNase A (2mg/ml) e 20µl de iodeto de propídio (5mg/ml). Em seguida realizou-se a aquisição dos dados em Citômetro de Fluxo FACSCalibur em 10.000 eventos, e para análise foi utilizado o programa Win Mdi 2.8.

4.6.5.2 Interpretação dos Resultados

O Iodeto de Propídio (PI) é um fluorocromo que se intercala estequiometricamente às duplas fitas de DNA. A fluorescência foi captada em FL-2, e ela é proporcional ao conteúdo de DNA na célula. Células diplóides que não estejam replicando (fases G0/G1 do ciclo celular) possuem conteúdo de células 2n, emitindo sinais de menor intensidade que as células situadas na fase S, durante a qual ocorre o aumento do conteúdo de DNA. Células em fase S, por sua vez, geram sinais de menor intensidade que aquelas situadas em G2/M até que

completem a replicação do conteúdo de DNA para $4n$, que permanece assim durante a fase G2 até a mitose, na qual cada célula mãe dá origem a duas células filhas.

As células situadas no pico hipodiplóide (Sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que $2n$, e podem representar aumento na ocorrência de debris celulares e DNA fragmentado, característicos de eventos de morte celular.

Todos os sinais gerados são amplificados e convertidos pelo aparelho em pulsos, permitindo a construção dos gráficos de distribuição das células no ciclo celular. Considerando a existência de uma relação proporcional entre o aumento do conteúdo de DNA e a área do pulso gerado.

Resultados

5. RESULTADOS

Para a caracterização de osteossarcoma canino, foram realizadas técnicas de microscopia invertida, microscopia eletrônica de transmissão e varredura para caracterização dos aspectos morfológicos, e citometria de fluxo para caracterização dos aspectos celulares.

5.1 DIAGNÓSTICO E CASUÍSTICA

Os exames histopatológicos confirmaram a hipótese de osteossarcoma. Os cães apresentavam impotência funcional (Figura 3), edema no membro afetado, claudicação intermitente, apatia, dois casos apresentaram ulceração. Macroscopicamente, o osteossarcoma é friável e esbranquiçado (Figura 4), pode apresentar áreas necróticas e de calcificação. Todos os tumores de osteossarcoma obtidos e avaliados apresentaram o subtipo histológico pobremente diferenciado ou indiferenciado, caracterizado pelo pleomorfismo celular, pouca deposição de matriz osteóide e aumento da densidade celular em resposta à capacidade proliferativa. As fotomicrografias dos tumores de osteossarcoma avaliados estão representados na figura 5.

Figura 3 - Fotomicrografia de cão da raça labrador. Observa-se impotência funcional do membro torácico direito

Figura 4 - Fotomicrografia do tumor de osteossarcoma canino. A: Observa-se edema e ulceração do membro. B: Aspecto macroscópico do tumor

Figura 5- Análise microscópica de osteossarcoma canino. A: Grande quantidade de vasos irregulares, alta celularidade, e matriz osteóide (setas); B: Alta celularidade e matriz osteóide (círculos); C: Aumento na densidade celular em resposta à capacidade proliferativa, e pouca deposição da matriz osteóide; D: Observa-se pleomorfismo celular

Foram obtidos 6 tumores, sendo 5 osteossarcomas do tipo indiferenciados, e 1 tumor de condrossarcoma. Destes 6 tumores foram estabelecidas 3 linhagens celulares, duas de osteossarcoma (OST 1 e OST 3) e uma de condrossarcoma (CDS1).

Os animais tinham entre 7 e 10 anos, exceto 1 deles que tinha 4 anos. Quanto á raça dos cães, 4 eram Rotweillers e 2 Labradores. Quanto ao sexo, 4 cães eram machos e 2 fêmeas, 4 dos tumores localizavam-se em membro torácico e 2 deles no membro pélvico. Os dados representativos de idade, raça, sexo, tipos tumorais, localização do tumor e linhagens celulares encontram se representados na tabela 1.

Tabela 1 - Dados representativos da casuística dos tumores obtidos, demonstrando identificação, tipos tumorais, raça, sexo, idade e localização do tumor

Identificação	Tipos Tumorais	Raça	Sexo	Idade	Localização do tumor
OST A	Osteossarcoma	Rotweiller	macho	7 anos	Membro torácico
OST 1	Osteossarcoma	Rotweiller	fêmea	9 anos	Membro torácico
OST 2	Osteossarcoma	Labrador	macho	4 anos	Membro torácico
OST 3	Osteossarcoma	Labrador	macho	10 anos	Membro pélvico
OST 4	Osteossarcoma	Rotweiller	fêmea	10 anos	Membro torácico
CDS1	Condrossarcoma	Rotweiller	macho	9 anos	Membro pélvico

5.2 OBTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR PRIMÁRIA DE OSTEOSSARCOMA CANINO

Foram realizados testes para padronizar os meios de cultivo adequados para manutenção das células de osteossarcoma canino. Aos meios de cultura testados, foram adicionados 10% soro fetal bovino (SFB), 1% de anticorpos e 1% de ácido pirúvico.

Os meios MEM (*Minimum Essential Medium*) e DMEM-H (*Dulbecco Modified Essential Medium High Glucose*) foram eficientes na manutenção das células, apresentaram uma resposta proliferativa e aspectos de crescimento celular satisfatórios. As células de osteossarcoma canino mantidas em meio MEM apresentaram aspecto fusiforme do tipo *fibroblast like*. Enquanto as células cultivadas em meio DMEM-H apresentavam-se com aspecto de pleomorfismo celular.

As células de osteossarcoma canino cultivadas em meios de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) e DMEM-LOW (*Dulbecco Modified Essential Medium-Low Glucose*) apresentaram resposta proliferativa insatisfatória, com crescimento lento e morfologia fusiforme do tipo *fibroblast like*. Porém após a expansão da cultura, as células apresentaram vacuolização, perda de adesão celular ao substrato e formação de agregados multicelulares no sobrenadante da cultura, resultando em morte celular. Os dados representativos dos meios de cultivo utilizados nas células de osteossarcoma canino estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Padronização dos meios de cultivo utilizados para as células de osteossarcoma canino (OST-1 e OST-3), demonstrando morfologia e resposta proliferativa para cada um deles

Meios de Cultivo	Morfologia	Resposta Proliferativa
MEM	tipo fibroblástica	Satisfatória
RPMI	Tipo fibroblástica	Insatisfatória
DMEM-LOW	Tipo fibroblástica	Insatisfatória
DMEM-H	pleomorfismo	Satisfatória

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS

A caracterização dos aspectos morfológicos do osteossarcoma canino e das células obtidas foi realizada pela análise e fotodocumentação das células em cultivo e técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

5.3.1 Fotodocumentação do Cultivo Celular

Após a obtenção das linhagens primárias de osteossarcoma canino foram analisados os aspectos morfológicos do cultivo celular através da fotodocumentação das garrafas de culturas em microscópio invertido.

As fotomicrografias das células de osteossarcoma canino OST1 demonstraram morfologia celular fusiforme do tipo fibroblast like. Entretanto após expansão das culturas, as células apresentaram vacuolização, perda de adesão celular ao substrato e formação de agregados multicelulares no sobrenadante da cultura, resultando em morte celular. A fotomicrografias das células de osteossarcoma canino OST 1 estão representadas na figura 6.

Figura 6 - Fotomicrografias de microcópia invertida representativas das células de osteossarcoma canino (OST-1). A: Aspecto da cultura após explante. B: Aspecto fusiforme das células OST-1 após 7 dias de cultivo

A linhagem celular de osteossarcoma canino (OST-3) apresentou capacidade proliferativa satisfatória. As células OST-3 apresentaram pleomorfismo celular, núcleos grandes e irregulares, diminuição da densidade citoplasmática, granulação citoplasmática, algumas células apresentam mais de um nucléolo ou mais de um núcleo, o que pode indicar uma maior capacidade proliferativa. Além disso, em algumas garrafas foi possível observar

um aspecto semelhante às trabéculas ósseas. As fotomicrografias representativas relacionadas à fotodocumentação do cultivo das células OST-3 estão representadas nas figuras 7, 8 e 9.

