DAYANE ALCÂNTARA

**Interação entre células-tronco de polpa dentária imatura
e o osteossarcoma canino**

São Paulo

2014

DAYANE ALCÂNTARA

**Interação entre células-tronco de polpa dentária imatura
e o osteossarcoma canino**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Anatomia dos Animais
Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais
Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angelica
Miglino

São Paulo

2014

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.3036
FMVZ

Alcântara, Dayane
Interação entre células-tronco de polpa dentária imatura e o osteossarcoma canino /
Dayane Alcântara. -- 2014.
110 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Células-tronco de polpa dentária. 3. Microambiente
tumoral. 4. Osteossarcoma. 5. Proliferação celular. 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 "Interação entre células-tronco de polpa dentária imatura e o osteossarcoma canino", protocolado sob o nº 2303/2011, utilizando 25 (vinte e cinco) camundongos, 15 (quinze) cães, 3 (três) ovos embrionados de galinhas e 5 (cinco) fetos de cães, 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 17/8/2011.

We certify that the Research "Interaction between immature dental pulp stem cells and canine osteosarcoma", protocol number 2303/2011, utilizing 25 (twenty-five) mice, 15 (fifteen) dogs, 3 (three) embryonated hen eggs and 5 (five) fetuses of dogs, 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 8/17/2011.

São Paulo, 8 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALCÂNTARA, Dayane

Título: Interação entre células-tronco de polpa dentária imatura e o osteossarcoma canino

Tese 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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“Dedico este trabalho aos meus pais, que me ensinaram que a maior herança que o ser humano pode ter e ninguém pode tirar dele é o conhecimento e a sabedoria. Além disso, agradeço por sempre lutarem e por serem meus maiores incentivadores nesta importante etapa!”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a **Deus**, que permitiu que tudo isto acontecesse.

Agradeço aos meus pais, **Alvarina Alcântara** e **Mauro Alcântara**, por acreditarem no meu potencial e por todo apoio e luta para que eu chegasse até aqui. Obrigada por me ensinarem que o conhecimento é a única herança que ninguém pode nos levar e a zelar pelo meu nome, sendo uma pessoa honesta, humilde, sincera, com bom caráter e justa. Eu sei que, às vezes, sou sincera demais e justa demais para não aceitar algumas situações, e às vezes meu perfeccionismo me faz pouco maleável e introspectiva, mas sei que mesmo assim, com todos os meus defeitos, posso contar com vocês sempre, e que vocês sempre estarão na arquibancada torcendo por mim. Agradeço, principalmente, por entenderem os momentos de ausência durante os intermináveis experimentos. Vocês são os melhores “paisamigos” que alguém pode ter! Amo muito vocês!

Ao meu irmão, **Edney G Alcântara**, um capítulo a parte de minha vida. Uma “pessoinha” muito especial, que me ensinou a dar valor nas pequenas vitórias de cada dia e a ver como os meus “probleminhas” e obstáculos cotidianos são tão pequenos diante de tantas coisas maiores. Você é um presente de Deus, que veio pra nos ensinar a viver. Você escolheu meu nome, cuidou de mim, e influenciou até mesmo na escolha da minha profissão. Obrigada por existir e por ser a razão da minha vida!

Ao meu noivo **Jeferson R Ferreira**, principalmente pela paciência e pela compreensão diante de toda a ausência nestes anos de mestrado e doutorado. Pela amizade e companheirismo nos momentos difíceis, pelo incentivo nesta etapa tão difícil. Sem o seu apoio nos piores momentos, eu não poderia ter chegado até ao fim. “*Cumplicidade é ser parceiro e fiel em todos os momentos. É andar junto e não dar as costas ao outro se o momento não for favorável, porque haverá muitos momentos ruins e aí é*

que serão testados teu amor e cumplicidade. Se fores dar as costas, que elas sirvam de apoio ao outro. Que não sirvam como uma muralha, parede, rocha, rua sem saída. Ser cúmplice é ser luz, caminho, mão dupla. Ter ideias para seguir junto ante as armadilhas do tempo. Ser refúgio e fortaleza (Autor desconhecido)”. Você foi a minha fortaleza durante todos estes sete anos, assim como eu acredito ter sido a sua, cada vitória minha é sua, e cada vitória sua, sei que também é minha. Obrigada por ter me ajudado a construir e solidificar esta carreira, que era só um sonho quando nos conhecemos.

Gostaria de dizer um muito obrigada à minha **família, meus tios e primos** que sempre torceram por mim, e que, algumas vezes, reclamavam da falta de visitas, mas sempre entenderam e torceram para que tudo desse certo. Especialmente, preciso agradecer meus tios **Antonio Gouveia, Silvana Gouveia, Dirce de Souza, José Paulo de Souza** que foram meus pais enquanto estive nos Estados Unidos, me ajudaram nas horas de apuro e por terem me recebido com tanto amor e carinho.

À minha orientadora **Maria Angelica Miglino**, primeiramente pela oportunidade, por não fazer distinção entre as pessoas e acreditar no potencial de cada um, abrindo as portas para todos que querem trabalhar e fazer ciência. *“O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente (Texto Budista)”*.

Eu não poderia deixar de agradecer ao **Dr. Durvanei Augusto Maria**, que me ensinou muito e seus ensinamentos me despertaram a curiosidade por essa área de trabalho e me incentivaram a sempre buscar mais e mais conhecimento. Muito Obrigada!

Às minhas amigas e “irmãzinhas postiças” **Fernanda M. O. Silva** e **Nathia N. Rigoglio**, obrigada pelo ombro amigo, pelos momentos de tristeza, alegria e de vitórias compartilhados. A única certeza que tenho é que sem amigos, não somos nada e sozinhos não chegamos a lugar algum. Vocês foram muito importantes nesta caminhada.

À amiga **Paula Fratini**, por todo auxílio com as amostras e experimentos intermináveis, que renderam milhares de tubos de citometria. À pós-doc e amiga **Ana Cláudia O. Carreira**, que teve uma participação imensa neste trabalho, orientando a melhor direção, discutindo melhores métodos e auxiliando na aquisição dos dados. Nenhuma vitória é só, ela sempre vem acompanhada de grandes pessoas, com disposição de trabalho e enorme coração.

A minha amiga **Sonia Elizabete Alves de Lima Will**, pelos finais de trabalho, infinitas coletas, pelas boas discussões científicas e pela amizade.

Aos velhos colegas de pós-graduação **Márcio N. Rodrigues**, **Valdir P. Junior**, **Rafael C. Carvalho**, **Érika Fonseca**, **Carlos Eduardo P. Sarmento**, **Juliana Passos S. Alves**, **Dilayla K. Abreu**, **André L. Francioli**, **Phelipe O. Favaron**, pela convivência, apoio e amizade.

Aos novos amigos de pós-graduação **Rennan Olio**, **Dailiany Orechio** e **Bruna Andrade**, que acabei adotando e auxiliando-os um pouco em seus trabalhos, por me ensinarem como pode ser prazeroso ensinar o que gostamos e, principalmente, pelo bom humor contagiante no trabalho. Desejo a vocês boa sorte, no início desta caminhada. Assim como a todos os novos colegas de pós-graduação que estão iniciando suas vidas profissionais.

Às amigas **Norma A. Ikeda**, **Fernanda Faião-Flores**, **Ana Rita T. Pizza** que, apesar da distância e da correria, sempre se mantiveram presentes como mãos e ombros amigos, além, é claro, de sempre

compartilharem experiências e ajudarem nos experimentos. Vocês são muito importantes!

Às amigas de longa data **Mariana Aparecida de Carvalho** e **Vanessa Tavares Bertozzi**, que estiveram sempre presentes, apesar da distância, o apoio de vocês e as palavras de incentivo foram fundamentais. “Um irmão pode não ser um amigo, mas um amigo será sempre um irmão” (Benjamin Franklin).

Aos meus queridos professores e amigos **Erika Zimmerknopf**, **Celina Fulanetto Mançanares**, **Patrícia Cantú Moreira Giordano** e **Sérgio Henrique Borin**, foi observando o amor de vocês pelo que fazem diariamente, que o amor pela ciência despertou em mim. Vocês foram grandes exemplos e os grandes “culpados” por eu ter chegado até aqui. “*Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção*” (Paulo Freire).

À minha mãe científica **Ana Flávia de Carvalho**, eu tenho muitas coisas a agradecer, pois sem o seu incentivo, nada disso seria possível. Talvez eu possa começar dizendo OBRIGADA pela sua paciência, quando aquela aluna que acabara de iniciar na graduação já te incomodava todas as aulas dizendo que queria fazer pesquisa, e que queria pesquisar qualquer coisa. Segundo, OBRIGADA, por ter me ensinado, logo no primeiro ano, como fazer buscas no PUBMED. Terceiro, não foi minha orientadora formalmente, mas participou de todas as etapas do meu primeiro trabalho científico. E, por último, gostaria de agradecer por todo auxílio, incentivo, pelas inúmeras viagens a São Paulo, por ser amiga e muitas vezes mãe, pelos conselhos, pela seriedade, profissionalismo e por ter me apresentado a esse mundo tão apaixonante. “*O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira*” (William Arthur Ward).

Aos secretários da pós-graduação **Jacqueline Barbosa**, **Maicon Silva** e **Bianca Domingues Netto**, pela disposição em auxiliar a todos os

alunos. A todos os funcionários de limpeza, que sempre deixaram tudo limpo e organizado, para que pudéssemos trabalhar.

Aos técnicos de laboratório **Rose Eli G. Rici** e **Ronaldo Agostinho Silva**, pelos ensinamentos e por nos auxiliarem em nossos projetos, tornando cada um possível.

Aos professores **Lucia Maria Guedes Silveira** e **João Paulo Boccia**, aos funcionários e alunos, e à **Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Paulista** (UNIP, sede Cantareira), por nos receberem tão gentilmente e colaborarem com a coleta de osteossarcoma, que foi imprescindível para realização deste estudo.

Ao Dr. **Herbert Corrêa**, da clínica ODONTOVET (Centro Odontológico Veterinário), à toda sua equipe de veterinários, atendentes e auxiliares, e principalmente aos pacientes, por auxiliarem e cederem amostras de polpa dentária derivada de dentes decíduos.

Agradeço, imensamente, aos **pacientes** com osteossarcoma e seus **proprietários**, sem a participação de vocês nada disso seria possível. Vocês são a fonte de inspiração e de luta, para que um dia possamos colaborar com os futuros pacientes, propiciando uma melhor qualidade de vida, diminuindo a dor e aumentando a sobrevida desses animais.

Agradeço ao Hospital Veterinário Arca de Noé, representado pelo proprietário **Adriano Barile Dora** e seus **funcionários**, por terem nos recebido tão bem e pelas doações de material, que foram essenciais para realização deste trabalho.

Agradeço aos **veterinários** envolvidos, direta ou indiretamente, nas coletas de materiais de trabalho: osteossarcomas, fetos para coletas de osso, e dentes decíduos. Agradeço até mesmo pelos calos ósseos a meia noite, ou pelos osteossarcomas que não conseguíamos localizar a olho nu

(risos), pelos úteros com piometra, tudo serviu como aprendizado e me fez crescer muito.

Ao **NUCEL** (Núcleo de Terapia Celular e Molecular) e ao técnico **Túlio Felipe Pereira**, por todo suporte técnico durante os experimentos de citometria de fluxo.

Aos meus orientadores do Estágio de Pesquisa no Exterior **Jaime F. Modiano** e **Subbaya Subramanian** e suas equipes de pesquisa, pela oportunidade de estar em um grande centro de pesquisa, de aprender novos mecanismos de estudo, o que em poucos meses contribuiu muito para minha formação como profissional, e também a **University of Minesotta**, por ter me recebido tão bem. Às colegas de trabalho **Rhohini Khatri**, **Lihua Li**, **Jamie Van Eten**, **Milcah Scott** e **Jyotika Varshney**, cujos ensinamentos e companheirismo no trabalho foram essenciais para o estágio. À minha, agora, querida amiga, e, quem diria, quase conterrânea **Michele Goulart**, por ter me acolhido tão bem em sua casa e fazer com que o tempo passasse mais rápido e a passagem pelos Estados Unidos fosse ainda mais fácil.

Aos meus professores e mestres da pós-graduação **José Roberto Kfoury Jr.**, **Paula de Carvalho Papa**, **Antonio Chaves de Assis Neto**, **Pedro Primo Bombonato**, **Carlos Eduardo Ambrosio** e **Daniele Martins** pelos ensinamentos que tanto contribuíram para minha formação.

À **Universidade de São Paulo** e à **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, que acolhe tantos alunos, por proporcionar a oportunidade de estudar e trabalhar numa instituição de ensino e pesquisa tão respeitada em todo o mundo.

E por último gostaria de agradecer à **Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP)**, por fomentar e tornar este sonho possível. O auxílio do órgão foi fundamental para realização deste trabalho. Muito Obrigada!!!

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

RESUMO

ALCÂNTARA, D. **Interação entre células-tronco de polpa dentária imatura e o osteossarcoma canino.** [Interaction between immature dental pulp stem cells and canine osteosarcoma]. 2014. 110f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno, de maior ocorrência em cães, possui rápido crescimento e alto potencial metastático. Assim, o cão é um modelo útil para o estudo da doença em humanos, tendo em vista as semelhanças clínicas e histopatológicas que ocorrem em ambas às espécies. Atualmente, os estudos a respeito de células-tronco são promissores considerando seu alto potencial terapêutico. Entretanto, ainda prevalecem muitas dúvidas referentes ao tratamento de tumores utilizando a terapia celular. Este tema é pouco conhecido e estudado, por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre células-tronco obtidas da polpa dentária canina com as células derivadas osteossarcoma canino. Foram realizados cocultivos celulares das células derivadas de polpa dentária canina, osteossarcoma canino e derivadas de osso normal canino. Analisou-se os aspectos morfológicos das células cocultivadas e controle, assim como a atividade proliferativa, a morte celular, o potencial elétrico mitocondrial e a expressão gênica. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que a interação entre a célula-tronco da polpa dentária canina imatura e as células de osteosarcoma canino não apresentam alterações morfológicas. Entretanto, as células-tronco derivadas da polpa dentária canina e de osso fetal canino sadio parecem servir de suporte para o crescimento tumoral. Além disso, a cocultura celular, em todos os grupos testados, promove alterações na expressão gênica e proteica.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Células-tronco de polpa dentária. Microambiente tumoral. Osteossarcoma. Proliferação celular.

