DANIEL SOARES SANCHES

**Estudo da expressão das proteínas de junções intercelulares do tipo
“Gap”, as conexinas, em tecido ósseo normal e neoplásico de cães**

São Paulo

2008

DANIEL SOARES SANCHES

**Estudo da expressão das proteínas de junções intercelulares do tipo
“Gap”, as conexinas, em tecido ósseo normal e neoplásico de cães**

Dissertação 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 Mestre
em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

São Paulo

2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2022
FMVZ

Sanches, Daniel Soares

Estudo da expressão das proteínas de junções intercelulares do tipo “Gap”, as conexinas, em tecido ósseo normal e neoplásico de cães / Daniel Soares Sanches. – São Paulo : D. S. Sanches, 2008.
72 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli.

1. Conexinas. 2. Osteossarcomas. 3. Tumores ósseos. 4. Junções Gap. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da expressão das proteínas de junções intercelulares do tipo "gap", as conexinas em tecido ósseo normal e neoplásico de cães", protocolo nº 839/2006, utilizando 60 (sessenta) cães (cadáveres/peças cirúrgicas), 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Expression of gap junction proteins, the connexins, in normal and neoplastic bone tissue", protocol number 839/2006, utilizing 60 (sixty) dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 09 de março de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANCHES, Daniel Soares

Título: Estudo da expressão das proteínas de junções intercelulares do tipo “Gap”, as conexinas, em tecido ósseo normal e neoplásico de cães

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a)Dr(a)_____ Instituição_____

Assinatura_____ Julgamento_____

Prof(a)Dr(a)_____ Instituição_____

Assinatura_____ Julgamento_____

Prof(a)Dr(a)_____ Instituição_____

Assinatura_____ Julgamento_____

Aos meus sobrinhos Uly, Beatriz e Mateus

*E aos meus pais que
possibilitaram e acompanharam
de perto minha evolução profissional,
sempre demonstrando carinho e amor*

Agradecimentos

A minha orientadora Maria Lúcia Zaidan Dagli, por minha orientação, amizade, apoio, e compreensão não só no desenvolvimento de meu estudo, mas em todos estes cinco anos de meu convívio no departamento de Patologia;

Aos meus pais e Irmãs e cunhados que sempre estiveram do meu lado, sempre com palavras de incentivo, amor e dedicação,

Aos professores do Departamento de Patologia pela amizade, orientação, expressos;

A minha amigona Lú, que sempre me ajudou no diagnóstico de meus tumores,

Aos meus amigos Buga e Cláudio pelo trabalho realizado com muito carinho e dedicação,

Aos meus amigos Raimundo, Edson, pela força dada na coleta de amostras ósseas,

A minha amiga Marguite pela amizade e ajuda nas Imunos,

As meninas da cirurgia do HOVET-USP, Andressa, Mouse, Viviane e Sandra que me ajudaram muito na coleta de minhas amostras de tumor ósseo,

Aos meus amigos de Laboratório, Tarso, Márcia, Mirela, Teresa, Kátia Kimura, Heloisa, Marcelo, Luise, Ivone, por toda e qualquer orientação e ajuda,

Aos amigos Livia, Fred e Carol, Andréia, Picachu, Dona Ro, Viviane, Marina, Carolzinha, Ricardo, Alexandre Carioca, Domenica, Bel, Caio, André, Renato, Renata, Shirlei, pela amizade, e por qualquer forma de ajuda nestes anos de VPT, e também pelas horas de descontração,

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ-USP pela ajuda na confecção da tese, e desenvolvimento de meus estudos,

E um especial agradecimento aos meus amigos e colaboradores Heidge, Patrícia Bruno, Lucas, e a minha linda Ruiva Maria Carolina sem os quais o termino de meus trabalhos não seria possível,

A FAPESP pelo apoio financeiro (processos. 05/57902-0, 06/56512-6)

RESUMO

SANCHES, D. S. **Estudo da expressão das proteínas de junções intercelulares do tipo “Gap”, as conexinas, em tecido ósseo normal e neoplásico de cães.** [Expression of gap junction proteins, the connexins, in normal and neoplastic osseous tissues from dogs]. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Tem sido demonstrado que a capacidade de comunicação intercelular via junções do tipo *gap* tem relevância na formação óssea. A principal conexina envolvida no desenvolvimento, na diferenciação e na regulação de crescimento de tecidos ósseos é a conexina 43. Contudo, outras duas conexinas expressas, são a Cx 45, que aparece em menor número em relação a Cx43, e a Cx46 que é caracterizada por ser detectada frequentemente associada à região *transi*-Golgi. Alterações no perfil de expressão e localização aberrante das conexinas têm sido associadas a oncogênese, demonstrando uma diminuição da expressão destas conexinas em tecidos neoplásicos. Escassos são os estudos que avaliaram a expressão das conexinas 43, 45 e 46 em células de osteossarcoma, e nenhum estudo enfocando este aspecto foi realizado em osteossarcoma canino. No presente foram avaliados os tecidos ósseos normais e neoplásico de cães quanto à expressão das Cx43, e 46 por meio de imunofluorescência, os níveis de expressão das mesmas conexinas por meio de Western blot e por PCR em tempo real, assim como sua correlação com o tipo de tumor ósseo, associado ao exame histopatológico de rotina. Os resultados mostraram que os níveis de expressão gênica da Cx43 foram semelhantes entre o tecido ósseo normal e neoplásico, sendo as mesmas encontradas no citoplasma e membrana citoplasmática. A conexina 46 foi encontrada retida em região perinuclear, tendo níveis diferentes de expressão gênica entre os tecidos ósseo normal e neoplásico. Concluímos então que a conexina 43 é expressa por osteoblastos normais e neoplásicos em níveis semelhantes, porém há diferenças na expressão de Cx46. Concluímos também que existem diferenças quanto à localização subcelular destas duas conexinas em tecidos ósseos normais e neoplásicos de cães. Estes resultados indicam um possível envolvimento das conexinas 43 e 46 em tumores ósseos de cães.