Figura 7 - Aspecto microscópico, obtido em microscopia invertida, da linhagem celular OST-3. A e B: 5 dias após obtenção da mesma, nota-se explante aderido à placa (seta) poucas células aderidas com morfologia fusiforme. B: 10 dias após obtenção da linhagem (4x). C: 15 dias após obtenção, nota-se aspecto semelhante à trabéculas ósseas (seta) (4x). D: Nota-se pleomorfismo celular, núcleos irregulares, pouco conteúdo citoplasmático, granulação nuclear e nucléolos evidentes (40x)

Figura 8 - Fotomicrografia obtida em microscópio invertido, das células de osteossarcoma canino (OST-3). A: Aspecto microscópico da cultura celular (4x); B: Pleomorfismo celular; C e D: Pleomorfismo celular, irregularidade nuclear, granulação citoplasmática, presença de 2 nucléolos (setas), e 2 núcleos (círculo)

Figura 9 - Fotomicrografia obtida em microscópio invertido, das células de osteossarcoma canino (OST-3). A: pleomorfismo celular (10x); B: irregularidade nuclear, granulação citoplasmática (40x); C: aspecto celular semelhante ao fibroblástico; D: pleomorfismo celular. Em A e B: Coloração Azul de toluidina; C e D: Coloração Hematoxilina-eosina

5.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos do tecido tumoral foram utilizados para realizar análises por microscopia eletrônica de transmissão. As fotomicrografias demonstraram irregularidade das membranas nucleares, pouco conteúdo citoplasmático e células que apresentam mais de um nucléolo. Observou-se também mitocôndrias esféricas com irregularidades na membrana interna, edema mitocondrial e presença de mitocôndrias gigantes com formato irregular. Além disso,

observamos também grande quantidade de ribossomos livres. As fotomicrografias da microscopia eletrônica de transmissão estão representadas na figura 10.

Figura 10 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão das células de osteossarcoma canino. A e B: Observa-se irregularidade da membrana nuclear, quantidade de nucléolos (setas); C: Observa-se junção célula-célula, irregularidade nuclear, edema mitocondrial. D: Nota-se edema mitocondrial e muitos ribossomos livres (círculo). E: Nota-se edema mitocondrial, irregularidade nuclear. E: Nota-se deformação da membrana mitocondrial

5.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura observamos pleomorfismo celular, células envoltas por uma provável matriz óssea, observou-se também irregularidades na membrana celular reproduzindo projeções semelhantes à sulcos, representados na figura 11.

Figura 11 - Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura das células de osteossarcoma canino (OST-3). A: Observa-se pleomorfismo celular, B: Detalhe da célula envolta por matriz extracelular, C e D: Desprendimento celular, E: Aspecto irregular da membrana celular, constituída por reentrâncias e sulcos; F: Aspecto das fibras da matriz extracelular

5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Na avaliação do potencial tumorigênico das células de osteossarcoma canino OST 1, realizada pela inoculação de células tumorais em camundongos Balb-c ^{nu/nu}, foi observada formação de massa tumoral, conferindo potencial de crescimento e tumorigênico às células OST1, representado na figura 12.

Figura 12 - Aspecto macroscópico do tumor implantado após 20 dias de inoculação das células de osteossarcoma canino (OST-1), na concentração de 10^6 células/ml em camundongos Balb-c NUDE

Os camundongos Balb-c ^{nu/nu} inoculados com células de osteossarcoma canino (OST 3) demonstraram caquexia e baço evidentes após 25 dias de inoculação, demonstrando o potencial metastático destas células. Estas características estão representadas na figura 13.

Figura 13 - Aspecto macroscópico do camundongo Balb-c NUDE; A: após inoculação das células de osteossarcoma canino (OST-3), B: Aspecto do animal 25 dias após inoculação das células observa-se caquexia e baço aumentado

5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Após a obtenção, expansão, congelamento e cultivo, as células OST-3 foram caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares. A avaliação do potencial de diferenciação osteogênica foi realizada pela coloração de Von Kossa. A fotomicrografia demonstrou a produção de matriz óssea pelas células OST-3, áreas de calcificação e marcação positiva para células ósseas, confirmando a origem óssea da linhagem obtida, representada na figura 14.

Figura 14- Fotomicrografia representativa da diferenciação osteogênica realizada nas células de osteossarcoma canino (OST-3), observa-se produção de matriz óssea e áreas de calcificação (setas)

5.6 ANÁLISES DOS MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o crescimento, expansão, congelamento e cultivo das células de osteossarcoma canino OST-3, foram realizadas as análises dos marcadores por citometria de fluxo.

5.6.1 Marcadores de Diferenciação Celular

A expressão dos marcadores CD44, CD90 e CD 105 mostraram-se significativamente aumentados em células OST-3 mantidas em cultura até a 7^a passagem. Os resultados estão

apresentados na forma de histograma plotados os valores da média do controle isotópico (curva em preto), em todas as amostras se mostraram negativos e os valores de expressão dos diferentes marcadores em análise (curva em vermelho) foram fortemente expressos pelas células. Em relação aos valores de média das culturas de OST-3 analisadas, a expressão dos marcadores CD44 e CD105 foram expressivamente maiores que o marcador CD 90, enquanto que o marcador CD34 foi negativo, demonstrando a dependência desta linhagem na adesão e síntese de matriz extracelular, supostamente dependente de TGF- β . Os histogramas representativos estão apresentados na figura 15 e as médias e desvio padrão na tabela 3.

Figura 15 - Histogramas representativos dos marcadores expressos em células de osteossarcoma canino (OST-3). Em A: expressão do marcador CD34; B: expressão do marcador CD44; C: CD90; D: expressão do marcador CD 105

A expressão dos marcadores para células-tronco tumorais Stro-1, Oct4, Nanog e dos receptores para o fator de crescimento vascular - VEGF mostraram-se significativamente

aumentados em células OST-3 mantidas em cultura até a 7^a passagem. Os valores da média das culturas de OST-3 analisadas, a expressão do marcador VEGF foi expressivamente maior, portanto capaz de responder a fatores envolvidos na angiogênese tumoral. Os marcadores de origem mesenquimal e embrionária Stro-1, Oct4 e Nanog foram positivos na linhagem OST-3, possivelmente representando a seleção de clones tumorais progenitores da célula-tronco tumoral. Os histogramas representativos estão apresentados na figura 16 e as médias e desvio padrão na figura 17 e tabela 3.

Figura 16 - Histogramas representativos dos marcadores expressos em células mesenquimais. A: expressão do marcador Stro-1; B: expressão do marcador OCT-4; C: expressão do marcador Nanog; D: expressão do marcador VEGF

Figura 17 - Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP para os marcadores de diferenciação celular expressos em células de osteossarcoma canino (OST-3) obtidos por citometria de fluxo

Tabela 3 - Valores de média de expressão dos marcadores de diferenciação celular para células de osteossarcoma canino (OST-3)

Marcador	Porcentagem de Expressão
CD 34	Não expesso
CD 44	82.1 $\pm$ 4.1
CD 90	63.8 $\pm$ 3.3
CD 105	80.6 $\pm$ 4.0
Stro-1	45.1 $\pm$ 2.2
Nanog	65.2 $\pm$ 3.3
Oct $\frac{3}{4}$	59.8 $\pm$ 2.9
VEGF	92,6 $\pm$ 4,6

5.6.2 Marcadores Envolvidos na Progressão do Ciclo Celular

A expressão dos marcadores de checagem e progressão do ciclo celular P21, P27, P53, Ciclina D1, e de proliferação celular Ki-67 e PCNA mostraram-se diferencialmente expressos em células OST-3 mantidas em cultura até a 7^a passagem. A mutação da P53 em células tumorais representa uma etapa do grau de malignidade, em células OST-3 somente ocorreu expressão em 15% das células, portanto seus reguladores de checagem e progressão foram aumentados significativamente, p21 e p27. O marcador de progressão expresso na fase final de G1 e início da fase de síntese, a ciclina D-1 neste tipo celular mostrou expressão heterogênea e diferencial em duas populações de células tumorais, representando capacidades diferentes de proliferação. Para os marcadores de proliferação expressos em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G0 ou quiescência, Ki67 e PCNA foram significativamente expressos nas duas populações de células tumorais. Os histogramas representativos estão apresentados na figura 18 e as médias e desvio padrão na figura 19 e tabela 4.

