Daniel Soares Sanches

Estudo dos aspectos
envolvidos na diferenciação
induzida em linhagens
celulares de osteossarcoma

SÃO PAULO
2013

Daniel Soares Sanches

**Estudo dos aspectos envolvidos na diferenciação induzida em
linhagens celulares de osteossarcoma**

SÃO PAULO
2013

Daniel Soares Sanches

**Estudo dos aspectos envolvidos na diferenciação induzida em linhagens celulares
de osteossarcoma**

**Tese apresentada ao programa de Pós – graduação em
Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia experimental e comparada.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Zaidan Dagli

SÃO PAULO
2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2757
FMVZ

Sanches, Daniel Soares
Estudo dos aspectos envolvidos na diferenciação induzida em linhagens
celulares de osteossarcoma / Daniel Soares Sanches. -- 2013.
97 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

1. Diferenciação. 2. Osteossarcoma. 3. Genisteína. 4. Arctigenina.
5. Tricostatina-A. I. Título.

ERRATA

SANCHES, D. S. Estudo dos aspectos envolvidos na diferenciação induzida em linhagens celulares de osteossarcoma, São Paulo. 2013. 97 f. Doutorado (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1º		97 f
Abstract	1º		97 f

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo dos aspectos envolvidos na diferenciação induzida em cultura celular de osteoblastos neoplásicos de cães", protocolado sob o nº1749/2009, utilizando 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade da Profa Dra Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/09/09.

We certify that the Research "Study of aspects involved in the induced differentiation of dogs neoplastic osteoblasts in cell cultures", protocol number 1749/2009, utilizing 20 (twenty) dogs, under the Profa Dra Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/09.

São Paulo, 24 de setembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANCHES, Daniel Soares

Título: Estudo dos aspectos envolvidos na diferenciação induzida em linhagens celulares de osteossarcoma

**Tese apresentada ao programa de Pós – graduação em
Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para 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: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus
Queridos e amados
Pais

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço de forma grandiosa a meus pais, Silvano e Dalva, que de maneira especialmente amorosa sempre me incentivaram e me levaram a buscar mais conhecimentos.

À professora doutora Maria Lúcia, pela paciência, compreensão e amizade, na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta tese.

A minhas irmãs Barbara, Renata e Thais, pelo incentivo ao meu desenvolvimento profissional.

Aos meus queridos sobrinhos Ully, Bia e Mateus por servir de fonte de inspiração para o meu trabalho.

A Carol, minha amada namorada e companheira de todas as horas, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem desde o início e me ajudou não somente nos trabalhos experimentais, mas também com a confecção desta tese.

A Leonina e aos meus avós que sempre estiveram carinhosamente ao meu lado, incentivando em todos os aspectos minha evolução profissional.

Aos meus amigos e colaboradores mestres e doutores do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada: Marguiti, Lucas, Márcia, Gregory, Teresa, Bruno, Ivone e Luciana não somente pelo convívio, pelo apoio e amizade, mas também pelo trabalho duro realizado nos mais diferentes estudos, para que eu conseguisse desenvolver e concluir meus trabalhos.

Aos amigos, Luciano e Claudio pela atenção e pelo apoio constante nos trabalhos desenvolvidos com as técnicas histológicas.

Aos meus amigos da sala de “necro,” Lú, Olivia, Raimundo e Edson pela amizade e suporte dado por todos estes anos.

A minha colaboradora Andreia pela atenção, amizade e trabalho árduo, referente aos ensaios de citometria de fluxo.

A minhas colaboradoras do HOVET da FMVZ-USP: Andressa e Viviane não somente pela ajuda com a cirurgia e coleta dos tumores utilizados em meus experimentos, mas, pelo convívio, e pela amizade;

Ao meu amigo Jesus do HOVET-USP pela ajuda na coleta dos tumores ósseos.

Aos meus amigos professores da FZEA, Heidge e Ricardo que sempre me ajudaram com discussões e orientações por todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

A todos meus amigos e colegas do Departamento de Patologia Livia, Adriana, Herculano, Nivea, Adriana (aluna), Cláudia, Thaisa, Bia, Aline, Ramon, Fernanda, pela amizade em todos os momentos de meus trabalhos.

A amiga Karen pelo apoio nessa etapa final.

Ao meu cunhado Marcelo pelo incentivo e ajuda no desenvolver final da minha tese.

Ao Kadu e a Samanta pelo apoio dado durante o desenrolar de minha pós-graduação.

Ao Rodrigo e a Patrícia pela ajuda e incentivo no decorrer dos meus trabalhos.

A Maria Alice e Antônio, pais da minha querida Carol pelas palavras de incentivo e ajuda nesta fase de minha vida.

*A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro
FAPESP 2009/52546-1
FAPESP 2010/05296-7*

“Amor é o que se aprende no limite,
depois de se arquivar toda ciência herdada,
ouvida. Amor começa tarde. “

Carlos Drummond Andrade

SANCHES, D. S. **Estudo dos aspectos envolvidos na diferenciação induzida em linhagens celulares de osteossarcoma.** [Study of differentiation process in osteosarcoma cell line.] 2013. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RESUMO

O Osteossarcoma é o tipo mais comum de câncer ósseo em cães e em seres humanos. Os osteossarcomas caninos representam um modelo único para o estudo desse tipo de câncer em humanos, devido a incidência relativamente alta, semelhanças no comportamento biológico, na apresentação clínica e características moleculares. Estudos envolvendo o desenvolvimento do fenótipo de osteoblastos em osteócitos terminalmente diferenciados, oferecem as bases para o entendimento do curso da transformação neoplásica. Neste sentido, a rápida expansão do conhecimento a respeito do processo de diferenciação óssea, em última análise pode conduzir ao desenvolvimento de marcadores diagnóstico e prognóstico, bem como terapias dirigidas para pacientes caninos e humanos portadores deste tipo de câncer. Este estudo teve por objetivos avaliar alguns dos aspectos relacionados ao processo de diferenciação induzida de osteoblastos caninos após o tratamento com três diferentes agentes descritos como tendo possível potencial antineoplásico. Para tanto, avaliou-se, em cultura celular em três dimensões, duas linhagens de osteossarcoma após tratamento com a Arctigenina, a Genisteína e a Tricostatina-A. Inicialmente, foi realizado o estabelecimento e caracterização de uma nova linhagem celular de osteossarcoma canino. Em seguida deu-se início aos trabalhos de avaliação dos marcadores de diferenciação por diferentes técnicas. Foram também utilizados estudos de viabilidade celular, ensaios de proliferação e morte celular induzida, assim como de invasão. Os resultados mostraram que todos os três tratamentos foram capazes de induzir diferenciação parcial nas linhagens de osteossarcoma, visto a heterogeneidade dos dados coletados, assim como, pela expressão parcial de marcadores tardios da transição osteoblasto/osteócito. Associado a isso se verificou que existe um decréscimo da viabilidade celular, porém sem ação diretamente ligada a caspase3. Notou-se ainda que mesmo com diferenças entre as linhagens, os princípios ativos foram capazes de inibir a capacidade de invasão nos ensaios de Transwell. Conclui-se, desta maneira, que os compostos utilizados induzem diferenciação parcial, porém, com efeito, antineoplásico importante. Em conjunto, estes resultados destacam a importância do processo de diferenciação, tumorigênese e terapia através da diferenciação.

Palavras- chave: Diferenciação, Osteossarcoma, Genisteína, Arctigenina, Tricostatina-A.

SANCHES, D.S. **Study of differentiation process in osteosarcoma cell lines.** [Estudo dos aspectos envolvidos na diferenciação induzida em linhagens celulares de osteossarcoma] 2013. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ABSTRACT

Osteosarcoma is the most common type of bone cancer in dogs and humans. Due to the fact that canine osteosarcoma is similar to human osteosarcoma in its high occurrence rate, biological behavior, clinical signs and molecular characteristics, this naturally occurring canine disease represents an important model for the study of osteosarcoma in humans. Studies regarding the development of the osteoblast phenotype into terminally differentiated osteocytes provide an understanding of the neoplastic transformation in bone cancer. For this reason, further studies of bone differentiation may lead to the discovery of bone-tumor-specific markers used for disease detection and prognosis, and the development of drug-targeted therapies. The focus of this study is the process of induced bone differentiation after treatment with three different drugs that have a potential anti-neoplastic activity against osteosarcoma. Two osteosarcoma cell lines in three-dimensional culture were evaluated after being treated with Arctigenin, Genistein, and Trichostatin-A. Initially, we performed the establishment and characterization of a novel canine osteosarcoma cell line. Then the work on the evaluation of differentiation markers by different techniques has been initiated. Studies were also used for cell viability, proliferation assays and induced cell death, as well as invasion. The results showed that all three treatments were able to induce partial differentiation in osteosarcoma cell lines, since the heterogeneity of the data collected, as well as the partial expression of markers of late transition osteoblast / osteocyte. Associated with this it was found that there is reduced cell viability, but without acting directly connected to caspase3. It is further noticed that even with differences between strains, the active principles were able to inhibit the invasiveness in Transwell assay. The conclusion is thus that the partial differentiation inducing compounds used, but with important antineoplastic effect. Together, these results highlight the importance of the process of differentiation, tumorigenesis and differentiation therapy.

Keywords: Differentiation, Osteosarcoma, Genistein, Arctigenin, Trichostatin-A.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µl	Microlitros
ALP	Fosfatase alcalina
ARC	Arctigenina
BCIP	5-bromo-4cloro-3índol fosfato
BMP2	Proteína morfogenética óssea 2
BrdU	Bromodeoxiuridina
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
Cx43	Conexina 43
CX45	Conexina 45
Cx46	Conexina 46
CXs	Conexina
DAB	3,3 Diaminobenzidina
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra- acetic
FBS	Soro fetal bovino
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
GEN	Genisteína
H&E	Hematoxilina e Eosina
HOVET	Hospital Veterinário
HPLC	Cromatografia líquida de eficiência

IHC	Imunoistoquímicas
min	Minuto
ml	Mililitros
mm	Milímetros
NBT	Nitroazul tetrazolio
nM	Nanomolar
OC	Osteocalcina
ON	Osteonectina
OPG	Osteoprotegerina
OSA	Osteossarcoma
OSA1	Osteossarcoma linhagem primária
OSA2	Osteossarcoma linhagem estabelecida
OSAs	Osteossarcomas
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reações em cadeia polimerase
rpm	Rotações por minuto
STRO1	Estromelisina
TSA	Tricostatina-A
TTBS	Solução tris salina tamponada
uM	Micromolar
VPT	Departamento de Patologia Animal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	ANIMAIS:.....	28
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO DE NEOPLASIAS ÓSSEAS.....	28
4.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA:.....	29
4.4	CULTURA CELULAR.....	29
4.5	OBTENÇÃO DE CULTURA EM TRÊS DIMENSÕES.....	32
4.6	AGENTES INDUTORES DE DIFERENCIAÇÃO	33
4.7	CURVA DE VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS AGENTES INDUTORES.....	34
4.8	ENSAIO DE MTT	34
4.9	CITOMETRIA DE FLUXO	35
4.10	ENSAIO DE INVASÃO E METÁSTASE ATRAVÉS DE TÉCNICA DO TRANSWELL	39
4.11	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA	40
4.12	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL TAQMAN	41
4.13	COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS	41
4.14	IMUNOISTOQUÍMICA.....	44
4.15	IMUNOFLOURESCÊNCIA	45
4.16	ANÁLISE CAPTURA DE IMAGENS (LAMINAS DE HISTOQUÍMICA, IMUNOISTOQUÍMICA E IMUFLUORESCÊNCIA)	46
5	RESULTADOS	47
5.1	ANIMAIS E TECIDOS ÓSSEOS NEOPLÁSICOS UTILIZADOS	47
5.2	CULTURA CELULAR.....	52
5.3	ESTUDOS DE ASPECTOS LIGADOS À DIFERENCIAÇÃO CELULAR INDUZIDA.....	57
5.4	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELA INCORPORAÇÃO DE BRDU	61
5.5	ANÁLISE DE MORTE CELULAR – TESTE DO NUCVIEW	62
5.6	ENSAIO DE INVASÃO CELULAR	63
5.7	ENSAIO DE EXPRESSAO DE MARCADORES ÓSSEOS	64
6	DISCUSSÃO.....	72
7	CONCLUSÕES.....	88

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
----------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

O osteossarcoma é o tumor ósseo de maior prevalência tanto em seres humanos como em cães. Em cães, o osteossarcoma representa cerca de 4% de todos os tumores, por volta de 85% de todos os tumores ósseos do esqueleto; 98% acometem o esqueleto apendicular. Possui alto potencial metastático, com 90% dos casos já apresentando metástases no ato do diagnóstico. O osteossarcoma canino possui aspectos clínicos, radiográficos, morfológicos e biomoleculares, que se assemelham muito aos osteossarcomas humanos. Por isso os osteossarcomas caninos têm sido abordados em estudos como modelos para o entendimento de aspectos relacionados com o osteossarcoma humano e também no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para ambas as espécies.

Atualmente existem muitos modelos para o estudo de tumores ósseos. Estes modelos, quando analisados em conjunto, têm contribuído para uma maior compreensão dos mecanismos de diferenciação e carcinogênese. Logicamente, cada um destes modelos tem suas limitações. Está claro, então, que tumores sólidos cujas células foram extraídas e cultivadas com sucesso em sistema de três dimensões, perfazem um modelo experimental realístico para a investigação de muitos dos aspectos associados à biologia tumoral, entre elas, os processos de diferenciação e proliferação em osteossarcomas.

Os programas de diferenciação de osteoblastos normais foram bem estudados, e atualmente são relativamente bem compreendidos. Em contraste, as bases moleculares da perda de diferenciação associada à carcinogênese ainda não foram bem elucidadas, e possivelmente variam entre os tipos de câncer e entre os diferentes tecidos. Com significativo impacto, a terapia por meio da diferenciação tem sido introduzida em estudos pré-clínicos e clínicos, com benefícios, trazendo esperança de que as relações

entre diferenciação e carcinogênese possam ser usadas no tratamento de pacientes com câncer. Neste sentido, objetivamos o estudo de alterações fenotípicas e morfofuncionais de osteossarcomas caninos em cultura primária, e sua comparação a linhagem celular de osteossarcoma humano MG63, com a finalidade de um maior entendimento dos aspectos associados aos processos de diferenciação celular. Para tanto, foram utilizados compostos químicos que potencialmente são descritos como tendo atividades antitumorais promissoras, entre outras, sendo então colocadas como possíveis agentes terapêuticos no combate ao osteossarcoma. Os compostos utilizados para o estudo da diferenciação induzida em osteossarcomas foram: a Arctigenina, um composto extraído de uma planta denominada *Arctium lappa*; a Genisteína, um flavonoide extraído da soja; e a Tricostatina-A, um composto químico conhecido pela sua atuação como inibidor da histona desacetilase.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o processo de diferenciação de osteossarcomas em cultura celular após a indução com os diferentes agentes : Arctigenina, Genisteína e Tricostatina-A.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer e caracterizar cultura primária de osteoblastos neoplásicos caninos (osteossarcomas);
- Avaliar o efeito da sensibilização através de indutores de diferenciação sobre as possíveis alterações na comunicação intercelular mediada pelas junções do tipo gap e seu possível efeito sobre a diferenciação de osteoblastos;
- Realizar avaliação temporal da sensibilização mediada pelos indutores de diferenciação em culturas de osteossarcoma canino, verificados por estudos morfológicos e de expressão de marcadores de diferenciação óssea através de colorações histoquímicas e imunocitoquímica, PCR em tempo real (osteocalcina, colágeno tipo I, osteonectina, fosfatase alcalina óssea, osteopontina);

- Avaliar o efeito da sensibilização através de indutores de diferenciação sobre aspectos correlacionados com proliferação celular e possíveis alterações no ciclo celular e de osteoblastos neoplásicos através da incorporação de BrdU e de iodeto de propídeo pela técnica de citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito da sensibilização através de indutores de diferenciação sobre aspectos correlacionados com a morte celular induzida através de apoptose com o Nucview;
- Avaliar o efeito da sensibilização através de indutores de diferenciação sobre aspectos correlacionados com o processo de invasão e metástase através do Transwell.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Tumores ósseos primários do esqueleto são comuns em cães e humanos, tendo como principal tipo o osteossarcoma (OSA). Em cães tem-se uma incidência de aproximadamente 65 a 85% para osteossarcomas (OSAs) e 15% para condrossarcomas. Os OSAs acometem 4% de todas as moléstias neoplásicas, e 98% dos tumores ósseos primários do esqueleto apendicular (WOLKE E NIELSEN, 1966; JONES et al., 2000; THOMPSON E POOL, 2002). Possui alto potencial metastático, e 90% morrem ou são eutanasiados devido a complicações associadas às metástases pulmonares (BRODEY; RISER, 1969; LING; MORGAN; POOL, 1974; WITHROW et al., 1991; HEYMAN et al., 1992; LUCROY; PECK; BERRY, 2001). Dados de histomorfologia, imunoistoquímica e dados experimentais têm sugerido que muitos, se não todos, sarcomas são derivados de células mesenquimais primitivas multipotenciais (células tronco), que podem se diferenciar em uma ou mais linhagens (osteoblástica, condroblástica, fibroblástica ou a combinação delas) durante o curso da transformação neoplásica (HOENERHOFF, 2004).