ABSTRACT

ALCÂNTARA, D. **Interaction between immature dental pulp stem cells and canine osteosarcoma.** [Interação entre células-tronco de polpa dentária imatura e o osteossarcoma canino]. 2014. 110f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Osteosarcoma is a malignant bone tumor most frequent in dogs. It has fast growth and high metastatic potential. Thus, the dog is an useful model for the study of human disease, due to the clinical and histological similarities found in both species. Currently, studies about stem cells are promising considering its high therapeutic potential. However, many doubts still exist regarding the treatment of tumors using cell therapy. This theme is little known and studied. Therefore, the aim of this study was to evaluate the interaction between stem cells obtained from canine immature dental pulp-stem cells with osteosarcoma cells derived from dogs. Cellular coculture were performed using cells derived from canine dental pulp, canine osteosarcoma and canine normal bone. The morphological aspects of co-cultured cells and control were analyzed, as well as proliferative activity, cell death, the mitochondrial membrane electric potential and gene expression. In summary, it was concluded that the interaction between stem cells from canine immature dental pulp and canine osteosarcoma cells did not show morphological changes. However, stem cells derived from canine dental pulp and healthy canine fetal bone serve to support tumor growth. Furthermore, the cell coculture in all groups tested, causes changes in gene and protein expression.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Stem cells from dental pulp. Tumor microenvironment. Osteosarcoma. Cell proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representativo demonstrando as placas de cocultura transwell. Em A: compartimento inferior, B: compartimento superior e em C: esquema demonstrando a interação entre as câmara superior sobre a inferior	50
Figura 2 -	Fotomicroscopia das células cocultivadas em sistema transwell.....	60
Figura 3 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da atividade celular proliferativa nos grupos 1-3.....	61
Figura 4 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da atividade celular proliferativa nos grupos 4-6.....	62
Figura 5 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da atividade celular proliferativa nos grupos 7-9.....	63
Figura 6 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da proporção de células metabolicamente ativas ou inativas por meio de análise do potencial elétrico mitocondrial dos grupos 1-3	64
Figura 7 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da proporção de células metabolicamente ativas ou inativas por meio de análise do potencial elétrico mitocondrial dos grupos 4-6	65
Figura 8 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da proporção de células metabolicamente ativas ou inativas por meio de análise do Potencial Elétrico Mitocondrial dos grupos 7-9	66
Figura 9 -	Gráfico de barras representativo de média $\pm$ dp da proporção de células viáveis, pelo método ANEXINAV/PI, considerando todos os grupos (1-9)	67
Figura 10 -	Gráfico de barras representativo de média $\pm$ dp da proporção de células mortas, pelo método ANEXINAV/PI, considerando os grupos 1-3	68

Figura 11 -	Gráfico de barras representativo de média $\pm$ dp da proporção de células mortas, pelo método ANEXINAV/PI, considerando os grupos 4-6	69
Figura 12 -	Gráfico de barras representativo de média $\pm$ dp da proporção de células mortas, pelo método ANEXINAV/PI, considerando os grupos 7-9	70
Figura 13 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp expressão de marcadores celulares nos grupos 1-3.....	71
Figura 14 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp expressão de marcadores celulares nos grupos 4-6.....	72
Figura 15 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp expressão de marcadores celulares nos grupos 7-9.....	73
Figura 16 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene VEGF por qRT-PCR	74
Figura 17 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene RUNX2 por qRT-PCR.....	75
Figura 18 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene OCT4 por qRT-PCR	76
Figura 19 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene OCT4 por qRT-PCR	77
Figura 20 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene osteopontina por qRT-PCR	78
Figura 21 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene osteocalcina por qRT-PCR	79
Figura 22 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene Rb1 por qRT-PCR	80
Figura 23 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene PCNA por qRT-PCR.....	81
Figura 24-	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene COL1A1 por qRT-PCR	82
Figura 25 -	Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene TNF α por qRT-PCR.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

α-MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle, ALPHA modification</i>
°C	Graus Celsius
Ca²⁺	Cálcio
cDNA	DNA complementar
CFSE	Carboxifluoresceína éster succinimidyl diacetato
cm²	Centímetros quadrados
CO₂	Dióxido de carbono
CPDC	Células de polpa dentária canina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Dicarbonato de dietila
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
dp	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	grupo
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Mg²⁺	Magnésio
MgCL₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
mL	Mililitro
nM	Nanomolar
OSC	Células de osteossarcoma canino
OSTBN	Células mesenquimais de osso

p53	gene supressor tumoral
PBS	Tampão salina fosfato
PBSA	Tampão salina fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+}
PE	<i>Phycoerythrin</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Iodeto de propídio
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
Rb1	Retinoblastoma
rhBMP2	Proteína morfogenética óssea recombinante humana tipoll
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RNase A	Ribonuclease A
RNaseOUT	Recombinant Ribonuclease Inhibitor
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
U	Unidades
µg	Micrograma
ul	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	TECIDO ÓSSEO	25
2.1.1	Componentes celulares	26
2.1.2	Componentes da Matriz Extracelular	28
2.1.2.1	Proteínas ósseas	28
2.2	OSTEOSSARCOMA.....	30
2.2.1	Osteossarcomatogênese	34
2.3	CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA POLPA DENTÁRIA	38
2.4	MICROAMBIENTE TUMORAL: CÉLULAS-TRONCO E CÂNCER....	39
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA	45
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.1	CULTIVO CELULAR.....	47
5.1.1	Células-tronco de polpa dentária canina.....	47
5.1.2	Células de Osteossarcoma Canino.....	48
5.1.3	Células mesenquimais derivadas de tecido ósseo normal	48
5.2	ENSAIO DE INTERAÇÃO POR COCULTIVO CELULAR	49
5.3	ANÁLISE DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA	50
5.4	ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	52
5.5	ANÁLISE DA EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA (ANEXINA V/PI).....	52
5.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	53
5.7	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA POR qRT-PCR.....	54
5.7.1	Síntese de cDNA Fita Dupla.....	55
5.7.2	Padronização dos primers e da concentração de cDNA para qRT-PCR.....	56
5.7.3	qRT-PCR.....	57

5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
6	RESULTADOS	60
6.1	ANÁLISE DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	60
6.2	ANÁLISE DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA	61
6.3	POTENCIAL DE ATIVIDADE ELÉTRICO MITOCONDRIAL	63
6.4	MORTE CELULAR POR APOPTOSE/NECROSE	66
6.5	MARCADORES CELULARES.....	70
6.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA por qRT-PCR	73
7	DISCUSSÃO	85
8	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS.....	98
	APENDICE A - INFORMAÇÕES SOBRE ANTICORPOS UTILIZADOS	109
	APENDICE B - INFORMAÇÕES SOBRE OS PRIMERS UTILIZADOS	
	PARA qRT-PCR	110

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer surge da proliferação e disseminação de clones de células malignamente transformadas. Atualmente, são considerados um problema mundial de saúde pública e grandes causadores de morbidade e mortalidade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

O osteossarcoma é o tumor ósseo primário de maior frequência em cães e em 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, ocorre com maior incidência entre a infância e adolescência, representando 5% das doenças malignas nesta faixa etária (RECH et al., 2004; VAN DEN BERG, 2006). Embora raro, é a segunda maior causa de morte por câncer em crianças, com o seu pico de incidência correspondente ao período de rápido crescimento esquelético (EK; DASS; CHOONG, 2006).

A prevalência de câncer de ocorrência espontânea em cães é semelhante à encontrada em humanos. Além disso, o osteossarcoma canino é muito similar ao que ocorre em humano, em termos estruturais histológicos, anatômicos e de resposta à quimioterapia. Entretanto a incidência do tumor em cães é de 40 a 50 vezes maior. Por este motivo, a doença na espécie canina é frequentemente utilizada como modelo para a doença, tanto para o estudo da neoplasia envolvendo seus mecanismos, quanto para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (KRUTH, 1996; VAN LEEUWEN, 1997; LOUKOPOULOS et al., 2004; OLIVEIRA; SILVEIRA, 2008).

Apesar de as duas últimas décadas terem sido promissoras no desenvolvimento de novos tratamentos para o osteossarcoma, e mesmo considerando o papel das novas estratégias terapêuticas, as quais têm proporcionado melhor qualidade de vida das espécies envolvidas e aumento da sobrevida, as expectativas de cura ainda são raras.

Atualmente, a terapia celular é considerada uma ferramenta útil na medicina regenerativa, pois as células-tronco possuem um alto potencial terapêutico devido à capacidade de auto-renovação e de diferenciação (WANG et al., 2009). De acordo com Hamada et al. (2005), a introdução de genes em células-tronco mesenquimais, pode ser útil em abordagens terapêuticas genéticas visando a regeneração óssea e de outros tecidos orgânicos.

As células-tronco derivadas da polpa dentária de várias espécies, incluindo os cães, apresentam um alto potencial de diferenciação osteogênica, fato que sugere sua indicação para o tratamento de injúrias ósseas. Considerando que existem algumas semelhanças entre o osteossarcoma e a estrutura dental em humanos e caninos, o cão pode ser um modelo útil para o estudo de novas abordagens terapêuticas, assim como para uma melhor compreensão da biologia dos tumores ósseos.

Sabe-se que as células-tronco mesenquimais possuem um tropismo por sítios de injúria, e seu tropismo por sítios tumorais primários e metastáticos tem sido relatado em múltiplos tipos de câncer (SPAETH et al., 2008). Entretanto o papel das células-tronco mesenquimais no ambiente tumoral ainda não é claro (KÉRAMIDAS et al., 2013).

Tais dúvidas sustentam a presente investigação e, baseado nas raras expectativas de cura do osteossarcoma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a interação entre células de osteossarcoma e células-tronco mesenquimais derivadas da polpa dentária imatura de cães, a fim de estabelecer seu comportamento no microambiente tumoral. Por outro lado, a equipe envolvida neste projeto pretendeu verificar se estas células podem regular o crescimento do tumor e serem, futuramente, utilizadas no tratamento *in vivo* do osteossarcoma.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o principal componente do esqueleto e é considerado órgão, por apresentar outros tecidos tais como cartilaginoso, o suprimento sanguíneo, o tecido conjuntivo fibroso, o tecido adiposo e inervação (TORTORA, 2000).

As três maiores funções do osso são a metabólica, hematopoética e mecânica, além de servirem como suporte para os tecidos moles e tencionam também como proteção para órgãos vitais, especialmente aqueles presentes nas caixas torácica, craniana e no canal raquidiano. Alojам e protegem a medula óssea, proporcionam apoio à musculatura esquelética e constituem um sistema de alavancas durante a contração muscular, além de constituírem depósito de cálcio, fosfato e outros íons (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Quanto ao formato, os ossos são classificados em longos, curtos, planos, irregulares e sesamóides (DRAKE; VOGL; MITCHELL, 2010), nos quais estão presentes tecido compacto, no córtex, e tecido esponjoso ou trabecular, disposto internamente, constituído por trabéculas intercomunicantes, que abrigam a medula óssea. O osso é revestido, interna e externamente, pelo endóstio e perióstio respectivamente (ANDIA; CERRIB; SPOLIDORIO, 2006).

A camada mais superficial do perióstio é constituída, principalmente, por fibroblastos e fibras colágenas, sendo que nas camadas mais profundas, o perióstio contém células osteoprogenitoras. O endóstio é formado por uma camada de células osteogênicas achatadas, as quais revestem as cavidades do osso esponjoso, os canais de “Havers”, “Volkmann” e o canal medular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Estruturalmente, o osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por 60 a 70% de cristal inorgânico e 30 a 35% de material

orgânico (MEIKLE et al., 1995; AVOLIO et al., 2008), cujas células, os osteócitos, são situadas nas lacunas e no interior da matriz. Os osteoblastos que sintetizam a parte orgânica da matriz e estão situados na periferia, enquanto que os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção, promovendo assim a remodelação óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

Os componentes orgânicos ou matriz óssea extracelular contêm o colágeno tipo I, o seu principal componente que responde por 90% das proteínas ósseas presentes na matriz. Aproximadamente 15% das suas proteínas que são não colágenas, dentre elas a osteocalcina é a mais abundante (AVOLIO et al., 2008).

A formação óssea, durante o seu desenvolvimento e remodelação, depende da expressão de genes fenotípicos e de crescimento celular. A formação óssea pode ser dividida em três fases: proliferação, maturação da matriz e mineralização (GRANDY et al., 2011). As células mesenquimais, oriundas da medula óssea e dos vasos no tecido conjuntivo, diferenciam-se em células osteogênicas pelo estímulo dos fatores de crescimento TGF- β e das proteínas morfogenéticas ósseas do tipo 2 (BMP2) (ANDRADE et al., 2007). O conhecimento destes fatores que regulam o crescimento, a remodelação óssea e a regeneração de tecidos lesados é clinicamente importante para o tratamento de lesões ósseas (LIAN; STEIN, 1992).

2.1.1 Componentes celulares

A formação óssea “in vivo” é um fenómeno complexo, dependente do recrutamento e da proliferação de precursores mesenquimais de osteoblastos, da diferenciação em pré-osteoblastos, da formação e maturação de osteoblastos, resultando em produção e mineralização da matriz óssea (AUBIN et al., 1995; AUBIN, 1998; RAOUF; SETH, 2000).

A osteogênese é definida como uma série de eventos, que se iniciam a partir da diferenciação de células-tronco mesenquimais por uma linhagem osteogênica precursora. Estas células proliferam e demonstram regulação positiva de genes osteoblásticos específicos e mineralização (ABE et al., 2000).

É um processo bem coordenado, no qual as células-tronco mesenquimais dão início a várias linhagens, são elas adipócitos, miócitos, condrócitos e osteócitos, por estímulos dos reguladores de cada linhagem como PPAR γ , MyoD, Sox9, ou Runx-2/osterix (TANG et al., 2008).

As células osteoprogenitoras são células mesenquimais primitivas capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condroblastos ou fibroblastos, e estão localizadas no tecido conectivo perivascular (PORTER; GURLEY; ROTH, 1997).

Os osteoblastos são originários de células mesenquimais primitivas, desempenham um importante papel na osteogênese (CHEN et al., 2013), sintetizam os componentes orgânicos da matriz óssea e secretam fosfatase alcalina (YAMAGUCHI; KOMORI; SUDA, 2000). Os osteoblastos elaboram as proteínas da matriz, dentre elas a osteocalcina. Entretanto outras proteínas também são secretadas em menor quantidade: osteopontina, sialoproteína óssea, fibronectina, vitronectina, glicoproteína ácida óssea, trombospondina, e que atuam na adesão das células junto à superfície óssea (AVOLIO et al., 2008).

Os osteócitos são células diferenciadas originárias de osteoblastos, que não possuem potencial proliferativo e migratório por estarem presos em pequenos espaços lacunares da matriz óssea mineralizada, ou em estrutura osteóide recém-formada (KOGIANNI; NOBLE, 2007). Correspondem ao tipo celular mais abundante no tecido ósseo e se comunicam com outras mediante rede de canalículos, os quais abrigam suas projeções citoplasmáticas (LINK, 2013).

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas de células-tronco hematopoéticas, responsáveis pela reabsorção óssea, fenômeno que acontece em muitos processos tais como crescimento ósseo, a erupção do dente e a cicatrização de fraturas. Além disso, são igualmente importantes, também na manutenção dos níveis adequados de cálcio

(VÄÄNÄNEM et al., 2000). Estão localizados na superfície endosteal ou na camada de tecido conjuntivo, que reveste a maioria dos ossos na superfície periosteal (PHAN; XU; ZHENG, 2004).

As células de revestimento ósseo são representadas pelos osteoblastos, os quais recobrem as superfícies ósseas quiescentes, exibem poucas organelas de síntese, secretam poucas proteínas e formam uma camada de células conectadas entre si, com potencial de manutenção da homeostase do órgão por meio da regulação citoplasmática de cálcio (ANDIA; CERRIB; SPOLIDORIO, 2006).

2.1.2 Componentes da Matriz Extracelular

A diferenciação osteoblástica é acompanhada pela expressão de vários marcadores presentes na matriz extracelular, tais como colágeno tipo I, a sialoproteína óssea, a fosfatase alcalina e a osteocalcina (CHEN et al., 2013).

2.1.2.1 Proteínas ósseas

A osteocalcina é uma proteína secretada por osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos. É responsável pela fixação do cálcio e da hidroxiapatita na matriz extracelular, resultando na mineralização do tecido ósseo. Além disso, pode participar do recrutamento e diferenciação osteoclástica (AVOLIO et al., 2008). É a proteína não colágena mais abundante no osso e dentina (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

A osteopontina é uma glicoproteína, inicialmente denominada como sialoproteína óssea I. O nome osteopontina surgiu devido à sua função de ligação entre as células e a hidroxiapatita. É expressa em vários tecidos,

mas no osso é produzida por osteoblastos, em vários estágios de diferenciação (SODEK, GANSS, MCKEEL; 2000). Está envolvida nos processos de reabsorção óssea, reparo de lesão, função imune, angiogênese, sobrevivência celular e biologia tumoral (STANDAL; BORSET; SUNDAN, 2004).

A osteonectina é uma glicoproteína, sintetizada por osteoblastos, células endoteliais e megacariócitos, e está relacionada ao crescimento tecidual e sua remodelação. É o principal componente da membrana celular basal de tecidos embrionários e adultos, que contém células em remodelação e proliferação ativa. Entretanto, em adultos, as fontes primárias da proteína são a matriz óssea mineralizada e as plaquetas. No osso, ela se liga ao colágeno do tipo I e à hidroxiapatita (KELM et al., 1994). Além disso, ela tem capacidade de regular a proliferação celular, bem como suas interações célula-matriz, estimulando angiogênese e a produção de metaloproteínases (DELANY et al., 2000).

A sialoproteína óssea é uma das maiores proteínas não colágenas presentes na matriz óssea. É expressa em osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e condrócitos hipertróficos (KARMATSCHEK et al., 1997). Representa o sítio de reconhecimento para integrinas e para os receptores de membrana de proteínas da matriz extracelular envolvidas na adesão (BIANCO et al., 1991). In vitro, estimula a formação de hidroxiapatita e media adesão entre a superfície celular e os componentes da matriz extracelular (KARMATSCHEK et al., 1997).