Figura 18 - Histogramas representativos dos marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular. Expressão do marcador P21; B: expressão do marcador P27; C: expressão do marcador P53; D: expressão do marcador Ciclina D1; E: expressão do marcador Ki-67; F: expressão do marcador PCNA

Figura 19 - Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP de expressão dos marcadores envolvidos na checagem e progressão do ciclo celular e na proliferação celular das células de osteossarcoma canino (OST-3) obtidos por citometria de fluxo

Tabela 4 - Valores de média e desvio padrão da expressão de marcadores envolvidos na checagem e progressão do ciclo celular, em células de osteossarcoma canino (OST-3)

Marcador	Porcentagem de Expressão
P21	53.5 $\pm$ 2.6
P27	70.3 $\pm$ 3.5
P53	15.3 $\pm$ 0.8
Ciclina D-1	78.5 $\pm$ 3.9
Ki-67	90.1 $\pm$ 4.5
PCNA	81.6 $\pm$ 4.1

5.6.3 Marcadores Envolvidos na Morte Celular

A determinação da quantidade de células mortas por apoptose ou necrose, foi determinada pela expressão dos marcadores Bax, Bad, Bcl-2, Caspase-3, $\text{TNF}\alpha$, AnexinaV/PI em células de osteossarcoma canino (OST-3) mantidas em cultura até a 7ª passagem. Em relação aos valores de média dos experimentos realizados com AnexinaV/PI, as células coradas em verde (AnexinaV- FITC) foram consideradas apoptóticas e as coradas em vermelho (PI) necróticas. Foram consideradas viáveis as células não marcadas.

Os resultados das diferentes proporções de células mortas mostraram que as células de osteossarcoma não apresentaram número expressivo de células em processo de morte programada ou por injúria, necróticas.

A família de proteínas Bcl-2 participam ativamente na ativação da apoptose. Os membros Bcl-2 e Bclx-1 inibem a apoptose, pois previnem a liberação do citocromo-c. Por outro lado, os membros Bax e Bad são proteínas pró-apoptóticas. Nossos resultados mostraram que em células de osteossarcoma (OST-3) expressam constitutivamente a proteína anti-apoptótica Bcl-2 em menores proporções os membros pró-apoptóticos Bax e Bad, o que permitiram o controle da sua homeostasia.

As caspases sinalizam para a apoptose, pois clivam substratos com resíduos de aspartato. A caspase-3 é uma caspase executora e os resultados obtidos em células de osteossarcoma canino (OST-3) mostraram que não há indução de morte celular.

A família de receptores do $\text{TNF}\alpha$ (TNFR-1), estão envolvidos na indução de apoptose pela via extrínseca, que também é capaz de ativar a cascata das caspases. Em células de osteossarcoma canino há um aumento na expressão desses receptores, provavelmente uma das possíveis vias de morte celular envolvidas na expansão de clones de células tumorais com diferentes potenciais tumorigênicos.

Os histogramas representativos estão apresentados na figura 20 e as médias e desvio padrão na figura 21 e tabela 5.

Figura 20 - Histograma representativo dos marcadores das vias de morte celular. A: expressão do marcador Bax; B: curva expressão do marcador Bad; C: expressão do marcador Bcl-2; D: expressão do marcador TNF α ; E: expressão do marcador Caspase- 3. F: Expressão do marcador Anexina V e marcador PI

Figura 21 - Gráfico de barras representando as médias $\pm$ DP dos diferentes marcadores de vias de morte celular. Nota-se maior expressão dos marcadores Bcl-2 (anti-apoptótico) e TNF α (necrose) obtidos por citometria de fluxo

Tabela 5 - Valores de média e desvio padrão de marcadores das vias de morte celular expressos nas células de osteossarcoma canino

Marcador	Porcentagem de Expressão
Bax	2,3 $\pm$ 0,1
Bad	4,6 $\pm$ 0,2
Bcl-2	69,3 $\pm$ 3,5
TNFα	65,8 $\pm$ 3,3
Anexina-V	3,9 $\pm$ 0,1
PI	1,3 $\pm$ 0,06

5.6.4 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial

A energia liberada durante as reações de oxidação na cadeia respiratória mitocondrial é armazenada como um gradiente eletroquímico que consiste de um potencial elétrico trans-

membrana, envolvido em diversos processos de liberação e ativação das proteínas pró e anti apoptóticas.

Após a aquisição da intensidade de fluorescência arbitrária, emitida pela sonda reodamina 123. Não há modificações no potencial elétrico mitocondrial em células OST-3. Os resultados dos histogramas representativos das células de osteossarcoma canino (OST-3) estão apresentados na figura 22.

Figura 22 - Histograma representativo da potencial elétrico mitocondrial. Curva em preto- controle negativo isotípico, curva em vermelho- expressão do marcador Rh123

5.6.5 Análise das Fases do Ciclo Celular

Células tumorais e normais se dividem mais rapidamente quando os volumes teciduais ou tumorais são menores. Sua fração proliferativa diminui à proporção que o volume cresce, aumentando seu tempo de duplicação. Assim, um tumor apresenta tempos diferentes de duplicação em momentos diferentes de seu crescimento ou estadio. Os resultados demonstraram uma grande proporção de células com capacidade de síntese (Fase S) e em proliferação celular (G2/M). O histograma representativo das diferentes fases do ciclo celular

das células de osteossarcoma canino está representado na figura 23, e os valores de média e desvio padrão na figura 24.

Figura 23 - Histograma representativo das diferentes fases do ciclo celular das células de osteossarcoma canino (OST-3)

Figura 24 - Gráfico de barras representando as médias e desvio padrão das diferentes fases do ciclo celular das populações de células de osteossarcoma canino (OST-3). Nota-se maior número de células em fase de síntese

Discussão

6 DISCUSSÃO

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno com alto potencial metastático, acomete principalmente humanos, gatos e cães. Apesar dos avanços com relação aos tratamentos atuais que promoveram um aumento da sobrevida e do intervalo livre de doença, ainda não há nenhum tipo de tratamento que seja eficiente contra esta neoplasia. Os osteossarcomas caninos são utilizados como modelos para a doença em humanos devido à grande semelhança na apresentação clínica e histológica. As linhagens celulares OST-1 e OST-3, estabelecidas com sucesso neste estudo, foram derivadas de osteossarcomas espontâneos de cães das raças Rotweiller e Labrador.

Histologicamente, o osteossarcoma pode apresentar 6 subtipos diferentes, o osteoblástico, fibroblástico, condroblástico, pobremente diferenciado, de células gigantes e teleangectásico. Neste trabalho, os osteossarcomas obtidos foram do subtipo pobremente diferenciado, de acordo com Thomas e Kansara (2006) este subtipo representa aproximadamente 80% dos osteossarcomas em cães.

A maior importância da obtenção de um banco de células, e um dos objetivos deste trabalho, é ser composto, principalmente, por culturas primárias ou subculturas primárias obtidas de biópsias de tumores em cães de diferentes raças. O método empregado neste trabalho foi a dissecação do explante primário, sem adição da digestão enzimática.

A cultura celular, atualmente, é uma ferramenta essencial e uma importante alternativa à experimentação animal. Os sistemas de cultura “*in vitro*” têm possibilitado estudos direcionados ao comportamento de crescimento e diferenciação celular, a modulação do ciclo celular, o crescimento viral, as interações célula-célula e as manipulações genéticas com vista ao estudo da estrutura e expressão gênica utilizadas na terapia celular, como no uso de células-tronco. Existem inúmeras vantagens com relação à obtenção e formação de um banco de células tumorais, como o controle das condições ambientais, a análise independente de parâmetros, a execução de grande número de testes em pequeno intervalo de tempo, a redução dos ensaios com modelos animais e principalmente o menor número de animais em experimentação. Entretanto, existem também desvantagens como a perda das características fenotípicas, um sistema biológico em desenvolvimento fora do ambiente natural e a ausência de sinais extracelulares reguladores importantes em vias de sinalização (FRESHNEY, 2000).

As células em cultura mantêm o seu genoma e os mecanismos fundamentais de proliferação e do ciclo celular, representando um modelo experimental, em muitos testes e delineamentos experimentais, substituindo o modelo animal (ASSIS et al., 2002). Portanto, cada informação genética preservada é inerente a um único genoma, sendo uma particularidade avaliada no modelo desenvolvido neste estudo, no qual as células do tumor primário de osteossarcoma canino foram submetidas.

Em estudos relacionados ao câncer, as culturas de tecidos têm um papel fundamental com possíveis aplicações no diagnóstico e no condicionamento do tratamento de vários tipos de neoplasias (SHAY et al., 1995).