Conceitualmente, a tumorigênese provavelmente envolve distúrbios de mecanismos que apropriadamente contrastam o início da proliferação por células tronco tumorais, ou que permitem a persistente expressão de aspectos semelhantes às de células tronco em células parcialmente comprometidas. As similaridades entre as propriedades de células tronco e destas células transformadas são notáveis. Ambos os tipos celulares possuem ilimitada auto-renovação, expressam telomerasas e são indiferenciadas como definida pela ausência de marcadores restritos de linhagem (REYA; CLEVERS, 2005). Existem também outras evidências de que cânceres são

caracterizados pela interrupção de mecanismos que forçam a saída do ciclo celular (THOMAS; KANSARA, 2006).

Um ponto chave no desenvolvimento ósseo é o de que a diferenciação é acompanhada de uma perda progressiva da capacidade proliferativa, existindo dois passos chave na diferenciação celular que parecem ser críticos para tumorigênese. O primeiro é o ponto de transição entre uma célula tronco mesenquimal e uma linhagem celular progenitora restrita (AUBIN, 1998). A divisão celular inicial é assimétrica, dando origem à outra célula tronco (auto-renovação) e um osteoprogenitor (WATT, 2001). Essa fase é associada com intensa atividade proliferativa. O pré-osteoblasto é um estágio intermediário que expressa STRO1, ALP, receptores para hormônios da tireóide, e colágeno tipo I, e é controlada em direção a linhagem osteoblástica (GRONTHOS ET AL., 1999). O osteoblasto maduro expressa ALP, osteopontina, sialoproteína óssea, e osteocalcina e permanece adjacente à nova matriz osteóide sintetizada, tendo limitada atividade replicativa (STEIN et al., 1996). O efeito cumulativo do recrutamento de células tronco e sua expansão e a capacidade funcional de osteoblastos maduros, é medida por taxas de formação óssea in vivo. O segundo passo chave inicia a diferenciação terminal e a saída permanente do ciclo celular. O estágio terminal da linhagem óssea é o osteócito pós-mitótico, frequentemente encontrado isolados no osso, embebido dentro de osteóide maduro ou ainda como um destino alternativo, terminar em apoptose (THOMAS; KANSARA, 2006).

A combinada aplicação de estudos moleculares, bioquímicos, histoquímicos e ultra-estruturais tem definido uma sequência temporal (ou cronológica) de expressão gênica associado com o desenvolvimento do fenótipo de células ósseas em culturas primárias de osteoblastos. O pico de expressão gênica reflete uma sequência de desenvolvimento da diferenciação de células ósseas caracterizadas principalmente por

três principais períodos: proliferação, maturação da matriz extracelular, e mineralização, além de dois pontos de restrição em que as células podem progredir porem não podem passar sem a promoção de certos sinais. A regulação do crescimento celular ósseo e a expressão de genes específicos têm sido examinadas durante a sequência de desenvolvimento e discutido no contexto: que a expressão de oncogênese em osteoblastos que estão em franca proliferação contribui para a supressão de genes expressos pós-proliferação; que a modulação hormonal do gene é dependente do estado de maturação dos osteoblastos; e que a estrutura da cromatina e a presença de nucleossomos contribuem para a organização tridimensional dos genes promotores que suportam a atividade sinérgica e/ou antagonista de mediadores do crescimento e diferenciação óssea (LIAN; STEIN, 1992, 1995; THOMAS; KANSARA, 2006). O processo de formação óssea é, conseqüentemente criticamente dependente da coordenação dos processos de proliferação e diferenciação.

Portanto perturbações dos programas de diferenciação em células tumorais podem resultar em alteração nos processos de sobrevivência celular, crescimento, e proliferação, perda de função especializada, e aquisição de da habilidade de invasão de tecidos vizinhos (HANAHAN ; WEIBERG, 2000). Contudo, alguns aspectos do fenótipo de osteoblastos normais diferenciados são claramente preservados no osteossarcoma, e a habilidade das células tumorais produzirem uma matriz aberrante é crucial para o diagnóstico. A Fosfatase alcalina (ALP), um precoce e não específico marcador de linhagem osteoblástica, é frequentemente vista em tumores ósseos. Em contraste, marcadores tardios da diferenciação de osteoblastos como osteocalcina (OC) é discretamente expressa ou não é expressa na maioria dos casos de osteossarcoma (HOPYAN et al.,1999). Isto sugere que a diferenciação terminal, porém não a diferenciação por si, é contrária a tumorigênese (THOMAS; KANSARA, 2006). Devido

ao programa de diferenciação de osteoblastos ser bem entendido, osteossarcomas representam um excelente modelo para o estudo das relações entre diferenciação e transformação.

Contudo, o desenvolvimento em estágios não pode ser feito definitivamente em células transformadas e em células de osteossarcoma porque a perda do controle do crescimento desconecta a relação existente entre proliferação e diferenciação que são operantes em células diplóides normais. Em contraste, as células normais, a constitutiva expressão de marcadores de diferenciação fenotípicos em células transformadas reflete a ausência dos dois importantes pontos de transição, e consequentemente dos três períodos que caracterizam a sequência de desenvolvimento observada em células diplóides normais (LIAN; STEIN, 1992). A noção de que linhagens comprometidas e diferenciação terminal são estágios chave na tumorigênese tem muitas implicações significantes. Primeiro sugerem que reguladores transcricionais da diferenciação podem ter papel ambivalente na tumorigênese, uma vez que residirá inicialmente sobre o comprometimento da linhagem e expansão, e tardiamente sobre os aspectos terminais da diferenciação. Em segundo lugar provavelmente os mecanismos celulares intrínsecos e extrínsecos estão envolvidos na regulação dos pontos de transição, que podem ser perturbados em cânceres. Em especial, o crescente reconhecimento de que mecanismos autônomos não celulares são críticos para formação dos tumores tem levado à especulação sobre o papel chave de mecanismos epigenéticos (mutação independente) em estados semelhantes a células tronco na tumorigênese. Existem também evidências de que mecanismos epigenéticos também são importantes no segundo ponto de transição para o estado de diferenciação terminal (THOMAS; KANSARA, 2006). Acetilação e desacetilação de histonas alteram a estrutura da cromatina, influenciando a sua interação com o DNA. A acetilação de histonas é regulada por um equilíbrio

dinâmico entre histona acetiltransferase e histonas desacetilase, que determinam o nível de acetilação e o status transcricional da cromatina. Nucleossomos altamente acetilados são geralmente associados com atividade transcricional ativa da cromatina, contudo histonas hipoacetiladas são encontradas nas regiões em que a cromatina está inativa. Histonas desacetiladas são associadas com crescimento celular. Entretanto histonas hiperacetiladas são associadas com a parada do ciclo celular, diferenciação, e/ou apoptose (ROH et al., 2004). O entendimento dos mecanismos biológicos regulatórios que suportam o desenvolvimento no contexto da relação existente entre proliferação/diferenciação provem uma viável base para o entendimento de desordens ósseas e particularmente de células de tumores ósseos, em que estas aberrações nesta relação podem facilitar o diagnóstico e avaliação de uma terapia dirigida (LIAN; STEIN, 1995).

A comunicação celular via junções do tipo gap tem sido associado a processos fisiológicos do tecido ósseo, como por exemplo, na formação, ossificação e remodelação, assim como na proliferação de células osteogênicas (GREEN et al., 1994; LECANDA et al., 1998; DONAHUE et al., 2000; SCHILLER et al., 2001). Estudos desenvolvidos por membros de nossa equipe em nosso laboratório em camundongos knockout para conexina 43, demonstraram retardo no processo de ossificação e diferenciação óssea, e expressão da conexina 45 apenas durante o início processo de ossificação intra-uterino (CHAIBLE et al. 2011). As conexinas também tem sido envolvidas com a carcinogênese. Alterações no perfil de expressão e localização aberrante das Cxs têm sido associadas a oncogênese. Em prévio estudo, observamos a expressão das conexinas, em tecido ósseo normal e neoplásico de cães. Observamos que a conexina 43 apresentava-se disposta em localização aberrante e com níveis de expressão variável entre as células de um mesmo tecido tumoral. Verificamos também a

existência do possível envolvimento da Cx43, 45 e 46 em processos de diferenciação e proliferação do tecido ósseo normal e neoplásico e sua capacidade supressora de tumor é foco de inúmeras revisões na literatura atual sobre tema (MESNIL, 2002; SANCHES, et al., 2009). Em osteossarcomas, foi observado que após transcrição de gene que codifica para Cx43, ocorreu redução na proliferação associado ao aumento dos níveis de inibidor p27, membro da Cip/ Kip envolvidos com o controle do ciclo celular (ZHANG et al., 2001). Outros autores, como Trosko et al., 1993, descreveram aumento na atividade anti- tumoral das conexinas quando induzidas por agentes antineoplásicos como os retinoides.

Muitos compostos são capazes de induzir diferenciação, perda da capacidade proliferativa e perda de oncogenicidade em tumores (RIFKIND et al., 1996). A Arctina um princípio ativo extraído da planta Bardana é um glicosídeo que é rapidamente transformado em Arctigenina (ARC) por bactérias do intestino, inibindo edema induzido na orelha em camundongos (NISHIBE, 1997). O primeiro trabalho científico sobre a bardana (*A. lappa*) foi realizado por Dombradi e Foldeak (1966), a respeito da atividade anti-tumoral dos extratos desta planta. Arctina e arctigenina possuem muitas bio-atividades interessantes e um número de propriedades farmacológicas importantes que incluem: atividade desmutagênica, citotóxica, antiproliferativa, antagonista do fator ativador de plaquetas e de cálcio, indução de diferenciação e anticarcinogênico (LÜ et al., 2007). Matsumoto *et al.* (2006) publicaram um trabalho estudando os efeitos antiproliferativos e apoptóticos das ligninas extraída da bardana em células da leucemia, demonstrando potente ação antiproliferativa das ligninas isoladas sobre células MH60. Porém, apenas recentemente os mecanismos moleculares pelos quais as ligninas exercem seu papel anti-tumoral começaram a ser desvendados. Foi demonstrado que arctina pode inibir o crescimento tumoral através da desfosforilação da proteína

supressora tumoral retinoblastoma em queratinócitos. Foi também sugerido que arctina parcialmente suprime o crescimento tumoral associado com a regulação de expressão da proteína Ciclina D1 em vários tipos celulares como osteossarcoma, tumores de pulmão, carcinomas mama, melanoma, células renais transformadas e células derivadas de câncer de próstata (MATSUZAKI et al., 2008)

Outros princípios ativos derivados de extratos vegetais e que têm potencial associado a propriedades anti-carcinogênicas são os flavonóides. Exemplo disso são as propriedades anti-tumorais da soja que tem sido atribuídas à inibição da proliferação celular pelas isoflavonas da soja. Dentre vários flavonóides, demonstrou-se que a Genisteína (GEN) é um potente inibidor, *in vitro*, interagindo com receptores de estrogênio no envelope nuclear para promover a parada do ciclo celular fase G2/M. Genisteína também mostrou capacidade de induzir diferenciação em osteoblastos, através do aumento e expressão de fosfatase alcalina, proteína morfogenética óssea 2 (BMP2), osteoprotegerina (OPG), e estimular diferenciação de células tronco. Em adição o tratamento de osteoblastos com genisteína, e outras isoflavonas, induz a formação de nódulos ósseos calcificados (NAKAYAMADA et al., 2003; CHEN et al., 2002; JHIA et al., 2003; ZHOU et al., 2003; MORRIS et al., 2006). Genisteína também aumenta a expressão de conexina 43, que apresenta-se localizada na membrana plasmática de linhagem de carcinoma de mama (CONKLIN et al., 2007). Entretanto, os precisos mecanismos pelo qual os flavonoides desempenham suas funções em osteoblastos parecem estar começando a se desvendados (KOOK et al., 2007).

Princípios que alterem a acetilação de histonas como, por exemplo, a Tricostatina A (TSA) têm emergido como uma promessa de estratégia de novos tratamentos em neoplasias, porém seu efeito em células de osteossarcoma permanece incerto. Inibidores de histona desacetilases são conhecidos por causar parada do ciclo

celular nas fases G1 através de alta dependência da regulação de p21/ WAF1; e/ ou G2/M por mecanismos independentes de p53 via Gadd45. Outros aspectos verificados por estes agentes são o de produzirem diferenciação ou apoptose em células de cultura que incluem células humanas de câncer de bexiga, de mama, próstata, pulmão, ovário e de cólon e de leucemia mielóide aguda. Em linhagem de osteoblastos HOS a triacostatina-A aumenta o nível de acetilação de histonas H3 e induzem a apoptose através de mitocôndrias. Tricostatina A originalmente desenvolvida como um agente antifúngico, é um potente agente inibidor de inibidores de histona desacetilase com atividade em baixas concentrações (HIROSE et al., 2003; ROH et al., 2004). Tricostatina-A também pode ter ação em osteoblastos neoplásicos através da regulação de genes associados à resposta a hipoxia ou de angiogênese induzida por hipoxia pela supressão da atividade de HIF-1A que é um fator responsável pela angiogênese via indução de VEGF (YANG et al., 2006).

Como visto, muitas células transformadas possuem retida a capacidade de diferenciação e assim possuem também retida a capacidade de suprimir ou perder as propriedades malignas que caracterizam o câncer. Além disso, os processos de proliferação e diferenciação estão diretamente envolvidos nos processos de desenvolvimento e função óssea. Essas características perfazem a base para o corrente estudo do potencial de indução de diferenciação, como método para o entendimento das alterações envolvidas na transformação celular dos osteossarcomas, assim como na busca de possíveis novas ferramentas que possam auxiliar não só no prognóstico deste tumor, como no desenvolvimento de novas estratégias dirigidas para o seu tratamento. Serão avaliados os processos envolvidos na diferenciação óssea de osteossarcomas, e sua possível correlação com aspectos associados com comunicação intercelular mediada pelas junções do tipo gap, processos de proliferação, invasão e metástase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS:

Os cães utilizados para obtenção das células neoplásicas a serem utilizadas no estudo, foram atendidos no Ambulatório de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Após exames clínicos estes animais foram encaminhados para o serviço de Radiologia do HOVET da FMVZ-USP onde obtiveram diagnóstico sugestivo de neoplasia óssea. Os animais foram então dirigidos para cirurgia de retirada (amputação) da neoplasia. Seguida a cirurgia, a neoplasia foi encaminhada ao Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia (VPT) da FMVZ-USP para coleta de material a ser processado para exames diagnóstico através da histopatologia e para serem submetidos ao estudo em cultura celular.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DE NEOPLASIAS ÓSSEAS

O tecido ósseo alterado foi colhido imediatamente após a cirurgia de retirada (quatro animais). Porções representativas de tecidos foram adequadamente cortadas em fragmentos com 0,5cm de espessura e então fixadas em formol a 10% por 48 horas. Posteriormente foram descalcificados em ácido fórmico a 20% durante uma semana, e depois lavados em água corrente por 5 horas. Após processo de descalcificação, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina. Cortes de 5µm foram obtidos para

serem utilizadas no exame histopatológico e outras eventuais colorações histoquímicas ou imunoistoquímicas (IHC). Outros fragmentos ósseos das mesmas regiões foram imediatamente coletados assepticamente e processados para confecção de cultura celular de osteoblastos neoplásicos de cães (descrição a seguir).