A osteoprotegerina exerce extrema importância no metabolismo ósseo, mais especificamente na remodelação e osteoclastogênese (YEUNG, 2004).

A fosfatase alcalina é o marcador de formação óssea mais utilizado, entretanto pode estar aumentada nos distúrbios de reabsorção do tecido ósseo. A isoforma óssea é secretada por osteoblastos, mas pode, também, ser secretada pelo fígado. A isoforma óssea predomina desde a infância até o final do crescimento esquelético, quando a hepática passa a ser a forma circulante mais abundante (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

2.2 OSTEOSSARCOMA

O osteossarcoma é o tumor ósseo maligno primário (KUMAR et al., 2005), altamente agressivo e metastático, muito comum em cães e humanos (POOL, 1990). É um tumor sólido que atinge mais frequentemente os ossos longos, próximos às suas epífises de crescimento (BASU-ROY; BASILICO; MANSUKHANI, 2013).

Em cães, 80% dos casos de osteossarcoma apresentam micrometástases no momento do diagnóstico. Entretanto apenas delas 10% são detectáveis (SU et al., 2009), sendo o pulmão o órgão mais afetado (OYA et al., 2001).

A etiologia do osteossarcoma canino é desconhecida. Sabe-se que a herança genética desempenha um importante papel no desenvolvimento dos tumores. Existem teorias baseadas na evidência de que o osteossarcoma tende a ocorrer nos ossos que sustentam maior peso corporal, em sítios adjacentes as fises de fechamento tardio. Os animais de grande porte são predispostos a pequenos e múltiplos traumas nas regiões metafisárias, local de maior atividade celular. A sensibilização de células, nesta região, pode dar início à doença mediante indução da proliferação celular, aumentando assim a probabilidade de desenvolvimento de uma linhagem celular mutada (STRAW, 1996).

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

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

Há, também, hipóteses sobre a origem viral do tumor, já que pode ocorrer em ninhadas e ainda ser induzido, experimentalmente, pela injeção de células neoplásicas em fetos caninos. Porém ainda não foi isolado

nenhum vírus responsável pelo surgimento do osteossarcoma canino (STRAW, 1996).

Existem relatos da doença envolvendo o esqueleto apendicular de cães devido a fraturas não tratadas, em especial aquelas que passaram por processos de atraso na sua consolidação, deficiência de união óssea ou por osteomielite crônica. Alterações genéticas foram observadas em cães portadores de osteossarcoma e relatadas como um importante fator de risco para o desenvolvimento do tumor (BRAMWELL, 1995; OLIVEIRA; SILVEIRA, 2008). As raças que apresentam o tumor, com mais frequência, 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; CANOLA, 2002). No Brasil, alguns estudos demonstram que as raças mais acometidas são aquelas de maior porte, tais 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, o tumor acomete o esqueleto apendicular (FOSSUM et al., 2001), membros pélvicos e torácicos, e nos 25% restantes, afeta o esqueleto axial ou ossos planos (KLEINER; SILVA, 2003; JOHNSON; WATSON, 2004).

O diagnóstico é baseado na história clínica, exame físico, achados radiológicos e cintilográficos, em que a confirmação é 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 para o diagnóstico é o exame citológico, com base nos achados por aspiração com agulha fina ou um aspirado na área acometida. Pode ser realizado rapidamente sem anestesia (MAHAFFEY, 1999), porém pode não fornecer informação

definitiva (REINHARDT et al., 2005). 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).

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 das margens da lesão, para um diagnóstico mais preciso (LONGHI et al., 2006; GOMES; BRANDÃO; RANZANI, 2008). 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).

Os tratamentos atuais para osteossarcoma incluem cirurgia e quimioterapia. Em cães, o tratamento cirúrgico de escolha é a amputação. Porém em humanos, frequentemente, envolve a preservação do membro (WITHROW et al., 1991).

Uma vez que a metástase é a causa mais comum de morte em cães portadores de osteossarcoma, 90% deles 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 dos animais. Este tratamento é utilizado em combinação com cirurgia ou radioterapia. A quimioterapia adjuvante tem demonstrado aumento dos intervalos livres de doença. As drogas mais utilizadas para o tratamento em humanos são a cisplatina, doxorubicina e metotrexato. Em cães, utiliza-se a cisplatina ou associação da cisplatina e doxorubicina (WITHROW et al., 1991; SILVEIRA et al., 2008).

O tratamento do osteossarcoma canino tem dois objetivos: paliativo da dor e da claudicação ou curativo. O tratamento paliativo da dor é realizado nos casos nos quais as metástases já são evidentes. Isso inclui o uso de analgésicos, terapia de radiação, amputação de membro e quimioterapia. O tratamento com intenção curativa inclui a combinação de diferentes modalidades de terapia, tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, independente da combinação utilizada, 80% dos cães portadores da doença morrem devido ao seu elevado potencial metastático (LIPTACK et al., 2004a; MUELLER; FUCHS; KASER-HOTZ, 2007).

Os procedimentos cirúrgicos com preservação dos membros estão sendo atualmente realizados, com o tempo de sobrevida comparável aos das 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).

No tratamento com intenção curativa, em humanos, 60% dos pacientes sobrevivem por um período de 5 anos, e 75% dos pacientes com doença localizada têm uma sobrevida maior que 5 anos. Na presença de doença metastática, essa taxa cai e varia entre 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 em cães, reduz a inflamação e resulta em necrose de células tumorais, substituição por tecido fibroso e 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.

Entretanto, apesar do avanço com relação às estratégias de tratamento que incluem cirurgia, quimioterapia adjuvante e radioterapia, o

prognóstico para estes pacientes ainda permanece ruim (ZHOUL et al., 2013).

2.2.1 Osteossarcomatogênese

A carcinogênese é um processo dependente de fatores genéticos e epigenéticos, em que a célula escapa dos mecanismos de controle e prolifera. Além da proliferação celular, ocorre a neovascularização e alterações na membrana celular, levando à perda da adesão intercelular e maior adesão com os tecidos vizinhos, o que permite o desenvolvimento de metástases (INOUE; AMAR; CERVANTES, 2005).

Em outras palavras, a carcinogênese é um processo composto por múltiplas etapas, tanto a nível fenotípico quanto a nível genético, resultante do acúmulo de múltiplas mutações, em diferentes células, gerando subclones com habilidades variadas de crescimento, invasão, metástase e resposta à quimioterapia (STRIKER; KUMAR, 2008).

A transformação neoplásica se origina de danos aos genes presentes no DNA. A ativação de um gene gera uma resposta celular de síntese da proteína codificada. Portanto, mutações genéticas alteram a produção e/ou a função das proteínas envolvidas. 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, interferindo com a leitura correta da sequência de DNA, durante a replicação (SZYFTER et al., 1996; RIVOIRE, et al., 2001).

Algumas alterações são essenciais para que ocorra a transformação maligna, tais como a autosuficiência nos sinais de crescimento, ou seja, as células possuem a capacidade de se proliferarem sem estímulos externos, devido à ativação de oncogenes. Insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento, em que o tumor pode não responder a fatores inibitórios como TGF β e inibidores diretos das cinases dependentes de ciclinas (CDK1). Evasão da apoptose, na qual há resistência à morte celular

programada, como consequência da inativação da p53 ou de genes anti apoptóticos. Potencial de replicação ilimitado, angiogênese mantida, capacidade de invadir e metastatizar e defeitos no reparo do DNA (STRIKER; KUMAR, 2008).

A neovascularização é o processo de formação e crescimento de novos vasos sanguíneos e constitui um fator importante no crescimento tumoral e metástase, constituindo, assim, um importante fator na progressão do câncer (FOLKMAN, 2002).

Além disso, neovascularização no processo de formação da metástase envolve uma tríade de eventos fisiopatológicos, como mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular (LIOTTA; STEEG; STELLER-STEVENSON, 1991).

O desenvolvimento de vasos sanguíneos em tumores sólidos favorece o rápido crescimento tumoral (WU et al., 2000). A complexa rede de microvasos tumorais garante o adequado suprimento de nutrientes e oxigênio, além de fornecer drenagem eficiente de metabólitos (EICHHORN et al., 2007).

Resultados adversos das terapias atuais, em especial em pacientes com prognóstico pobre e em estágio avançado da doença tem despertado a possibilidade de que as células tumorais incluem uma população de células responsáveis pela iniciação do tumor, seu crescimento e a sua capacidade de metástases e recidiva. Essas células são nomeadas células-tronco tumorais e têm habilidade de se manterem quiescentes, fato este responsável por sua resistência à quimioterapia. A metástase é responsável por 90% dos óbitos em pacientes e representa o estágio final do processo de tumorigênese (PAVELICK et al., 2011).

Os tumores são organizados por uma hierarquia de populações heterogêneas de células, com diferentes potenciais proliferativos (WANG et al., 2011). A evidência experimental para a existência de células-tronco tumorais foi proposta, primeiramente, em leucemias, por Bonnet e Dick (1997), porém, mais recentemente, foram descobertas em tumores sólidos, em regiões de mama, cérebro, pâncreas e ossos (REGENBRECHT; LEHRACH; ADJAYE, 2008).

O osteossarcoma é uma doença com falhas na diferenciação, decorrente de alterações genéticas e epigenéticas na via de diferenciação dos osteoblastos, e possui um amplo espectro de apresentações histológicas com características comuns, contendo células-tronco mesenquimais malignas, altamente proliferativas, e produção de osteóide e/ou osso por células tumorais (TANG et al., 2008).

Ao contrário de muitos sarcomas, o osteossarcoma não é caracterizado por translocações em um cromossomo específico, e sim por um rearranjo complexo que pode afetar qualquer cromossomo (MARTIN; SQUIRE; ZIELENSKA, 2012).

A identificação dos mecanismos de sinalização molecular envolvidos na carcinogênese e formação de metástase do osteossarcoma desempenha um papel importante no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (LI et al., 2013). No osteossarcoma são encontradas mutações nos genes Rb1 e/ou p53, porém não existem alterações genéticas únicas neste tipo de tumor (SU et. al., 2009).

Segundo Martin, Squire e Zielenska (2012), o osteossarcoma tem um amplo espectro de instabilidades genômicas, como instabilidade cromossômica, caracterizada por alta taxa de ganho ou perda de cromossomos inteiros ou secções, resultando em aberrações numéricas e aberrações complexas, e grande heterogeneidade celular, instabilidade microsatélite e fenótipo metilados das ilhas CpG.

A instabilidade microsatélite é resultado da alta taxa de mutação, que ocorre, principalmente, em nucleotídeos curtos, e o fenótipo metilador das ilhas CpG é caracterizado pela extensa metilação do promotor (GEIGL et al., 2008).

O cariótipo canino é composto por 38 autossomos acrocêntricos e dois cromossomos sexuais metacêntricos. O osteossarcoma canino pode apresentar cariótipo altamente variável e caótico, incluindo hipodiploidia, hiperdiploidia e aumento no número de cromossomos metacêntricos. As instabilidades cromossomais podem resultar da segregação cromossomal deficiente, durante a mitose, que pode ocorrer por meio da disfunção dos telômeros, amplificação dos centrossomos, centrômeros disfuncionais ou

por deficiência no controle do ponto de checagem do fuso (MAEDA et al., 2012).

Mutações ou desregulações de genes importantes para os pontos de checagem da fase de mitose parecem ser as principais causas de instabilidades cromossomais, como por exemplo, a inativação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb (MARTIN; SQUIRE; ZIELENSKA, 2012).

Estas proteínas estão envolvidas na regulação do ciclo celular, sendo pRb a maior reguladora da progressão da fase G1 - fase S do ciclo celular, por meio da ligação e supressão do fator de transcrição E2F, que é controlada pela fosforilação do complexo ciclina D1/CDK4 (WADAYAMA et al., 1994; HANSEN, 2002; CHUN, DE LORIMIER, 2003).

Se a via pRb for inativada, a célula se torna sensível a fatores que bloqueiam o anticrescimento envolvido no avanço do ciclo, resultando em proliferação. O papel do gene Rb na tumorigênese do osteossarcoma canino pode não ser tão importante como na doença humana, pois linhagens celulares caninas podem conter mutações que, indiretamente, inativam os membros da família pRb (MUELLER, FUCHS, KASER-HOTZ, 2007).

O reconhecimento do dano ao DNA e o reparo são vitais para a manutenção da estabilidade genética e, portanto, para a 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).

A p53 controla o ciclo celular, após danos ao DNA, provocando uma parada na fase G2 do ciclo celular, e possui um papel importante na regulação da apoptose. Portanto mutações nos genes que regulam p53 foram identificados no osteossarcoma, como MDM2, que juntamente com CDK4 codificam uma proteína que se liga a p53 e bloqueia sua atividade. Além disso, outra proteína envolvida neste processo é a p14, produto do

gene INK4, e exerce um efeito protetor sobre a p53 se ligando ao produto de MDM2 (HANSEN, 2002).

Além disso, outros genes podem estar envolvidos no desenvolvimento do osteossarcoma, tais como PTEN, EZR, MET, ERBB2, STAT3 (ANGSTADT et al., 2012), cMyc, RECQL4 e RUNX-2 (MARTIN; SQUIRE; ZIELENSKA, 2012).

2.3 CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA POLPA DENTÁRIA

A dentição decídua canina é formada por 28 dentes, sendo 6 incisivos (inferiores/superiores), 2 caninos (inferiores/superiores) e 6 pré-molares (inferiores/superiores). Assim como nas demais espécies, os dentes decíduos em cães são muito menores do que os permanentes e possuem raízes mais longas (GETTY, 2008). Os cães são frequentemente utilizados para investigar doenças dentais, periodontais e para testar terapias voltadas para a espécie humana, por apresentarem anatomia dental semelhante (MARTIN; GASSE; STASZYK, 2010).

O dente é um órgão complexo, com áreas de tecidos mole e sólidos, incluindo dentina, esmalte, cemento e polpa. A formação das estruturas sólidas é controlada por cementoblastos, ameloblastos e odontoblastos e a diferenciação e morfogênese do dente são controladas pela interação epitélio mesenquimal (HONDA et al., 2010).

A célula-tronco é uma ferramenta importante na regeneração tecidual devido à sua capacidade de auto-renovação e diferenciação, em várias linhagens celulares (PENG, YE, ZHOU; 2009).

Embora, as células-tronco dentais tenham origem na crista neural (HONDA et al., 2010), estas possuem características mesenquimais, incluindo a expressão de marcadores de superfície, expressão de fosfatase alcalina, capacidade de auto-renovação e de diferenciação em outros tipos celulares, caracterizando assim a diferenciação adipogênica, osteogênica, neurogênica, condrogênica e miogênica (JEON et al., 2011).

O mesênquima dental é denominado ectomesenquima devido à sua interação com a crista neural. Por isso, as células-tronco dentais derivadas do ectomesenquima podem possuir características semelhantes as da crista neural (HUANG et al., 2009).

As células-tronco de polpa dentária vêm sendo muito estudadas para regeneração da própria polpa e dentina e podem ser facilmente isoladas (DISSANAYAKA et al., 2011). Além disso, as células-tronco de polpa dentária humana possuem perfil de expressão de genes e capacidade de diferenciação semelhante às células-tronco derivadas da medula óssea (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002).

Segundo Dissanayaka et al. (2011), vários estudos têm isolado e caracterizado células-tronco derivadas da polpa dentária, em diferentes espécies tais como suínos, murinos e macacos. O cão é a espécie mais frequentemente utilizada para experimentos referentes a endodontia regenerativa por possuir estruturas do tecido dentário, sadias ou não, semelhantes aquelas encontradas em humanos.

Apesar de a polpa dentária imatura canina representar uma fonte promissora de células-tronco para a medicina regenerativa na área de odontologia, ela pode, também, ser útil no tratamento de defeitos ósseos. Além disso, podem sustentar pesquisas clínicas em animais e servir de modelo para o estudo em humanos.

2.4 MICROAMBIENTE TUMORAL: CÉLULAS-TRONCO E CÂNCER

O comportamento tumoral não é determinado somente por células tumorais. As citocinas e células não tumorais também exercem seus papéis no microambiente tumoral durante a tumorigênese e desenvolvimento tumoral (WANG; CHENG; ZHENG, 2013).

O microambiente tumoral é composto por vários tipos celulares, incluindo células tumorais, imunológicas, fibroblastos, mioblastos assim

como matriz extracelular e moléculas de sinalização (LORUSSO; RÜEGG, 2008).