Palavras chave: Conexinas. Osteossarcomas. Tumores ósseos. Junções Gap.

ABSTRACT

SANCHES, D. S. **Expression of gap junction proteins, the connexins, in normal and neoplastic osseous tissues from dogs.** [Estudo da expressão das proteínas de junções intercelulares do tipo “Gap”, as conexinas, em tecido ósseo normal e neoplásico de cães]. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Increasing evidence indicates that junctional communication by gap junctions has a critical role in a bone physiology. The main connexin (Cx) express involved in development, differentiation and regulation of tissue growth, is the called Cx43. However, other, two connexis are expressed: Cx45 and Cx46. Cx46 is retained as monomers in a trans-golgi compartment of osteoblastic cells. Alterations in the expression profile and aberrant localization of the conexinas have been associated to oncogenesis, demonstrating a reduction of the expression of these conexins in neoplastic tissues. In the present study, we aimed at evaluating the expression of Cx43 and Cx46 in normal and neoplastic osseous tissues from dogs, by means of immunofluorescence, Western blot and Real time- PCR. These results were correlated with the routine histological evaluation of the bone tumor. Results showed that the levels of genetic expression of Cx43 were similar in both normal and neoplastic osseous tissues from dogs, and the Cx43 were found both in the cytoplasm and in the cytoplasmic membrane. Connexin 46 was found in the perinuclear region of neoplastic osteoblasts, and different levels of genic expression were found between normal and neoplastic osseous tissues. We can conclude that the Cx43 is similarly expressed by both normal and neoplastic osteoblasts from dogs, however there are differences in the expression of Cx46. These results point to a possible role of connexins 43 and 46 in dog bone tumors.

Keywords: Connexins. Osteosarcoma. Bone tumors. Gap junctions.

LISTA DE ABREVIATURAS E TERMOS UTILIZADOS

cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar ao RNA
Conéxons	Unidade morfológica das junções do tipo GAP que consiste da oligomerização de 6 conexinas
Cx43	Conexina43; proteína da junção GAP alfa-1
Cxs	Conexinas
FMVZ – USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade de São Paulo
H&E	Hematoxilina eosina
kDa	Quilodáltons
mA	Microanperes
mg	Microgramas
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
µl	Micro litros
µm	Micro metros
Nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
ON	Osteonectina
OC	Osteocalcina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSA	Osteossarcoma
PBS	Solução tampão a base de fosfato
PCNA	Antígeno Nuclear de Células em Proliferação
PCR tempo real	Reação da Polimerase em cadeia em tempo real
PCR	Reação da Polimerase em cadeia
Primer	Oligonucleotídeos que reconhecem um determinado gene; iniciadores
qPCR	Reação de PCR em tempo real semi-quantitativa

RNA	Ácido Ribonucléico
r.p.m.	Rotações por minuto
TOM	Tumor ósseo multilobular
TSA	Tyramide Signal Amplification
TTBS	Solução tampão a base de Trizma associado a Tween
U	Unidades
WB	Western blot

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 O ESQUELETO, OS OSSOS E O TECIDO ÓSSEO	13
2.2 TUMORES ÓSSEOS	17
2.3 CONEXINAS	22
3. OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 ANIMAIS	27
4.2 COLETA DE MATERIAIS	27
4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	28
4.4 COLORAÇÃO HISTOQUÍMICA	29
4.5 IMUNOFLOURESCÊNCIA	29
4.6 IMUNOISTOQUÍMICA	30
4.7 ANÁLISE CAPTURA DE IMAGENS (laminas em H&E, imunoistoquímica e imofluorescência)	30
4.8 PCNA	31
4.9 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE TECIDO	31
4.10 WESTERN BLOT: ANÁLISE DE PROTEÍNAS – WESTERN BLOT (WB) ..	33
4.11 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DO TECIDO	34
4.12 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL TAQMAN	35
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5. RESULTADOS	37
5.1 APRESENTAÇÃO DOS CASOS	37
5.2 CARACTERÍSTICAS DOS TUMORES	39
5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES ÓSSEOS	41
5.4 REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA	43
5.5 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO NOS TUMORES ÓSSEOS	44
5.6 ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA)	46
5.7 CARACTERIZAÇÃO DAS Cx43 E Cx46 EM TUMORES ÓSSEOS	49
5.7.1 CONEXINA 43	49
5.7.2 CONEXINA 46	55
5.8 SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS ACOMETIDOS POR TUMOR	58
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

Osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, são as células ósseas responsáveis manter a homeostasia do tecido ósseo. Osteoblastos secretam matriz constituída principalmente de colágeno do tipo I, e quantidades variáveis de proteínas não colagenosas (entre elas, osteopontina, osteonectina, sialoproteína e osteocalcina) para formação de uma matriz extracelualr chamada de osteóide. Subseqüentemente esta matriz é modelada e remodelada, e por fim mineralizada. Quando da produção da matriz osteóide, osteoblastos que ficam presos em meio a esta matriz diminuem seu metabolismo e dão origem aos chamados osteócitos. Osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea, tendo uma participação importante no processo de formação óssea. Fica claro que para manter estes e outros processos em bom funcionamento, é necessário que exista uma comunicação direta entre as células, evitando desta maneira, que existam falhas que levem a perda desta homeostasia. As estruturas moleculares, responsáveis por esta comunicação são chamadas junções do tipo gap, constituídas de sub-unidades de nome conexinas. Estas junções do tipo gap, agem nos tecidos ósseos permitindo a passagem de moléculas entre as células, fazendo com que o osso funcione como um “sincício funcional”, transmitindo de forma rápida e eficaz, mensagens entre os contituíntes celulares dos ossos. Conexinas tem sido associadas a processos neoplásicos, e com principal enfoque voltado para a sua capacidade suressora de tumor. Ossos como qualquer outro órgão do organismo de vertebrados, são passíveis de transformação neoplásica. Sendo assim o estudo da expressão das conexinas nos tecidos ósseos se fazem de extrema relevância, pois o conhecimento do comportamento destas proteínas, na fisiologia dos ossos assim com na patofisiologia dos tumores, são ferramentas importantes na busca de melhores prognósticos, e de melhorias na terapêutica associada a estes tipos de tumores. Neste trabalho estudamos a expressão das conexinas em tecidos ósseos normais e neoplásicos de cães. Verificamos sua localização nas células, os seus níveis de expressão, assim como a tentativa de correlação com processos como a proliferação neoplásica e a produção de matriz principalmente em osteossarcomas, o tipo mais comum de neoplasia óssea encontrada em cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ESQUELETO, OS OSSOS E O TECIDO ÓSSEO

O esqueleto de cães assim como de todos os outros vertebrados, consiste de ossos e articulações, funcionando como suporte para as partes moles, protegendo órgãos vitais na cavidade torácica e caixa craniana. Também aloja e protege a medula óssea, proporciona apoio aos músculos esqueléticos transformando suas contrações em movimentos úteis constituindo um sistema de alavancas que amplia as forças geradas durante a contração muscular (função mecânica). Além destas funções, os ossos funcionam como depósito de células sanguíneas, fosfato de cálcio e outros íons, liberando-os de maneira controlada (funções metabólicas e hematopoiética). O esqueleto pode ser dividido em esqueleto apendicular (membros torácico, membros pélvicos e ossos do coxal) e esqueleto axial (ossos do crânio, vértebras, costelas e esterno) (PORTER et al.,1997; WEISBRODE, 2007) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema de um esqueleto canino. Fonte: lesnau.vilabol.uol.com.br

Durante a vida de um indivíduo os ossos sofrem alteração e são continuamente remodelados. Este processo altera seu tamanho e forma em resposta a vários estímulos normais, patológicos, mecânicos e bioquímicos (PORTER et al.,1997). Os ossos como os órgãos individuais, variam em função, formação, crescimento e estrutura. A função mecânica dos ossos determina a sua aparência macroscópica e sua forma microscópica. (PORTER et al.,1997). Ossos longos como os do esqueleto apendicular e os da coluna vertebral são divididos anatomicamente em epífises, placa metafisária de crescimento, metáfises, e diáfises (Figura 2). São constituídos de uma variedade de tecidos mesenquimais, sendo encontrados os tecidos: ósseo, cartilaginoso, nervoso, adiposo, hematopoiético, e tecido mesenquimal ordinário (POOL; THOMPSON, 2002).

Figura 2 - Esquema de corte longitudinal de osso longo mostrando parte esponjosa (osso esponjoso) e parte compacta (osso compacto).

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo de vertebrados. Esta estrutura rígida permite uma classificação com base em sua estrutura macroscópica, em osso compacto e osso esponjoso (esta classificação é utilizada macroscopicamente, pois ambos, osso compacto e esponjoso, compartilham da mesma estrutura histológica básica). Histologicamente, o tecido ósseo é categorizado de acordo com a organização

do colágeno depositado em osso primário ou imaturo (Woven) e osso secundário ou lamelar (Figura 2). O osso compacto é organizado em numerosas estruturas básicas chamadas de Osteon ou sistemas de Harvers. Estas estruturas são caracterizadas por cilindros de camadas concêntricas de lamelas que contém centralmente localizados, vasos sanguíneos e nervos. Entre estes cilindros, são encontrados ossos lamelares chamado de lamela intersticial e o osso envolto a estas estruturas, que dá a forma cilíndrica aos ossos, é chamada de lamela circunferencial. Esta estrutura osteonal é suprida por vasos sangüíneos que se dispõem longitudinalmente (osteon) e transversalmente (canais de Wolkman) à orientação do eixo principal (Figura 3). Ao contrário do osso compacto, com sua estrutura rígida, o osso esponjoso é caracterizado por apresentar anastomoses de finas trabéculas, constituídas de deposição lamelar delgada, na qual a sua orientação, reflete adaptação ao estresse mecânico aplicado ao osso (Figuras 2 e 3) (WEISBRODE, 2007). Osso imaturo ou Woven, é visto em regiões de rápido crescimento ósseo, incluindo o osso primário do embrião, calos ósseos após fraturas, reação periostal (encontrados em processos responsivos a infecções, inflamações ósseas e tumores) e tumores ósseos. Osso lamelar é encontrado em regiões de baixo crescimento ósseo, como os encontrados no organismo adulto e na remodelação óssea (PORTER et al., 1997)

Figura 3 - Cortes de osso desgastado. A esquerda osso esponjoso. A direita esquema de corte de osso demonstrando sistema de Harvers

O osso é composto de uma fase extracelular, que é formada, mantida e remodelada por três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. É um tecido dinâmico, influenciado por fatores físicos, nutricionais e fisiológicos (RATH et al.,