4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA:

Os fragmentos de tecido ósseo neoplásico, após a fixação em formalina a 10%, descalcificação com EDTA, e processamento rotineiro de inclusão em parafina, confecção de lâminas histológicas e coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E), foram observados ao microscópio óptico comum, possibilitando conjuntamente com dados clínicos e radiográficos, um diagnóstico morfológico, e classificação de subtipos, tomando por base a orientação de. Slayter, Boosinger., Pool, Dämmrich., Misdorp e Larsen (1994), *Histological Classification of Bone and joint Tumors of Domestic Animals*, referência associada à Organização Mundial da Saúde.

4.4 CULTURA CELULAR

Linhagens celulares

Os estudos foram conduzidos, utilizando-se de duas linhagens diferentes de osteossarcoma sendo elas: MG63 e CL3. A primeira, adquirida de banco de células comercial, constitui-se de linhagem estabelecida de osteossarcoma humano. A segunda (CL3) foi desenvolvida e estabelecida em nosso laboratório como descrito a seguir.

Desenvolvimento, estabelecimento e caracterização da linhagem celular de osteossarcoma canino

Após cirurgia de retirada (amputação) realizada no setor de Cirurgia do HOVET da FMVZ-USP, o material foi encaminhado ao Laboratório de Oncologia Experimental e Comparado do VPT da FMVZ-USP, onde fragmentos representativos foram coletados assepticamente e colocados em placas de cultura contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium - Gibco®) associado à penicilina (100 unid/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Anti-anti - Gibco®). Os fragmentos foram então levados a um fluxo laminar onde foram lavados em PBS (tampão fosfato-salino) e cortados em pedaços menores (2-3mm), e então colocados em garrafas de 75cm² (Corning® CellBIND® Surface) contendo meio de cultura DMEM (Gibco®), o qual foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS-Gibco®), Anti-anti (Gibco®). Os cultivos celulares foram mantidos em estufa de CO₂ com atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada dois a três dias. Chegada à confluência, as células foram tripsinizadas (GIBCOtrypsin 0,5% - Gibco®), e então subdivididas para novas garrafas ou então estocadas em nitrogênio líquido. Estas passagens foram realizadas a cada dez a quatorze dias não ultrapassando 24 passagens. Após o estabelecimento da cultura celular seguiu-se a caracterização celular, através de marcadores de ósseos realizados a partir de reações de IHC e ensaios de citometria de fluxo para avaliação de ploidia celular (descrição a seguir). A cada neoplasia colocada em cultura foi dado um nome referente ao número do animal seguindo a ordem de coleta em: CL1 (animal 1/tumor um), CL2, CL3 e CL4.

Congelamento e descongelamento de células

As células a serem congeladas foram inicialmente lavadas com PBS, e então tripsinizadas por 10 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Depois de verificado o destacamento celular ao microscópio, as células foram coletadas e em seguida adicionou-se meio de cultura DMEM com 10% de FBS para a inativação da tripsina. A suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos a 1200rpm. Terminada a centrifugação, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM. Uma alíquota foi coletada e contada automaticamente no contador automático de células (Countess™- Life Technologies), e a concentração ajustada para 10⁶ células/ml com a mistura de congelamento (10% DMSO + 90% Suspensão de células em FBS). A suspensão já com DMSO foi alíquotada em criotubos (Corning®) devidamente identificados, e estes, foram acondicionados em reservatório próprio para congelamento (Mr Frosty, Nalgene) e então colocados em freezer a -80°C. Depois de congelados os criotubos foram retirados rapidamente do freezer e colocados em tambor contendo nitrogênio líquido até o momento de sua utilização.

O descongelamento foi realizado sempre que necessário, retirando-se o criotubo do tambor de nitrogênio, e colocado em banho-maria a 37°C. Uma vez descongelado à suspensão de células, foi adicionado meio DMEM com FBS sendo então centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. Após centrifugação as células foram então ressuspensas em meio DMEM com 10% de FBS e então colocados em frascos próprios Corning® CellBIND de 25cm² para o início do crescimento celular prévio aos experimentos.

Curva de crescimento células de osteossarcoma canino

Optamos por utilizar o método do cristal violeta (4 - [(4 dimetilaminofenila)-metil-fenil]-N, N-dimetil anilina), a fim de uma análise inicial da proliferação das células de osteossarcoma canino CL3. Para obtenção da curva de crescimento, garrafas com células em confluência (monocamada) foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de noventa e seis poços com fundo chato, estéril ultra low attachment (Corning®), em quadruplicadas, 100 µL por poço, na concentração de 5×10^6 células/mL e colocadas em estufa de CO₂ com atmosfera umidificada e 5% de CO₂ a 37°C pelos seguintes períodos de tempo: 24, 48 e 72 horas. Ao final de cada período as células foram coradas com cristal violeta durante dez minutos. Os núcleos de células viáveis incorporaram o corante. As placas foram então lavadas em água corrente. Quando todas as placas foram lavadas e secas, 100µL de metanol foram adicionados ao cristal violeta incorporado às células solubilizando-o e a densidade óptica pode ser lida em espectrofotômetro Multiskanex © (Uniscience), software Ascent Software © (leitor de ELISA), com o comprimento de onda de 620 nm.

4.5 OBTENÇÃO DE CULTURA EM TRÊS DIMENSÕES

Com o objetivo de obtenção de um modelo mais próximo ao modelo animal, utilizou-se de placas e garrafas com o tratamento Ultra low attachment (Corning®). Tais reservatórios propiciam a formação de cultura celular em três dimensões, por não permitir a adesão das células dos tumores a serem avaliadas, fazendo que as células unam-se em pequenos agrupamentos celulares e se formem os chamados “esferoides.” Então, antes de cada experimento, osteoblastos neoplásicos foram descongelados e cultivados em frascos de 75cm² (Corning® CellBIND® Surface) que propiciam adesão

celular. Após o período de crescimento celular em monocamada, as células foram lavadas com PBS, em seguida tripsinizadas e centrifugadas, e então colocadas em garrafas ou placas com superfície Ultra low attachment (Corning®) por 12 horas para formação dos esferoides. Todos os experimentos relacionados a seguir foram realizados após a formação dos esferoides, que após o período de tratamento, foram coletados e a seguir trabalhados da forma mais adequada para cada técnica.

4.6 AGENTES INDUTORES DE DIFERENCIAÇÃO

Nos experimentos foram utilizados três diferentes compostos químicos no intuito de avaliação da possibilidade de indução do processo de diferenciação celular em cultura celular: Arctigenina com pureza maior que 99% (Tocris Bioscience – 1777/50MG), Genisteína com pureza ~ 98% HPLC (Sigma Aldrich - G6776-10MG), Arctigenina (Sigma Aldrich – T1952-200UL). Depois de terminado os ensaios de viabilidade celular foram escolhidos as doses de trabalho para os outros experimentos, sendo elas: ARC-200 μ M, GEN-100 μ mol/L e TSA-200nM. Todos os compostos químicos foram diluídos em solução de estoque em Dimetilsulfóxido (DMSO). As concentrações de uso de DMSO utilizados para cada composto foram: ARC- 0,222%, GEN-0,135% e TSA-0,004% (v/v).

4.7 CURVA DE VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS AGENTES INDUTORES

Para obtenção da curva de sensibilidade celular aos diferentes agentes escolhidos (GEN, ARC, TSA), garrafas com células em confluência foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de noventa e seis poços com fundo chato, estéril Ultra low attachment (Corning®), em quadruplicatas, 100 µL por poço, na concentração de 5×10^6 células/mL para formação de esferoides e então colocadas em estufa de CO₂ com atmosfera umidificada e 5% de CO₂ a 37°C por vinte e quatro horas. Após este período, quatro diferentes concentrações de cada um dos agentes foram adicionadas. As placas foram incubadas durante os seguintes períodos de tempo: 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Ao final de cada período as células foram coradas com cristal violeta durante dez minutos e lavadas em água corrente. Quando todas as placas foram lavadas e secas, foi adicionado 100 µl de álcool metílico a cada pocinho e a densidade óptica pode ser lida em espectrofotômetro Multiskanex © (Uniscience), software Ascent Software © (leitor de ELISA), com o comprimento de onda de 620 nm.

4.8 ENSAIO DE MTT

Para determinar o efeito do tratamento, a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o ensaio MTT baseado na metabolização dos sais de tetrazolium (3-)4,5-dimethylthiazol-2-(yl)-2,5-(diphenyl tetrazolium bromide) pelas mitocôndrias de células metabolicamente ativas, nos tempo de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. As células foram tratadas com concentrações variando de acordo com o princípio ativo a ser

avaliado. Após cada tempo de incubação com os princípios ativos, foi adicionado 10 µl/poço de MTT (5mg/ml) para 100 µl de meio. A placa foi então incubada em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C, por 4 horas. Foi adicionado então 100 µl de solução DMSO em cada poço. Quinze minutos depois após este procedimento, a densidade óptica pode ser lida em espectrofotômetro Multiskanex © (Uniscience), software Ascent Software © (leitor de ELISA), com o comprimento de onda de 620 nm.

4.9 CITOMETRIA DE FLUXO

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickison [BD] Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Machintosh Apple, CA, USA), sendo os eventos adquiridos por meio de um programa denominado Cell Quest Pro® (Becton Dickison [BD] Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – *Foward Scatter* e SSC – *Side Scatter* que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As fluorescências do reagente Nucview 488 e do isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram detectadas pelo filtro FL-1 (530 nm) e do iodeto de propídeo (PI) foi detectada pelo filtro FL-2 (585 nm). Todos os dados foram analisados através do programa FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, USA), sendo as populações de interesse em cada experimento selecionadas por meio de *gates*, excluindo assim outros tipos celulares das amostras. Além disto, quando necessário o aparelho foi compensado com um tubo branco como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

Ploidia celular

Para avaliar a ploidia celular por citometria utilizou-se como padrão de células diploides as células mononucleares isoladas de sangue canino, as quais foram separadas por gradiente de densidade e centrifugação utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences) segundo as normas do fabricante. O sangue utilizado foi conseguido de cão saudável da raça Beagle, sendo coletado de forma asséptica no ambulatório médico do HOVET-USP. Resumidamente, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de seis poços com fundo chato, estéril *Ultra low attachment* (Corning®), em triplicatas, 1 mL por poço, na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL. A definição desta concentração baseou-se em dois fatores, o primeiro ser 10^6 células a concentração mínima exigida pela técnica e o segundo minimizar a redução do número de células devido ao tratamento ou da metodologia pós-tratamento. As culturas celulares ($n = 3$ amostras/grupo) destinadas ao tratamento foram incubadas por 7 dias, em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C com os respectivos tratamentos. Após os tratamentos, as células foram ajustadas para 1×10^6 células e fixadas em 1 mL de etanol 70% gelado, sendo mantidas a -20°C até o momento da análise por citometria de fluxo. Para análise as células foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS (1800 rpm/10 min) e, em seguida, incubadas em 200 µL solução de PI [20 µg/mL de iodeto de propídeo (Fluka - Sigma Aldrich), 200 µg/mL RNase A (Invitrogen™) e 0,1% triton X-100 (v/v) em PBS] por 15 min a 37°C. Após esta etapa, foram adquiridos 10000 eventos das células de interesse em cada amostra em um citômetro FACS Calibur equipado com o programa Cell Quest Pro® (Becton Dickison [BD] Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). Todos os dados foram analisados pelo programa FlowJo, sendo os dados de ploidia foram determinados pelo DNA index, conforme as normas da BD, no qual a intensidade média de fluorescência (MFI) das células na fase G0/G1 de cada amostra é

dividida pela MFI das células padrão diploide da mesma espécie. Assim, quando o DNA index = 1 as células avaliadas são consideradas diploides, porém quando este resultado é diferente de zero elas são classificadas como aneuploides, sendo haploides ($=0,5$), hipodiploides (<1), hiperdiploides (>1) e tetraploides ($=2$).

Avaliação de apoptose pela detecção de caspase 3 ativada

Para análise de morte celular por apoptose foi realizado o ensaio do Nucview (Biotium Hayward, CA) segundo as recomendações do kit. Depois do tratamento com os agentes químicos escolhidos as células cultivadas em triplicata em placas de 24 poços com superfície Ultra low attachment (Corning®) por 7 dias foram coletadas, tripsinizadas e centrifugadas. As células foram então ressuspensas em PBS em uma densidade de 10^6 células/mL. Para o controle, foram utilizadas células tratadas com Ac-DEVD-CHO do kit. Foram adicionados 5 μ L de substrato Nucview 488 da solução de estoque aos tubos com as amostras a serem avaliadas, obtendo uma concentração final de 5 μ M deste substrato. As células foram incubadas por 15 - 30 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao final foram adicionados 300 μ L de PBS e a leitura da fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur equipado com o programa Cell Quest Pro® (Becton Dickison [BD] Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). Os dados foram expressos como porcentagem de células caspase 3⁺.

Avaliação da proliferação celular pela incorporação de BrdU

O ensaio de bromodeoxiuridina (BrdU) foi realizado segundo Rothausler e Baumgarth (2005) com algumas modificações. Após 7 dias com os tratamentos, os esferoides em placas de 24 poços de fundo chato estéril *Ultra low attachment*

(Corning®) foram incubados com 100µM de BrdU (Sigma Aldrich - B5002-1G) por 2 horas, em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C. Passados os 120 minutos, o meio foi removido e as células lavadas com PBS e, em seguida, tripsinizadas por 15 min em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram então centrifugadas a 1200rpm/10 min. O sobrenadante foi descartado e a concentração celular foi ajustada para 10⁶ células/mL e fixadas por 30 minutos em solução de fixação (Paraformaldeído 4%, pH 7,6 acrescido de 1% de Triton X-100, pH 7,4 - 7,6) a 4°C. Foram realizadas então três lavagens com PBS, seguida de centrifugação a 2000rpm por 5 min., entre cada lavagem. As células foram permeabilizadas com solução de permeabilização (1% de Triton X-100 em PBS dissolvida em solução HEPES 0,01M na proporção 1:10) por 10 min. seguidas de três novas lavagens em solução de lavagem (0,5% de Triton X-100 dissolvidos em solução de HEPES 0,01M) e nova centrifugação. Depois de centrifugadas as células foram colocadas em solução de congelamento (Meio de cultivo, acrescido de 10% de SFB inativado e 10% de DMSO) a -80°C, por 12h, para permeabilizar a membrana nuclear. Depois de descongeladas em banho-maria a 37°C, os osteoblastos foram lavados e centrifugados. Foram então incubados com anticorpo primário anti-BrdU (Anti-BrdU – GE Healthcare-Amersham – RPN202) por 1 hora a temperatura ambiente seguidos de três lavagens em PBS e centrifugação a 2000 rpm por 5 min., entre cada lavagem. Por fim as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (GE Healthcare-Amersham – N1031) por 30 min., a temperatura ambiente, no escuro, lavadas e ressuspensas em PBS para os dados serem adquiridos por citometria de fluxo. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur equipado com o programa Cell Quest Pro® (Becton Dickison [BD] Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). Foram adquiridos e analisados

10.000 eventos por amostra. Os dados de proliferação foram expressos como porcentagem de células BrdU⁺.