Atualmente, os avanços no desenvolvimento de cultivo de células permitiram a formulação de uma variedade de meios de cultura, acrescidos de substâncias, fatores de crescimento ou aminoácidos essenciais, possibilitando, o cultivo de células da maioria dos tecidos e órgãos. Existem inúmeras críticas sobre a validade do cultivo celular como modelo biológico com função fisiológica, por, frequentemente, não expressarem as mesmas propriedades e características das células de origem, devido às mudanças no ambiente celular quando mantidas e amplificadas “*in vitro*” (FRESHNEY, 2000).

Os meios de cultura utilizados e avaliados para a obtenção das linhagens de osteossarcoma canino OST-1 e OST-3 foram DMEM-H, RPMI-1640, MEM e DMEM-LOW. Condições favoráveis de crescimento foram obtidas com os meios de cultura DMEM-H e MEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de ácido pirúvico. As células tumorais apresentavam-se com aspecto pleomórfico e após a expansão, congelamento e cultivos sucessivos possibilitaram a ampliação da cultura até a 7ª passagem, onde foram analisados os diferentes aspectos morfofuncionais apresentados neste trabalho.

O crescimento celular foi avaliado após a adesão e multiplicação. Ao longo do tempo, as células utilizam os nutrientes do meio e os resíduos aparecem modificando seu pH. Após sete dias, as células de osteossarcoma OST-3 atingiram a confluência de aproximadamente 70-80%, momento que foi substituído em sua totalidade o meio de cultura, e parte da suspensão celular foi novamente cultivada e a outra parte utilizada na determinação dos diferentes marcadores celulares.

As células de osteossarcoma são derivadas de tumores ósseos malignos, estas células compartilham algumas características osteoblásticas, e por isso são frequentemente utilizadas como modelo osteoblástico. Entretanto, aberrações cromossômicas levam a uma alteração na

função celular normal. No osteossarcoma, a expressão de proteínas da matriz extracelular pode contribuir para o desenvolvimento de alterações celulares, levando a um padrão histológico e imunoistoquímico diferencial quando comparados a osteoblastos normais.

Estudos celulares são importantes, pois, o osteossarcoma pode apresentar diferentes subpopulações (PAUTKE et al., 2004). Neste trabalho, a linhagem celular de osteossarcoma OST-1 apresentou aspecto morfológico fusiforme do tipo *fibroblast like*, enquanto que, as células da linhagem OST-3 apresentaram pleomorfismo celular, exibindo núcleos irregulares, pouco conteúdo citoplasmático, granulação citoplasmática, aumento na quantidade de nucléolos e núcleos, como também foram capazes de sintetizar matriz avaliada pelo método citoquímico de Von Kossa. Estes achados corroboram com os estudos de Pautke e colaboradores (2004), que analisaram 3 tipos celulares diferentes de osteossarcoma humano, MG-63, Saos-2 e U-2 OS, e relataram características morfológicas ovais a fusiformes sem ramificações celulares, pequenas células poligonais com poucas ramificações e aspecto triangular consecutivamente.

Loukopoulos et al. (2004) avaliaram três linhagens celulares de osteossarcoma canino, por microscopia invertida, e observaram a presença de numerosos grânulos citoplasmáticos e vacúolos, células com aspecto fusiforme em tamanhos variados, células grandes pentagonais ou poliédricas e esféricas. Observaram também nucléolos proeminentes, entretanto células multinucleadas não foram frequentes.

Nas avaliações por microscopia eletrônica de transmissão, realizadas em nosso trabalho foram observadas células com núcleos grandes, com formato irregular, e nucléolos proeminentes e múltiplos, diminuição do conteúdo citoplasmático, algumas células binucleadas e mitocôndrias com aspecto irregular, estes achados também corroboram com os estudos de Loukopoulos e colaboradores (2004).

A mitocôndria realiza inúmeras funções vitais na célula, e suas disfunções são associadas com numerosas síndromes multisistêmicas como doenças neurodegenerativas, câncer e envelhecimento (WOJEWODA; DUSZYŃSKI; SZCZEPANOWSKA, 2010). Em nosso estudo, as mitocôndrias apresentavam aspecto irregular, podendo ser esféricas ou mesmo deformadas e em tamanhos gigantescos, foram observadas interrupções na membrana mitocondrial externa, entretanto, o potencial elétrico mitocondrial apresentou-se funcional.

Outros modelos também são utilizados para o estudo desta neoplasia, como camundongos, por exemplo, e podem ajudar a compreender os mecanismos da patogênese e

desenvolvimento deste tumor, e permitem testar agentes terapêuticos, e observar a resposta “*in vivo*”, não só no sítio primário como também os metastáticos. O desenvolvimento de camundongos Balb-c^{nu/nu} foi um grande avanço, que permitiu os estudos de inúmeras células tumorais de diferentes espécies (EK; DASS; CHOONG, 2006).

Em nosso trabalho foram utilizados camundongos Balb-c^{nu/nu} para analisar o potencial de tumorigênese das linhagens obtidas, após a implantação em modelo xenogênico. Quando implantadas as células de osteossarcoma OST-1 foi observado a formação de uma massa tumoral, comprovada pela existência e origem do tumor após análise histológica, entretanto não foram observadas metástases em órgãos internos. Na linhagem OST-3 observou-se massa tumoral inicial, absorvida após 15 dias de inoculação, os animais apresentaram esplenomegalia e caquexia, características do surgimento de metástases. Khanna e colaboradores (2001) relataram que a implantação de fragmentos de tecidos tumorais permite o desenvolvimento consistente do tumor primário e maior incidência de metástases pulmonares, quando comparados a utilização de uma suspensão de células tumorais.

Os marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares envolvidos na diferenciação celular, checagem e progressão do ciclo celular e vias de morte foram avaliados por citometria de fluxo, ferramenta utilizada para caracterização e origem das células de osteossarcoma canino.

A fase de crescimento e invasão tumoral tem na angiogênese seu principal suporte somado às características genéticas e fatores de crescimento diferentes do processo normal de reparação. Estes fatos tornam a densidade microvascular importante para avaliação prognóstica. Ela pode ser estudada com diversos marcadores, como a expressão da glicoproteína CD-34 (TAJRA et al., 2008).

CD44 é uma proteína de adesão celular, principal receptor de superfície para o ácido hialurônico, um polissacarídeo extracelular envolvido em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos. Esta proteína sofre inúmeras mudanças estruturais e funcionais durante o processo de transformação maligna, que pode levar a alterações na adesão célula-célula e célula-matriz, facilitando a invasão dos tecidos adjacentes e aumentando a proliferação celular tumoral (RUDZYKI; JOTHY, 1997; SILANPÄÄ et al., 2003). Silanpää et al. (2003), relataram que o conjunto de variantes em todos os níveis de CD44 mudam durante o desenvolvimento dos tumores, estas mudanças podem levar a alterações na adesão entre as células tumorais e a matriz extracelular invadida, facilitando a invasão e aumentando

o crescimento. A expressão desta glicoproteína não tem sido encontrada em tecidos normais, no osteossarcoma esta proteína está envolvida no potencial de invasão e metástase, e está relacionada com a diminuição do tempo de sobrevida (MA et al., 2010; NAKAJIMA; TANIGUCHI; MUTOH, 2010). Em nosso trabalho, foi observada a expressão do marcador CD44, conferindo potencial de invasão e migração às células de osteossarcoma canino OST-3.

Assim como a proteína CD44 o marcador CD90 também está envolvido na adesão e migração celular, está expresso em uma série de linhagens celulares fibroblásticas, estromais, endoteliais e algumas linhagens celulares tumorais (SICLARI; QIN, 2010). Entretanto, não foi observada expressão de CD90 na linhagem celular OST-3, portanto, as células de osteossarcoma canino OST-3 não expressam este marcador.

Não há relatos de marcadores estritamente específicos para a avaliação da angiogênese tumoral no osteossarcoma, entretanto, há uma variedade de marcadores potenciais sob investigação que podem ser classificados como marcadores de ativação de células endoteliais, proliferação celular, stress por hipóxia, receptores de fatores de crescimento, antígenos celulares endoteliais, e proteínas de membrana. A busca por marcadores que possam ser utilizados para o monitoramento da eficácia de tratamentos anti angiogênicos são importantes para a análise da progressão tumoral. A endoglina ou CD105 é uma glicoproteína de membrana expressa na superfície de células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células músculo esqueléticas. A formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes, a angiogênese, é essencial para o crescimento tumoral e desenvolvimento de metástase. CD105 é predominantemente expressa em células endoteliais angiogênicas e reguladas por hipóxia (DUFF et al., 2003; SANZ-RODRIGUEZ et al., 2004). Em nosso estudo, foi observada expressão significativa deste marcador, conferindo potencial angiogênico às células de osteossarcoma canino OST-3.