2000). Os osteoblastos estão presentes nas superfícies dos ossos, onde a formação óssea ativa está ocorrendo, e secretam matriz chamada de osteóide, que posteriormente é calcificada. Esta matriz é principalmente constituída de colágeno do tipo I associado a uma fase mineral composta de hidroxiapatita, mas também 10 a 15% de proteínas não-colagenosas, que incluem osteopontina, osteonectina (ON), sialoproteína e osteocalcina(OC). Além disso, uma pequena quantidade de proteoglicano está presente (PORTER et al., 1997; GAY; WEBER, 2000). Osteoblastos são derivados de células tronco mesenquimais. Quando ativos, são grandes, com abundante citoplasma basofílico rico em retículo endoplasmático rugoso, proeminente complexo de golgi, e numerosas mitocôndrias. Inativos osteoblastos demonstram-se com pequeno escasso citoplasma devido à redução em suas organelas necessárias na síntese de matriz e secreção. Uma verificação indireta da atividade osteoblástica é refletida pela concentração sanguínea das enzimas fosfatase alcalina e proteínas não colagenosa osteocalcina (OC). Não se sabe ao certo a função destas duas enzimas, porém a fosfatase alcalina, é encontrada na superfície de osteoblastos e a osteocalcina (OC) é secretada pelos osteoblastos e encontrada na matriz extracelular (WEISBRODE, 2007).

Osteócitos são osteoblastos que foram albergados pela matriz óssea extracelular depositada. Eles ocupam pequenos espaços chamados de lacunas, em fazem contato entre si e com osteoblastos através de longos processos citoplasmáticos encontrados em pequenos túneis através de matriz ossificada, chamados de canaliculos.

Osteoclastos são células responsáveis pela reabsorção de matriz óssea. São derivadas de células tronco hematopoiéticas, derivadas de granulócitos-monócitos. Eles possuem abundante citoplasma eosinofílico e bordas especializadas em escova, adjacente a superfície óssea que está sendo reabsorvida (WEISBRODE, 2007).

Figura 4 - Fotomicrografias de osso imaturo, mostrando as células que constituem o tecido ósseo (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) (objetiva 20x)

2.2 TUMORES ÓSSEOS

Como qualquer outro órgão dos organismos vertebrados, os ossos são passíveis de transformação neoplásica. Os tumores primários podem ser derivados de tecido conectivo ordinário, vasos sangüíneos, cartilagens, e células ósseas (como os osteoblastos, osteoclastos e seus precursores) (JUBB et al., 1993), sendo os tumores derivados de células ósseas e cartilaginosas os mais comuns (POOL; THOMPSON; 2002). Tumores ósseos primários do esqueleto são comuns em cães, tendo uma incidência de aproximadamente 65 a 85% para osteossarcomas (OSAs) e 15% para condrossarcomas (JONES et al., 2000; DERNELL et al., 2001). Os OSAs acometem 4% de todas as moléstias neoplásicas, e 98% dos tumores ósseos primários do esqueleto apendicular. As formas benignas de tumores ósseos em animais domésticos são descritas como incomuns. (JONES et al., 2000; POOL; THOMPSON, 2002).

Tumores mesenquimais de partes moles e sarcomas primários do esqueleto perfazem um largo e heterogêneo grupo de neoplasmas. Dados de histomorfologia, imunohistoquímica e dados experimentais têm sugerido que muitos, se não todos, sarcomas de são derivados de células mesenquimais primitivas multipotenciais, que podem se diferenciar em uma ou mais linhagens durante o curso da transformação neoplásica (HOENERHOFF, 2004). A classificação destas neoplasias como benignos e

malignos, é tipicamente baseada em achados morfológicos. Estes grupos são subdivididos baseado em seu tipo celular, matriz produzida e localização em relação ao osso acometido (central ou medular e periférico), sendo os tumores de origem central os de maior incidência e envolvimento. (JUBB et al., 1993; POOL; THOMPSON, 2002). Um diagnóstico acurado dos tumores ósseos requer adequadas avaliações clínicas e radiográficas, assim como exame histopatológico. As lesões benignas são classificadas como osteoma, fibroma ossificante, mixoma, osteocondroma, condroma e hemangioma. As lesões malignas centrais são classificadas como OSA pobremente diferenciado, OSA osteoblástico (produtivo e não produtivo), OSA condroblástico, OSA fibroblástico, OSA telangiectásico, e OSA de células grandes; condrossarcoma, fibrossarcoma, hemangiossarcoma, tumor ósseo de células grandes e tumor ósseo multilobular ; e as lesões malignas periféricas como: condrossarcoma periostal, fibrossarcoma periostal, fibrossarcoma maxilar, OSA periostal e osteossarcoma parosteal (BOOSINGER et al., 1994).

Os OSAs ocorrem principalmente em cães de meia idade (média de sete anos) e em raças de porte grande ou gigante (não se observa predileção racial), sendo que em 75% dos casos acomete o esqueleto apendicular e os 25% restantes afetam o esqueleto axial (JONES et al., 2000). Manifestações clínicas refletem o local da lesão, porém como o esqueleto apendicular é o mais afetado, a claudicação é o primeiro sinal em muitos dos casos. Outros sinais que acompanham o desenvolvimento do tumor, são : congestão, edema, fibroplasia, e formação periostal. Com o passar do tempo a musculatura do membro afetado torna-se atrófica e os linfonodos reponsáveis pela drenagem linfática local tornam-se firmes e aumentados em volume. Fraturas patológicas podem ocorrer, mesmo sem sinais evidentes especialmente se o crescimento é rápido e osteolítico. (POOL; THOMPSON, 2002). Dentre as principais características radiográficas observam-se padrões variando entre lesões completamente osteolíticas e osteoblásticas, lise cortical, proliferação periostal e aumento de tecidos moles. Embora uma quantia menor que 5% dos cães acometidos apresentam metástases pulmonares detectáveis pelo raio-x quando primeiramente apresentados ao médico veterinário, 90% morrem ou são eutanasiados devido a complicações associadas às metástases pulmonares. O tempo de sobrevivência em cães com OSAs de esqueleto axial e marginalmente melhor do que aqueles acometidos no esqueleto apendicular (HEYMAN et al., 1992).O local de predileção do aparecimento de OSAs é a região metafisária do