4.10 ENSAIO DE INVASÃO E METÁSTASE ATRAVÉS DE TÉCNICA DO TRANSWELL

Para verificar a existência de alterações nos mecanismos de invasão e metástase, optou-se pela técnica do Transwell, a qual permite avaliar a capacidade de locomoção e degradação de matriz extracelular em um único experimento. Para tal, células foram tripsinizadas de garrafas de 75cm² (Corning® CellBIND® Surface) e então colocadas em placas de 24 poços com superfície Ultra low attachment (Corning®), em triplicatas em uma concentração de $3,0 \times 10^6$ células/poço. Esperou-se então 24 horas para a formação dos esferoides. Depois de formados os esferoides deu-se início ao período de tratamento de sete dias com os três agentes (ARC, GEN e TSA). Após este período, as células (esferoides) foram coletadas e colocadas em uma segunda placa de 24 poços possuindo insertos (3533504 – BD Falcon™ 24-well) para a técnica de transwell propriamente dita, como descrito a seguir. No sexto dia de tratamento dos esferoides, em uma segunda placa estéril, foram colocados os insertos, os quais possuem uma membrana na parte inferior contendo poros de 8µm de diâmetro. Uma vez colocados os insertos na placa de 24 poços, seguiu-se o preparo do matrigel (BD Matrigel™) em uma proporção 1: 20 em meio DMEM gelado e sem adição de FBS. Colocou-se então 100µL deste preparado em cada um dos insertos. A placa então foi colocada em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C, por 24 horas para o endurecimento do gel. Depois deste período (24 horas do Matrigel e sete dias de

tratamento) os esferoides foram transferidos para os insertos já com matrigel endurecido, em 100µL de meio de cultura DMEM sem a adição de FBS. No poço, abaixo de cada inserto contendo os esferoides, foram adicionados 750 µL de meio de cultura DMEM acrescido de 10% FBS para agir como quimioatrativo. Aguardados 48 horas, os insertos foram coletados e então lavados em tampão (PBS), seguido de fixação com paraformaldeído a 4% por três minutos. Os insertos foram lavados novamente por duas vezes, e colocados à exposição com álcool metílico por 20 minutos seguido de nova lavagem e coloração com Giemsa por 15 minutos. Depois de coradas e lavadas, as células que aderiram ao fundo, do lado de dentro do inserto, foram removidas com atrito mecânico com a utilização de swab. O inserto foi levado então a uma lupa Olympus SZX7, na qual, as células emigradas que se localizavam no fundo do lado de fora, foram fotografadas e contadas. A porcentagem de invasão foi medida pela razão entre a média de células emigradas através do matrigel e do inserto pela média de células emigradas através do inserto controle. O índice de invasão foi conseguido pela razão entre as porcentagens das células testadas pela porcentagem de invasão das células controle.

4.11 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para a transcrição reversa, 1,5ug do RNA total tratado com DNase foram acrescidos de 1 uL de dNTP (mix 10mM – 2,5 mM de cada dNTP) e 1uL de Oligo DT e incubado a 65°C por 5 minutos. Foi adicionado em seguida, quatro uL de buffer 5x, 2uL DTT 1M e 1uL de RNase OUT e incubado por 2 minutos a 42°C. Acrescentou-se então 1UI de superscript III, incubando-se por 50 minutos a 42°C, seguido de incubação por 15 minutos a 70°C. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação

do cDNA. Todos os reagentes e enzimas utilizados são provenientes da Invitrogen (Life Technologies).

4.12 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL TAQMAN

O RT-PCR foi realizado em aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, USA). Os primers foram utilizados na concentração final de 0,9mM e as sondas, na concentração de 0,25mM. Os ciclos e condições para amplificação do cDNA foram determinados pelo ABI Prism Sequence Detection Systems. O número relativo de cópias dos RNAm de cada amostra foi calculado com base nos seus valores de C_t comparados com o grupo T0. O número relativo de cópias dos RNAm foi normalizado ao do 18S e GAPDH (genes de controles endógenos), sendo que o gene 18S (fluoróforo VIC) foi amplificado na mesma reação que os genes de interesse e o GAPDH (todos utilizando fluoróforo FAM), reações duplex. A análise final da expressão relativa dos genes foi realizada segundo o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001).

4.13 COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS

Após o tratamento com os agentes escolhidos, os esferoides em cultura celular em três dimensões, foram coletados e fixados em paraformaldeído a 4% por 12 horas. Em seguida os esferoides foram lavados em água destilada por 45 minutos e em seguida levados para banhos subsequentes de álcoois 70, 85, 95, seguidos de isopropanol, todos durante 45 minutos cada. Após o último banho de álcool isopropílico os esferoides foram colocados em três banhos de parafina com duração de 45 minutos, 12 horas, e 15

minutos subsequentes, então emblocados em parafina. Os blocos foram então cortados em micrótomo em cortes de espessura de 5µm, seguida de colorações histoquímicas (Nitroazul tetrazolio/5-bromo-4cloro-3índol fosfato, Tricômico de Masson e Van kossa) e imunohistoquímicas (Conexina 43, osteocalcina, osteonectina e osteopondina).

Teste de Nitroazul tetrazolio/5-bromo-4cloro-3índol fosfato (NBT/BCIP)

Osteoblastos possuem alta atividade de fosfatase alcalina. Então, para verificar a atividade de fosfatase alcalina nas células da linhagem estabelecida (CL3), foi realizado o teste com NBT/BCIP. BCIP é utilizado em conjunto com NBT como um método colorimétrico para detecção de atividade de fosfatase alcalina. NBT / BCIP é um substrato de ALP, a qual sofre uma reação de oxidação / redução, após desfosforilação pela enzima, resultando num produto precipitado insolúvel azul escuro depois da reação de redução. Então para a caracterização dos osteoblastos e verificar a existência de atividade de fosfatase alcalina nestas células após os tratamentos, seguiu-se a coloração de NBT/BCIP. Aos esferoides, momentos antes de sua coleta, foram adicionados 100µl de NBT/BCIP e incubados durante 15 minutos. Após incubação as células foram coletadas, fixadas e processadas em blocos de parafina. Foram realizados então os cortes histológicos e coloração de fundo com Eosina, desidratação diafanização e montagem da lamina com resina e lamina.

Tricômico de Masson

A coloração do Tricômico de Masson é utilizada para verificação da deposição de matriz extracelular pelas células neoplásicas. Tem como resultado positivo para o colágeno na cor azul e vermelho para o citoplasma e fibras intercelulares. Então, os

esferoides laminados foram desparafinados, hidratados e em seguida lavados em água corrente durante 5 minutos. Depois de lavadas as laminas contendo os esferoides tratados foram Incubados em solução de Bouin (Solução saturada de Ácido Pírico 75 ml + Formaldeído puro 25 ml + Ácido Acético Glacial 5 ml) por 60 minutos a 60°C. Após este período foram lavados em água corrente e depois em água destilada e incubação com solução de Hematoxilina Férrica de Weigert* (da Solução A [Hematoxilina 1 g + Álcool 95% 100 ml] + Solução B [Solução aquosa de Cloreto Férrico a 29% - 4 ml + Água destilada 95 ml + Ácido Clorídrico Concentrado 1 ml]) por 10 minutos. Nova lavagem em água corrente por 10 minutos e nova passagem em água destilada. Os esferoides foram corados pela solução de Escarlate de Biebrichm(Solução aquosa de Escarlate de Biebrich 1% - 90 ml + Solução aquosa de Fucsina Ácida 1% 10 ml + Ácido Acético Glacial 1 ml) por 5 minutos com nova passagem pela água destilada. A seguir os esferoides foram diferenciados pela solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico (Ácido Fosfotúngstico 2,5 g + Ácido Fosfomolibdico 2,5 g + Água destilada 100 ml) durante 10 a 15 minutos seguidos de passagem por água destilada. As laminas foram então coradas pela solução de Azul de Anilina (Azul de Anilina 2,5 g + Ácido Acético Glacial 2 ml + Água destilada 100 ml) durante 5 a 10 minutos com nova lavagem em água destilada ao final deste período e passagem pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos seguidos novamente de água destilada. As laminas coradas foram finalmente desidratadas diafanizadas e montadas em resina.

* Solução de trabalho: colocados na hora do uso partes iguais da solução A e B.

Von Kossa

A coloração histoquímica de Van Kossa foi utilizada para evidenciação de possível deposição de cálcio pelas células neoplásicas após os tratamentos. Os esferoides laminados foram desparafinados, hidratados e lavados por 3 vezes em água destilada. Em seguida foram incubados com solução de Nitrato de prata 5% (Nitrato de Prata 5 g + Água destilada 100 ml), sob luz Ultra-violeta por 20 minutos. A seguir foram lavadas em água destilada, e incubadas em solução de tiosulfato de Sódio 5% (tiosulfato de Sódio 5 g + água destilada 100 ml) por 5 minutos para retirar a Prata livre seguida de nova lavagem em água destilada. Depois de lavadas as laminae foram contra-coradas pela solução de Safranina (Safranina 0,1 g + Ácido Acético Glacial 1 ml + Água destilada 99 ml) por 5 minutos. Finalmente foram rapidamente desidratadas, diafanizadas e montadas em resina.

4.14 IMUNOISTOQUÍMICA

Os cortes laminados dos esferoides foram desparafinados em xilol e hidratados em sequência de álcoois (absoluto, 95% e 70%) e água destilada. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação, por 30 minutos, em solução contendo 80% de álcool metílico e 20% de peróxido de hidrogênio 30 volumes. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários por uma noite, em câmara úmida. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-osteocalcina (monoclonal de camundongo – ab13421, 1:10), anti-osteopontina (policlonal de coelho – ab8448, 1:1000), anti-osteonectina (policlonal de coelho – ab135601, 1:100). Como anticorpo secundário foi utilizado o kit LSAB

(DakoCytomation); assim, os cortes foram incubados com solução contendo pan-anti-imunoglobulina (anti-coelho + anti-camundongo + anti-cabra) por 30 minutos, sendo então lavados 3 vezes com PBS. Em seguida, incubados com solução contendo complexo estreptavidina-peroxidase (kit LSAB), por 30 minutos, sendo então lavados 3 vezes com PBS. A revelação foi realizada aplicando-se sobre os cortes, 50µL de solução de DAB (diaminobenzidina, SIGMA®) a 0,05% em PBS. Imediatamente antes da utilização, foram acrescentados 0,75 µL de peróxido de hidrogênio 30 volumes por ml da solução cromógena. Em seguida as lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS e 1 vez com água destilada, contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 1 minuto, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina sintética e lamínula.

4.15 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e hidratados em sequência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e finalmente água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão próprio EDTA (pH 6,0) EDTA associado a TRIS em forno de microondas na potência máxima por 20 minutos. A peroxidase endógena, bloqueada por incubação, por 30 minutos, em solução contendo 80% de álcool metílico e 20% de peróxido de hidrogênio 30 volumes. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes. Para a marcação foram utilizados os anticorpos primários anti-Cx43 (Zymed®, 1:500) incubados em câmara úmida, 4°C por 12 horas em solução de bloqueio do *kit* TSA (Tyramide Signal Amplification, PerkinElmer™ Life Science, Inc). Os cortes foram incubados com anticorpos secundários anti-imunoglobulinas de coelho biotinizados (DakoCytomation, 1:200), seguindo-se a conjugação com o

complexo estreptavidina-HRP (1:100) e tiramida (1:50) do *kit* TSA. Por fim, seguiu-se à incubação com iodeto de propídeo (Sigma®, 1:1000), para marcação nuclear, e montados sob lamínula com Vectashield (Vector®) para evitar o esgotamento de fluorescência. As imagens foram obtidas em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de epi-fluorescência.

4.16 ANÁLISE CAPTURA DE IMAGENS (LAMINAS DE HISTOQUÍMICA, IMUNOISTOQUÍMICA E IMUFLUORESCÊNCIA)

As imagens digitais, das amostras de esferoides neoplásicos, foram obtidas através do microscópio Nikon E-800 (equipado com sistema de epi-fluorescência) acoplado ao Sistema de Análise de Imagens Computadorizado (Image Pro-plus) do Laboratório de Oncologia Experimental da FMVZ-USP.

5 RESULTADOS

5.1 ANIMAIS E TECIDOS ÓSSEOS NEOPLÁSICOS UTILIZADOS

Animais utilizados no estudo e a coleta de tecido neoplásico

Para realização dos estudos de diferenciação óssea em osteossarcomas foram utilizados quatro cães (Quadro 1) oriundos do HOVET da FMVZ-USP. Os animais escolhidos foram todos aproveitados não tendo nenhuma restrição a sua utilização no projeto. Todos os animais incluídos no estudo possuíam moléstia neoplásica com acometimento do esqueleto apendicular. O osso lesionado em todos os casos foi o Úmero, em uma mesma região (região proximal). Também possuíam o mesmo tipo e subtipo de neoplasia. Porém as características morfológicas macroscópicas de cada um foram ligeiramente diferentes, tais como presença e quantidade de necrose e osteólise associados, consistência da massa tumoral, quantidade de reação periosteal, presença de fratura patológica, e etc. Tais características ficam melhor evidenciadas no quadro 1 e nas figuras 1 e 2 .

Quadro 1: Dados Gerais dos animais incluídos no projeto e classificação dos tumores coletados no período de outubro de 2009 a outubro de 2010

NºANIMAL/Nº PRONTUÁRIO	RAÇA	IDADE	SEXO	OSSO ACOMETIDO	DATADA CIRURGIA	TIPO DE NEOPLASIA	CLASSIFICAÇÃO	SUBTIPO
1/203646	Golden Retriever	9 anos	Fêmea	Úmero proximal direito	25/08/2009	Mesenquimal	Osteosarcoma	Osteoblástico produtivo
2/204362	SRD	13 anos	Fêmea	Úmero proximal direito	02/10/2009	Mesenquimal	Osteosarcoma	Osteoblástico produtivo
3/207774	Fila Brasileiro	7 anos	Fêmea	Úmero proximal direito	23/03/2010	Mesenquimal	Osteosarcoma	Osteoblástico produtivo
4/207610	Rottweiler	9 anos	Fêmea	Úmero proximal esquerdo	24/03/2010	Mesenquimal	Osteosarcoma	Osteoblástico produtivo

Figura 1: Macroscopia de membro torácico, amputado devido à formação neoplásica em Úmero proximal. Note o aspecto necrótico hemorrágico associado tendo como consequência a fratura patológica. Osteossarcoma osteoblástico produtivo

Figura 2: Corte longitudinal de Úmero mostrando o acometimento ósseo por osteossarcoma. Note o comprometimento do canal medular (seta azul) pela neoplasia e a intensa reação periosteal associada (seta branca)

Classificação histopatológica

Após retirada cirúrgica dos quatro tumores estes foram processados e laminados. De acordo com a *Histological Classification of Bone and Joint Tumors of Domestic Animals*, referência associada à Organização Mundial da Saúde, os tumores ósseos coletados foram classificados como indicado no quadro 1. Embora classificados com o mesmo tipo e subtipo tumoral, pode-se verificar que existe diferença em relação à capacidade de produção de matriz osteóide, o que pode ser apurado pela diferença entre as quantidades desta matriz depositada nos tecidos analisados (Figuras 3 a 6).

Figura 3: Osteossarcoma osteoblástico produtivo (ref. ao animal N°1). Moderada produção de osteóide a partir de vasos sanguíneos. Objetiva - 10X

Figura 4: Osteossarcoma osteoblástico produtivo (ref. ao animal N°2). Discreta a moderada produção de osteóide. Objetiva 10x

Figura 5: Osteossarcoma osteoblástico produtivo (ref. ao animal nº3). Intensa produção de matriz osteóide. Objetiva de 10x

Figura 6: Osteossarcoma osteoblástico produtivo (ref. ao animal de nº4). Note a presença de produção de osteóide de forma irregular. Objetiva: 10x

5.2 CULTURA CELULAR

Como descrito anteriormente os estudos foram realizados com duas linhagens celulares de osteossarcoma: a linhagem MG63 (linhagem humana) e a CL3 (linhagem estabelecida no Laboratório de Oncologia Experimental do VPT-USP).

Desenvolvimento e estabelecimento de linhagem de osteossarcoma canino CL3

Depois de realizada a cirurgia de retirada dos tecidos ósseos alterados, estes foram postos em cultura celular e identificados segundo a ordem de coleta (Quadro 2). Para desenvolvimento da linhagem foi utilizado de passagens consecutivas. Dos quatro tumores primários colocados em cultura celular apenas um gerou uma linhagem estabelecida após 21 passagens: o tecido neoplásico referente ao animal de número três (figura 7).

Quadro 2: Identificação das linhagens celulares de osteossarcoma

nºAnimal/nº prontuário	Nome da linhagem celular
1/203646	CL1
2/204362	CL2
3/207774	CL3
4/207610	CL4

Figura 7: Cultura celular de osteossarcoma canino (ref. ao animal de nº3). A) Cultivo celular de osteossarcoma após quatro passagens. B) Cultivo celular após 21 passagens. Seleção de células tumorais de osteossarcoma

Caracterização da linhagem estabelecida de osteossarcoma canino

Depois de estabelecida, a linhagem de osteossarcoma (CL3) proveniente de tumor espontâneo canino foi submetida à caracterização fenotípica. Para isso, foram avaliadas não somente a expressão de marcadores ósseos, mas também a capacidade de formação de esferoides, dados de proliferação e dados de ploidia celular.

Com a finalidade de estudar a proliferação celular nas células oriundas de osteossarcoma, escolhemos a técnica de incorporação pelo Cristal violeta. As células tumorais em suas primeiras passagens (OSA1) foram comparadas com as mesmas células após 21 passagens (OSA2). Conforme o gráfico 1, se pode observar que após seleção da linhagem (CL3) através de passagens, as células aumentaram discretamente o índice de crescimento celular quando comparadas as mesmas células em suas primeiras passagens no período avaliado.