O microambiente tumoral é responsável por favorecer o crescimento e invasão tumoral, protege o tumor do sistema imune, mantém a resistência terapêutica e fornece nichos de células tumorais latentes. Além disso, células-tronco tumorais, células-tronco normais e progenitoras podem estar presentes neste nicho durante o processo de tumorigênese e progressão tumoral (WANG; CHENG; ZHANG, 2013).

As células estromais compõem de 60 a 90% da massa tumoral, e uma grande porção destas células são produzidas na medula óssea (HOUGHTON et al., 2007).

A terapia celular, atualmente, tem sido uma ferramenta útil na medicina regenerativa, com alto potencial terapêutico, devido à capacidade de auto renovação e diferenciação destas células (WANG et al., 2009). Segundo Hamada et al. (2005), a introdução de genes exógenos em células-tronco mesenquimais é útil em abordagens terapêuticas gênicas para regeneração óssea e de outros tecidos.

No câncer, o conceito da utilização das células-tronco como veículo terapêutico surgiu da hipótese de que os tumores, assim como feridas ou lesões, enviam atraentes químicos, como o VEGF, para recrutarem células-tronco mesenquimais, para darem suporte ao tumor (SAGAR et al., 2007).

O transplante de células-tronco hematopoéticas tem sido amplamente utilizado para tratar doenças hematológicas, para reconstituição medular, e tem sido sugerido como tratamento para pacientes com doença autoimune severa (HOUGHTON et al., 2007).

Células-tronco mesenquimais são utilizadas na prevenção e tratamento da doença enxerto-hospedeiro, e na recuperação funcional dos pacientes transplantados com células-tronco hematopoéticas (SAGAR et al., 2007).

As células-tronco são atraídas para o sítio tumoral por quimiotaxia, mediante fatores produzidos pelas células tumorais, quimiocinas inflamatórias locais e citocinas induzidas pela invasão tumoral. Este tropismo faz com que células-tronco mesenquimais tenham habilidade de

distribuir, seletivamente, proteínas inibitórias de crescimento, propiciando um microambiente desfavorável à proliferação das células tumorais e alterando sua resposta à quimioterapia (LING et al., 2010).

As células-tronco mesenquimais podem constituir um eficiente sistema de terapia gênica alvo-dirigida para abordagens antitumorais, devido à capacidade de infiltração destas células no parênquima tumoral (DUAN et al., 2010). Segundo Rici et al. (2012), a associação entre células-tronco mesenquimais da medula óssea fetal canina e rhBMP2 diminui o potencial tumorigênico das células de osteossarcoma canino.

Para Reya et al. (2001), a interação entre células-tronco normais e o câncer precisa ser estudada, assim como as vias de controle da oncogênese que permitem o controle da autorrenovação de células tronco normais.

Segundo Abdallah e Kassem (2008), por possuírem efeito imunossupressor *in vitro* e *in vivo* e por produzirem citocinas que dão suporte à hematopoese, as células-tronco mesenquimais são utilizadas, principalmente, na prevenção e tratamento de doenças enxerto *versus* hospedeiro, complicação do transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas, podendo ainda ser úteis na recuperação funcional do transplantado.

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da interação entre células-tronco, derivadas da polpa dentária imatura de cães com células derivadas do osteossarcoma canino, tendo como controle as células derivadas de tecido ósseo normal.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os aspectos morfológicos da interação celular entre polpa dentária canina imatura, osteossarcoma e tecido ósseo sadio “in vitro”;
- Analisar a atividade proliferativa das células-tronco da polpa dentária imatura, células de osteossarcoma e de tecido ósseo sadio, ambas derivadas da espécie canina, tratadas por cocultivo celular;
- Analisar a expressão de marcadores, por imunofenotipagem, nas células-tronco da polpa dentária imatura, células de osteossarcoma e de tecido ósseo sadio, ambas derivadas da espécie canina, tratadas por cocultivo celular;
- Analisar o potencial elétrico mitocondrial das células-tronco da polpa dentária imatura, células de osteossarcoma e de tecido ósseo sadio, ambas derivadas da espécie canina, tratadas por cocultivo celular;
- Comparar a expressão de mRNAs das células-tronco da polpa dentária imatura, células de osteossarcoma e de tecido ósseo sadio, ambas derivadas da espécie canina, tratadas por cocultivo celular;

4 Hipótese Científica

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

- As células-tronco derivadas da polpa dentária imatura de cães apresentam potencial inibitório sobre as células derivadas do osteossarcoma canino. A interação entre esses dois tipos celulares pode provocar alterações morfológicas e/ou funcionais nos tipos celulares analisados.

5 Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado e está em conformidade com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, protocolado sob o número 2303/2011.

5.1 CULTIVO CELULAR

5.1.1 Células-tronco de polpa dentária canina

As células-tronco de polpa dentária canina foram cultivadas em meio de cultura Alpha MEM (Minimum Essential Medium-GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Invitrogen), 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de L-glutamina.

Os dentes decíduos caninos foram coletados e lavados em solução tampão salina fosfato (PBS), contendo 5% de antibiótico penicilina/estreptomicina. Após as lavagens, a polpa foi retirada com auxílio de um extrator de polpa dentária e colocada em tubos cônicos contendo solução de collagenase tipo I (3mg/ml) e mantida em estufas a 37° C, por 40 minutos. Após este período, a collagenase foi neutralizada com meio de cultivo completo (descrito acima) e a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em meio de cultivo, colocado em placas de cultura e mantido em estufa a 37° C e 5% de CO₂.

5.1.2 Células de Osteossarcoma Canino

Foram obtidos fragmentos tumorais de osteossarcoma, provenientes do Hospital Veterinário da Universidade Paulista (UNIP) e do Hospital Veterinário Arca de Noé, após amputações ou biópsias de animais com a doença. Os fragmentos foram lavados em solução de PBS, contendo 5% de antibióticos (penicilina/streptomina). Após a lavagem, foi retirado todo o tecido gorduroso e hemorrágico, com auxílio de bisturi, contido no espécime clínico. Os fragmentos foram colocados em tubos cônicos do tipo Falcon® (BD, USA) de 15ml, contendo colagenase do tipo II (INVITROGEN) e mantidos em estufa a 37°C, por 1 hora. Após este período, a colagenase foi neutralizada com meio de cultivo completo descrito abaixo e o material foi centrifugado a 1500rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material colocado em garrafas de 25cm², contendo meio de cultivo celular DMEM-High glucose (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal de bovino (GIBCO), 1% de antibiótico penicilina e streptomina (INVITROGEN) pH=7.4, mantidas em estufa a 37 ° C, com CO² a 5% umidificada.

5.1.3 Células mesenquimais derivadas de tecido ósseo normal

As células mesenquimais derivadas de tecido ósseo normal de fetos caninos foram obtidas com o objetivo de estabelecer um grupo controle para o tratamento do osteossarcoma canino.

Os fetos foram obtidos por meio de campanhas de castração, realizadas na cidade de Guarulhos. Após a obtenção dos fetos, o membro pélvico foi desarticulado, os ossos foram limpos, com a retirada de pele, músculos e periósteo. Em seguida, foram retirados flaps de osso com auxílio de bisturi e estes fragmentos foram colocados em solução de colagenase tipo II (5mg/ml) e tripsina EDTA, por 1 hora.

Após este período, a colagenase foi neutralizada com meio de cultura completo, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado, o pellet foi ressuspensionado em meio completo e colocado em placas de cultura, em estufa a 37°C, a 5% de CO₂. O meio de cultivo utilizado foi DMEM-High glucose (GIBCO), acrescido de 10 % de soro fetal bovino, 1% de antibióticos-penicilina e estreptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de L-glutamina.

5.2 ENSAIO DE INTERAÇÃO POR COCULTIVO CELULAR

Para o ensaio de interação celular, as células foram cultivadas por meio de placas de cocultura em transwell (CORNING Inc, NY, USA) ilustradas da figura 1.

Após subconfluência, as células OSC, OSTBN e CPDC foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas em placas de cultura *transwell* (CORNING Inc., NY, USA) de 6 orifícios (Figura 4). As células foram contadas (10^4) e foram cultivadas, tanto no compartimento superior quanto inferior da placa. O experimento foi realizado em duplicatas e o tratamento teve duração de três dias (72 horas), seguindo os grupos citados abaixo.

Todos os aspectos de crescimento celular e do tratamento “*in vitro*” foram acompanhados pela fotodocumentação das garrafas, em microscopia invertida acopladas a um sistema de captura de imagem CCD-Sony. Os grupo de tratamento foram:

- Grupo 1: Células CPDC controle sem tratamento;
- Grupo 2: Células CPDC no compartimento inferior, tratadas com células OSC em compartimento superior;
- Grupo 3: Células CPDC no compartimento inferior, tratadas com células OSTBN em compartimento superior;
- Grupo 4: Células OSC controle sem tratamento;

- Grupo 5: Células OSC no compartimento inferior, tratadas com células CPDC em compartimento superior;
- Grupo 6: Células OSC no compartimento inferior, tratadas com células OSTBN em compartimento superior;
- Grupo 7: Células OSTBN controle sem tratamento;
- Grupo 8: Células OSTBN no compartimento inferior, tratadas com células CPDC em compartimento superior;
- Grupo 9: Células OSTBN no compartimento inferior, tratadas com células OSC em compartimento superior;

Figura 1 – Esquema representativo demonstrando as placas de cocultura transwell. Em A: compartimento inferior, B: compartimento superior e em C: esquema demonstrando a interação entre as células, com a câmara superior sobre a inferior

5.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA

Para análise da atividade proliferativa foi utilizado o kit CellTrace™ Violet Cell Proliferation kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conhecido como CellTrace™ CFSE (carboxifluoresceína éster succinimidyl diacetato). Os kits CellTrace possuem um éster não fluorescente de membrana celular não permeável, que entra nas células por difusão através da membrana plasmática. Após a entrada na célula, a molécula é convertida por esterases, em um derivado fluorescente. O éster succinimidyl ativo se liga, covalentemente, a grupos amina em proteínas, resultando na retenção do corante, por um longo prazo, no interior da célula.

Por meio das divisões celulares, as células filhas recebem, aproximadamente, metade da marcação da célula original, ou seja, metade da fluorescência da célula mãe, o que permite avaliar as diferentes gerações através da intensidade de fluorescência gerada, determinando o número de gerações a partir da marcação.

Inicialmente, foi preparada a solução CellTrace 5mM estoque, através da adição de 20ul de DMSO (dimetilsulfóxido), em um vial do reagente CellTrace Violet. Para a solução de trabalho, foi realizada a diluição de 1ul da solução estoque em 1mL de solução de PBS pré-aquecido em banho-maria, a 37°C.

As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas, gentilmente, na solução de trabalho e incubadas por 20 minutos, a 37°C, protegidas da luz. Após este período, foram acrescidas cinco vezes o volume original da coloração, utilizando meio de cultivo ALPHA-MEM suplementado com 1% de soro fetal bovino, para remover o corante livre remanescente na solução, incubado por 5 minutos.

As células foram, então, centrifugadas, ressuspensas, em meio de cultivo completo, e incubadas por 10 minutos, para permitir a hidrólise de acetato. Após a última incubação, as células foram plaqueadas seguindo o protocolo de cocultivo descrito anteriormente e incubadas por 24, 48 e 72 horas, consecutivamente. Após cada período de tratamento, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em PBSA contendo 2% de paraformaldeído para fixação, lavadas e ressuspensas, novamente, em PBSA para análise no citômetro de fluxo. Para aquisição dos dados, as análises foram realizadas em DAPI, no citômetro de fluxo FACS Ariall Cell Sorter (Becton Dickinson, San Jose, California, USA), utilizando o software FlowJo v.10.

5.4 ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para análise do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado o fluorocromo Rhodamine 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que inibe a função mitocondrial, marcando, assim, apenas as mitocôndrias ativas ou viáveis. O fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular.

Após o desprendimento e centrifugação, as células foram ressuspendidas em solução tampão salina-fosfato e foram adicionados 5µl de Rodamina 123 (5mg/ml), em cada tubo. As amostras foram, então, incubadas no escuro, em estufa, a 37° C a 5% de CO², por 30 minutos. As células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado, ressuspendidas em 100µl de tampão PBSA e analisadas por citômetro de fluxo FACS Arianal Cell Sorter (Becton Dickinson, San Jose, California, USA), utilizando o software FlowJo v.10.

5.5 ANÁLISE DA EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA (ANEXINA V/PI)

O objetivo desta técnica foi determinar a porcentagem de células mortas por apoptose ou necrose, por meio da habilidade de ligação por Anexina V ou pelo PI (iodeto de propídeo). Quando as células são coradas com Anexina V/PI células apoptóticas expressando fosfatidilserina, são detectadas no canal FITC (verde), as células mortas ou necróticas mostram fluorescência vermelha PE e, portanto, as células vivas não apresentam fluorescência.

As células tratadas e controles foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspendidas em 0.2mL de tampão de ligação de anexinaV-FITC para FACS (solução 1). As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante

descartado, as células foram ressuspensas em 100µl de tampão de ligação contendo anexina V-FITC (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), diluídas (1:1000) e incubadas no escuro, a 37° C, por 20 minutos.

Após a incubação, 0.3 mL de PBSA e 20µl de solução de iodeto de propídeo (PI) em condições não denaturantes (solução 2), foram adicionados, logo antes da análise no citômetro de fluxo. As aquisições foram realizadas em citômetro de fluxo FACS Arian Cell Sorter (Becton Dickinson, San Jose, California, USA) e analisadas pelo software FlowJo v.10. No aparelho, a aquisição das amostras foi realizada utilizando os filtros FL-1 (AnexinaV) e FL2 (PI) e analisados os eventos adquiridos usando um dot plot (eixo X: Anexina V e eixo Y: PI). A proporção de eventos, em cada quadrante, representa a proporção de células em cada estágio de sobrevivência.

- Solução 1: O tampão de ligação de anexinaV-FITC foi preparado em 300mL de HEPES 10mM e pH 7.4 (LGC, São Paulo, SP), contendo NaCl 150mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM e CaCl₂ 1.8mM. Conservado a 4° C.
- Solução 2: A solução de iodeto de propídeo (PI) foi preparada em 100mL de PBSA, usando 10µg/mL PI (estoque: 1mg/ml de H₂O). A solução foi conservada a 4° C.
- PBSA: Solução de PBS sem Ca²⁺ e Mg²⁺.

5.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES POR CITOMETRIA DE FLUXO

As análises de citometria de fluxo permitem a caracterização fenotípica das células de modo que foi possível observar alterações decorridas da cocultura celular. Após o desprendimento celular e centrifugação, o sobrenadante foi descartado novamente, e acrescentado a solução de PBSA ao *pellet*. A suspensão foi transferida para tubos de citometria, onde foram adicionados os anticorpos primários e incubados por 30 minutos, a 4° C. Após a incubação, foi adicionado o anticorpo

secundário, por 30 minutos, a 4° C. Após a incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão PBSA, para aquisição dos dados em Citômetro de Fluxo FACS Arial Cell Sorter (Becton Dickinson, San Jose, California, USA), as aquisições analisadas pelo programa e analisadas pelo software FlowJo v.10. A expressão de marcadores foi determinada pela comparação com um isotipo controle marcado com o fluorocromo inespecífico. Os anticorpos utilizados foram Caspase-3, osteopontina, VEGF e p53 (APÊNDICE A).

5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA POR qRT-PCR

Os ensaios para PCR quantitativo, em tempo real, foram realizados com o objetivo de comparar a expressão dos genes nas células tratadas e controle.

Primeiramente, as células tiveram o seu RNA total extraído. Esses RNAs foram utilizados como molde na reação de transcrição reversa, para a síntese de cDNA fita dupla, conforme descrito abaixo. Os primers foram desenhados com a utilização do programa Primer Express v3.0. Como alvos para análise foram utilizados os genes *VEGF*, *RunX2*, *Oct-4*, *Stat3*, *Osteopontina*, *Osteocalcina*, *Rb1*, *c-Myc*, *PCNA*, *Col1*, *TNF-alfa* e para análise foi utilizado o gene endógeno de cão GAPDH (todos os primers estão descritos no APÊNDICE B).