úmero proximal, rádio e ulna distal, fêmur distal e tibia proximal (Figura 5), podendo se expandir para ossos adjacentes com a sua evolução (BURK, 1996). De fato em um estudo realizado para verificação de incidência de OSA canino, foi observado que 68% dos tumores ocorreram em quatro dos ossos longos rádio (23%), úmero(19%), tibia (14%) e fêmur (14%) (WOLKE et al., 1966). No intuito de se descobrir algo a respeito desta disposição peculiar, a região do rádio onde há predileção ao OSA foi avaliada em cães sadios de diferentes portes, não sendo evidenciada a presença de microlesões ou áreas de remodelamento ósseo, o que sugere que estas alterações, quando associadas, são um fator de risco importante para a indução de OSA (GELLASCH, 2002). Cães machos e fêmeas tendem a ser mais acometidos pelo osteossarcoma apendicular e axial, respectivamente (BRODEY, 1969; JACOBSON, 1971; LING, 1974; MISDROP, 1979). Estudos retrospectivos analisaram cães de grande porte com OSA axial, e correlacionam a raça do animal com o respectivo tempo de sobrevida, concluindo que nos cães sem raça definida existe um tempo de sobrevivência significativamente maior (DICKERSON, 2001).

Figura 5 : Locais mais acometimento por tumores ósseos Fonte :
www.marvistavet.com/.../Osteosarcoma_dog.gif

Apesar da disposição característica do OSA, este pode vir a acometer qualquer tecido, tanto primária quanto secundariamente. Sítios incomuns também apresentam potencial metastático alto, como o OSA proveniente da patela, que assim como o da escápula demonstra potencial agressivo e de comportamento biológico similar ao de cães com a afecção de localização apendicular (LUCROY et al., 2001; DALECK,

2002). As lesões metastáticas em ossos adjacentes, chamadas “Skip Metastases”, tem um prognóstico similar ou até mais grave que o associado a metástases pulmonares (MOORE et al., 2000). Componentes metastáticos podem em parte, diferir em aparência histológica, tipo celular e formação de matriz extracelular em relação ao tumor primário, sugerindo um potencial multipotente de diferenciação celular associado (HOENERHOFF, 2004). O conceito de que neoplasmas malignos primários dos ossos poderiam conter elementos fibroblásticos e condroblásticos, são objetos de vários estudos em termos de prognóstico. Em humanos alguns acreditam que estes achados histológicos denotariam em parte em melhor prognóstico. Outros não, e relatam com cautela quando observam tais achados como bom prognóstico para OSA. Vários estudos realizados com animais conduzidos por patologistas veterinários, têm resultado similar no conflito de opinião sobre o prognóstico e sua correlação com o subtipo histopatológico. Também se acredita que o microambiente de um OSA pode ditar a direção da diferenciação mesenquimal que será seguida pelas células do tumor. Isto é baseado no fato de que a natureza radiográfica de um OSA pode mudar com o tempo de evolução da moléstia (BOOSINGER et al., 1994).

A aparência macroscópica e radiográfica, dos tumores ósseos é variável e é determinada pelo comportamento das células tumorais, e da natureza da matriz que é produzida e depositada. Em todos os subtipos histopatológicos, existe destruição de osso normal, formação de osso reativo no periósteo e endósteo, e produção de osteoide pelas células tumorais. Algumas formas são predominantemente líticas, outras produtivas, e algumas uma mistura de elementos produtivos e destrutivos. Os subtipos de OSA que freqüentemente formam lesões líticas incluem e que por vezes permitem um reconhecimento macroscópico são: OSA pobremente diferenciado, OSA osteoblástico não produtivo, e OSA fibroblástico, nos quais todos possuem matriz mole e pálida contendo pequenas áreas distribuídas aleatoriamente de tecido mucóide, congestão e necrose. A diferenciação dos três subtipos é realizada por exame microscópico; OSA condroblástico e alguns tipos mistos de OSA produzem matriz cartilaginosa pálida e em quantidade suficiente para detecção macroscópica; OSA telangectático é reconhecido pela sua aparência hemorrágica, e consistência mole, porém não pode ser distinguida de hemangiossarcomas primário ou secundário; OSA de células gigantes usualmente possuem homogênea e aparência pálida e sua matriz possui consistência de “barro”.

Em OSAs caracterizados por padrão misto, pode ocorrer destruição parcial da arquitetura normal do osso em adição a quantidades variáveis de matriz óssea depositados. Este osso novo depositado pode ter três origens: depositados por células tumorais em grupos aleatoriamente distribuídos e intercalados ao osso esponjoso; segundo, depositados pelo endosteio reativo e terceiro pela reação do periosteio ao tumor. Inseridos neste contexto misto de destruição e produção estão os OSA osteoblástico produtivo, OSA condroblástico, e por volta de 50% dos OSA fibroblásticos.

Apenas alguns tipos de OSAs são inicialmente produtivos, como os encontrados em ossos chatos como escapula, mandíbula, íleo, e ísquio. Nestes, a confusão com infecções fúngicas, osteomielite pode ocorrer devido ao espreado do tumor sobre a superfície do osso normal e perda do suprimento sanguíneo para cavidade medular, enfartando esta região. Devido a este conjunto de alterações a parte viável do tumor e a reação periosteal associada, conferem um padrão na diáfise que se assemelha a outras moléstias não neoplásicas radiologicamente.