Gráfico 1: Curva de crescimento celular. Crescimento discretamente maior foi observado após seleção das células tumorais através de passagens

Com o intuito de avaliar a ploidia celular da linhagem estabelecida CL3 foi realizado o exame através de citometria de fluxo. Foi encontrado predominância de um perfil hipodiploide nas diferentes amostras avaliadas (Quadro 3). Expostos abaixo estão os dados de referência fornecidos pela BD Biosciences para análise de ploidia celular (Quadro 4).

Quadro 3: DNA index. Análise de ploidia celular encontrada nas diversas amostras testadas da linhagem celular estabelecida de osteossarcoma canino CL3. O quadro mostra a predominância de células hipodiploides

DNA Index	
0,54	0,655
0,525	0,53
0,62	0,635
0,585	0,575
0,62	0,63
0,535	0,63
0,59	0,4675
0,615	0,54
0,55	1,025

Quadro 4: Referência de valores estimados para análise de ploidia (BD Biosciences)

Ploidia	DNA index
Diploide	=1.0
Aneuploide	≠1.0
Hiperdiploide	>1.0
Tetraploide	2.0
Hipodiploide	<1.0
Haploide	0.5

Como citado a linhagem celular de osteossarcoma foi testada em sua capacidade de formação dos esferoides. As células foram capazes de formar esferoides nos quais se verificou também a capacidade de produção e deposição de matriz extracelular em lamina coradas em H & E e confirmadas pelo Tricrômico de Masson (figura 8).

Figura 8: Análise da arquitetura celular em três dimensões. Os osteoblastos neoplásicos demonstraram capacidade de formação dos esferoides e retida capacidade de deposição de matriz extracelular colagenosa que na fotomicrografia se apresenta de coloração rósea em A e azulado em B. A) Hematoxilina e Eosina. B) Tricrômico de masson. Barra = 40 μ m

Para uma caracterização fenotípica das células em cultura e o descarte da possibilidade de contaminação por outras linhagens celulares que não a osteoblástica, foram realizadas reações imunoistoquímicas da linhagem celular estabelecida. Foram escolhidos três marcadores ósseos: Osteopontina, osteocalcina e osteonectina com resultado positivo encontrado na linhagem CL3 (figura 9).

Figura 9: Imunofenotipagem da linhagem estabelecida do osteossarcoma canino CL3. Marcação positiva para os três marcadores escolhidos. Barra = 40 μ m

Foi realizada também a coloração histoquímica de NBT/BCIP para verificar a expressão e atividade de fosfatase alcalina, com resultado positivo para a linhagem estabelecida (Figura 10).

Figura 10: Atividade de fosfatase alcalina na linhagem estabelecida CL3. Presença de agregados azulados mostrando resultado positivo para atividade de fosfatase alcalina nos osteoblastos neoplásicos caninos. Barra = 40 μ m

5.3 ESTUDOS DE ASPECTOS LIGADOS À DIFERENCIAÇÃO CELULAR INDUZIDA

Após o estabelecimento e caracterização da linhagem de osteossarcoma canino CL3, foi dado início aos trabalhos com os agentes químicos (ARC, GEN e TSA) escolhidos para o estudo de alguns aspectos associados ao processo de Diferenciação induzida. Inicialmente ambas as linhagens foram cultivadas em monocamada até atingir o número necessário para realização dos estudos propriamente ditos. A seguir as células foram colocadas em garrafas ou placas especiais para formação dos esferoides em cultura celular em três dimensões. Os resultados descritos a seguir são referentes aos estudos realizados em cultura celular em três dimensões.

Viabilidade celular após exposição aos agentes indutores

A fim de identificarmos uma melhor dosagem de trabalho para indução de diferenciação celular, escolhemos inicialmente verificarmos a viabilidade celular após a exposição a cada um dos agentes escolhidos (ARC, GEN e TSA). Optou-se então, pela técnica de incorporação pelo cristal violeta seguido do ensaio com MTT.

As células das duas diferentes linhagens sendo elas CL3 e MG63 foram tratadas com quatro diferentes dosagens de cada um dos compostos, durante cinco períodos de tempo (24, 48, 72, 96 e 120 horas respectivamente). De uma maneira geral todos os compostos parecem inibir o crescimento celular em cultura, assim como diminuir a viabilidade celular de uma forma dose-dependente (Gráficos 2 e 3).

Gráfico 2: Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade in vitro na linhagem desenvolvida C13.
Diminuição da viabilidade celular dose dependente com o passar do tempo

Gráfico 3: Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade in vitro na linhagem MG63.

5.4 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELA INCORPORAÇÃO DE BRDU

A análise de proliferação por incorporação de BrdU foi feita pelo programa FlowJo 7.6.4® conforme ilustrado a seguir na figura 11 e gráfico 4. .

Figura 11 e Gráfico 4 : Porcentagem de células em proliferação BrdU⁺. Análise de células em proliferação pela incorporação de Brdu **(acima)** **A.** Linhagem CL3. **B** Linhagem MG. Em vermelho são apresentadas as medianas das triplicatas de cada tratamento(abaixo)

5.5 ANÁLISE DE MORTE CELULAR – TESTE DO NUCVIEW

A análise de morte celular por apoptose devido ativação de caspase 3 foi feita pelo programa FlowJo 7.6.4® conforme ilustrado a seguir na figura 12 e gráfico 5.

Figura 12 - Sobreposição de histogramas mostrando a fluorescência do reagente Nucview 488 ativada pela ação da enzima caspase 3

Gráfico 5 – Porcentagem de células com a enzima caspase 3 ativada. **A.** Linhagem CL3. **B** Linhagem MG. Nota-se menor porcentagem de células caspase 3⁺ após os tratamentos com Arc e Gen nas duas linhagens. *p<0,05 vs. T0 pós-teste de Dunn. Em vermelho são apresentadas as medianas das triplicatas de cada tratamento

5.6 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR

Ensaio do Transwell

Outro fator importante estudado foi o impacto que os princípios ativos exercem sobre os processos de destacamento das células da massa tumoral e degradação de matriz extracelular, possibilitando desta maneira a migração celular. Isto é particularmente importante, pois tais processos são intimamente vinculados aos processos de invasão tecidual e metástase em organismos vivos. Nota-se que os compostos GEN e TSA inibiram significativamente a migração celular e a degradação de matriz extracelular quando comparado aos controles (Gráfico 6).

Gráfico 6: Ensaio do transwell. Diferenças de migração celular através do matrigel foram significativas ($p < 0.05$ Tukey test) nos tratamentos com os compostos GEN e TSA nas linhagem CL3 e ARC e GEN na linhagem MG63

5.7 ENSAIO DE EXPRESSAO DE MARCADORES ÓSSEOS

O processo de diferenciação induzida de osteoblastos foi estudado e avaliado de diferentes formas, da expressão gênica à expressão *in situ*.

Análise da expressão gênica dos marcadores de diferenciação óssea através do PCR em tempo real.

Gráfico 7: Análise de expressão genica dos esferoides constituídos de células de osteossarcoma. Verificou-se a alto estímulo a expressão dos marcadores ósseos analisados apenas no tratamento com GEN

Analise de atividade de fosfatase alcalina através da coloração de NBT/BCIP

A análise morfológica da atividade da fosfatase alcalina foi realizada utilizando-se de da coloração de NBT/BCIP. Discreto aumento na quantidade de agregados azulados foi verificado na linhagem CL3. Nas células MG63 não se observou modificação morfológica na expressão da fosfatase alcalina. (Figura 13 e 14)

Figura 13: Atividade de fosfatase alcalina após tratamento na linhagem canina CL3. Discreto aumento foi observado gradualmente com o tempo nas células tratadas quando comparadas aos controles. NBT/BCIP. Barra = 40um

Figura 14: Atividade de fosfatase alcalina após tratamento na linhagem humana MG63. Contrario a linhagem CL3, não se observou diferenças entre os grupos, ou entre os diferentes tempos estudados. NBT/BCIP. Barra = 40um

Análise da deposição de constituintes da matriz extracelular por osteoblastos neoplásicos em cultura em três dimensões.

Para uma avaliação *in situ* da indução a diferenciação, foi escolhido verificar a quantidade de matriz osteóide depositada pelos osteoblastos, após períodos de tempo de tratamento determinado. Para tal optou-se como descrito anteriormente pelo método histoquímico de Tricômico de Masson, o qual evidencia em lamínas histológicas a cor azul as bandas de colágeno (Figura 15 e 16), parte integrante da matriz extracelular orgânica. Como verificado na figura 15 e 16 pode-se observar que com o passar dos dias do tratamento existe um aumento precoce da deposição de colágeno nos esferóides tratados com os três princípios ativos, em relação aos controles utilizados. Nota-se ainda que os grupos tratados apresentam matriz extracelular que morfologicamente parecem ser depositadas em quantidade discretamente maior que os grupos controles.

Figura 15: Estudo da deposição de matriz extracelular. As células de osteossarcoma canino expostas aos agentes químicos ARC, GEN e TSA depositaram matriz extracelular precocemente quando comparados aos controles. Tricrômico de Masson. Barra 40um

Figura 16: Estudo da deposição de matriz extracelular. As células de osteossarcoma humano MG63 expostas aos agentes químicos ARC, GEN e TSA depositaram matriz extracelular precocemente quando comparados aos controles. Tricrômico de Masson. Barra 40um

Além da deposição de colágeno, também foram avaliadas a expressão de dois marcadores ósseos através do método de imunohistoquímica, como apresentado a seguir na figura 17.

Figura 17: Estudo da expressão de marcadores ósseos osteocalcina e osteopontina na linhagem CL3. Marcação positiva para os marcadores analisados

Análise do processo de mineralização através da coloração de Von Kossa

O processo de mineralização pelos osteoblastos neoplásicos foi estudado pela coloração histoquímica de Von Kossa. Nesta coloração através da reação do fosfato de cálcio depositado pelas células com o nitrato de prata sob iluminação intensa, evidencia-se agregados enegrecidos de prata reduzida. Observou-se que na linhagem canina CL3, apenas discretos focos puntiformes foram evidenciados demonstrando o início do processo de mineralização, mesmo depois de 27 dias de tratamento (Figura 18). Já na linhagem MG63, notaram-se moderados agregados enegrecidos distribuídos por todo o esferoide depois de 27 dias. Observa-se ainda que as células tratadas possuem maior quantidade de agregados enegrecidos quando comparados ao controle (Figura 19).

Figura 18: Análise da deposição de cálcio pelos osteoblastos neoplásicos caninos CL3. Apenas discretos agregados puntiformes puderam ser observados depois de 27 dias. Von kossa. Barra 40 µm

Figura 19: Análise da deposição de cálcio pelos osteoblastos neoplásicos humanos MG63. Observaram-se discretos agregados enegrecidos depois de 10 dias nos grupos tratados e apenas com 27 dias nos grupos controle. Nos grupos tratados depois de 27 dias a quantidade de agregados enegrecidos foi superiormente maior do que os grupos controle. Von kossa. Barra 40 µm

Análise de expressão de proteínas das junções do tipo gap em cultura celular de osteossarcoma em três dimensões.

Tumores ósseos possuem localização aberrante e desorganizada da Conexina 43 (Cx43) quando comparados a expressão em tecidos ósseos normais. Para avaliar se os tratamentos poderiam alterar a expressão *in situ* da Cx43 em cultura celular em três dimensões foi realizada reação imunoistoquímica, na qual se pode evidenciar que diferente dos outros marcadores de diferenciação óssea que tiveram sua expressão alterada, a Cx43 não alterou sua expressão mesmo após vários dias de tratamento. (Figura 20).

Figura 20: Expressão de conexina 43 por osteoblastos neoplásicos de cão. Mesmo após 27 dias de tratamento a expressão continuou a mesma quando comparada com os controles e a localização permaneceu aberrante.

6 DISCUSSÃO

Avanços nas técnicas moleculares, bioquímicas, histológicas e ultraestruturais têm contribuído para uma maior compreensão dos mecanismos de diferenciação e carcinogênese. Potenciais sistemas de cultura celular, desenvolvidos para estudar o crescimento e diferenciação, oferecem possibilidades de análise de eventos associados a diferenciação de osteoblastos normais e neoplásicos. Porém, Loukopoulos e colegas (2004) mencionaram ser pequeno o número de linhagens de células de osteossarcoma canino produzidas, e que estas linhagens foram apenas parcialmente caracterizadas. Estas incluem: o Rádio (BOSTOCK e OWEN, 1970; NIEVES et al, 1998), o Úmero (NIEVES et al., 1998), o Fémur (NORRDIN et al., 1989), a Tíbia (NORRDIN et al., 1989), a Mandíbula (HONG et al., 1998) e da Escápula (HONG et al., 1998). Neste contexto, o estabelecimento e caracterização de novas linhagens ou culturas primárias a partir de tumores espontâneos oferece um ótimo modelo para o estudo da diferenciação de osteoblastos neoplásicos. Outro fator a se levar em consideração foi o da escolha de uma linhagem desenvolvida e caracterizada a partir de um tumor espontâneo canino. Isto é especialmente importante, visto que tumores espontâneos caninos, especialmente o osteossarcoma, têm sido aludidos a terem comportamento biológico, aparência morfológica e biologia molecular semelhante ao encontrado em osteossarcomas humanos (MISDORP, 1980; WITHROW et al., 1991; TORRICELLI et al., 2003; SÉGUIN et al., 2006; MUELLER et al., 2007). Associado a isso o desenvolvimento dos experimentos com a Linhagem de osteossarcoma humano MG63, corroboram estes achados. Em nosso estudo todos os animais escolhidos para o desenvolvimento de uma nova linhagem celular apresentavam osteossarcoma, o que corrobora com dados de prevalência encontrados na literatura, mesmo que com número reduzido de casos

(WOLKE E NIELSEN, 1966; JONES et al., 2000; THOMPSON E POOL, 2002).

Muito embora todos os tumores que foram coletados e postos em cultura celular tenham o Úmero como órgão afetado, e igual classificação segundo a histopatologia, o comportamento celular em cultura não foi o mesmo. Todos os tumores coletados possuíram bom crescimento inicial depois de colocados em cultura celular. O tamanho e a morfologia celular foram variáveis, sendo encontradas células fusiformes, redondas, poliédricas e raras multinucleadas assim como encontrados em estudos anteriores (HONG et al., 1998; LOUKOPOULOS et al., 2004). Assim, dependendo do estágio de diferenciação funcional, as células são representadas por um fenótipo distintivo, morfologia e atividade biossintética (KARTSOGIANNIS E NG, 2004). Após algumas passagens então, ocorreu seleção e estabelecimento de apenas uma linhagem celular das quatro colocadas em cultura. A variação na morfologia depois desta seleção foi reduzida drasticamente quando comparadas às mesmas células em suas primeiras passagens (LOUKOPOULOS et al., 2004). Como uma primeira parte da caracterização celular após o estabelecimento da linhagem celular de osteossarcoma canino, foi realizada através da citometria de fluxo, o estudo de ploidia celular pela incorporação do iodeto de propídeo, no qual se verificou que a linhagem estabelecida oriundo de tumor espontâneo era constituída de células hipodiplóides, como descrito anteriormente em outros estudos semelhantes com neoplasmas caninos e de outras espécies tal como a humana (CORNELISSE et al., 1994; HONG et al., 1998; SERRA et al., 2001; SÉGUIN et al., 2006). Séguin e colegas (2006) descreveram como difícil à caracterização diagnóstica de osteossarcoma pela imunoistoquímica visto a dificuldade de encontrar marcadores específicos para osteossarcoma. Afirma ainda, que marcadores como OC que seria altamente específica não seria tão sensível. E ao contrário, a ON que seria mais sensível não seria tão específica por ser encontrada em outras linhagens celulares

como a fibroblástica. De fato o diagnóstico e caracterização celular, tanto em cortes histopatológicos como em cultura celular, pode ser um desafio. Isto se deve em parte, da possibilidade de se encontrar em uma mesma neoplasia, células em diferentes estágios de diferenciação com variáveis apresentações morfológicas, ou ainda contaminação por outras linhagens celulares (LIAN e STEIN, 1992; KARTSOGIANNIS e NG, 2004). Grande parte das linhagens celulares de osteossarcoma desenvolvidas e descritas na literatura foram parcialmente caracterizadas. Os mais recentes estudos tem levado a conclusão que a capacidade de adesão celular e morte celular estão intimamente ligados. Adicionalmente a fundamental importância da matriz extracelular depositada também tem sido confirmada (SANTINI et al., 2000). Quando os osteoblastos neoplásicos (CL3) foram colocados em cultura, o microambiente celular foi modificado. Contudo as células mantiveram a capacidade de adesão celular e expressão de marcadores fenotípicos que são tidos como parte do desenvolvimento da diferenciação óssea e utilizados na caracterização fenotípica da linhagem estabelecida. Os osteoblastos da linhagem CL3 depois de estabelecidas apresentaram então: células hipodiplóides, retida a capacidade de adesão celular, atividade de fosfatase alcalina e expressão e secreção dos marcadores OC, OP, ON e colágeno (BENAYAHU et al., 2002). Todos os descritos fizeram parte integrante das ferramentas para o diagnóstico preciso de osteossarcoma não somente na rotina médica, como, na parte experimental, utilizados na caracterização de uma nova linhagem celular de osteossarcoma canino (LIAN; STEIN, 1995). As outras três linhagens tiveram parada no crescimento celular evoluindo para morte celular. Estes resultados são consistentes com os encontrados anteriormente (HONG et al., 1998, SÉGUIN et al., 2006) . Como visto neste estudo, assim como em outros modelos, existem limitações, como por exemplo, a própria instabilidade e possibilidade de comportamento aberrante associado com o caso de muitos clones de linhagens

celulares, ou no caso de linhagens primárias, o fato de que estas possuem uma heterogeneidade de osteoblastos em diferentes estágios de diferenciação e possivelmente de outros tipos de linhagens celulares incluindo fibroblastos (AUBIN et al., 1993; LIU et al., 1994).