A extração do RNA total foi realizada a partir do protocolo de Trizol. As amostras de homogeneizado de células foram acrescidas de 500µl de Trizol e homogenizados, com o auxílio do vortex. O homogenato foi armazenado a temperatura ambiente, durante 5 minutos, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos presentes na solução. Após este período, 100 µl de clorofórmio foram adicionados (200µl para cada mL de Trizol) e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 10.000 rpm, a 4°C.

Enquanto isso, novos tubos foram identificados e acrescidos de 500

μl de isopropanol. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para os tubos contendo isopropanol, homogeneizados, suavemente, e incubados a temperatura ambiente, por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 10.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (RNA Total) solubilizado com 1 mL de álcool 75% diluído em água DEPC. Uma nova centrifugação foi realizada, por 5 minutos, 7.000 rpm, a 4 °C. O excesso de álcool foi retirado e o precipitado (RNA Total) solubilizado em 200μl de água tratada com DEPC.

Para a quantificação do RNA total, as amostras foram diluídas na proporção 1:5, ou seja, 40 μl de H₂O DEPC, foi adicionada de 10 μl do RNA total e homogeneizada, suavemente. A quantificação foi realizada no Biofotômetro (Eppendorf), a 260/280nm.

5.7.1 Síntese de cDNA Fita Dupla

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado 1 μg de RNA tratado com 2,5 mM MgCl₂, 2U DNase I (RNase *free*, Thermo Scientific), 20U RNaseOUT (Life Technologies) e água deionizada (Milli-Q®), em quantidade suficiente para completar 10 μL de reação. Esta mistura foi incubada, inicialmente, a 37 °C, por 10 minutos, e depois a 75 °C por 5 minutos.

Adicionou-se, posteriormente, em cada reação, 0,77 mM dNTP (Thermo Scientific), 500μg Oligo (dT) primer (Thermo Scientific), 1 μL água deionizada e incubou-se por 10 minutos, a 65 °C. A seguir, acrescentou-se à reação: 1X Super Script III Buffer (Thermo Scientific), 5mM DTT (Thermo Scientific), 20U RNaseOUT (Thermo Scientific), 1 μL enzima SuperScript III (Thermo Scientific) e 0,5 μL água deionizada e incubou-se a 25 °C, por 10 minutos, a 55 °C, por 2 horas e a 75 °C, por 15 minutos. Por fim, foi adicionado a cada reação 1 μL RNaseH (Takara) e incubou-se por 30 minutos, a 37 °C, e por 10 minutos, a 72 °C. Cada amostra (20 μL) foi

diluída, adicionando-se 40 µL de água deionizada e essas soluções foram armazenadas em alíquotas a -20°C.

5.7.2 Padronização dos primers e da concentração de cDNA para qRT-PCR

A padronização dos *primers* por PCR, em tempo real, mostrou que as sequências de oligonucleotídeos escolhidas eram eficientes para a amplificação.

Os cDNAs produzidos foram, então, utilizados em reações de PCR, em tempo real. Os *primers* usados na amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados com o auxílio do programa computacional *Primer Express* versão 2.0 (Applied Biosystems), respeitando as seguintes especificações: amplificar fragmentos, cujos tamanhos variem entre 50-150bp, apresentar quantidade de CG entre 30 e 80%, não apresentar a capacidade de formar dímero ou de estrutura secundária, apresentar temperatura de anelamento entre 58 °C e 60 °C, de acordo com o algoritmo *nearest neighbor*.

Além disso, a fim de evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico contaminante, os pares de *primers* foram desenhados em *exons* diferentes do gene. Para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR em tempo real, foi utilizado o reagente Fast SYBR® Green Dye (Life Technologies) e o aparelho ViiA7 Real Time PCR System (Life Technologies). Para a normalização dos dados, foi utilizado *primer* para um gene de expressão constitutiva, o GAPDH, que estará atuando como controle interno das reações.

Para tanto, diferentes concentrações de *primers* foram testadas: 200, 400 e 600nM com misturas de cDNAs diluídas em séries. Com este ensaio, pode-se determinar a concentração ótima de *primers*, que é caracterizada como a menor concentração onde o Ct e o perfil da curva de amplificação não apresentassem grandes variações em relação às maiores

concentrações, com uma menor formação de dímeros *de primers* (quando estes estão presentes) Após escolhidas as melhores concentrações dos *primers*, tanto do gene referência como dos *primers* alvos, a melhor concentração de cada *primer* foi testada com diferentes concentrações de cDNA: 1:30, 1:60, 1:120, 1:240 e 1:480. A análise de regressão linear dos valores de Cts, em função do logaritmo da respectiva diluição, fornece o coeficiente angular da reta (a, em $y=ax+b$), que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, na seguinte fórmula:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

5.7.3 qRT-PCR

Após a padronização dos primers, foram realizados os testes de nível de expressão gênica em cada célula tratada ou não-tratada (segundo os grupos amostrais demonstrados no Quadro 2), por PCR em tempo real, utilizando as concentrações de *primer* e de cDNA escolhidas na padronização. Assim, a expressão do gene alvo foi determinada em relação à expressão do gene referência *GAPDH*. Após a obtenção dos Cts de cada amostra, inicialmente, é calculada a média dos Cts das réplicas.

Dado que a expressão do gene é analisada em relação a uma amostra, que é utilizada como referência, calcula-se, então, a diferença entre a média dos Cts da amostra referência e a média dos Cts da amostra estudada. Essa diferença é definida como ΔC_p . O cálculo do ΔC_p é realizado para os dados do gene alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado

que a eficiência de amplificação dos “primers” utilizados não é de 100%, é dada por:

$$ratio = \frac{Ef_{\text{genealvo}}^{\Delta CP_{\text{genealvo}}}}{Ef_{\text{controle endógeno}}^{\Delta CP_{\text{controle endógeno}}}}$$

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada utilizando-se a análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de TUKEY-KRAMER. Todos os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (dp), considerando-se como nível crítico para significância valores $p < 0.05$. As diferenças significantes entre o grupo controle e os grupos tratados foram indicadas por: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0.

6 Resultados

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Foi possível observar que as células-tronco, derivadas da polpa dentária imatura do cão apresentaram morfologia fibroblastóide. Em contrapartida, as células de osteossarcoma apresentam morfologia variada, com algumas células em formato fibroblastóide, outras mais arredondadas ou com configuração poligonal semelhante às células de linhagem osteoblástica normal. Estes aspectos morfológicos foram observados nas células sem tratamento e tratadas. Portanto, após o período de 72 horas em cocultivo celular, não foram observadas alterações morfológicas nas células, em nenhum dos grupos tratados (Figura 2).

Figura 2 - Fotomicroscopia das células cocultivadas em sistema transwell

Legenda: Células-tronco de polpa dentária canina controle (A) e tratadas em cocultivo com células de osteossarcoma canino (B), e com células de osso normal (C); Células de osteossarcoma controle (D), e cocultivadas com células-tronco de polpa dentária canina (E) de osso normal (F); Células de osso normal controle (G) e cocultivadas com células-tronco de polpa dentária canina (H), e com osteossarcoma canino (I).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

6.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA

A análise da atividade proliferativa foi realizada pelo método que utiliza o corante CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) e analisado por citometria de fluxo. As análises foram realizadas a cada 24 horas, totalizando três leituras em cada grupo, respeitando o período de tratamento de 72 horas.

As análises, nos grupos 1 a 3, demonstraram que a atividade proliferativa das células-tronco de polpa dentária canina sem tratamento diminuiu, significativamente, às 48 e 72 horas em relação ao primeiro período de 24 horas. Foi possível observar que a proliferação foi sempre menor em todos os grupos quando comparados ao grupo controle de 24 horas. Entretanto notou-se uma diminuição significativa na atividade das células-tronco de polpa dentária canina cocultivadas com células de osteossarcoma (48 horas), mas esta atividade proliferativa aumenta no período de 72 horas. No período final do tratamento, 72 horas, foi observado que a atividade proliferativa das células-tronco tratadas em cocultivo foi significativamente maior em relação ao controle (Figura 3).

Figura 3 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da atividade celular proliferativa nos grupos 1-3

Legenda: Grupo 1: Células-tronco de polpa dentária canina; Grupo 2: Células-tronco de polpa dentária canina cocultivadas com células de osteossarcoma; Grupo 3: Células-tronco de polpa dentária canina cocultivadas com células de osso normais. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Nos grupos 4-6 de tratamento, notou-se, também, uma diminuição da atividade proliferativa nas células de osteossarcoma sem tratamento (grupo 4), em relação ao tempo de cultivo. Nas primeiras 24 horas de tratamento, não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados em cocultivo (grupo 5: células de osteossarcoma cocultivadas com células-tronco de polpa dentária canina; Grupo 6: células de osteossarcoma cocultivadas com células derivadas do tecido ósseo normal).

Na análise do período de 48 horas, houve um aumento não significativo nos grupos tratados em relação ao primeiro período, entretanto a atividade proliferativa foi maior nestes grupos quando comparados ao grupo sem tratamento.

Nas avaliações de 72 horas, a atividade proliferativa é significativamente maior nos grupos tratados em cocultivo, quando comparados ao grupo sem tratamento, embora tenha ocorrido uma diminuição significativa da atividade proliferativa ($p < 0.05$), nas células de osteossarcoma tratadas com células-tronco de polpa dentária canina, quando comparadas ao tratamento de 48 horas (Figura 4).

Figura 4 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da atividade celular proliferativa nos grupos 4-6

Legenda: Células de osteossarcoma canino; Grupo 5: Células de osteossarcoma canino cocultivadas com células-tronco de polpa dentária; Grupo 6: Células de osteossarcoma canino cocultivadas com células de osso normais. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Nos grupos 7-9, células derivadas do tecido ósseo normal controle e tratadas em cocultivo com células-tronco de polpa dentária e osteossarcoma, notou-se um pequeno aumento na atividade proliferativa no período de 48 horas, e ligeira diminuição no período de 72 horas, onde foi possível observar, também, uma diminuição na atividade proliferativas das células em cocultivos, quando comparadas ao grupo controle, entretanto não houve nenhuma alteração significativa (Figura 5).

Figura 5 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da atividade celular proliferativa nos grupos 7-9

Legenda: Grupo 7: Células derivadas de tecido ósseo normal controle sem tratamento; Grupo 8: Células derivadas de tecido ósseo normal cocultivadas com células-tronco de polpa dentária; Grupo 9: Células derivadas de tecido ósseo normal cocultivadas com células de osteossarcoma. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

6.3 POTENCIAL DE ATIVIDADE ELÉTRICO MITOCONDRIAL

As células-tronco de polpa dentária canina, de osteossarcoma e células derivadas de tecido ósseo normal controle e cocultivadas foram submetidas à análise do potencial elétrico mitocondrial pelo fluorocromo rodamina 123.

Esta técnica permite a análise da viabilidade mitocondrial, sendo assim, é possível avaliar se as células estão inviáveis e/ou mitocôndrias metabolicamente inativas, ou células viáveis e/ou mitocôndrias metabolicamente ativas.

A partir dos resultados obtidos pelo programa Flow Jo, foi possível observar que, nos grupos 2 e 3 (células-tronco de polpa dentária cocultivada com células de osteossarcoma e de osso normal, respectivamente) não houve diferença significativa em relação as células não ativas ou ativas metabolicamente, quando comparadas ao grupo 1 (controle sem tratamento). Os resultados podem ser observados na figura 6.

Figura 6 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da proporção de células metabolicamente ativas ou inativas por meio de análise do potencial elétrico mitocondrial dos grupos 1-3

Legenda: Grupo 1: Células-tronco de polpa dentária canina; Grupo 2: Células-tronco de polpa dentária canina cocultivadas com células de osteossarcoma; Grupo 3: Células-tronco de polpa dentária canina cocultivadas com células de osso normais. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER ns-não significativo.

Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Nos grupos 4 a 6, referente às células de osteossarcoma canino, notou-se um discreto aumento das células inativas metabolicamente, quanto tratadas com as células-tronco de polpa dentária canina, diminuindo, assim, as células em atividade. Entretanto estes resultados não foram significativos, quando comparados ao grupo controle sem tratamento. Além disso, pôde-se observar uma diminuição significativa

das células inativas metabolicamente no grupo tratado com células derivadas de osso normal, resultando em um aumento das células tumorais ativas (Figura 7).

Figura 7 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da proporção de células metabolicamente ativas ou inativas por meio de análise do potencial elétrico mitocondrial dos grupos 4-6

Legenda: Grupo 4: Células de osteossarcoma canino; Grupo 5: Células de osteossarcoma canino cocultivadas com células-tronco de polpa dentária; Grupo 6: : Células de osteossarcoma canino cocultivadas com células de osso normais. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (* $p < 0.05$).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Durante as análises dos grupos 7-9, células derivadas de osso normal controle e cocultivadas com células-tronco de polpa dentária canina e osteossarcoma canino, notou-se diminuição no número de células metabolicamente inativas no Grupo 8 (tratado com células-tronco de polpa dentária canina), culminando com o aumento de células ativas. Enquanto isso, ocorreu um aumento das células inativas no Grupo 9 (tratado com células de osteossarcoma canino), diminuindo, assim, o número de células metabolicamente ativas (Figura 8).

Figura 8 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da proporção de células metabolicamente ativas ou inativas por meio de análise do Potencial Elétrico Mitocondrial dos grupos 7-9

Legenda: Grupo 7: Células derivadas de tecido ósseo normal controle sem tratamento; Grupo 8: Células derivadas de tecido ósseo normal cocultivadas com células-tronco de polpa dentária; Grupo 9: Células derivadas de tecido ósseo normal cocultivadas com células de osteossarcoma. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (** $p < 0.01$).

Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

6.4 MORTE CELULAR POR APOPTOSE/NECROSE

Este método permite avaliar a morte celular por apoptose e necrose e ainda saber qual a porcentagem de células não marcadas (viáveis). Primeiramente, foi possível visualizar um discreto aumento na viabilidade celular, embora não significativo, nas células de osteossarcoma tratadas (Grupos 5 e 6) e nas células de osso normal tratadas, em relação aos seus controles. Entretanto, nos grupos de células-tronco tratadas com células de osteossarcoma e de osso normal (grupos 2 e 3), houve uma diminuição da viabilidade celular, que por sua vez foi significativa quando houve o cocultivo com as células de osteossarcoma (Figura 9).

Figura 9 - Gráfico de barras representativo de média $\pm$ dp da proporção de células viáveis, pelo método ANEXINAV/PI, considerando todos os grupos (1-9)

Legenda: Grupos 1-3: Células-tronco de polpa dentária canina controle, e cocultivadas com células de osteossarcoma e células de osso normais, respectivamente; Grupos 4-6: células de osteossarcoma canino controle e, cocultivadas com células-tronco de polpa dentária e células de osso normais, respectivamente; Grupo 7-9: Células derivadas de tecido ósseo normal controle e, cocultivadas com células-tronco de polpa dentária e células de osteossarcoma, respectivamente. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (* $p < 0.05$).

Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Mediante análise de morte celular por apoptose/necrose, foi possível observar que nos grupos 1-3, ocorreu uma discreta diminuição das células-tronco de polpa dentária tratadas com osteossarcoma, em apoptose inicial, enquanto houve um aumento significativo das células mortas por apoptose tardia e um aumento não significativo de morte celular por necrose, quando comparadas ao controle sem tratamento. Notou-se, também, um aumento, não significativo, da expressão de células em apoptose inicial, uma diminuição significativa de células em apoptose tardia e aumento de morte celular por necrose, quando as células-tronco de polpa dentária canina foram tratadas utilizando as células derivadas do tecido ósseo normal (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico de barras representativo de média $\pm$ dp da proporção de células mortas, pelo método ANEXINAV/PI, considerando os grupos 1-3

Legenda: Grupos 1-3: Células-tronco de polpa dentária canina controle, e cocultivadas com células de osteossarcoma e células de osso normais, respectivamente. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

As análises de morte celular dos grupos 4-6 demonstraram uma discreta diminuição das células em apoptose inicial, quando o osteossarcoma foi cocultivado com células-tronco de polpa dentária, diminuição da porcentagem de células em apoptose tardia e da morte celular por necrose, quando foi realizado o cocultivo celular, em comparação ao controle, porém essas alterações não foram significativas estatisticamente (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico de barras representativo de média $\pm$ dp da proporção de células mortas, pelo método ANEXINAV/PI, considerando os grupos 4-6

Legenda: Grupos 4-6: células de osteossarcoma canino controle e, cocultivadas com células-tronco de polpa dentária e células de osso normais, respectivamente. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Nos grupos 7 a 9, referente às células derivadas do osso normal, controle e tratadas em cocultivo, notou-se uma diminuição significativa das células em apoptose inicial, quando comparadas ao controle sem tratamento. Foi possível notar ainda, uma diminuição das células em apoptose tardia, quando cocultivadas, e um discreto aumento das células em morte celular por necrose quando realizado o cocultivo com células-tronco de polpa dentária, mas estas alterações não foram significativas (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico de barras representativo de média $\pm$ dp da proporção de células mortas, pelo método ANEXINAV/PI, considerando os grupos 7-9

Legenda: Grupos 7-9: Células derivadas de tecido ósseo normal controle e, cocultivadas com células-tronco de polpa dentária e células de osteossarcoma, respectivamente. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (* $p < 0.05$).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

6.5 MARCADORES CELULARES

Alguns marcadores celulares foram analisados por citometria de fluxo, com o objetivo de estudar os mecanismos envolvidos nas alterações celulares provocadas pelo cocultivo celular. Foram analisados os marcadores p53 (proteína de supressão tumoral), VEGF (fator de crescimento endotélio-vascular relacionado), caspase-3 (morte celular por apoptose) e osteopontina (proteína da matriz extracelular óssea).