A aparência histopatológica pode variar em casos de OSA. Porém casos de definitivo diagnóstico são baseados na produção de osteóide e/ou osso por células mesenquimais. Devido à natureza multipotencial das células mesenquimais primitivas, quantidades variáveis de osteóide, matriz cartilaginosa, e colágeno podem ser encontradas. Porém em tumores em que a quantidade do componente cartilaginoso é predominante, a presença de osteóide denota um diagnóstico de OSA. Isto reflete o grande potencial maligno de tumores mesenquimais com potencial osteogênico. Formação óssea pode ocorrer em casos de condrossarcoma e similarmente em casos de metaplasia óssea em casos de carcinoma mamário, adenocarcinoma intestinal, e melanoma oral, e não pode ser confundido com a produção de matriz óssea por células tumorais. Neste sentido em uma biópsia e que se observa à produção de cartilagem ou colágeno por células mesenquimais não excluem a possibilidade de OSA, fazendo-se necessárias, o exame de vários fragmentos de diferentes regiões do tumor, visto que um fragmento analisado não reflete a natureza e o comportamento do tumor podendo não ser representativo. Osteoblastos malignos variam em forma podendo se apresentar: pleomórficos, fusiformes como fibroblastos, oval, e redondas com citoplasma basofílico e excêntrico e hipercromáticos nucléolos que se assemelham a osteoblasto não neoplásico (POOL; THOMPSON, 2002).

2.3 CONEXINAS

Estudos demonstram que as células ósseas normais assim como as neoplásicas podem comunicar-se através de fatores solúveis, e o microambiente é abundante em citocinas e fatores de crescimento com funções parácrina e autócrina. Acentuadas são as evidências que demonstram que as interações diretas de uma célula à outra célula podem estar diretamente envolvidas na manutenção da homeostasia do tecido ósseo (UDAGAWA et al., 1989). Outra maneira importante de comunicação celular é via junções do tipo *gap* é, de clara relevância na formação óssea. Por exemplo, os osteoblastos formam uma rede de comunicação semelhante a um epitélio sobre a superfície óssea as quais são interconectadas por conexinas, as proteínas que constituem as junções comunicantes do tipo *gap* (GUILLOTIN et al., 2004). Osteoblastos também se comunicam com osteócitos através de longos processos citoplasmáticos, encontrados no interior de canalículos via junções do tipo *gap* (STAINS; CIVITELLI, 2005)

O padrão de expressão de genes de conexinas não é idêntico em todos os tecidos. As junções *gap* nos diferentes tecidos compartilham uma estrutura básica com proteínas de seis subunidades, as **conexinas** (Cxs), formando um hemi-canal, o **conéxon**, cada um fornecido por uma célula adjacente. As Cxs, proteínas filogeneticamente conservadas (KRUTOVSKIKH et al., 1995), são encontradas na maioria dos tecidos animais amplamente distribuídas em praticamente todas as espécies animais. Através das Cxs existe a troca direta de moléculas com peso molecular inferior a 1000 - 2000 daltons (YAMASAKI, 1990; YAMASAKI; NAUS, 1996). Estas proteínas são codificadas, nos mamíferos, por uma família multigênica, constituída por 21 membros (CRUCIANI; MIKALSEN, 2005).

O cDNA que codifica para as Cxs revela regiões de alta homologia, e regiões com pequena ou nenhuma homologia, de forma que uma classificação das conexinas por números, que correspondem aos pesos moleculares, pôde ser estabelecida (Cx25, Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx31.3, Cx31.9, Cx32, Cx36, Cx37, Cx40, Cx40.1, Cx43, Cx45, Cx46, Cx47, Cx50, Cx58 e Cx62), e relacionada aos diferentes tipos celulares (YAMASAKI ; NAUS, 1996; CRUCIANI; MIKALSEN, 2005).

A participação direta das Cxs no desenvolvimento, na diferenciação e na regulação de crescimento vem sendo descrita há pelo menos 25 anos (LOEWENSTEIN, 1979; YAMASAKI ; NAUS, 1996; TROSKO; RUCH, 1998; EVANS; LEVIN, 2001; MARTIN, 2002; WEI et al., 2004). A alteração em uma única base do gene que codifica para as Cxs acarreta inúmeras desordens genéticas nos seres humanos (EVANS; MARTIN, 2002; WILLECKE et al., 2002). A hipótese de que as Cxs estariam diretamente envolvidas nas etapas de promoção/progressão da carcinogênese foi primeiramente descrita no final da década de 60 (LOWENSTEIN, 1966) e sua capacidade supressora de tumor é foco de inúmeras revisões na literatura atua sobre tema (MESNIL, 2002).

Recentes estudos têm mostrado que células ósteo-progenitoras oriundas de células estromais da medula óssea, em contato direto com células endoteliais umbilicais humanas, apresentam capacidades alteradas de diferenciação e proliferação quando em cultura (GUILLOTIN et al., 2004). Recentemente tem se demonstrado que estas células osteoprogênitoras células endoteliais se comunicam via junções do tipo gap constituídos principalmente pela Cx43 (Gja1), necessária para o processo de maturação celular de osteoblastos. Resultados têm demonstrado que a cooperação entre os osteoblastos é específica para células endoteliais primárias e que esta cooperação celular é dependente das junções do tipo *gap*. Um aumento na atividade da fosfatase alcalina que determina o grau de diferenciação dos osteoblastos foi observada quando estes dois tipos celulares estão em contato direto (VILLARS et al., 2002). Outro estudo mostrou que a Cx43 desempenha um papel essencial na comunicação entre os osteoblastos participando diretamente no seu desenvolvimento (EWART et al., 1997; HUANG et al., 1998). Alterações da expressão da Cx43 desempenham papel crítico no processo normal de ossificação e na função dos osteoblastos (LECANDA et al., 2000).