Muitos modelos de cultura celular têm sido empregados para o estudo da diferenciação de osteoblastos, com cada sistema oferecendo vantagens pelo aumento do entendimento do desenvolvimento ósseo, diferenciação, expressão gênica, reposta a hormônios e fatores locais. Observações feitas nestes tipos de sistemas têm sido extrapoladas para o osso adulto in vivo, para o desenvolvimento de conceitos sobre o fenótipo do osteoblasto. Importante salientar que dependendo do sistema e condições de cultura utilizada, aspectos temporais da diferenciação de osteoblastos e a habilidade acerca da expressão sequencial de marcadores variam marcadamente e em algumas vezes se torna contraditória (AUBIN et al., 1993, 1995). Aqui nós trabalhamos com cultura celular em três dimensões na busca de um modelo mais próximo do modelo animal, ou ainda, mais semelhante ao osteossarcoma espontâneo de cães (SANTINI et al., 2003). Trabalhar com cultura tridimensional se faz interessante por muitos motivos que serão descritos a seguir. Uma característica importante, principalmente para estudos com células neoplásicas, seria que a densidade celular e consequentemente a quantidade de espaço extracelular pode variar nas diferentes camadas celulares. Isso influencia diretamente a distribuição dos nutrientes e oxigênio e consequentemente a biologia global e as propriedades celulares nestas diferentes regiões (SUTHERLAND et al., 1981). Estas variações se assemelham as variações encontradas nos tumores sólidos como o osteossarcoma. Outra característica é o fato de que algumas células adquirem a capacidade de ficar quiescentes em regiões onde a atividade proliferativa é escassa por situações adversas como as já mencionadas: privação de nutrientes e a presença de

hipóxia. Estas mesmas células possuem a capacidade de locomoção e podem migrar para regiões mais favoráveis e retornar a capacidade proliferativa. Isso é particularmente importante devido à capacidade das células tumorais em evadir a terapia antineoplásica convencional que teria como alvo células em proliferação. O estudo dos esferóides constituídos de células neoplásicas, portanto, pode ser utilizado para avaliar métodos terapêuticos e melhorias nas previsões de eficácia (SUTHERLAND et al., 1981; HOFFMAN, 1991; HIRSCHHAEUSER et al., 2010).

O processo de diferenciação de osteoblastos normais em estágios, atualmente é bem entendido. Recentemente, defeitos na diferenciação têm sido associados a moléstias neoplásicas, uma vez que estão associados com a perda do controle do processo proliferação. Os eventos que seguem ao desenvolvimento do osteoblasto normal não pode ser realizado em osteoblastos neoplásicos devido a desregulação dos mecanismos de controle de crescimento e também, pela perda da relação operante existente entre os processos de proliferação e diferenciação que acontece normalmente em osteoblastos normais (LIAN; STEIN 1992 e 1995; WAGNER et al., 2011). Tratamentos com objetivo de superar esses defeitos poderiam permitir a diferenciação terminal e subsequente inibir a ação tumoral, pois, partes importantes ligadas ao processo de diferenciação podem se manter preservados nas células neoplásicas. Embora os órgãos reguladores iniciais de osteogênese possam ser incapazes de contornar esses defeitos, alguns tratamentos poderiam ser capazes de forçar a superação de alguns dos defeitos e inibir a propagação do tumor através da promoção de diferenciação osteogênica (WAGNER et al., 2011). Parte disso são as novas e alternativas modalidades, ou conceitos associados ao desenvolvimento de novas terapias contra tumores de origem no tecido ósseo ou ainda em outros tecidos. A terapia através de diferenciação se faz em um modelo atraente para o tratamento, com a possibilidade

de criação de novos alvos terapêuticos a partir de novas visões acerca da terapêutica associada a tumores ósseos. Então, depois de estabelecida e caracterizada a linhagem canina de osteossarcoma CL3, iniciou-se os estudos associados ao processo de diferenciação nesta linhagem assim como na linhagem humana de osteossarcoma MG63.

Tendo como base a sequencia temporal definida em períodos (LIAN E STEIN, 1995) de desenvolvimento (proliferação, deposição de matriz extracelular e mineralização de matriz extracelular), se verificou neste estudo os eventos associados a diferenciação induzida em osteoblasto neoplásicos em sequencia a saber: inicialmente o processo de viabilidade celular e proliferação celular, seguido do processo de invasão, e expressão de marcadores ósseos ao final. A sensibilidade dos osteoblastos neoplásicos foi realizada através dos ensaios de MTT e cristal violeta após variadas doses de tratamento de ARC, GEN e TSA. Quando as células foram expostas a ARC, observou-se redução na viabilidade celular e na proliferação de 50% em doses a partir de 200 uM. Semelhante aos dados de viabilidade celular, Matsumoto et al. (2006) publicaram um trabalho estudando os efeitos das ligninas extraída da bardana em células da leucemia, demonstrando potente ação antiproliferativa das ligninas isoladas sobre células MH60. Também exerceu inibição de crescimento tumoral em células de câncer colo-retal por indução a apoptose (HAUSOTT; GREGER; MARIAN, 2003). Este composto exibiu o notável efeito antitumoral nas fases de iniciação e promoção da carcinogênese de tumores de pele em ratos tanto com aplicação tópica como na administração oral. Além disso, ARC exibiu uma atividade antitumoral no teste de duas fases da carcinogênese de tumores pulmonares induzidos em ratos (TAKAZAKI et al., 2000). Jeong et al. (2011) demonstraram ação antiproliferativa através do ensaio de MTT obtendo resultado semelhante aos nossos, verificados pela diminuição da proliferação das células SNU-1 e

AGS (linhagens celulares de câncer gástrico) de uma forma tempo e dose dependente, quando comparadas aos controles. Adicionalmente, ARC também induziria a parada do ciclo celular na fase G1/S pela expressão de proteínas regulatórias como Rb, ciclina D1, ciclina E, CDK4, CDK2, p21Waf1/Cip1 and p15 INK4b (JEONG et al., 2011). A ARC foi o princípio ativo selecionado por Sun et al.(2010) devido sua seletiva ação contra células humanas tumorais de pâncreas e próstata, com ou em ausência de glicose, mostrando diminuição da viabilidade e da proliferação celular nestas linhagens. A ARC também se mostrou como um agente tumor específico com citotoxicidade e indução a apoptose em células de câncer de pulmão (A549), câncer hepáticos (HepG2) e câncer de estômago (KATO III), ao passo que nenhuma citotoxicidade foi observada em varias linhagens de células normais (SUSANTI et al., 2012). As células cancerosas em tumores sólidos pouco vascularizados são constantemente ou intermitentemente expostas a microambientes estressantes, incluindo privação de glicose e hipóxia. Estas condições específicas em tumores sólidos, especialmente a privação de glicose, ativam uma via de sinalização da chamada “resposta de proteína desdobrada” (UPR), que aumenta a sobrevivência celular através da indução das proteínas de estresse. A inibição das UPRs levam a apoptose envolvendo vias mitocondriais pela ativação de caspase 9 e 3. Estudos demonstraram que esta ação seletiva da ARC em células tumorais ocorre preferencialmente em células onde existe privação da glicose. Assim a ARC agiria apenas nas células metabolicamente estressadas erradicando as células tumorais sem afetar os tecidos normais (AWALE et al., 2006; KIM et al., 2010; GU et al., 2012). A ARC também foi utilizada para avaliação de seus efeitos quando associada a outro agente antineoplásico. A ARC foi capaz de aumentar a sensibilidade das células quando tratadas com Cisplatina (YAO et al., 2011). Derivados obtidos de modificações na molécula de ARC também foram avaliados em estudos *in vitro* e *in vivo*, com linhagens

tumorais de câncer pancreático PANC-1 e CAPAN-1, demonstrando que estas novas moléculas de ARC também possuem atividade antitumoral, que pode ter potencial semelhante ou ainda maior do que a molécula nativa (KUDOU et al., 2013).

Quando as células de osteossarcoma foram expostas a GEN pode-se observar que doses até 10 μ mol/L não obtiveram efeito significativo com relação ao crescimento celular. Porém dosagens acima de 50 μ mol/L diminuíram acentuadamente a proliferação e a viabilidade celular. Outros trabalhos realizados em cultura celular em monocamada mostraram que a GEN tem um potente efeito inibidor in vitro, levando à parada do ciclo celular fase G2/M. (NAKAYAMADA et al., 2003; CHEN et al., 2002; JHIA et al., 2003; ZHOU et al., 2003). Semelhantes resultados foram obtidos com a linhagem celular humana de osteossarcoma, MG63, na qual foi mostrada significativa redução na proliferação e aumento da fragmentação nuclear (apoptose) com doses acima de 10 μ mol/L (MORRIS et al., 2006). Nakamura et al. (2012) demonstraram na linhagem celular murina de osteossarcoma LM8, que a GEN inibe de forma dose dependentemente a proliferação e viabilidade celular. Em doses de 50 μ M conseguiram 91% de diminuição do conteúdo de DNA, assim como na quantidade de células positivas para Brdu quando comparadas a células não tratadas. Estes resultados também foram conseguidos em estudos em monocamada celular.

Em nossos estudos se pode observar que a TSA levou a inibição do crescimento e diminuição da viabilidade celular em praticamente todas as dosagens (50 a 400nM) escolhidas quando comparado ao controle, resultado este semelhante aos encontrados na literatura com células de osteossarcoma e outras linhagens tumorais (HIROSE et al., 2003; ROH et al., 2004). Resultado semelhante foi encontrado em células de osteossarcoma HOS, nas quais se observou diminuição dose dependente da viabilidade celular, com doses variando de 10 a 300 nM. Neste mesmo estudo observou-se indução

de apoptose e parada do ciclo celular na fase G2/M com dosagem de 300 nM. O aumento visto na fase G2 / M foi acompanhado em paralelo pela queda na percentagem de células em fase G0/G1 paralelo um aumento da apoptose. TSA é conhecido por causar a parada do crescimento celular na fase no G1 e (ou) fase G2 / M e por induzir a apoptose numa variedade de células tumorais. A parada do ciclo G1 pela TSA é pensada ser altamente dependente do aumento de p21/WAF1, mas o mecanismo exato que causa a parada em G2 / M ou apoptose continua por ser elucidado (ROH et al.2004). O mecanismo sugerido para a parada em G2/M seria via Gadd25. As funções desta molécula ainda estão incertas, mas, muitos trabalhos demonstraram seu comprometimento com a fase G2/M e indução a apoptose (HIROSE et al., 2003). A linhagem MG63 também foi testada com relação ao crescimento celular em monocamada por Cheng e colegas (2012), os quais descrevem também uma significativa diminuição do crescimento celular de uma maneira dose e tempo dependente semelhante aos nossos achados em cultura em três dimensões.

Importante notar aqui, que em todos os estudos de viabilidade celular, com os três princípios ativos, para ambas as linhagens de osteossarcoma, corroboram os achados de outros autores anteriormente descritos em cultura celular em monocamada. Contudo, embora com atividade citotóxica, aqui em contraste, não foram observadas alterações em relação a células BrdU positivas, sem evidências então, de comprometimento direto ao processo de proliferação como descrito anteriormente. Outro ponto importante foi o de que não se observou diferenças na quantidade de células positivas no ensaio de apoptose, mostrando atividade citotóxica sem atividade direta de caspase 3 ativada. Pode-se levar em consideração que em estudos em monocamada, os grupos controle não sofram a ação da privação de nutrientes como nos modelos em três dimensões. E também que nos grupos tratados todas as células estariam

expostas aos agentes químicos desde o início até o término dos experimentos, excetuando-se logicamente aqueles dirigidos a privação de nutrientes. Associa-se ainda que o tamanho dos esferoides formados e a coesão entre as células podem alterar tais resultados devido ao poder limitado de penetração dos agentes químicos. Em parte acredita-se que estes resultados aconteceram devido a estrutura formada pelas células em três dimensões em contraste aos estudos em monocamada no qual todas as células estariam expostas aos agentes químicos (SUTHERLAND et al., 1981; HOFFMAN, 1991; HIRSCHHAEUSER et al., 2010).

Um problema associado ao osteossarcoma é a frequente formação de micrometástases para o pulmão anteriormente ao diagnóstico, com consequente desenvolvimento das lesões metastáticas seguidas de complicações e morte. Dada a arquitetura se assemelhar ao tecido neoplásico espontâneo, o modelo de estudo em três dimensões se faz um modelo único para o estudo de invasão e metástase (HOFFMAN, 1991). Esta informação é especialmente importante pelo fato de que em monocamadas todas as células se encontram livres e facilmente podem aderir e migrar pela superfície do inserto. Já em estudos em três dimensões as células tem que possuir primeiramente a capacidade de se destacar e se locomover em meio ao complexo morfológico tridimensional formado por células e depósitos extracelular. Interessantemente, não foram achados dados a respeito deste processo na literatura referente ao tratamento com a ARC. Contudo nós observamos que existiu uma discreta diminuição entre os grupos controle e o grupo tratado com a ARC na linhagem CL3. Interessantemente também, na linhagem MG63 nós observamos acentuada diminuição de migração por parte das células quando tratadas com a ARC, mostrando uma diferença no comportamento celular em relação as células CL3. A GEN tem sido utilizada com sucesso para inibir invasão e metástase em cânceres diversos (PAVESE; FARMER; BERGAN, 2010).

Quando utilizado o tratamento com a GEN, pode-se observar declínio acentuado da quantidade de osteoblastos neoplásicos que conseguiram destacar do esferoide, degradar matriz extracelular (matrigel) possibilitando sua migração e por fim transpassar a membrana e se fixar ao fundo do lado oposto do inserto em ambas as linhagens estudadas. Semelhante a este resultado, Nakamura e colegas (2012) estudando este processo invasivo, percebeu o potencial invasivo diminuído em células de osteossarcoma LM8 tratadas com GEN quando comparadas a células não tratadas. Descreveu ainda que a expressão da MMP2, enzima relacionada a degradação de matriz extracelular, foi menor nas culturas tratadas com GEN. Cheng e outros (2012) mostraram que um grande número de células do grupo controle transpassou pelo filtro do inserto no estudo de invasão celular, quando comparado ao grupo tratado com TSA. Mostrou ainda que embora exista diminuição da motilidade celular de uma forma dose dependente, mudanças significativas foram encontradas apenas com doses a partir de 300nM. Aqui nós conseguimos significativa diminuição de células que se soltaram do esferoide, migraram e transpassaram o filtro com dose de 200 nM nas linhagens de osteossarcoma canino CL3. Porém, na linhagem MG63 apenas uma discreta diminuição, não significativa, foi observada.