As células OST-3 expressaram significativamente Stro-1, um marcador de superfície expresso em células tronco mesenquimais e em células tronco tumorais. Siclari e Qin (2010) relataram a presença de uma pequena subpopulação de células expressando Stro-1, denominadas células tronco tumorais que podem surgir pela transformação de células tronco ou de sua desdiferenciação. Células de polpa de dente humana também expressam Stro-1 (SHI; GRONTHOS, 2003)

Marcadores de células mesenquimais, tronco-mesenquimais, embrionárias, e moléculas de adesão e migração celular como CD44, CD105, Stro-1 e CD90, Oct3/4, Nanog e VEGF, foram expressos pelas células de osteossarcoma canino OST-3, o CD90 foi pouco expresso e não houve expressão do marcador CD34. Berger, Muraro e Fagioli (2008), que verificaram expressão positiva em células de osteossarcoma humano para marcadores de células mesenquimais como CD44 e CD105, entretanto não foi observada expressão de CD34 corroborando com os nossos achados, entretanto foi observada expressão positiva para CD90 e no nosso estudo este marcador foi pouco expresso nas células de osteossarcoma canino OST-3. DI FIORE e colaboradores (2009) também analisaram a expressão destes marcadores em duas linhagens de osteossarcoma humano (MG-63 e 3AB-OS), não foi observada a expressão de marcadores CD105 e CD34 foram observadas expressão de CD44 e CD90.

As células de osteossarcoma canino OST-3 expressaram Oct3/4 e Nanog, fatores de transcrição que regulam a supressão dos genes que levam a diferenciação e manutenção da pluripotência e da nucleostemina, expressa em nucléolos de células tronco embrionárias e várias linhagens tumorais, importantes para o controle da progressão do ciclo celular (PAN; THOMSON, 2007; YE et al., 2008).

A nucleostemina é uma proteína concentrada no nucléolo de muitas células tronco e também em células tumorais. Esta proteína está envolvida na progressão do ciclo celular, devido à capacidade de modular a P53. A superexpressão da nucleostemina causa o sequestro da proteína MDM2 impedindo a degradação da P53 (MA; PEDERSON, 2008).

A progressão do ciclo celular é controlada pela expressão de antígenos nucleares de proliferação celular, Ki-67 e PCNA, e por uma família de ciclinas dependentes de quinases (CDK) que se tornam ativas pela ligação com as proteínas ciclinas. Os marcadores Ki-67 e PCNA são os mais utilizados na avaliação da proliferação celular e estão expressos em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀. Em nosso trabalho foram encontradas duas populações de células, que expressam diferencialmente cada marcador, indicando que as mesmas possivelmente encontram-se em diferentes fases do ciclo celular. Czyewska e colaboradores (2004) relataram que níveis elevados de expressão das proteínas de proliferação celular Ki-67 e PCNA estão relacionados à malignidade do tumor.

A angiogênese é fundamental para o crescimento tumoral e formação de metástases. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um importante regulador deste processo. A ativação da via de receptores VEGF desencadeia uma rede de sinalização de processo que

promovem o crescimento da célula endotelial, migração e manutenção da rede vascular pré-existent. Devido ao seu papel na angiogênese este receptor tornou-se um foco importante de estudos no desenvolvimento de drogas antiangiogênicas (HICKLIN; ELLIS, 2005). O aumento da expressão do VEGF é um importante fator envolvido no crescimento de tumores sólidos, incluindo o osteossarcoma. Portanto, em humanos a expressão do VEGF em osteossarcoma está relacionada com uma diminuição do tempo de sobrevida e com a presença de metástases (KAYA et al., 2000; KAYA et al., 2002). Em nosso estudo, o VEGF foi significativamente expresso nas células de osteossarcoma canino OST-3 e também em células de osteossarcoma humano MG-63 (dados não mostrados).

A P53 é um fator de transcrição codificado pelo gene supressor de tumor *TP53*, expresso constitutivamente na maioria das células e tecidos. Durante a exposição a estresses genotóxicos e não genotóxicos, a P53 é ativada atuando como fator de transcrição ou de repressão de genes que induzem a parada do crescimento, reparo, apoptose ou senescência (MEPLAN et al., 2000).

A indução de P53 ocorre por modificações pós-traducionais que estabilizam a proteína pelo escape da degradação proteassomal e a parada do ciclo celular é controlada essencialmente por modulação transcricional de genes ativados por P53 como o P21, um inibidor de CDK que age nas fases do ciclo G1 e G2 (EL-DEIRY et al., 1993). O reconhecimento do dano ao DNA e o reparo são vitais para a manutenção da estabilidade genética e, portanto, à redução do risco de câncer. Células que apresentam mutações em p53 são propensas à tumorigênese (MYIASHI, 2009). O gene p53 é um supressor tumoral bem conhecido e um dos principais determinantes da progressão do tumor, sua mutação pode ocorrer diretamente por deleção do gene p53, mas também pela interrupção de qualquer uma das vias que regulam a atividade da proteína P53 como a MDM2 (BOURDON et al., 2010).

Os principais eventos relacionados à regulação da proliferação celular e diferenciação ocorrem entre as fases G1/S do ciclo celular, no qual a célula se compromete com a replicação do DNA (SANCHEZ; DYNLAT, 2005). O descontrole na progressão do ciclo celular desempenha um papel fundamental na carcinogênese, e a perda do ponto de checagem entre as fases G1/S, é particularmente importante neste processo (WONG et al., 2003).

A progressão pelo ponto de checagem G1/S exige a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb) com liberação do fator de transcrição E2F e posterior transcrição de genes essenciais à replicação do DNA e progressão do ciclo celular. A ciclina D1 é

responsável por este processo juntamente com a ciclina dependente de quinase CDK4 (CUI et al., 2006).

A atividade do complexo ciclina D1/CDK4 é regulada negativamente por uma série de inibidores, incluindo p21, um dos efetores *downstream* da p53. A passagem das células tumorais pelo ponto de checagem G1/S pode ser devida à desregulação da função da via pRb ou p21 ou por aumento da expressão da ciclina D1 (IOACHIM et al., 2004). A proteína P27 é um supressor de tumor não-convencional, porque mutações de seu gene são extremamente raras em tumores, o que implica que a função normal da proteína é alterada durante desenvolvimento tumor. Embora a função supressora de tumor seja mediada por interações inibitórias de p27 com os complexos ciclina / CDK, a sua função oncogênica é independente do complexo ciclina / CDK (LEE, KIM; 2009).

A parada do ciclo celular no ponto de checagem dependente de Rb e pode prevenir a ativação do complexo ciclina E/CDK2, estabilizando sua interação com proteínas inibitórias P21 e P27. A proteína P21 é um inibidor de CDK induzido pela proteína P53, independente de mutações existentes (RESNITZKY et al., 1995). A carcinogênese é caracterizada pela desregulação do ciclo celular, e embora p53 ainda seja o mais importante regulador do ciclo celular, em tumores, há evidências de que a desregulação da expressão de ciclinas e inibidores de CDK constituam eventos importantes na transformação maligna (IOACHIN et al., 2004).

Não foi observada a expressão de P53 na linhagem celular OST-3, sugerindo uma mutação nesta via com o descontrole na progressão do ciclo celular, devido a diminuição da capacidade de reparo do DNA danificado. As proteínas P21, P27, e ciclina D1 foram diferencialmente expressas, demonstrando o grande potencial tumorigênico das células OST-3.

Membros da família Bcl-2 regulam a apoptose. Esta família inclui membros pró-apoptóticos (Bax, Bad, Bak e Bcl-X_s) e membros anti- apoptóticos (Bcl-2). Chorna, et al. (2005), compararam os efeitos do raio-X e de drogas quimioterápicas específicas (doxorubicina, cisplatina e metotrexato) na expressão de proteínas Bax, Bad e Bcl-2 em células de carcinoma de mama (MCF-7) e relataram aumento nos níveis da proteína Bcl-2 nas células após o tratamento com raio-X, apresentando redução da resposta apoptótica e diminuição na capacidade de reparo do DNA em células MCF-7, contribuindo para a resistência destas células ao tratamento com raio-X.