Além da Cx43, a principal Cx envolvida no processo de ossificação, a Cx45 está presente em osteoblastos humanos normais, porém em quantidades relativas inferiores às observadas para a Cx43 (CIVITELLI et al., 1993). A Cx43 permite, a difusão de um sinal relativamente alto de moléculas menores que 1.2 kDa de peso molecular e preferência por cargas negativas. Em contraste a Cx45 forma pequenos poros permitindo a difusão de moléculas menores que 0.3 kDa com preferência para cargas moleculares positivas. Porém a formação de hemicanais homoméricos ou heteroméricos entre estas duas conexinas é possível, e as conexinas que formam o

hemicanal ditam o tamanho molecular e a permeabilidade resultante do canal formado (MARTINEZ et al., 2002 ; WEBER et al., 2004). Esta propriedade também é associada à possibilidade existente de formação de interações heterotípicas, dependentes da compatibilidade dos “loops” extracelulares entre dois conexons. Assim em conjunto, estas duas Cxs, juntas, conferem grande plasticidade, ditando permeabilidade e seletividade resultantes, restringindo ou permitindo sinais entre células adjacentes (CRUCIANI; MIKALSEN, 2002; WARN- CRAMER et al., 2004). Os osteoblastos expressam também a Cx46 que é caracterizada por não ser traficada corretamente para membrana citoplasmática, permanecendo na região *trans*-Golgi em células em cultura (KOVAL et al., 1997). Interessantemente, não há relatos na literatura que mostrem a localização de tal Cx *in vivo*. Outro aspecto relevante é a falta de informações sobre o papel desta Cx no processo de diferenciação celular dos osteoblastos. Uma característica interessante desta Cx é a sua capacidade de formar canais heterotípicos com a Cx43 (DAS SARMA, 2001).

As Cxs, e os genes que codificam estas proteínas têm sido estudadas em tecidos normais e em neoplásicos humanos. No entanto, são escassos os relatos de estudos semelhantes em animais domésticos. O único trabalho do gênero foi desenvolvido por pesquisadores de nossa equipe utilizando tumores mamários com diferentes graus de diferenciação onde se estudou o perfil de expressão das Cx26 e da Cx43 (TORRES et al., 2005). Um decréscimo da expressão das conexinas foi observado em neoplasias mamárias, renais e sarcomas , por Wilgenbus et al (1992) .

Alterações no perfil de expressão e localização aberrante das Cxs têm sido associadas à oncogênese (YAMASAKI, 1990; TROSKO et al., 1990; ROSE et al., 1993; KRUTOVSKIKH et al., 1995; YAMASAKI; NAUS, 1996). Devido a constante observação de que as principais Cxs expressas em um tecido estão ausentes na massa tumoral, tem se considerado que tais genes constituem uma família de genes supressores de tumores (YAMASAKI, 1990). Corroborando com esta hipótese, células humanas de OSA U2OS transfectadas com o cDNA que codifica para a Cx43 diminuiu a proliferação destas células (ZHANG et al., 2001).

São poucos os estudos que avaliaram a expressão das Cxs 43, 45 e 46 em células de OSA de ratos linhagem ROS 17/2.8, de linhagem UMR 106-01(RODAN et al., 1989) e de linhagem MC3T3-E1 (YAMAGUCHI et al., 1994). Até o presente momento

não existem estudos que avaliem a expressão de Cxs no tecido ósseo canino, bem como sua participação nos processos neoplásicos originários destas células.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o tecido ósseo normal e neoplásico quanto aos níveis de expressão das Cx43, 45 e 46, assim como sua correlação com o tipo de tumor ósseo e índice proliferativo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diagnosticar e classificar as neoplasias ósseas de cães obtidos no ambulatório de cirurgia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, por meio de exame histopatológico;
- Investigar a localização e os níveis de expressão das Cx43, 45 e 46 em tecido ósseo normal de cães, por meio de imunofluorescência;
- Investigar a presença destas mesmas conexinas em processos neoplásicos malignos do tecido ósseo de cães, por meio de imunofluorescência;
- Determinar os níveis de expressão das Cx43, 45 e 46 em neoplásico, por Western blot;
- Determinar os níveis de expressão relativa dos RNAm das Cx43, 45 e 46 em tecido ósseo normal e neoplásico, por PCR em tempo real.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados cães machos e fêmeas oriundos do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (HOVET da FMVZ-USP) para a realização dos experimentos sendo divididos em dois grupos, o primeiro de animais sem alterações neoplásicas em ossos, e o segundo de animais com acometimento neoplásico primário dos ossos, sendo:

- Para o estudo da expressão das conexinas (Cxs) em ossos normais, foram escolhidos cães encaminhados ao Serviço de Necropsia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, os quais tenham vindo a óbito devido a outros processos que não os neoplásicos do tecido ósseo.
- Os animais para o estudo das mesmas Cxs em tecido neoplásico foram escolhidos após diagnóstico e estadiamento clínicos no Serviço de Cirurgia do Hospital Veterinário da FMVZ-USP. Foram então encaminhados, ao Serviço de Patologia Animal da FMVZ-USP, tecido ósseo alterado de cães portadores de neoplasias malignas. Após exame histopatológico, foram selecionados apenas aqueles animais que continham neoplasias com origem no tecido ósseo.