Nos grupos 1-3, foi possível observar que a expressão de VEGF, osteopontina e p53 diminuiu nos grupos tratados, quando comparados ao controle. E a expressão de caspase-3 apresentou um discreto aumento nos grupos tratados em cocultivo. Entretanto nenhuma dessas alterações foi significativa estatisticamente (Figura 13).

Figura 13 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp expressão de marcadores celulares nos grupos 1-3

Legenda: Grupos 1-3: Células-tronco de polpa dentária canina controle, e cocultivadas com células de osteossarcoma e células de osso normais, respectivamente. Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Nos grupos 4-6, foi possível notar uma discreta diminuição na expressão de VEGF, nos grupos tratados em cocultivo, e na expressão da proteína p53, nas células de osteossarcoma cocultivadas com células derivadas de tecido ósseo normal, entretanto, essas alterações não foram significativas estatisticamente.

Notou-se diminuição, estatisticamente significativa, na expressão de osteopontina nas células de osteossarcoma cocultivadas com células-tronco de polpa dentária, e de Caspase-3 nas células de osteossarcoma cocultivadas com células de osso normais quando comparadas ao Grupo 4 controle (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp expressão de marcadores celulares nos grupos 4-6

Legenda: Grupo 4 (células de osteossarcoma canino); Grupo 5 (células de osteossarcoma cocultivadas com células-tronco de polpa dentária canina) e Grupo 6 (células de osteossarcoma cocultivadas com células de osso normal). Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (** $p < 0.01$).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

As análises dos grupos 7-9, referentes às células obtidas de tecido ósseo normal controles e tratadas em cocultivo, mostraram aumento estatisticamente significativo na expressão de VEGF e Caspase-3 nos dois grupo tratados. Aumento na expressão de osteopontina nos grupos de cocultivo, entretanto foi significativo apenas no grupo tratado com as células-tronco de polpa dentária canina. Além disso, notou-se que o cocultivo das células de osso normais induz um aumento na expressão da proteína p53 (Figura 15).

Figura 15 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp expressão de marcadores celulares nos grupos 7-9

Legenda: Grupo 7 (células de osso normais); Grupo 8 (células de osso normais cocultivadas com células-tronco de polpa dentária canina) e Grupo 9 (células de osso normais cocultivadas com células de osteossarcoma). Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$).

Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

6.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA por qRT-PCR

A análise da expressão de mRNA por qRT-PCR demonstrou superexpressão em todos os genes analisados quando as células foram tratadas em cocultura. Os genes analisados foram VEGF, OCT4, osteopontina, RUNX-2, cMYC, Osteocalcina, Rb1, PCNA, Col 1 e TNF α .

A interação entre as células, em todos os grupos de tratamento, mostrou uma superexpressão do VEGF, quando comparadas aos respectivos grupos de células controle sem tratamentos. Entretanto, na comparação entre os grupos, tratados não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 16).

Figura 16 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene VEGF por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Foi possível observar uma maior expressão do gene RUNX2 nas células-tronco de polpa dentária canina cocultivadas com células derivadas do tecido ósseo normal. Entre os grupos de células de osteossarcoma tratadas em cocultivo, a expressão foi maior no grupo tratado com células-tronco de polpa dentária canina. Entre os grupos 8 e 9, de células de osso normal tratadas, a expressão deste gene foi maior quando foi realizado o cocultivo com células de osteossarcoma. Entretanto não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento (Figura 17).

Figura 17 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene RUNX2 por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

O OCT4 apresentou-se menos expresso nos grupos de células-tronco tratadas (G2 e G3), quando comparadas aos outros tipos celulares, houve maior expressão nos grupos 5, 6, 8 e 9, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (Figura 18).

Figura 18 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene OCT4 por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Assim como os outros genes analisados, o cMyc também foi superexpresso, em todos os grupos tratados por cocultura, esteve menos expresso no grupo 6, em que as células de osteossarcoma foram cocultivadas com células de osso normal. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 19).

Figura 19 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene cMyc por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

As células de osso normal cocultivadas demonstraram uma maior expressão de osteopontina, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos tratados (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene osteopontina por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

A osteocalcina demonstrou maiores valores de expressão nos grupos de células de osteossarcoma, sendo maior no grupo tratado com células-tronco de polpa dentária. Entretanto também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados (Figura 21).

Figura 21 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene osteocalcina por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

A expressão do gene Rb1 demonstrou-se maior no grupo 3, de células-tronco de polpa dentária canina tratadas com células de osso normal, e menor no grupo 6, de células de osteossarcoma tratadas com células de osso normal. No entanto, neste gene também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados (Figura 22).

Figura 22 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene Rb1 por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

Com relação à expressão do gene PCNA, ela foi maior nos grupos 5 e 6, de células de osteossarcoma tratadas com células-tronco de polpa dentária imatura e de osso normal, respectivamente. Entretanto, estatisticamente, não houve diferença com relação aos grupos tratados (Figura 23).

Figura 23 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene PCNA por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

As análises do gene COL1A1 também não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados. No entanto observou-se uma maior expressão nas células de osso tratadas com células-tronco de polpa dentária canina imatura e uma menor expressão no grupo 3, quando as células-tronco de polpa dentária foram tratadas com células de osso normal (Figura 24).

Figura 24 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene COL1A1 por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
 Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

O gene para TNF α demonstrou um maior nível de expressão, nas células de osteossarcoma tratadas, tanto com células-tronco quanto com células de osso normal. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos tratados (Figura 25).

Figura 25 - Gráfico de barras representando média $\pm$ dp da expressão do gene TNF α por qRT-PCR

Legenda: Análise estatística da variância de ANOVA seguida por teste múltiplo de TUKEY KRAMER (ns: não significativo).
Fonte: (ALCÂNTARA, D., 2014)

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

Defeitos ósseos ocorrem, frequentemente, em animais, devido aos transtornos do desenvolvimento, traumas, fraturas, ressecção tumoral, cirurgia e periodontite. O tratamento padrão consiste em enxerto ósseo autógeno, porém o procedimento pode ser muito invasivo e causar complicações. Acredita-se, então, que as células-tronco mesenquimais possam ser úteis, ajudando a diminuir a ocorrência de morbidades e complicações causadas por essa doença (YAMADA et al., 2011). Por isso, o principal objetivo da engenharia tecidual é reconstruir e restaurar a função de órgãos e tecidos lesionados (HONDA et al., 2010).

O grande desafio no tratamento do osteossarcoma são as metástases, de rápida ocorrência, e difícil tratamento. As metástases são frequentemente resistentes à quimioterapia convencional e os tratamentos atuais são muito agressivos. Além disso, não garantem uma sobrevida do animal a longo prazo.

Atualmente, o tratamento do câncer tem entrado numa nova era, complementando as antigas terapias, tais como quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia com a terapia celular. Esta tem chamado atenção dos pesquisadores, principalmente aqueles que acreditam na a possibilidade do sucesso da terapia gênica, ou seja, da incorporação de genes às células, permitindo a realização de terapias alvo-dirigidas (SAGAR et al., 2007).

De acordo com Yamada et al. (2011), as células-tronco embrionárias e as células pluripotentes induzidas têm sido amplamente estudadas para atender a estas necessidades, porém existem, ainda, muitos problemas éticos e biológicos, tais como a imunorrejeição e formação de tumores, neste tipo de tratamento. Sendo assim, as células-tronco mesenquimais e as hematopoéticas têm sido consideradas uma ótima fonte de células para a terapia celular.

Atualmente, células-tronco mesenquimais obtidas de diferentes tecidos têm sido isoladas e estudadas, apresentando características e propriedades semelhantes, bem como mínimas diferenças devido ao microambiente de origem. Contudo elas podem exercer diferentes efeitos, dependendo do contexto biológico a ser considerado (BARCELOS-DE-SOUZA et al., 2013).

O transplante de células-tronco hematopoéticas tem sido amplamente utilizado para tratar doenças hematológicas, para reconstituição medular, e tem sido sugerido como tratamento para pacientes portadores de doença autoimune severa (HOUGHTON et al., 2007).

Entretanto existem muitas dúvidas sobre a aplicação de tratamentos utilizando terapia celular em câncer, principalmente em tumores sólidos, por isso, são necessários estudos sobre a interação entre estas células-tronco mesenquimais e células tumorais.

Os estudos sobre interação entre células-tronco mesenquimais e as células derivadas do osteossarcoma são extremamente importantes porque, muitas vezes, é necessária a realização de enxerto ósseo, no qual estas células poderiam auxiliar na regeneração. Além disso, tais estudos permitirão responder se as células-tronco poderiam se somar aos tratamentos atuais como coadjuvantes, inibindo o crescimento tumoral e metástases, ou ainda como carreadoras de substâncias antitumorais.

A terapia celular tem sido utilizada na reconstituição do sistema imunológico, após o tratamento do câncer, sendo que as células-tronco derivadas da medula óssea são as mais utilizadas. Porém, o procedimento para aspiração da medula óssea é invasivo e pode provocar complicações tais como fratura, infecção da ferida e sepse. O maior desafio da utilização da terapia é a contaminação das células-tronco com células-tumorais, mas já existem mecanismos para purificar esta população celular, de modo que o paciente receberá apenas células saudáveis (SAGAR et al., 2007).

A cirurgia em pacientes com osteossarcoma representa um grande desafio, uma vez que, após a ressecção tumoral, amplos defeitos ósseos precisam ser reconstruídos (DI BELLA et al., 2010). Sendo assim, a enxertia óssea é amplamente na ressecção oncológica, sendo que, as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea são utilizadas, com sucesso, no reparo ósseo, porquanto podem ser coletadas após a quimioterapia e expandidas *ex vivo*, podendo auxiliar na reparação tecidual (BECCHERONI et al., 2003).

As células derivadas da polpa dentária imatura canina têm alto potencial de diferenciação em pré-osteoblastos, tornando possível a produção tecidual *in vitro*, que após transplante *in vivo*, é rapidamente remodelada em osso lamelar. Este procedimento parece ser o mais eficiente na formação de tecido ósseo, quando

comparado às células-tronco derivadas da medula óssea (d'AQUINO et al., 2007). Além disso, podem representar uma alternativa viável por serem coletadas de forma não invasiva, portanto de mais fácil obtenção.

O estroma é o tecido conjuntivo de suporte do tecido hospedeiro e é composto por diferentes tipos celulares como fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais vasculares e linfovasculares, e células do sistema imune que se infiltram no tecido, como macrófagos. Este estroma participa, ativamente, dos processos de crescimento e progressão tumoral, mediante liberação de fatores que atuam de forma parácrina ou autócrina, resultando em um fenótipo mais agressivo (WEBER; KUO, 2008).

Segundo Rizvanov e colaboradores (2010), o desenvolvimento de novos métodos que simulam, *in vitro*, as interações entre células tumorais, células somáticas normais e células-tronco podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de iniciação e desenvolvimento tumoral, assim como de resistência terapêutica.

As análises do tratamento *in vitro*, neste estudo, não demonstraram alterações relacionadas à morfologia celular. Existe, atualmente, uma carência de estudos que explorem esta tema e que discutam esses possíveis efeitos. Porém nos estudos realizados por Rizvanov et al. (2010), as células-tronco mesenquimais derivadas do germe dental do terceiro molar, em contato com células de neuroblastoma, em um ensaio de matrigel, rapidamente se organizam formando estruturas canaliculares, enquanto as células de neuroblastoma se organizam em ilhas.

Segundo Houghton et al. (2007), a diferenciação que as células-tronco sofrem é mediada pelo microambiente onde elas são implantadas (HOUGHTON et al., 2007), o que explica o fato pelo qual as células-tronco da polpa dentária de cão tiveram seu comportamento modulado, tanto a nível celular quanto molecular, no presente estudo.

As células-tronco derivadas da medula óssea se dirigem aos sítios tumorais e, uma vez incorporados, elas podem se diferenciar em células funcionais que participam da homeostasia do microambiente. O tropismo de células-tronco mesenquimais da medula óssea, por sítios tumorais ou de injúria, ocorre em ambos devido a uma *upregulation* de mediadores inflamatórios semelhantes (BARCELOS-DE-SOUZA et al., 2013).

Segundo Rici et al. (2013), a terapia combinada de células mesenquimais de medula óssea e BMP2 ativa células do sistema imune e aumenta sua infiltração nos tumores, isso demonstra que o tratamento foi eficiente na modulação do crescimento, morte celular, angiogênese e resposta imune. Estes resultados, entretanto, não foram observados neste estudo, que utilizou, como fonte celular, as células-tronco derivadas da polpa dentária imatura de cães, isoladamente.

Segundo Ling et al. (2010), células-tronco mesenquimais que superexpressavam IFN β inibem o crescimento e formação de metástase de tumores mamários murinos por inativação da via STAT3, que em nosso estudo mostrou-se superexpressa, portanto ativa. A superexpressão desta via é um indicativo de transcrição gênica aumentada, desempenhando um papel importante na auto-renovação, assim como no comportamento biológico de células-tronco tumorais em osteossarcoma (WILSON et al., 2008).

Durante as avaliações diárias do comportamento proliferativo das células-tronco derivadas da polpa dentária imatura canina, das células obtidas do tecido ósseo sadio e do osteossarcoma, foi possível notar que a cocultura favorece a proliferação das células em todos os grupos analisados, inclusive nos grupos 7-9, nos quais foram utilizadas as células de osso normal, controle dos nossos tratamentos. Isso demonstra que o cocultivo celular, tanto com células-tronco quanto com células somáticas sadias, favorece a proliferação celular das células-tumorais, servindo como suporte para o crescimento do osteossarcoma *in vitro*, fato este, também observado em células saudáveis.

Além disso, os resultados da expressão gênica do PCNA também demonstram uma superexpressão deste gene em todos os grupos quando realizada a cocultura celular, principalmente no grupo de células de osteossarcoma tratado com células-tronco de polpa dentária, no qual a expressão foi aproximadamente seis vezes maior que no grupo controle.

De acordo com Czyewska et al. (2004), altos níveis de expressão de proteínas como o Ki67 e PCNA estão relacionados à malignidade do tumor, portanto esses resultados podem indicar um pior prognóstico, devido à alta capacidade proliferativa.

Corroborando os achados deste estudo, Muehlberg e colaboradores (2009) também observaram um crescimento tumoral, entretanto *in vivo*, e segundo eles, a interação entre células-tronco derivadas do tecido adiposo e o câncer de mama

provoca uma incorporação das células-tronco dentro dos vasos tumorais e se diferenciam em células endoteliais, promovendo assim, o crescimento tumoral.

Complementando esses achados, Rhodes et al. (2010) relataram que células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea se dirigem ao sítio tumoral, no câncer de mama, e se integram ao estroma tumoral promovendo o crescimento e progressão tumoral e independência hormonal.

Em osteossarcoma, *in vivo*, Xu et al. (2009), observaram que as células-tronco mesenquimais de medula óssea se dirigem ao sítio tumoral e promovem o crescimento tumoral e metástases e relataram duas hipóteses para este fato. Uma delas relaciona-se ao fato que estas células-tronco migram para o sítio e se unem às células do estroma. Na segunda hipótese os autores consideram a produção de fatores pelas células-tronco que podem estimular a angiogênese.