Bcl-2 e TNF α , marcadores de morte celular, foram expressos nas células OST-3 e Bax, Bad e caspase-3, por sua vez, foram pouco expressos. A fraca marcação das células pela Anexina V/PI indicou que as células estão viáveis e com grande capacidade proliferativa. As células OST-3 expressaram receptores do fator de necrose tumoral α (TNF α), sugerindo morte celular por via extrínseca.

A apoptose é definida por uma cascata de eventos bioquímicos que conduzem a fragmentação nuclear e morte celular. O efeito citotóxico da maioria dos agentes quimioterápicos “*in vitro*” e “*in vivo*” dependem da indução de apoptose em células tumorais suscetíveis. Os tratamentos disponíveis para o osteossarcoma canino, como os quimioterápicos doxorrubicina, epirrubicina e cisplatina induzem apoptose em células de osteossarcoma canino D17. O ácido retinóico é capaz de induzir apoptose em células tumorais quimio sensíveis. Em estudos experimentais com células de osteossarcoma D17, a administração de ácido retinóico inibiu a atividade da telomerase em células tratadas com antraciclina, e cisplatina (CIARCIA et al., 2008).

O estabelecimento e a caracterização da linhagem celular de osteossarcoma canino possibilitou a análise dos marcadores expressos nesta neoplasia e a comparação com os resultados encontrados na literatura com relação à doença em humanos, permitindo confirmar a semelhança entre as duas espécies, e a hipótese de que o cão possa ser utilizado como modelo de estudo. Esta análise permitiu traçar um perfil de expressão das células OST-3, que pode constituir uma ferramenta útil no desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas, para o estabelecimento de fatores prognósticos, e terapêuticas como a quimioterapia experimental, terapias celulares com células tronco ou terapia gênica.

Conclusões

“Nós somos aquilo que fazemos repetidas vezes, repetidamente. A excelência portanto não é
um feito, mas um hábito”
(Aristóteles)

7 CONCLUSÕES

- As estratégias experimentais e metodológicas no estabelecimento da cultura primária de osteossarcoma, utilizando os meios de cultivo DMEM-H e MEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1 % de ácido pirúvico foram eficientes para a obtenção, manutenção e expansão das células de osteossarcoma canino;
- os aspectos morfológicos encontrados foram de células fusiformes do tipo *fibroblast-like* para a linhagem celular OST-1 e pleomorfismo celular para as células OST-3 com núcleos irregulares, presença de uma ou mais núcleos e/ou nucléolos e pouco conteúdo citoplasmático, analisados em microscopia de luz e eletrônica;
- a inoculação das células tumorais OST-1 e OST-3 demonstraram potencial tumorigênico quando implantadas em camundongos NUDE;
- expressão de marcadores de superfície, citoplasmáticos e nucleares para células tumorais mostraram diferencialmente expressos o que denota suas características de transformação celular maligna.

Referências

REFERÊNCIAS

- ASSIS, M. F. L.; SANTOS, E. C. O.; JESUS, I. M.; JESUS, M. I.; PINTO, W. V. M.; MEDEIROS, R. L. F.; SILVA, D. F. L. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2002.
- BERG, J. Canine osteosarcoma: amputation and chemotherapy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, p. 111-119, 1996.
- BERGER, M.; MURARO, M.; FAGIOLI, F. Osteosarcoma Derived from Donor Stem Cells Carrying the Norrie's Disease Gene. **The New England Journal of Medicine**, p. 2502-2504, 2008.
- BOURDON, J.; SILVA, A. M.; PERRIER, S. p53 family members in cancer diagnosis and treatment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 20, p. 57-62, 2010.
- BRAMWELL, V. The role of chemotherapy in osteogenic sarcoma. **Critical Reviews in Oncology/ Hematology**, v. 20, p. 61-85, 1995.
- BROOKS, P. C. Role of integrins in angiogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 32a, p. 2423-2429, 1996.
- BURDEN, R. E.; GORMLEY, J. A.; JAQUIN, T. J.; SMALL, D. M.; QUINN, D. J.; HEGARTY, S. M.; WARD, C.; WALKER, B.; JOHNSTON, J. A.; OLWILL, S. A.; SCOTT, C. J. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 6042-6051, 2009.
- CALUX, N. M. C. T.; RIBALTA, J. C. L.; FOCCHI, J. N. S. J.; BARACAT, E. C.; LIMA, G. R. Angiogênese na neoplasia escamosa do colo uterino: comparação de dois marcadores de células endoteliais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 5, 2001.
- CHORNA, I. V.; DATSYUK, L. O.; STOIK, R. S. Expression of Bax, Bad and Bcl-2 proteins under x-radiation effect towards human breast carcinoma MCF-7 cells and their doxorubicin-resistant derivatives. **Experimental Oncology**, v. 27, n. 3, p.196-201, 2005.
- CHUN, R.; DE LORIMIER, L. F. Update on the biology and management of canine osteosarcoma. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 33, p. 491-516, 2003.
- CIARCIA, R.; PAGNINI, C.; FIORITO, F.; PELLICANE, A.; MONTAGNARO, S.; RUSSO, R.; FLORIO, S. Effect of "All - trans " retinoic acid in canine osteosarcoma chemotherapy. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 1, p. 267-269, 2008.
- COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell cycle inhibitors: a function for each cell compartment? **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 65-70, 2003.

- COSTA, F. S.; TOSTES, R. A.; FARIAS, M. R.; SAMPAIO, R. L.; PEREZ, J. A. Metástase cutânea de osteossarcoma em um cão. relato de caso. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 240-242, 2001.
- CUI, L.; SHI, Y.; QIAN, J.; DAI, G.; WANG, Y.; XIA, Y.; CHEN, J.; SONG, L.; WANG, S.; WANG, X. Deregulation of the p16-cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4-retinoblastoma pathway involved in the rat bladder carcinogenesis induced by terephthalic acid-calculi. **Urological Research**, v. 34, n. 5, p. 321-328, 2006.
- DALECK, C. R. Osteossarcoma canino. **Clínica Veterinária**, v. 1, n. 5, p. 26-27, 1996.
- DALECK, C. R.; CANOLA, J. C.; STEFANES, S. A.; SCHOCKEN, P. F. L.; NARDI, A. B. Estudo retrospectivo de osteossarcoma primário dos ossos da pelve em cães em um período de 14 meses. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 125-131, 2006.
- DALECK, C. R.; FONSECA, C. S.; CANOLA, J. C. Osteossarcoma canino. **Revista Educação Continuada**, v. 5, p. 233-242, 2002.
- DI FIORE, R.; SANTULLI, A.; FERRANTE, R. D.; GIULIANO, M.; DE BLASIO, A.; MESSINA, C.; PIROZZI, G.; TIRINO, V.; TESORIERE, G.; VENTO, R. Identification and expansion osteosarcoma cancer-stem-cells by long term 3-aminobenzamide treatment. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, p. 301-313, 2009.
- DOIGE, C. E.; WEISBRODE, S. E. Doenças dos ossos e das articulações. In: CARLTON, W. W. **Patologia veterinária especial de Thonson**, 2. ed. Porto Alegre: Art Méd, 1998. cap.10, p.448-485.
- DUFF, S. E.; LI, C.; GARLAND, J. M.; KUMAR, S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. **FASEB Journal**, v. 17, p. 984-992, 2003.
- EICHHORN, M. E.; KLEESPIES, A.; ANGELE, M. K.; JAUCH, K. W.; BRUNS, C. J. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 392, p. 371-379, 2007.
- EK, E. T. H.; DASS, C. R.; CHOONG, P. F. M. Commonly used mouse models of osteosarcoma. **Clinical Reviews in Oncology/ Hematology**, v. 60, p. 1-8, 2006.
- EL-DEIRY, W. S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V. E.; LEVY, D. B.; PARSONS, R.; TRENT, J. M.; LIN, D.; MERCER, W. E.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. WAF1/GIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Research**, v. 75, p. 817-825, 1993.
- ESPOSITO, J. P.; CAMARGO, R. S.; LONGATTO FILHO, A.; DI LORETO, C.; KANAMURA, C. T.; TOLOSA, E. M. C. Expressão imunohistoquímica dos marcadores PCNA, Ki67 e P53 em carcinomas epidermóides do trato aerodigestivo superior. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 27, n. 5, p. 327-331, 2000.

FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; HULSE, D. A.; JOHSON, A. L.; SEIM, H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G. L. Outras doenças ósseas e articulares: **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2001. cap. 32, p. 1115-1137.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells. In: **A manual of basic technique**. 4. ed. New York: Willey – Liss, 2000. 577 p.

GIANNIS, A.; RÜBSAM, F. Integrin antagonists and other low molecular weight compounds as inhibitors of angiogenesis: new drugs in cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 36, n. 6, p. 588-590, 1997.

GIBBS, C. P.; KUKEKOV, V. G.; REITH, J. D.; TCHIGRINOVA, O.; SUSLOV, O. N.; SCOTT, E. W.; GHIVIZZANI, S. C.; IGNATOVA, T. N.; STEINDLER, D. A. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. **Neoplasia**, v. 7, p. 967-976, 2005.

GOMES, C.; FERREIRA, M. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; CAVALCANTI, R. L.; SPAGNOL, C.; OLIVEIRA, L. O.; CONTESINI, E. A.; OLIVEIRA, R. T. Estudo epidemiológico de cães com imagens radiográficas compatíveis com neoplasias ósseas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 159-162, 2006.

GOMES, L. C.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T. Osteossarcoma canino: revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 2, p. 204-219, 2008.

GRAÇA, B.; LUNET, C.; COELHO, A. S.; MONTEIRO, G.; FREIRE, P.; SPEIDEL, A.; CARVALHO, L. Angiogénese e cancro: da biopatologia à terapêutica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 17, p. 76-93, 2004.

GRIVICICHI, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HAUBEN, E. I.; ARENDS, J.; VANDENBROUCKE, J. P.; VAN ASPEREN, C. J.; VAN MARCK, E.; HOGENDOORN, P. C. W. Multiple primary malignancies in osteosarcoma patients. Incidence and predictive value of osteosarcoma subtype for cancer syndromes related with osteosarcoma. **European Journal Human Genetics**, v. 11, n. 8, p. 611-618, 2003.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 1011-1027, 2005. INOUE, D. P.; AMAR, A.; CERVANTES, O. Marcadores Tumorais no Câncer da Laringe. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 34, n. 1, 2005.

IOACHIM, E. E.; KATSANOS, K. H.; MICHAEL, M. C.; TSIANOS, E. V.; AGNANTIS, N. J. Immunohistochemical expression of cyclin D1, cyclin E, p21/waf1 and p27/kip1 in inflammatory bowel disease: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 19, n. 4, p. 325-333, 2004.

JOHNSON, A. L.; HULSE, D.A. Neoplasias ósseas. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005, p. 1165-1176.

JOHNSON, K. A.; WATSON, A. D. J. Doenças esqueléticas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, cap. 184, p. 1988-2019.

JONES, T. C. Neoplasias induzidas por parasitos. In: JONES, C. J.; HUNT, R. D. ; KING, N. W. 6. ed., **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 116.

JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE, R. L. Genética do Câncer: In **Genética Médica**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 197-212.

KAYA, M.; WADA, T.; AKATSUKA, T.; KAWAGUCHI, S.; NAGOYA, S.; SHINDOH, M.; HIGASHINO, F.; MEZAWA, F.; OKADA, F.; ISHII, S. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 572-577, 2000.

KAYA, M.; WADA, T.; KAWAGUCHI, S.; NAGOYA, S.; SHINDOH, M.; HIGASHINO, F.; MEZAWA, F.; OKADA, F.; ISHII, S. .Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. **British Journal of Cancer**, v. 86, p. 864–869, 2002.

KERBAUY, F. R. Mutações do gene p53 em linfomas de Burkitt: muito além do gene c-myc. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 1-4, 2008.

KHANNA, C.; PREHN, J.; YEUNG, C.; CAYLOR, J.; TSOKOS, M.; HELMAN, L. An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. **Clinical Experimental Metastasis**, v. 18, n. 3, p. 261-271, 2000.

KLEINER, J. A.; SILVA, E. G. Tumores ósseos em pequenos animais. **MEDVEP - Revista Científica de Medicina Veterinária Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 1, n. 3, p. 193-200, 2003.

KOCH, W. M. Molecular biology of head and neck tumors. In: CUMMINGS, C. W.; FREDRICKSON, J. M.; HARKER, L. A.; KRAUSE, C. J.; RICHARDSON, M. A.; SCHULLER, D. E. **Otolaryngology head & neck surgery**. 3. ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1998.

KRUTH, S. Canine models for gene therapy. **Transfusion Science**, v. 17, n. 1, p. 71-77, 1996.

LANGEBANBACH, A.; ANDERSON, M. A.; DAMBACH, D. M.; SORENMO, K. U.; SHOFR, F. D. Extraskelletal osteosarcoma in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986- 1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, p. 113-120, 1998.

LARUE, S. M.; WITHROW, S. J.; WRIGLEY, R. H. Radiographic bone surveys in the evaluation of primary bone tumors in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 5, p. 514-516, 1986.

LEE, J.; Kim, S. S. The function of p27 KIP1 during tumor development. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 41, n. 11, p. 765-771, 2009.

LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 253-270, 2001.

LIMA, J. J. G.; MANZI, F. R.; SILVA, F. L.; BAPTISTA, M. Z. Osteossarcoma extra-esquelético na região cervical- revisão da literatura e relato de caso clínico. **Radiologia Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 315-319, 2002.

LINK, M.; EILBER, F. Osteosarcoma. In: PIZZO, P.; POPLACK, D. **Principles and practice of pediatric oncology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 2002. p. 1051-1089.

LIOTTA, L. A.; STEEG, P. S.; STELLER-STEVENSON, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, p. 327-336, 1991.

LIPTACK, J. M.; DERNELL, W. S.; EHRHART, N.; WITHROW, S. J. Canine appendicular osteosarcoma: diagnosis and palliative treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 26, n. 3, p. 172-182, 2004a.

LIPTACK, J. M.; DERNELL, W. S.; EHRHART, N.; WITHROW, S. J. Canine appendicular osteosarcoma: curative-intent treatment. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 26, n. 3, p. 188-196, 2004b.

LIU, S. Tumores ósseos e cartilaginosos In: BOJARAB, W. J. **Mecanismos das moléstias na cirurgia de pequenos animais**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1996. p. 1037-1092.

LONGHI, A.; ERRANI, C.; PAOLIS, M.; MERCURI, M.; BACCI, G. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. **Cancer Treatment Reviews**, v. 32, p. 423-436, 2006.

LOUKOPOULOS, P.; O'BRIEN, T.; GHODDUSI, M.; MUNGALL, B. A.; ROBINSON, W. F. Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. **Research in Veterinary Science**, v. 77, p. 131-141, 2004.

LOUKOPOULOS, P.; ROBINSON, W. F. Clinicopathological relevance of tumor grading in canine osteosarcoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, p. 65-73, 2007.

MA, H.; PEDERSON, T. Nucleostemin: a multiplex regulator of cell-cycle progression. **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 12, p. 575-579, 2008.

MA, X.; YANG, Y.; WANG, Y.; AN, G.; GANG, L. V. Small interfering RNA-directed knockdown of S100A4 decreases proliferation and invasiveness of osteosarcoma cells. **Cancer Letters**, 2010. (No prelo).

MAHHAFHEY, E. A. Citology of musculoskeletal system. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1999, p. 120-124.

MARTELLI, A.; TEIXEIRA, L. B. C.; SANTOS JR., A. R. Aspectos histopatológicos e histoquímicos de osteossarcoma em cães. **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 67, p. 179-189, 2007.

MC KAIG, R. G.; BARIC, R. S.; OLSHAN, A. F. Human papilloma virus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. **Head Neck**, v. 20, s.n., 1998.

MÉPLAN, C.; RICHARD, M. J.; HAINAUT, P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. **Oncogene**, v. 19, n. 46, p. 5227-5236, 2000.

MIYACHI, M.; KAKAZU, N.; YAGYU, S. Restoration of p53 Pathway by Nutlin-3 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Rhabdomyosarcoma Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 12, 2009.

MUELLER, F.; FUCHS, B.; KASER-HOTZ, B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. **Anticancer Research**, v. 27, s. n., p. 155-164, 2007.55-164, 2007.

MUNDAY, J. S.; EGINS, J.; SELCER, B. A. e STEDMAN, N. L. Renal osteosarcoma in dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 45, p.618-622, 2004.