Em uma classificação patológica incorporando graus de diferenciação na avaliação histológica se verificou que, nas amostras em que existia a ausência de diferenciação, também existia a redução de 10 - 15% na sobrevida dos pacientes em 5 anos. Outra observação foi a de que muitos marcadores de diferenciação caracterizados como tardios em osteoblastos normais, não são expressos em OSA. Estas observações levam a crer que os OSAs falham em desenvolver diferenciação terminal, e este grau de diferenciação pode correlatar com pior prognóstico. Por outro lado alguns aspectos fenotípicos dos osteoblastos são preservados durante carcinogênese. A capacidade de

produzir matriz extracelular é uma delas, e isto é fundamental no momento do diagnóstico e nos estudos de osteossarcomas (THOMAS; KANSARA, 2006; WARGNER et al., 2010). Os achados aqui descritos e discutidos ilustram o processo de diferenciação induzida em cultura celular que levam a produção de uma matriz extracelular, que se assemelha a matriz encontrada em tecidos ósseos. Durante o desenvolvimento de muitos estudos associados a diferenciação de osteoblastos, foi mostrado a progressiva expressão de marcadores associados a diferenciação fenotípica de osteoblastos (LIAN; STEIN, 1992). Em sua maior parte, estes estudos caracterizaram apenas parcialmente o processo de diferenciação osteoblástica. Contudo a reunião destes mesmos achados mostrou que diferenças nos processos de proliferação e viabilidade são acompanhadas por mudanças morfológicas que alteram a capacidade de síntese (MORRIS et al., 2006). Assim, claramente existiu uma indução a síntese proteica após o tratamento com os agentes ARC, GEN, e TSA. Esta indução se reflete pelo aumento de expressão de marcadores ósseos vista em ambas a linhagens estudadas. Segundo Lian e Stein, (1992) a temporal sequencia de expressão gênica de osteoblastos normais, definem os três períodos (proliferação, desenvolvimento da matriz e mineralização desta matriz) pelos quais os osteoblastos se comprometem até a sua diferenciação terminal em osteócito. Estes genes suportam a diferenciação, na importância que genes expressos no período da proliferação são necessários para sequencia das fases seguintes. Então uma vez estudados partes destes marcadores, se avaliou aqui a expressão gênica através do PCR em tempo real. Observou-se que os tratamentos com ARC e TSA não alteraram significativamente a expressão gênica de osteoblastos neoplásicos de cães. Contudo quando tratadas com a GEN, a expressão de ALP e OC aumentou intensamente entre os períodos de 5 e 15 dia com queda ao final do período de 25dias. A ALP, um marcador precoce e não-específico da linhagem

osteoblástica, é frequentemente observada em tumores ósseos. A atividade de fosfatase alcalina também foi um fator avaliado no processo de diferenciação induzida. Morfologicamente não se observou diferenças entre os grupos do estudo. Porém percebe-se que as células de ambas linhagens possuem alta atividade de ALP. É importante relatar que embora a ALP seja constantemente visualizada em osteossarcomas, sua expressão é considerada menor, quando comparada a expressão em osteoblastos normais (HARRIS et al., 1995; LUO et al., 2008). Em contraste à ALP, marcadores tardios da diferenciação dos osteoblastos que são altamente expressos em osteoblastos normais, tais como a OC são pouco, ou não são expressos na maior parte dos osteossarcomas (HOPYAN et al., 1999; CHENG et al., 2003; KANG et al., 2004; LUO et al., 2005; LUU et al., 2007). Em estudos conduzidos com linhagens de osteossarcoma murino ML8, a GEN induziu alterações morfológicas e apresentou marcada diminuição de formação de massas compostas de múltiplas camadas celulares, e marcada expressão gênica de OC (AUBIN et al., 1995; NAKAMURA et al., 2012).

Ainda durante a fase de proliferação de osteoblastos normais, estes começam a expressar genes associados ou constituintes da matriz extracelular tais como: TGF β , fibronectina, e colágeno tipo I. Então se examinou a possibilidade do estímulo a deposição do colágeno. O colágeno depositado contribui para mudanças na estrutura celular, diferenciação dos osteoblastos e múltiplas via de expressão gênica (entre elas, as que contribuem para a diminuição da atividade proliferativa) (LIAN; STEIN, 1995). Observou-se nas laminais histológicas coradas pelo Tricrômico de Masson que durante a progressão do tempo de tratamento, os grupos controles produziram e depositaram quantidades inferiores de matriz extracelular quando comparados aos grupos tratados com os três compostos químicos. Outra observação importante foi a de que nas amostras tratadas a deposição de colágeno começou antes da verificada nos controles. Em um

outro estudo, porém conduzido em monocamada com a GEN em linhagem MG63, demonstrou aumento de síntese e secreção de colágeno, além de aumentadas atividade de ALP e potencial de mineralização (MORRIS et al., 2006).

E em se tratando de mineralização a OP, uma glicoproteína ácida que tem estreita atividade ligada a este processo foi expressa pelos esferoides durante todos o período de tempo avaliado no estudo. Entretanto, algumas variações foram observadas nos ensaios para verificação do potencial de mineralização da matriz extracelular depositada pelos osteoblastos através da coloração de Von Kossa. Notou-se que a linhagem CL3 após 27 dias de tratamento com os três princípios ativos, apenas apresentava discretos focos puntiformes de coloração enegrecida que refletem discreta atividade de deposição de mineral. Por outro lado a linhagem MG63 apresentou moderadas a intensas áreas apresentando franca atividade de mineralização para todos os tratamentos. Esta mineralização foi notada em tempos inferiores nos grupos tratados quando comparadas ao grupo controle. Importante notar que em culturas celulares de osteoblastos normais, nos quais se verificam alta atividade de mineralização, existe diminuição dos níveis de expressão genica de ALP (LIAN; STEIN, 1992). Este dado foi verificado em nossos experimentos. Mineralização também foi relatada através do uso de TSA pela indução a diferenciação osteoblástica através da via de AP1, estimulando as atividades da OP na mineralização, em linhagem celular mesenquimal indiferenciada de camundongo (SAKATA et al., 2004). Porém mais estudos são necessários para o entendimento dos mecanismos de ossificação e calcificação patológica.

Como já mencionado anteriormente, com a mineralização em franca atividade, existe um decréscimo da expressão de marcadores como COL-I e ALP, e existe um aumento de expressão de marcadores associados ao fenótipo característico do osteócito. Um marcador expresso durante a transição osteoblasto/osteócito é a Conexina 43

(Cx43) (BOUKHECHBA et al., 2009). Ela está intimamente ligada ao processo de diferenciação óssea e em alguns aspectos ligados a carcinogênese. Em prévios estudos verificamos a possível correlação entre a expressão de Cx43 (um marcador tardio da diferenciação óssea) e a diferenciação de osteossarcomas de cães (GREEN et al., 1994; LECANDA et al., 1998; DONAHUE et al., 2000; SCHILLER et al., 2001; MESNIL, 2002; SANCHES, et al., 2009). Contudo, na tentativa de se avaliar alterações no perfil de marcação para Cx43 após os tratamentos com os agentes químicos, verificamos que não existiu alteração em relação ao perfil de imunomarcação entre os grupos analisados. Outro fator a se observar é o de que a localização aberrante encontrada nos osteoblastos neoplásicos permaneceu mesmo após 27 dias de tratamento. Estas observações demonstram possibilidades acerca do processo de diferenciação por si e dos possíveis caminhos alternativos encontrados na diferenciação e desenvolvimento de osteoblastos, uma vez que a Conexina 43 perfaz um importante marcador da transição osteoblasto /osteócito (STANGENBERG et al., 2005)

Até o presente momento nossos resultados nos levam a crer que cada substância química, a seu modo, tem potencial de induzir a diferenciação em osteoblastos neoplásicos. Porém, como verificado, tal nível de diferenciação pode não estar totalmente vinculado a modulação de todos marcadores de diferenciação óssea tais como verificado pela ausência de mudanças na expressão e localização da Cx43. Outra hipótese seria a de que estes compostos induzem apenas uma diferenciação parcial, uma vez que nem todos os marcadores foram expressos em um limite de tempo em que o osteoblasto normal teria o processo de diferenciação terminada com o fenótipo de osteócito maduro. Outra hipótese a ser verificada é a de que, com a perda ou deleção parcial de seu material genético os osteoblastos neoplásicos teriam perdido parte importantes da maquinaria ligada a expressão de marcadores ósseos de diferenciação,

comprometendo assim a expressão terminal ligada ao fenótipo de osteócito. Em todos os casos, como já citado anteriormente e corroborando achados anteriores, isto sugere que a diferenciação terminal, mas não de diferenciação, por si só, é antitética para a carcinogênese (THOMAS; KANSARA, 2006). Também é certo que cada composto a seu modo de ação possui atividades antineoplásicas interessantes, como visto pela seletividade, baixa toxicidade, atividade antimetastática e antiproliferativa. Estas observações fazem de cada composto químico ótimos alvos para terapia antineoplásica de osteossarcomas.

7 CONCLUSÕES

7.1 Arctigenina, Genisteína e Tricostatina-A foram capazes de induzir diferenciação parcial em osteoblastos neoplásicos caninos em cultura e em linhagem de osteossarcoma humano.

7.2 Além disso, os tratamentos com Arctigenina, Genisteína e Tricostatina-A em osteoblastos neoplásicos caninos em cultura e em linhagem de osteossarcoma humano:

- não determinaram alterações de expressão ou de localização subcelular da Conexina 43
- não determinaram alterações de proliferação celular, medida pela incorporação de BrdU em citometria de fluxo
- diminuíram a viabilidade celular, por mecanismos que provavelmente dependem não apenas da caspase 3
- diminuíram a capacidade de invasão da matriz extracelular em ensaio de Transwell.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUBIN, J. E. Advances in the osteoblast lineage. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 76, n. 6, p. 899-910, 1998.

AUBIN, J. E.; LIU, F.; MALAVAL, L.; GUPTA, A. K.; Osteoblast and chondroblast differentiation. **Bone** v. 17, p. 77– 83, 1995. Suppl. 2.

AUBIN, J. E.; TURKSEN, K.; HEERSCHE, J.N.M. Osteoblastic cell lineage. In: Noda, M. (Ed.), **Cellular and Molecular Biology of Bone**. Academic Press, San Diego, p. 1– 45, 1993.

AWALE S.; LU J.; KALAUNI S. K.; KURASHIMA S.; TEZUKA Y.; KADOTA S.; ESUMI H. Identification of Arctigenin as an Antitumor Agent Having the Ability to Eliminate the Tolerance of Cancer Cells to Nutrient Starvation. **Cancer Research**. v. 66, n. 3, p. 1751-1757, 2006.

BENAYAHU D.; SHUR I.; MAROM R.; MELLER I. ISSAKOY J. Cellular and Molecular Properties Associated With Osteosarcoma Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 84, p. 108-114, 2002.

BOUKHECHBA F.; BALAGUER T.; MICHIELS J. F.; ACKERMANN K.; QUINCEY D.; BOULER J. M .; PYERIN W.; CARLE G. F .; ROCHET N. Human Primary Osteocyte Differentiation in a 3D Culture System. **Journal of bone and mineral research** . v. 24, n. 11, 2009

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRODEY R. S.; RISER W. H. Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. **Clinical Orthopaedics and Related Research** v.62, p. 54-64, 1969.

BOSTOCK D. E.; OWEN L. N. Transplataion and tissue – culture studies of canine osteosarcoma. **European journal of cancer**. v. 6, n. 6, p. 499- 502, 1970.

CHAIBLE L. M.; SANCHES D. S.; COGLIATI B.; MENNECIER G.; DAGLI M. L. Delayed osteoblastic differentiation and bone development in Cx43 knockout mice. **Toxicologic Pathology**. v. 39, n. 7, p. 1046-1045, 2011.

CHEN X. W.; GARNER S. C.; ANDERSON J. J. B. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 295, p.417–22. 2002.

CHEN X. W.; GARNER S. C.; ANDERSON J. J. B. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 295, p.417–22. 2002.

CHENG D. D.; YANG Q. C.; ZHANG Z. C.; YANG C. X.; LIU Y. W.; Antitumor Activity of Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A in Osteosarcoma Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. n. 13, p. 1395-1399, 2012.

CHENG H.; JIANG W.; PHILLIPS F. M.; HAYDON R. C.; PENG Y.; ZHOU L.; LUU H. H.; AN N.; BREYER B.; VANICHAKARN P.; SZATKOWSKI J. P.; PARK J. Y.; HE T. C. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). **Journal of Bone and Joint Surgery A**, v. 85, n. 8, p. 1544–1552, 2003.

CHO, M. K.; JANG, Y. P.; KIM, Y. C.; KIM, S. G. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF- α inhibition. **International Immunopharmacol**, v. 4, n. 10-11, p. 1419-1429, 2004.

CONKLIN, C. M.; BECHBERGER, J. F.; MACFABE, D.; GUTHRIE, N.; KUROWSKA, E. M.; NAUS, C. C. Genistein and quercetin increase connexin43 and suppress growth of breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 1, p. 93-100, 2007.

CORNELISSE C. J.; RUTTEMAN G. R.; KUIPERS-DIJKSHOON N. J.; , HELLMÉ E. The difference in DNA ploidy pattern between some canine and human neoplasms appears to be genuine and a reflection of dissimilarities in DNA aneuploidy evolution. **Anticancer Research**.; v. 14, n. 4A, p.1599-601, 1994.

DONAHUE H. J.; LI Z.; ZHOU Z.; YELLOWLEY C. E.; : Differentiation of human fetal osteoblastic cells and gap junctional intercellular communication. **American Journal of Physiology Cell Physiology** .v. 278, p. 315-322, 2000.

GREEN C. R.; BOWLES L.; CRAWLEY A.; TICKLE C: Expression of the connexin43 gap junctional protein in tissues at the tip of the chick limb bud is related to the epithelial-mesenchymal interactions that mediate morphogenesis. **Developmental Biology** v.161, p. 12-21, 1994.

GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A. C.; GRAVES, S. E.; OHTA, S.; HAY, S. J.; SIMMONS, P. J. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 14, n. 1, p. 47-56, 1999.

GU Y.; QI C.; SUN X.; MA X.; ZHANG H.; HU L.; YUAN J.; YU Q. Arctigenin preferentially induces tumor cell death under glucose deprivation by inhibiting cellular energy metabolism. **Biochemical Pharmacology** v .84, p. 468–476, 2012.

HAUSOTT B.; GREGER H.; MARIAN B. Na turally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorecatk tumor cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 129, n. 10, p. 569-576, 2033.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARRIS S. A.; ENGER R. J.; RIGGS B. L.; SPELS- BERG T. C. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 10, no. 2, pp. 178–186, 1995.

HEYMAN S. J.; DIEFENDERFER D. L.; GOLDSCHMIDT M. H.; NEWTON C. D: Canine axial skeletal osteosarcoma. A retrospective study of 116 cases (1986 to 1989). **Veterinary Surgery** v.21, p. 304-310, 1992.

HIRSCHHAEUSER F.; MENNEB H.; DITTFELD C.; WESTB J.; MUELLER – KLIESERA W.; KUNZ- SCHUGHART L. A. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again . **Journal of Biotechnology** , v.148, p. 3–15, 2010.

HIROSE, M.; YAMAGUCHI, T.; LIN, C.; KIMOTO, N.; FUTAKUCHI, M.; KONO, T.; NISHIBE, S.; SHIRAI, T. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. **Cancer Letters**, v. 155, n. 1, p. 79-88, 2000.

HIROSE, T.; SOWA, Y.; TAKAHASHI, S.; SAITO, S.; YASUDA, C.; SHINDO, N.; FURUICHI, K.; SAKAI, T. p53-independent induction of Gadd45 by histone deacetylase inhibitor: coordinate regulation by transcription factors Oct-1 and NF-Y. **Oncogene**, v. 22, n. 49, p. 7762-7773, 2003.

HOENERHOFF M. J.; KIUPEL M.; ROSENSTEIN D.; POOL R. R: Multipotential osteosarcoma with various mesenchymal differentiations in a young dog. **Veterinary Pathology** v.4, p. 264-268, 2004.

HOFFMAN C. Three dimensional histoculture origins and applications in cancer research. **Cancer cell**, v.3, n.3, p. 86- 92, 1991.

HONG S. H.; KADOSAWA T.; MOCHIZUKI M.; MATSUNAGA S.; NISHIMURA R.; SASAKI N. Establishment and characterization of two cell lines derived from canine spontaneous osteosarcoma. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**. v. 60, n. 6, p. 757- 760, 1998.