Segundo Wang, Cheng e Zhang (2013), o microambiente é responsável por favorecer o crescimento e invasão tumoral, pois protege o tumor do sistema imune, mantém a resistência terapêutica e fornece nichos de células tumorais latentes. Além disso, células-tronco tumorais, células-tronco normais e progenitoras podem estar presentes neste nicho durante o processo de tumorigênese e progressão tumoral, demonstrando que durante a ocorrência do tumor, as células normais dão suporte ao crescimento tumoral.

Neste contexto, a expressão do VEGF tem sido correlacionada à ocorrência de metástases pulmonares e ao pobre prognóstico em pacientes com osteossarcoma. A alta expressão de VEGF demonstra uma alta tendência a uma menor sobrevida global, pois a alta taxa de recorrência e o potencial metastático estão associados com o alto grau de vascularização e rápido crescimento de osteossarcomas (SULZBACHER et al., 2002).

A ativação da via de receptores de VEGF desencadeia uma cascata de sinalizações de processos que promovem o crescimento e migração das células endoteliais e também a manutenção da rede microvascular preexistente (HICKLIN; ELLIS, 2005).

Kéramidas e colaboradores (2013) demonstraram que a administração de células-tronco mesenquimais de medula óssea humana, em tumores mamários murinos, provoca uma diminuição do crescimento tumoral, quando injetadas sistemicamente ou peritumoral. Outro fator importante é que, embora estas células tenham induzido angiogênese fisiológica *in vivo*, o processo global de angiogênese

patológica, encontrado nos tumores, não foi alterado, embora induza um remodelamento deste padrão vascular.

Estes achados corroboram nossos resultados, em que, apesar do gene VEGF ter uma tendência a superexpressão nos grupos de células-tronco derivadas da polpa dentária imatura e de osteossarcoma tratados em cocultura, os valores de expressão da proteína demonstraram tendência a diminuir, porém não demonstraram alteração significativa após o tratamento. Diferentemente deste fato, as células derivadas do tecido ósseo normal, apresentaram um comportamento diferente, caracterizado pela tendência a uma maior expressão do gene, com o aumento significativo da expressão da proteína nos grupos tratados.

Estudos, *in vivo*, realizados por Rici e colaboradores (2013) demonstraram que o tratamento do osteossarcoma canino, utilizando células-tronco mesenquimais de medula óssea sozinhas e associadas à proteína morfogenética óssea do tipo 2 (BMP2), promoveu diminuição da expressão de fatores de transcrição OCT4 e Nanog, que conferem pluripotência às células e tem um importante papel no crescimento tumoral.

O OCT4 é um fator de transcrição, inicialmente expresso na massa interna de embriões e diminui com o desenvolvimento. Este fator trabalha junto com Nanog na manutenção da pluripotência celular (WILSON et al., 2008).

Os resultados desta pesquisa demonstram que há uma tendência a superexpressão do gene OCT4, nas células de osteossarcoma tratadas, demonstrando que há um aumento da pluripotência das células tumorais, enquanto a expressão deste gene, apesar de superexpresso, é menor nas células-tronco tratadas, quando comparadas aos outros grupos de células, conferindo uma possível diferenciação destas células.

Contudo, no reparo tecidual, o microambiente no qual as células-tronco mesenquimais são implantadas, os fatores de crescimento e interações celulares locais têm um papel crucial na determinação da biologia da célula-tronco mesenquimal tais como como sobrevivência, proliferação, e diferenciação específica (MOSNA; SENSEBE; KRAMPERA, 2010).

O RUNX-2 é considerado um regulador da diferenciação osteogênica que, segundo Luo et al. (2008), está pouco expresso em células de osteossarcoma, o que significa que estas células sofrem falhas na diferenciação, como foi visto neste estudo. Assim, maiores níveis de superexpressão foram relatados em células-tronco

e células do tecido ósseo normal, demonstrando um *status* de diferenciação mais avançado destas células quando tratadas, enquanto que nas células de osteossarcoma cocultivadas, apesar de superexpresso, os níveis foram menores quando comparados aos outros grupos. Ainda segundo o autor, o RUNX2 diminui a capacidade proliferativa das células de osteossarcoma e algumas linhagens podem se tornar mais diferenciadas quando induzidas por RUNX2.

Segundo Lucero et al. (2013), o RUNX2 está associado a tumorigenicidade, progressão tumoral, metástase, menor sobrevida e pobre prognóstico.

No estudo de Rici et al. (2012), o cocultivo de células-tronco de medula óssea associadas à proteína morfogenética óssea do tipo 2 (rhBMP2), demonstrou um aumento significativo da apoptose via Caspase-3, concluindo que as células-tronco associadas a rhBMP2 diminuem a tumorigênese em osteossarcoma canino *in vitro*.

As caspases são responsáveis por aspectos cruciais da morte celular induzida por apoptose. Existem 11 membros conhecidos desta família, em que a Caspase-3 é a executora da cascata e a principal agente na apoptose (DING et al., 2014).

Na presente investigação, o cocultivo celular demonstrou que há uma tendência ao aumento da morte celular por apoptose das células-tronco de polpa dentária tratadas. Por outro lado, contrapondo os resultados de Rici e colaboradores (2012), há uma diminuição da atividade de Caspase-3 nas células de osteossarcoma, em contraposição às células derivadas do tecido ósseo normal, que sofreram um aumento significativo desta morte celular programada. Isso demonstra um possível mecanismo de proteção na tentativa de eliminar células danificadas que possam ter sofrido diferenciação, devido ao microambiente. Portanto, a apoptose, ou morte celular programada, é essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase tecidual e eliminação de células danificadas (DING et al., 2014). Além disso, a apoptose é definida como 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* depende da indução de apoptose em células tumorais suscetíveis (CIARCIA et al., 2008).

A p53 é uma proteína chave na regulação do ciclo celular, envolvida na resposta ao stress, supressão tumoral e senescência. A ativação da p53 está relacionada à parada do ciclo celular e apoptose em resposta ao stress (TSAI; MCKAY, 2002). O reconhecimento do dano e o reparo são fundamentais para a

estabilidade genética e, portanto, para redução do risco de câncer (MYIACHI et al., 2009). Sua mutação pode ocorrer diretamente por deleção do gene TP53, mas também por qualquer via que interrompa a atividade da proteína, como a MDM2 (BOURDON et al., 2010).

Em contraposição ao estudo de Rici e colaboradores (2012), que demonstraram uma diminuição dos níveis de p53 nas células de osteossarcoma, tratadas com células-tronco da medula óssea e rhBMP2, o nosso resultado, utilizando células-tronco da polpa dentária canina, isoladamente, demonstrou níveis da proteína nas células controle muito semelhantes às células tratadas com células tronco. Portanto, a fonte celular e/ou a presença de um agente terapêutico pode(m) influenciar a resposta ao tratamento, confirmando a hipótese descrita na literatura de que as células-tronco servem como carreadoras de substâncias ou genes que possam efetivamente tratar este tumor.

Os principais eventos relacionados à regulação da proliferação celular e diferenciação celular ocorrem entre as fases G1/S, nas quais a célula se compromete com a replicação do DNA (SANCHEZ; DYNLAT, 2005). O descontrole na progressão do ciclo celular desempenha um papel fundamental, assim como a perda do ponto de checagem nestas fases (WONG et al., 2003).

A osteopontina é a maior proteína da matriz extracelular óssea e sua expressão é regulada em fases específicas de diferenciação da linhagem osteoblástica. Ela interage com o VEGF, induzindo a migração de células endoteliais e regulando a migração celular endotelial pelo VEGF. Em tumores, a osteopontina pode estar superexpressa, em comparação ao tecido normal (SULZBACHER et al., 2002).

Os resultados do presente estudo demonstram uma maior superexpressão nos grupos de células do tecido ósseo normal tratado, principalmente, naquelas cocultivadas com células tumorais de osteossarcoma, comprovado também pelos maiores níveis da proteína. Uma expressão mais modesta foi observada nas células-tronco mesenquimais da polpa dentária tratadas com osteossarcoma. Além disso, os níveis de expressão da proteína tendem a ser mais altos nas células-tronco que não sofreram tratamento, demonstrando um status de diferenciação destas células e níveis mais baixos nas células de osteossarcoma tratadas.

Segundo Luo et al. (2008), isto ocorre porque a osteopontina é um marcador de osteogênese tardio, sendo assim, os pesquisadores observaram uma alta

expressão em osteoblastos fetais humanos, enquanto células-tronco mesenquimais, que possuem populações heterogêneas, compostas tanto por células progenitoras quanto osteogênicas, em diferentes estágios de diferenciação, apresentam níveis de expressão moderado. Enquanto isso, as células de osteossarcoma possuem níveis significativamente mais baixos, demonstrando que a maioria dos osteossarcomas não sofre diferenciação terminal osteogênica.

Quando analisados os grupos tratados, foi possível demonstrar uma maior superexpressão do gene osteopontina no grupo controle do nosso experimento, ou seja, nas células derivadas do tecido ósseo normal. Fato este, confirmado pelo aumento significativo da expressão da proteína neste mesmo grupo e uma diminuição significativa nos níveis da proteína, nas células de osteossarcoma tratadas com células-tronco de polpa dentária canina.

De acordo com Rizvanov e colaboradores (2010), as células-tronco mesenquimais do germe dental se tornaram mais viáveis sob o estresse oxidativo, na cocultura com células tumorais, pois sabe-se que as células tumorais secretam diferentes moléculas, que exercem um efeito protetor, para promover a sobrevivência e proliferação das células tumorais e formação de metástases. Entretanto, no nosso estudo, uma vez que analisada a atividade mitocondrial, as células-tronco tiveram um mesmo comportamento quando tratadas em cocultivo quando comparadas ao seu controle. Além disso, quando analisada a morte celular por apoptose/necrose, houve uma diminuição na viabilidade das células-tronco mesenquimais quando tratadas com as células de osteossarcoma.

Em contrapartida, as células de osteossarcoma tiveram a sua atividade mitocondrial aumentada quando tratadas com células-tronco da polpa dentária imatura e com as células derivadas do tecido ósseo normal, bem como as células de osso normal também apresentaram uma maior atividade quando tratadas com células tumorais, demonstrando uma resposta semelhante entre as células que provém de um mesmo nicho.

Neste sentido foi possível observar um efeito protetor entre células de mesma origem tecidual, complementando este fato e justificando esta hipótese, notou-se uma diminuição na morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose, em células de osteossarcoma tratadas e um aumento da morte celular em células-tronco. Apesar de ter ocorrido uma indução de morte celular e diminuição da atividade mitocondrial das células-tronco, foi observada uma quantidade maior de células

ativas e viáveis, demonstrando que pode existir, sim, um efeito protetor e estes eventos podem ocorrer em consequência da mudança de microambiente.

Finalmente, confrontando os relatos da literatura e os dados deste trabalho, pôde-se perceber que o resultado desta complexa sinalização das células-tronco mesenquimais no microambiente tumoral podem tanto estimular quanto inibir o seu crescimento. Portanto, o contexto biológico pode alterar esta resposta como tipos tumorais e seus microambientes, assim como o relatado por Barcelos-de- Souza e seus colaboradores (2013).

A partir dos dados obtidos, foi possível notar que a interação entre as células-tronco e tumorais altera aspectos fenotípicos e genotípicos das células avaliadas. As células-tronco da polpa dentária canina e as células normais do tecido ósseo dão suporte ao crescimento do osteossarcoma. Portanto, estes achados indicam que a aplicação destas células-tronco de polpa dentária canina, isoladamente, sem a adição de algum agente que possa diminuir o crescimento ou malignidade deste tumor, não é indicada como terapia durante a ocorrência do tumor.

8ª Conclusão

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, foi possível concluir que as células-tronco de polpa dentária imatura não possuem potencial inibitório sobre as células de osteossarcoma, ou mesmo provocam morte celular destas células, e, a interação por meio do cocultivo celular não altera a morfologia celular. Entretanto, o cocultivo celular afetou a expressão fenotípica e genotípica das células avaliadas.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218, n. 1, p. 9–12, 2008.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592 p.
- ABE, E.; YAMAMOTO, M.; TAGUCHI, Y.; LECKA-CZERNIK, B'; O'BRIEN, C. A.; ECONOMIDES, A. N.; STAHL, N.; JILKA, R. L.; MANOLAGAS, S. C. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 15, p. 663-673, 2000.
- ANDIA, D. C.; CERRIB, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191-98, 2006.
- ANDRADE, A. D.; MARINHO, C. F.; BARCELOS, M.; ZORZAL, M. B.; CONZ, M. B.; VIDIGAL JR, G. M. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Revista Implantnews**, v. 4, n. 6, p. 659-62, 2007.
- ANGSTADT, A. Y.; THAYANITHY, V.; SUBRAMANIAN, S.; MODIANO, J. F.; BREEN, M. A genome-wide approach to comparative oncology: high-resolution oligonucleotide aCGH of canine and human osteosarcoma pinpoints shared microaberrations. **Cancer Genetics**, v. 205, n. 11, p. 572-587, 2012.
- AUBIN, J. E. Bone Stem Cells. **Journal of Cellular Biochemistry Supplement**, v. 72, n. 30-31, p. 73 - 82, 1998.
- AUBIN, J. E.; LIU, F.; MALAVAL, L.; GUPTA, A. K. Osteoblast and chondroblast differentiation. **Bone**, v. 17, p. 77S-83S, 1995. Suppl. 2.
- AVOLIO, G.; BRANDÃO, C. M. A.; OLIVEIRA, J. X.; COSTA, C.; ALONSO, G. O papel da vitamina D3 e da osteocalcina no metabolismo ósseo: uma análise necessária para se otimizar a osseointegração. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 26, n. 3, p. 347-350, 2008.
- BASU-ROY, U.; BASILICO, C.; MANSUKHANI, A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. **Cancer Letter**, v. 338, n. 1, p. 158-67, Sep. 2013.
- BIANCO, P.; FISHER, L. W.; YOUNG, M. F.; TERMINE, J. D.; ROBEY, P. G. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. **Calcified Tissue International**, v.49, n.6, p. 421-426, 1991.
- BRAMWELL, V. The role of chemotherapy in osteogenic sarcoma. **Critical Reviews in Oncology/ Hematology**, v. 20, n. 1-2, p. 61-85, Sep. 1995.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Medicine**, v. 3, n. 7, p. 730–737, 1997.

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.

CHEN, Q.; LIU, W.; SINHA, K. M.; YASUDA, H.; CROMBRUGGHE, B. Identification and characterization of microRNAs controlled by the osteoblast-specific transcription factor osterix. **Plos One**, v. 8, n. 3, p.1-12, 2013.

CHUN, R.; DE LORIMIER, L. F. Update on the biology and management of canine osteosarcoma. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, 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.

CZYEWSKA, J., GUZINSKA, U.K., LEBELT, A., ZALEWSKI, B., KEMONA, A. EVALUATION of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku**, v. 49, p. 64-66, 2004. Suppl. 1.

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**, São Paulo, 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.

d'AQUINO, R.; GRAZIANO, A.; SAMPAOLESI, M.; LAINO, G.; PIROZZI, G.; de ROSA, A.; PAPACCIO, G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 1162–1171, 2007.

BARCELOS-DE-SOUZA, P.; GORI, V.; BAMBI, F.; CHIARUGI, P. Tumor microenvironment: Bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1836, n. 2, p. 321–335, 2013.

DELANY, A. M.; AMLING, M.; PRIEMEL, M.; HOWE, C.; BARON, R.; CANALIS, E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 7, p. 915-923, 2000.

DI BELLA, C.; ALDINI, N. N.; LUCARELLI, E.; DOZZA, B.; FRISONI, T.; MARTINI, L.; FINI, M.; DONATI, D. Osteogenic protein-1 associated with mesenchymal stem

cells promote bone allograft integration. **Tissue engineering**. Part A, v. 16, n. 9, p. 2967–76, 2010. doi:10.1089/ten.tea.2009.0637.

DING, Y.; WANG, Y.; CHEN, J.; HU, Y.; CAO, Z.; REN, P.; ZHANG, Y. p21 overexpression sensitizes osteosarcoma U2OS cells to cisplatin via evoking caspase-3 and Bax/Bcl-2 cascade. **Tumor Biology**, v. 35, n. 4, 3119-3123.