NAKAJIMA, K.; TANIGUCHI, K.; MUTOH, K. I. Expression of CD44v6 as matrix-associated ectodomain in the bone development. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 72, n. 8, p. 1017-1022, 2010.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Neoplasias selecionadas em cães e gatos: osteossarcoma em cães e gatos. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 84, p. 899-901.

OLIVEIRA, F.; SILVEIRA, P. R. Osteossarcoma em cães (revisão de literatura). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 11, 2008.

OYA, N.; KOKUBO, M.; MIZOWAKI, T.; SHIBAMOTO, Y.; NAGATA, Y.; SASAI, K.; NISHIMURA, Y.; TSUBOYAMA, T.; TOGUCHIDA, J.; NAKAMURA, T.; HIRAOKA, M. Definitive intraoperative very high-dose radiotherapy for localized osteosarcoma in the extremities. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 51, n. 1, p. 87-93, 2001.

PALMER, N. Diseases of bone. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. 4. ed. **Patology of domestic animals**. San Diego: Academic Press Inc., 1992. v. 1, p. 1 -137.

PAN, G.; THOMSON, J. A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. **Cell Research**, v. 17, p. 42-49, 2007

PATNAIK, A. K. Canine extraskeletal osteosarcoma and chondrosarcomas: a clinicopathologic study of 14 cases. **Veterinary Patology**, v. 27, n. 1, p. 46- 55, 1990.

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 Research**, v. 24, p. 3743-3748, 2004.

PEÑA, L. L., NIETO, A. I.; PÉREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTAÑO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p.237–246, 1998.

PINTO, A. P.; CRUM, C. P. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. **Clinical Obstetrics Gynecology**, v. 43, n. 2, 2000.

POOL, R. R. Tumors of bone and cartilage. In: MOULTON, J. E. **Tumors of domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California Press, 1990. cap. 5, p.157- 230. poor prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 572-577, 2000.

RECH, C.; CASTRO JR., C. G.; MATTEL, J.; GREGLANIN, L.; DI LEONE, L.; DAVID, A.; RIVERO, L. F.; TARRAGO, R.; ABREU, A.; BRUNETTO, A. L. Características clínicas do osteossarcoma na infância e sua influência no prognóstico. **Journal of Pediatrics**, v. 80, n. 1, p. 65-70, 2004.

REINHARDT, S.; STOCKHAUS, C.; TESKE, E., RUDOLPH, R.; BRUNNBERG, L. Assessment of cytological criteria for diagnosing osteosarcoma in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n. 2, p. 65-70, 2005.

RESNITZKY, D.; REED, S. I. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. **Molecular Cell Biology**, v.15, n.7, p. 3463-3469, 1995.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. V. E.; SILVA, I. S. B. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179-184, 2001.

RIVOIRE, W. A.; CORLETA, H. V. E.; BRUM, I. S.; CAPP, E. Biologia Molecular do câncer cervical. **Revista Brasileira Saúde Materna e Infantil**, v. 6, n. 4, 2006.

RU, G.; TERRACINI, B.; GLICKMAN, L. T. Host related risk factors for canine osteosarcoma. **Veterinary Journal**, v. 156, p. 31-39, 1998.

RUDZYK, Z.; JOTHY, S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v. 50, p. 57-71, 1997.

SÁNCHEZ, I.; DYNLACHT, B. D. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, n. 3, p. 311-321, 2005.

SANZ-RODRIGUEZ, F.; GUERRERO-ESTEO, M.; BOTELLA, L. M.; BANVILLE, D.; VARY, C. P. H.; BERNABÉU, C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32858-32868, 2004.

SHAY, J. W.; TOMLINSON, G.; PIATSZEK, M. A.; GOLLAHON, L. S. Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 1, p. 425 - 432, 1995.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 4, p. 696-704, 2003.

SICLARI, V.; QIN, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 5, n. 78, 2010.

SILLANPÄÄ, S.; ANTTILA, M. A.; VOUTILAINEN, K.; TAMMI, R. H.; TAMMI, M. I.; SAARIKOSKI, S. V.; VELLI-MATTI, K. CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 5318-5324, 2003.

SILVEIRA, P. R.; DALECK, C. R.; EURIDES, D.; SILVA, L. A. F.; REPETTI, C. S. F.; NARDI, A. B. Estudo retrospectivo de osteossarcoma apendicular em cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 487-495, 2008.

SPODNICK, G. J.; BERG, J.; RAND, W. M. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). **Journal of the American Veterinary Association**, v.200, n. 7 p. 995-999, 1992.

STRAW, R. C. Tumors of the skeletal system. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 378-417.

STRAW, R. C.; WITHROW, S. J.; POWERS, B. E. Management of canine appendicular osteosarcoma. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 1141-1161, 1990.

SU, Y.; LUO, X.; HE, B. C.; WANG, Y.; CHEN, L.; ZUO, G. W.; LIU, B.; BI, Y.; HUANG, J.; ZHU, G. H.; HE, Y.; KANG, Q.; LUO, J.; SHEN, J.; CHEN, J.; JIN, X.; HAYDON, R. C.; HE, T. C.; LUU, H. H. Establishment and Characterization of a new highly metastatic human osteosarcoma cell line. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 26, n. 7, p. 599-610, 2009.

SZYFTER, K.; HEMMINKI, K.; SZIFTER, W.; SZMEJA, Z.; BANASZEWSKI, J.; PABISZCZAK, M. Tobacco smoke-associated N-alkylguanine in DNA of larynx tissue and leucocytes. **Carcinogenesis**, v. 17, 1996.

TAJRA, J. B. M.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J. M.; CZECZKO, N. G.; PAULO NASSIF, P. A. N.; SILVA, M. I. Expressão Citofotométrica do marcador CD-34 no adenocarcinoma de Cólon. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 4, p. 409-413, 2008.

THOMAS, D.; KANSARA, M. Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, p 757-769, 2006.

THOMPSON, K. G.; POLL, R. R. Tumors of bones. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. EUA: Iowa State Press, 2002. p. 245-317.

THOMSON, R. G. Neoplasia. **Patologia geral veterinária**. Philadelphia: Guanabara, 1983. cap. 6, p. 290 - 315.

TRIEB, K.; KOTZ, R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 11-17, 2001.

VAN DEN BERG, H. Biology and therapy of solid tumors in childhood. **Update on Cancer Therapeutics I**, p. 367-383, 2006.

VAN LEEUWEN, I. S.; CORNELISSE, C. J.; MISDORP, W.; GOEDEGEBUURE, S. A.; KIRPENSTEIJN, J.; RUTTEMAN, G. R. P53 gene mutations in osteosarcomas in the dog. **Cancer Letters**, v.111, p. 173-178, 1997.

WHITE, V. A.; FANNING, C. V.; AYALA, A. G.; RAYMOND, A. K.; CARRASCO, C. H.; MURRAY, J. A. Osteosarcoma and the role of fine needle aspiration: a study of 51 cases. **Cancer**, v. 62, n. 6, p. 1238-1246, 1988.

WITHROW, S. J.; DOIGE, C. E. En bloc resection of a juxtacortical and three intraosseous osteosarcoma of the zygomatic arch in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 16, p. 867- 872, 1980.

WITHROW, S. J.; POWERS, B. E.; STRAW, R. C.; WILKINS, R. M. Comparative aspects of osteosarcoma: dog versus man. **Clinical Orthopaedics Related Research**, v. 270, p. 159-168, 1991.

WOJEWODA, M.; DUSZYŃSKI, J.; SZCZEPANOWSKA, J. Antioxidant defence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: effect of selenium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 890-896, 2010.

WONG, N. A.; MAYER, N. J.; ANDERSON, C. E.; MCKENZIE, H. C.; MORRIS, R. G.; DIEBOLD, J.; MAYR, D.; BROCK, I. W.; ROYDS, J. A.; GILMOUR, H. M.; HARRISON, D. J. Cyclin D1 and p21 in ulcerative colitis-related inflammation and epithelial neoplasia: a study of aberrant expression and underlying mechanisms. **Human Pathology**, v. 34, n. 6, p. 580-588, 2003.

WU, H.; WANG, T.; DENG, Z.; CHEN, D. Study on angiogenesis factor of human osteosarcoma. **Journal of Tongji Medical University**, v. 20, n. 3, p. 227-230, 2000.

YE, F.; ZHOU, C.; CHENG, Q.; SHEN, J.; CHEN, H. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. **BMC Cancer**, v. 8, n. 108, 2008.