HOPYAN, S.; GOKGOZ, N.; BELL, R. S.; ANDRULIS, I. L.; ALMAN, B. A.; WUNDER, J. S. Expression of osteocalcin and its transcriptional regulators core-binding factor alpha 1 and MSX2 in osteoid-forming tumours. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 17, n. 5, p. 633-638, 1999.

JEONG J. B.; HONG S. C.; JEONG H. J.; KOO J. S.; Arctigenin induces cell cycle arrest by blocking the phosphorylation of Rb via the modulation of cell cycle regulatory proteins in human gastric cancer cells . **International Immunopharmacology** v.11, p. 1573–1577, 2011.

- JIA T. L.; WANG H. Z.; XIE L. P.; WANG X. Y.; ZHANG R. Q. Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. **Biochemical Pharmacology**. v.65, p.709–15, 2003.
- JONES T. C.; HUNT R. D.; KING N. W: Esqueleton System. In: **Veterinary pathology**, 6th ed., pp. 1191-1201. Williams & Wilkins, Pennsylvania, 2000.
- KANG Q.; SUN M. H.; CHENG H.; PENG Y.; MONTAG A. G.; DEYRUP A. T.; JIANG W.; LUU H. H.; LUO J.; SZATKOWSKI J. P.; VANICHAKARN P.; PARK J. Y.; LI Y.; HAYDON R. C.; HE T. C. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. **Gene Therapy**. v. 11, n. 17, p. 1312–1320, 2004.
- KARTSOGIANNIS V.; NG K. W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology . **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 228, n. 1-2, 30, p. 79-102, 2004.
- KIM J. Y.; HWANG J. H.; CHA M.R.; YOON M.Y.; SON E. S.; TOMIDA A.; KO B.; SONG S. W.; YA K. S.; HWANG Y.I .; PARK H. R. Arctigenin Blocks the Unfolded Protein Response and Shows Therapeutic Antitumor Activity . **Journal Cellular Physiology**. v. 224, p. 33–40, 2010.
- KOOK, S. H.; SON, Y. O.; JANG, Y. S.; LEE, K. Y.; LEE, S. A.; KIM, B. S.; LEE, H. J.; LEE, J. C. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase sensitizes tumor cells to flavonoid-induced apoptosis through down-regulation of JunD. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 227, n. 3, p. 468-476, 2008.
- KUDOU N.; TANIGUCHI A.; SUGIMOTO K.; MATSUYA Y.; KAWASAKI M.; TOYOOKA N.; MIYOSHI C.; AWALE S.; DIBWE D. F .; ESUMI H.; KADOTA S.; TEZUKA Y. Synthesis and antitumor evaluation of arctigenin derivatives based on antiausterity strategy. **European Journal of Medicinal Chemistry** v.60, p. 76 e 88, 2013.
- LECANDA F.; TOWLER D. A.; ZIAMBARAS K.; CHENG S. L.; KOVAL M.; STEINBERG T. H.; CIVITELLI R: Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. **Molecular Biology of the Cell** v.9, p. 2249-2258, 1998.
- LIANG C.; LI H.; SHEN C. ; LAI J.; SHI Z.; LIU B.; TAO H. M. Genistein Potentiates the Anti-cancer Effects of Gemcitabine in Human Osteosarcoma via the Downregulation of Akt and Nuclear Factor- κ B Pathway . **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v . 12, p. 554-563, 2012.
- 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 Medicine**, v. 3, n. 3, p. 269-305, 1992.
- LIAN J. B.; STEIN, G. S. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. **Iowa Orthopaedic Journal**, v. 15, n., p. 118-140, 1995.

- LIN S. C.; CHUNG T. C.; LIN, C. C.; UENG, T. H.; LIN, Y. H.; LIN, S. Y.; WANG, L. Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced liver damage. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 28, n. 2, p. 163-173, 2000.
- LING G. V.; MORGAN J. P.; POOL R. R: Primary bone tumors in the dog: a combined clinical, radiographic, and histologic approach to early diagnosis. **Journal American Veterinary Medical Association** v.165, p.55-67, 1974.
- LIU F., MALAVAL, L., GUPTA, A.K., AUBIN, J.E. Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. **Developmental Biology**. v.166, p. 220–234, 1994.
- LOTAN R. Effects of vitamin A and its analogues (retinoids) on normal and neoplastic cells. **Biochimica Biophysica Acta** v.605, p. 33-91, 1980.
- LOUKOPOULOS P.; O'BRIEN T.; GHODDUSI M.; MUNGALL B. A.; ROBINSON W. F. Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. **Research in Veterinary Science**. v. 77, n. 2, p. 131-141, 2004.
- LU W.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.; DING, X.; CHEN, H.; LIU, M. Microemulsion electrokinetic chromatography for the separation of arctiin and arctigenin in *Fructus Arctii* and its herbal preparations. **Journal of Chromatogr B Analytical Technologies Biomedical Life Sciences**, v. 860, n. 1, p. 127-133, 2007.
- LUCROY M. D.; PECK J. N.; BERRY C. R: Osteosarcoma of the patella with pulmonary metastases in a dog. **Veterinary Radiology and Ultrasound** v.42, p. 218-220, 2001.
- LUO J.; SUN M. H.; KANG Q.; PENG Y.; JIANG W.; LUU H. H.; LUO Q.; PARK J. Y.; LI Y.; HAYDO R. C. Gene therapy for bone regeneration, **Current Gene Therapy**. v. 5, n. 2, p. 167–179, 2005.
- 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.; ZH 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.
- LUU H. H.; SONG W. X.; LUO X.; MANNING D.; LUO J.; DENG Z. L.; SHARFF K. A.; MONTAG A. G.; HAYDON R. C.; HE TC. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 5, p. 665–677, 2007.
- MATSUMOTO, T.; HOSONO-NISHIYAMA, K.; YAMADA, H. Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. **Planta Medical**, v. 72, n. 3, p. 276-278, 2006.

MATSUZAKI Y.; KOYAMA, M.; HITOMI, T.; YOKOTA, T.; KAWANAKA, M.; NISHIKAWA, A.; GERMAIN, D.; SAKAI, T. Arctiin induces cell growth inhibition through the down-regulation of cyclin D1 expression. **Oncology Reports**, v. 19, n. 3, p. 721-727, 2008.

MESNIL M. Connexins and cancer. **Biology of the Cell**, v. 94, n. 7-8, p. 493-500, 2002.

MISDORP W. Skeletal osteosarcoma. Animal model: canine osteosarcoma. **The American journal of pathology**. v. 98, n. 1, p. 285-288, 1980.

MORRIS, C.; THORPE, J.; AMBROSIO, L.; SANTIN, M. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 5, p. 1166-1170, 2006.

MUELLER F.; FUCHS B.; KASER-HOTZ B. Comparative Biology of Human and Canine Osteosarcoma. **Anticancer research**. v. 27, p. 155-164, 2007.

NAKAMURA A.; AIZAWA J.; SAKAYAMA K.; KIDANI T.; TAKATA T.; NORIMATSU Y.; MIURA H.; MASUNO H. Genistein inhibits cell invasion and motility by inducing cell differentiation in murine osteosarcoma cell line LM8. **BMC Cell Biology**. v. 26; 13 (n. 1); 24, p. 1186/ 1471- 2121- 13-24, 2012.

NAKAYAMADA S.; OKADA Y.; SAITO K.; TAMURA M.; TANAKA Y. Beta(1) integrin/ focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 453, p.68–74, 2003.

NIEVES M. A.; VAHLE J.; ACKERMANN M.; HOWARD M.; DIETZ A. B.; CARPENTER S. L.; CHEVILLE N. Production and characterization of canine osteosarcoma cell lines that induce transplantable tumors in nude mice. **American journal of veterinary research**. v. 59, n. 3, p. 359-362, 1998.

NISHIBE, S. Bioactive phenolic compounds for cancer prevention from herbal medicines, in: H. Ohigashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, T. Yoshikawa (Eds.), **Food Factors for Cancer Prevention** p. 276-279, 1997.

NORRDIN R. W.; POWERS B. E.; TORGERSEN J. L.; SMITH R. E.; WITHROW S. J. Characterization of osteosarcoma cells from two sibling large-breed dogs. **American journal of veterinary research**. v. 50, n. 11, p. 1971- 1975, 1989.

PAVESE J. M.; FARMER R. L.; BERGAN R. C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. **Cancer Metastasis Reviews**. v. 29, p. 465–482, 2010

THOMPSON K. G.; POOL R. R. Tumors of bones, In : **Tumors in domestic animals**, 1th ed., pp. 245-318. State press, Iowa, EUA, 2002.

REYA, T.; CLEVERS, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 843-850, 2005.

ROH, M. S.; KIM, C. W.; PARK, B. S.; KIM, G. C.; JEONG, J. H.; KWON, H. C.; SUH, D. J.; CHO, K. H.; YEE, S. B.; YOO, Y. H. Mechanism of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induced apoptosis in human osteosarcoma cells. **Apoptosis**, v. 9, n. 5, p. 583-589, 2004.

RIFKIND R. A.; RICHON V. M.; MARKS P. A. Induced differentiation, the cell cycle, and the treatment of cancer. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 69, n. 2, p. 97-102, 1996.

SAKATA R.; MINAMI S.; SOWA Y.; YOSHIDA M.; TAMAKIT. Trichostatin A activates the osteopontin gene promoter through AP1 site. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 315, p. 959-963, 2004.

SANCHES, D. S.; PIRES, C.; FUKUMASU H.; COGLIATI B.; MATSUZAKI P.; CHAIBLE L.; TORRES L.; FERRIGNO, C. R.; DAGLI, M. L. Expression of connexins in normal and neoplastic canine bone tissue. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 846- 859, 2009.

SANTINI M. T.; RAINALDI G.; INDOVINA L. P. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids . **Critical Reviews in Oncology: Hematolog** v. 36, p.75-87, 2000.

SANTINIA M. T.; RAINALDIA G.; ROMANOB R.; FERRANTEA A.; CLEMENTEC S.; MOTTAB A.; INDOVINAB P. L. MG-63 human osteosarcoma cells grown in monolayer and as three-dimensional tumor spheroids present a different metabolic profile :a ¹H NMR study. **FEBS Letters** v. 557, p. 148-154, 2004.

SÉGUIN B.; ZWERDLING T.; MCCALLAN J. L.; DECOCK H. E.; DEWE L. L.; NAYDAN D. K.; YOUNG A. E.; BANNASCH D. L.; FOREMAN O.; KENT M. S. Development of a new canine osteosarcoma cell line. **Veterinary and comparative oncology**. v. 4, n. 4, p. 232-240, 2006.

SERRA M.;TARKKANEN M.; BALDINI N.; SCOTLANDI K.; SARTI M.; MAURICI D.; MANARA M. C.; BENINI S.; BACCHINI P.; KNUUTILA S.; PICCI P. Simultaneous Paired Analisis of Numerical Chromosomal Aberrations and DNA Content on Osteosarcoma. **Modern Pathology**. v. 14, n. 7, p. 710-716, 2001.

SCHILLER P. C.; D'IPPOLITO G.; BALKAN W.; ROOS B.A.; HOWARD G. A. Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. **Bone** v. 28, p.362-369, 2001.

SHIAU R. J.; CHEN, K. Y.; WEN, Y. D.; CHUANG, C. H.; YEH, S.L. Genistein and *b*-carotene enhance the growth-inhibitory effect of trichostatin A in A549 cells. **European Journal Nutrition** . v. 49, p.19-25, 2010.

STANGENBER G. L.; SCHAEFER D. J.; BUETTNER O.; OHNOLZ J.; MÖBEST D.; HORCH R. E .; STARKG. B.; KNESER U. Differentiation of Osteoblasts in Three-Dimensional Culture in Processed Cancellous Bone Matrix: Quantitative Analysis of

- Gene Expression Based on Real- Time Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction. **Tissue Engineering**. v. 11, n. 5-6, p. 855- 864, 2005.
- STEIN, G. S.; LIAN, J. B.; STEIN, J. L.; VAN WIJNEN, A. J.; MONTECINO, M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. **Physiological Reviews**, v. 76, n. 2, p. 593-629, 1996.
- SUN, S.; WANG, X.; WANG, C.; NAWAZ, A.; WEI, W. Arctigenin Suppresses Unfolded Protein Response and Sensitizes Glucose Deprivation-Mediated Cytotoxicity of Cancer Cells. **Planta Medicinal**. v. 77, n. 2, p. 141- 145, 2010.
- SUSANTI S.; IWASAKI H.; ITOKAZU Y.; NAGO M.; TAIRA N.; SAITOH S.; OKU H.; . Tumor specific cytotoxicity of arctigenin solated from herbal plant *Arctium lappa* L. **Journal Natural Medicine**. v. 66, p. 614–621, 2012.
- SUTHERLAND R, CARLSSON J, DURAND R, YUHAS J. Meeting Report. Spheroids in Cancer Research. **Cancer research** v. 41, p. 2980-2984, 1981.
- TAKASAKI M.; KONOSHIMA T.; KOMATSU K.; TOKUDAH.; NISHINO H. Anti-tumor-promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa*. **Cancer Letters**. V. 158, p. 53-59 2000.
- THOMAS, D.; KANSARA, M. Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. **Journal Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 4, p. 757-769, 2006.
- TROSKO, J. E.; MADHUKAR, B. V.; CHANG, C. C. Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: toxicological and pharmacological implications. **Life Sciences**, v. 53, n. 1, p. 1-19, 1993.
- TORRICELLI P.; FINI M .; GIAVARESI G.; BORSARI V.; CARPI A.; NICOLINI A.; GIARDINO R. Comparative interspecies investigation on osteoblast cultures:data on cell viability and synthetic activity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. n. 57, p. 57–62, 2003.
- WAGNER E. R.; LUTHER G. V.; ZHU G.; LUO Q.; SHI Q.; KIMS. H.; GAO J. L.; HUANG E.; GAO Y.; ANG K.; WANG L.; TEVEN C.; LUO X.; LIU X.; LI M.; HU N.; SU Y.; BI Y.; HE B. C.; TANG N.; LUO J.; CHEN L.; ZUO G.; RAMES R.; HAYDON R. C.; LUU H. H.; HE T. C. Defective Osteogenic Differentiation in the Development of Osteosarcoma. **Sarcoma**. v. 2011, p. 1-12, 2011.
- WATT, F. M. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. **Current Opinion in Genetics Development**, v. 11, n. 4, p. 410-417, 2001.
- WITHROW S. J.; POWERS B. E.; STRAWS R. C.; WILKINS R. M: Comparative aspects of osteosarcoma, dog versus man. **Clinical orthopaedics and related Research** v. 270, p. 159-167, 1991.
- WOLKE R. E.; NIELSEN S. W: Site incidence of canine osteosarcoma. **Journal Small Animal Practice** v.7, p.489-492, 1966.

YANG, Q. C.; ZENG, B. F.; SHI, Z. M.; DONG, Y.; JIANG, Z. M.; HUANG, J.; LV, Y. M.; YANG, C. X.; LIU, Y. W. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by trichostatin A via suppression of HIF-1 α activity in human osteosarcoma. **Journal of Experimental Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 4, p. 593-599, 2006.

YAO X.; ZHU F.; ZHAO Z.; LIU C.; LUO L.; YIN Z. Arctigenin Enhances Chemosensitivity of Cancer Cells to Cisplatin Through Inhibition of the STAT3 Signaling Pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 112, p. 2837–2849, 2011.

ZHANG B.; SHI Z.L.; LIU B.; YAN X. B.; FENG J.; TAO H. M. Enhanced anticancer effect of gemcitabine by genistein in osteosarcoma: the role of Akt and nuclear factor- κ B. **Anti-Cancer Drugs** v. 21, p. 288-296, 2010.

ZHANG, Y. W.; MORITA, I.; IKEDA, M.; MA, K. W.; MUROTA, S. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. **Oncogene**, v. 20, n. 31, p. 4138-4149, 2001.

ZHOU S.; TURGEMAN G.; HARRIS S. E.; LEITMAN D. C.; KOMM B. S.; BODINE P. V. N.; GAZIT D. Estrogens Activate Bone Morphogenetic Protein-2 Gene Transcription in Mouse Mesenchymal Stem Cells. **Molecular Endocrinology**. v. 17, n. 1, p.56-66, 2003