DISSANAYAKA, W. L.; ZHU, X.; ZHANG, C.; JIN, L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 8, p. 1074-80, Aug. 2011.

DRAKE, R. L.; VOGL, A. W.; MITCHELL, A. W. M. Sistemas do corpo: sistema esquelético. In:_____. **Gray's anatomia para estudantes**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 14-20.

DUAN, X.; GUAN, H.; CAO, Y.; KLEINERMAN, E. S. Murine bone marrow derived mesenchymal stem cells as vehicles for IL-12 gene delivery into Ewing's Sarcoma tumors. **Cancer**, v. 115, n. 1, p. 13–22, 2010.

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, n. 3, 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.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, v. 29, n. 6, p. 15-18, 2002. Suppl. 16.

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.

GEIGL, J. B.; OBENAUF, A. C.; SCHWARZBRAUN, T.; SPEICHER, M. R. Defining chromosomal instability. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 2, p. 64-69, 2008.

GETTY, R. Sistema Digestivo. In:_____. **Sisson & Grossman: Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1445-1464.

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.

GRANDY, R.; SEPULVEDA, H.; AGUILAR, R.; PIHAN, P.; HENRIQUEZ, B.; OLATE, J.; MONTECINO, M. The Ric-8B Gene Is Highly Expressed in Proliferating Preosteoblastic Cells and Downregulated during Osteoblast Differentiation in a SWI/SNF- and C/EBP β -Mediated Manner. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 14, p. 2997–3008, 2011.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; GEHRON ROBEY, P.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.

HAMADA, H.; KOBUNE, M.; NAKAMURA, K.; KAWANO, Y.; KATO, K.; HONMOU, O.; HOUKIN, K.; MATSUNAGA, T.; NIITSU, Y. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. **Cancer Science**, v. 96, n. 3, p. 149-156, 2005.

HANSEN, M. F.; Genetic and molecular aspects of osteosarcoma. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 2, n. 6, p. 554-560, 2002.

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, n. 5, p. 1011-1027, 2005.

HONDA, M. J.; IMAIZUMI, M.; TSUCHIYA, S.; MORSCZECK, C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. **Journal of Oral Science**, v. 52, n. 4, p. 541-552, 2010.

HOUGHTON, J. M.; MOROZOV, A.; SMIRNOVA, I.; WANG, T. C. Stem cells and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 3, p. 191–203, Jun. 2007.

HUANG, G. T. J.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 9, p. 792–806, 2009.

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.

JEON, B. G.; KANG, E. J.; KUMAR, B. M.; MAENG, G. H.; OCK, S. A.; KWACK, D. O.; PARK, B. W.; RHO, G. J. Comparative analysis of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity in human dental stem cells. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 11-12, p. 1693-1705, 2011.

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.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:_____. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 135-152.

KARMATSCHEK, M.; MAIER, I.; SEIBEL, M. J.; WOITGE, H. W.; ZIEGLER, R.; ARMBRUSTER, F. P. Improved purification of human bone sialoproteína and development of a homologous radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2076–2082, 1997.

KELM Jr., R. J.; SWORDS, N. A.; ORFEO, T.; MANNL, K. G. Osteonectin in matrix remodeling: a plasminogen-osteonectin-collagen complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 48, p. 30147-30153, 1994.

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.

KOGIANNI, G.; NOBLE, B. S. The biology of osteocytes. **Current Osteoporosis Reports**, v. 5, n. 2, p. 81-86, 2007.

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

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Bones. In: _____ **Robbins e Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LI, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; SI, M.; YIN, H.; LI, J. Diallyl trisulfide inhibits proliferation, invasion and angiogenesis of osteosarcoma cells by switching on suppressor microRNAs and inactivating of Notch-1 signaling. **Carcinogenesis**, v.34, n.7, p.1601 -1610, 2013.

LIAN, J. B.; STEIN, G. S. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 269-305, 1992.

LING, X.; MARINI, F.; KONOPLEVA, M.; SHOBER, W.; SHI, Y.; BURKS, J.; CLISE-DWYER, K.; WANG, R.; ZHANG, W.; YUAN, X.; LU, H.; CALDWELL, L.; ANDREEF, M. Mesenchymal stem cells overexpressing INF- β inhibit breast cancer growth and metastases through STAT3 signaling in a syngeneic tumor model. **Cancer Microenvironment**, v. 3, p. 83-95, 2010.

LINK, D. C. Osteocytes link bone maintenance to blood homeostasis. **Blood**, v. 121, n. 6, p. 867-868, 2013.

LIOTTA, L. A.; STEEG, P. S.; STELLER-STEVENSON, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, n. 2, 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.
- LORUSSO, G.; RÜEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochemistry and Cell Biology**, v.130, n. 6, p. 1091-1103, 2008.
- LOUKOPOULOS, P.; O'BRIEN, T.; GHODDUSI, M.; MUNGALL, B. A.; ROBINSON, W. F. Characterization of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. **Research in Veterinary Science**, v. 77, p. 131-141, 2004.
- LUCERO, C. M.; VEGA, O. A.; OSORIO, M. M.; TAPIA, J. C.; ANTONELLI, M.; STEIN, G. S.; VAN WIJNEN, A. J.; GALINDO, M. A. THE Cancer-Related Transcription Factor Runx2 Modulates Cell Proliferation in Human Osteosarcoma Cell Lines. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 4, p. 714-723, 2013.
- LUO, X.; CHEN, J.; SONG, W. X.; TANG, N.; LUO, J.; DENG, Z. L.; SHARFF, K. A.; HE, G.; BI, Y.; HE, B. C.; BENNETT, E.; HUANG, J.; KANG, Q.; JIANG, W.; SU, Y.; ZHU, G. H.; YIN, H.; HE, Y.; WANG, Y.; SOURIS, J. S.; CHEN, L.; ZUO, G. W.; MONTAG, A. G.; REID, R. R.; HAYDON, R. C.; LUU, H. H.; HE, T. C. Osteogenic BMPs promote tumor growth of human osteosarcomas that harbor differentiation defects. **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 12, p. 1264-1277, 2008.
- MAEDA, J.; YURKON, C. R.; FUJISAWA, H.; KANEKO, M.; GENET, S. C.; ROYBAL, E. J.; ROTA, G. W.; SAFFER, E. R.; ROSE, B. J.; HANNEMAN, W. H.; THAMM, D. H.; KATO, T. A. Genomic Instability and Telomere Fusion of Canine Osteosarcoma Cells. **Plos One**, v. 7, n. 8, 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0043355>>. Acesso em: 02/08/2014. doi: 10.1371/journal.pone.0043355.
- MAHHAFHEY, E. A. Cytology 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.
- MARTIN, A.; GASSE, H.; STASZYK, C. Absence of lymphatic vessels in the dog dental pulp: an immunohistochemical study. **Journal of Anatomy**, v. 217, n. 5, p. 609-615, 2010.
- MARTIN, J. W.; SQUIRE, J. A.; ZIELENSKA, M. The genetics of osteosarcoma. **Sarcoma**, v. 2012, 2012: 63725. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/627254>>. Acesso em 10/01/2014. doi: 10.1155/2012/627254.
- 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.

MOSNA, F.; SENSEBE, L.; KRAMPERA, M. HUMAN bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells : a user ' s guide. **Stem Cell and Development**, v.19, n.10, p. 1449-1470, 2010.

MUEHLBERG, F. L.; SONG, Y. H.; KROHN, A.; PINILLA, S. P.; DROLL, L. H.; LENG X.; SEIDENSTICKER, M.; RICKE, J.; ALTMAN, A. M.; DEVARAJAN, E.; LIU, W.; ARLINGHAUS, R. B.; ALT, E. U. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 4, p. 589–597, 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.

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, Jul. 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, Sep. 2001.

PAVELIC, S. K.; SEDIC, M.; BOSNJAK, H.; SPAVENTI, S.; PAVELIC, K. Metastasis: new perspectives on an old problem. **Molecular Cancer**. v. 10, n. 22, p. 1-14, 2011.

PHAN, T. C. A.; XU, J.; ZHENG, M. H. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. **Histology and Histopathology**, v. 19, n. 4, p. 1325-1344, 2004.

PENG, L.; YE, L.; ZHOU, X. D. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. **International Journal of Oral Science**, v. 1, n. 1, p. 6–12, 2009.

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.

RAOUF, A.; SETH, A. Ets transcription factors and targets in osteogenesis. **Oncogene**, v. 19, p. 6455-6463, 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**, Porto Alegre, v. 80, n. 1, p. 65-70, Jan- Feb. 2004.

REGENBRECHT, C. R. A.; LEHRACH, H.; ADJAYE, J. Stemming cancer: functional genomics of cancer stem cells in solid tumors. **Stem Cell Reviews**, v. 4, n. 4, p. 319-328, 2008.

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.

REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, p. 105-111, 2001.

RICI, R. E. G.; ALCÂNTARA, D.; FRATINI, P.; WENCESLAU, C. V.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; MARIA, D. A. Mesenchymal stem cells with rhBMP-2 inhibits the growth of canine osteosarcoma cells. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/17>>. Acesso em: 10/10/2013. doi: doi:10.1186/1746-6148-8-17.

RICI, R. E. G.; WILL, S. E. A.; FAVARON, P. O.; FRATINI, P.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARIA, D. A. Modulation of Angiogenesis and Immune Response in Canine Osteosarcoma by BMP-2 and Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Stem Cell Research and Therapy**, v. 3, n. 143, 2013. Disponível em: <<http://omicsonline.org/modulation-of-angiogenesis-and-immune-response-in-canine-osteosarcoma-by-bmp-2-and-mesenchymal-stem-cells-2157-7633.1000143.pdf>>. Acesso em: 20/07/2014. doi: 10.4172/2157-7633.1000143.

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, p. 447-451, 2006.

RIZVANOV, A. A.; YALVAÇ, M. E.; SHAFIGULLINA, A. K.; SALAFUTDINOV, I. I.; BLATT, N. L.; SAHIN, F.; KIYASOV, A. P.; PALOTÁS, A. Interaction and self-organization of human mesenchymal stem cells and neuro-blastoma SH-SY5Y cells under co-culture conditions: A novel system for modeling cancer cell micro-environment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 253-259, 2010.

RHODES, L. V.; MUIR, S. E.; ELLIOTT, S.; GUILLOT, L. M.; ANTOON, J. W.; PENFORNIS, P.; TILGHMAN, S. L.; SALVO, V. A.; FONSECA, J. P.; LACEY, M. R.; BECKMAN, B. S.; MCLACHLAN, J. A.; ROWAN, B. G.; POCHAMPALLY, R.; BUROW, M. E. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 2, p. 293-300, 2010.

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

SAGAR, J.; CHAIB, B.; SALES, K.; WINSLET, M.; SEIFALIA, A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. **Cancer cell international**, v. 7, n. 9, 2007. Disponível em : <<http://www.cancerci.com/content/pdf/1475-2867-7-9.pdf>>. Acesso em: 20/08/2014. doi:10.1186/1475-2867-7-9, 2007.

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

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, 2002.

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.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEEL, M. D. Osteopontin. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 11, n. 3, p. 279-303, 2000.

SPAETH, E.; KLOPP, A.; DEMBINSKI, J.; ANDREEFF, M.; MARINI, F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. **Gene Therapy**, v. 15, n. 10, p. 730–738, 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.

STANDAL, D.; BORSET, M.; SUNDAN, A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. **Experimental Oncology**, v. 26, n.3, p. 179-184, 2004.

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.

STRIKER, T. P.; KUMAR, V. **Neoplasia**. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Robbins e Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 259-330.

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.

SULZBACHER, I.; BIRNER, P.; TRIEB, K.; LANG, S.; CHOTT, A. Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 441, n. 4, p. 345–9, 2002.

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, n. 3, p. 501-503, 1996.

TANG, N.; SONG, W. X.; LUO, J.; HAYDON, R. C.; HE, T. C. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 466, n. 9, p. 2114–2130, 2008.

TORTORA, G. J. Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia, 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TSAI, R. Y. L.; MCKAY, R. D. G. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. **Genes & development**, v. 16, n. 23, p. 2991–3003, 2002.

VAN DEN BERG, H. Biology and therapy of solid tumors in childhood. **Update on Cancer Therapeutics I**, v. 1, n. 3, 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.

WADAYAMA, B.; TOGUUCHIDA, J.; SHIMIZU, T.; ISHIZAKI, K.; SASAKI, M. S.; KOTOURA, Y.; YAMAMURO, T. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Research*, v. 54, n. 11, p. 3042-3048, 1994.

WANG, L.; CHENG, T.; ZHENG G. The impact of tumor microenvironments on stem cells. **Translational Cancer Research**, v. 2, n. 5, p. 422-428, 2013.

WANG, W.; ITAKA, K.; OHBA, S.; NISHIYAMA, N.; CHUNG, U.; YAMASAKI, Y.; KATAOKA, K. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 30, n. 14, p. 2705-2715, 2009.

WEBER, C. E.; KUO, P. C. The tumor microenvironment. **Surgical Oncology**, v. 21, n. 3, p. 172-177, 2012.

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.

WILSON, H.; HUELSMEYER, M.; CHUN, R.; YOUNG, K. M.; FRIEDRICHS, K.; ARGYLE, D. J. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 69-75, 2008.

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

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.

XU, W. T.; BIAN, Z. Y.; FAN, Q. M.; LI, G.; TANG, T. T. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. **Cancer Letters**, v. 281, n. 1, p. 32-41, 2009.

YAMADA, Y.; ITO, K.; NAKAMURA, S.; UEDA, M.; NAGASAKA, T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 7, p. 1003-1013, 2011.

YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T.; SUDA, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 4, p. 393-411, 2000.

YEUNG, R. S. M. The Osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand family: role in inflammation and bone loss. **The Journal of Rheumatology**, v.31, n. 5, p. 844-846, 2004.

ZHOU, G.; SHI, X.; ZHANG, J.; WU, S.; ZHAO, J. MicroRNAs in osteosarcoma: from biological players to clinical contributors, a review. **The Journal of international Medical Research**, v. 41, n. 1, p. 1-12, 2013.

APENDICE A - INFORMAÇÕES SOBRE ANTICORPOS UTILIZADOS

Anticorpo	Reatividade	Fabricante
Caspase-3 (sc 7272)	Humano	Santa Cruz Biotechnology
Osteopontina (ab91655)	Humano, camundongo	ABCAM
VEGF (sc152)	Humano, camundongo, rato	Santa Cruz Biotechnology
p53 (ab26)	Mouse, Rat, Cow, Dog, Human, Monkey, Chinese Hamster, Syrian Hamster	ABCAM
Rodamina 123	Não se aplica	Sigma
Iodeto de Propídio	Não se aplica	Sigma
Anexina V	Não se aplica	
Cell Trace Violet Cell Proliferation kit (C34557)	Não se aplica	Invitrogen

**APENDICE B - INFORMAÇÕES SOBRE OS PRIMERS UTILIZADOS
PARA qRT-PCR**

Gene	Sequência dos Primers
GAPDH	F: AGT ATG ATT CTA CCC ACG GCA AA
	R: CAC AAC ATA CTC AGC ACC AGC AT
OCT4	F: TCG TGA AGC CGG ACA AGG AGA AG
	R: AGG AAC ATG TTC TCC AGG TTG CCT
VEGF	F: TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT
	R: TGT GCT CTC CTC CTG CCA TAG
Osteopontina	F: TAT GGA AGA TGA CTT CAA TGC CG
	R: GGC CCT TGG TTT CCA TAC TG
Osteocalcina	F: CTG GTG TTT CCA CTG ACA C
	R: CAG GGC TAT TTG GGA GTC AT
RUNX-2	F: CCA TAA CCG TCT TCA CAA ATC C
	R: AAT GCG CCC TAA ATC ACT G
cMyc	F: AGA GAT GCC ATG TGT CCA CC
	R: GCGGTTGTTGCTGATCTGTT
RB1	F: AAC GCG AAT GCA GAA GCA AA
	R: GTC CGG GAC CCT CAT TTC TC
PCNA	F: TGA ACC TCA CCA GCA TGT CC
	R: TAC TAG TGC CAA GGT GTC CG
COL 1A1	F: GTA GAC ACC ACC CTC AAG AGC
	R: CCA GTC GGA GTG GCA CAT
TNFα	F: GGG TCT TCC AAC TGG AGA AGG
	R: GGT TTG GGC AAG AAT GGA CG