4.2 COLETA DE MATERIAIS

Ossos normais: durante a necropsia, de seis cães, foram coletados fragmentos ósseos das epífises e metáfises de ossos longos (fêmur), os quais foram cortados transversalmente, com uma espessura de 4 mm aproximadamente. Porções representativas de tecidos ósseos foram fixadas tanto em formol a 10% por 48 horas como em metacarn (fixador alcoólico composto por 60% de metanol, 30 % de clorofórmio e 10% de ácido acético) por 12 horas, sendo então transferidos (quando em

metacarn) para álcool 95% onde foram mantidos 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 parafina para confecção de lâminas histológicas para o exame histopatológico, imunofluorescência, colorações histoquímicas e imunoistoquímicas. Outros fragmentos ósseos das mesmas regiões foram lavados com água ultrapura autoclavada, a fim de retirar tecidos moles aderidos a superfície externa e retirada de medula óssea. Após isso, foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80°C , para a realização das técnicas de Western blot (WB) e PCR em tempo real.

Neoplasias ósseas: O tecido ósseo alterado foi colhido imediatamente após a cirurgia de retirada (14 animais) ou durante exame necroscópico (5 animais). Este foi colhido e representado da mesma maneira descrita acima.

4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os fragmentos ósseos coletados após confecção de lâminas de rotina em hematoxilina e eosina (H&E) foram analisados a fim de observar a estrutura normal do tecido ósseo e verificação de possíveis alterações ou moléstias associadas ao tecido ósseo.

Os fragmentos de tecido ósseo alterado por moléstias neoplásicas, após confecção de lâminas e coloração de rotina através de coloração H&E, foram observados ao microscópio óptico comum, possibilitando conjuntamente com dados clínicos e radiográficos, um diagnóstico morfológico, e classificação de subtipos encontrados, tomando por base a orientação de Slayter et al.,(1994). Em sua obra ***Histological Classification of Bone and joint Tumors of Domestic Animals***, referência associada à Organização Mundial da Saúde (OMS).

4.4 COLORAÇÃO HISTOQUÍMICA

Lâminas confeccionadas em cortes de 5µm foram utilizadas em coloração especial de Picrosirius (solução aquosa saturada de ácido picrico com sirius red a 2%) com o intuito de se avaliar a formação de matriz osteóide, e o tipo de colágeno depositado pelas células neoplásicas de origem no tecido ósseo. Imagens digitais foram obtidas através do microscópio Nikon E-800 com luz polarizada. fotomicrografias no item RESULTADOS).

4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e hidratados em seqüência decrescente de etanolálcoois (absoluto, 95% e 70%) e finalmente água destilada. O desmascaramento antigênico foi realizado com tampão próprio EDTA (pH 6,0) EDTA associado a TRISem 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 das Cx43 e Cx46, foram utilizados os anticorpos primários anti-Cx43 (Zymed®, 1:500 e 1:1000) e anti-Cx46 (Zymed®, 1:500 e 1:1000) e incubados em câmara úmida, 4°C *overnight* 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 biotinilados (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 fluorescência (fotomicrografias no item RESULTADOS).

4.6 IMUNOISTOQUÍMICA

Os cortes histológicos 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 *overnight*, em câmara úmida. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-PCNA (DakoCytomation, 1:600) anti-OSTEOCALCINA (ZYMED® 1:200), anti-OSTEONECTINA (ZYMED® 1:200), anti-VIMENTINA (DakoCytomation, 1:100), anti-PAN-CITOQUERATINA (DakoCytomation, 1:100). Como anticorpo secundário foi utilizado o kit LSAB (DakoCytomation); assim, os cortes foram incubados com solução contendo anti-imunoglobulina de camundongo biotinilada 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, 200µL 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.

4.7 ANÁLISE CAPTURA DE IMAGENS (lâminas em H&E, imunoistoquímica e imofluorescência)

As imagens digitais, das amostras de tecidos ósseos normais e 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.

4.8 PCNA (contagem de células)

Para análise da proliferação celular, quantificou-se o número de células positivas e negativas para o PCNA. Para isto, Depois de realizadas a técnica de imunoistoquímica e a captura de imagens digitais das laminas, seguiu-se aforam realizadas as contagensm de células de oito campos aleatórios de cada amostra utilizando objetiva 20X de um microscópio de luz. Foram contadas pelo menos 2000 2097 células por lâminaa partir desses 8 campos, calculando-se a porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-PCNA, utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ células positivas} = \text{número de células positivas} \times 100 / \text{número de células totais}$$

Foram realizados controles positivos e negativos para testar a sensibilidade e especificidade do anticorpo.

Para a análise das conexinas 43 e 46, graduou-se a presença da marcação em três graus de intensidade e número de marcações positivas observadas, sendo então estimado o índice de marcação positiva para as Cxs estudas em: discreto (+), moderado (++) e intensa (+++).

4.9 EXTRAÇÃO DE PROTEINAS DE TECIDO

Para extração de proteínas de tecido ósseo normal, o método empregado foi, através do maceramento do tecido ainda congelado em cadinho e pistilo. Para evitar degradação do material, todo o processo de maceração foi realizado com a utilização de

nitrogênio líquido, mantendo-os desde os fragmentos até o produto em pó de osso congelados. Após maceração o resíduo em pó de osso foi acondicionado em tubos de vidro e adicionados 400µl de 2X Sample Buffer; e em seguida, adicionados 400µl de 1X Working Solution associado a cocktail de inibidor de proteases. Em seguida foram transferidos para um eppendorf de 1,5ml. Centrifugados durante 15 minutos a 13000 r.p.m. a 4°C; o sobrenadante em seguida foi transferido para um novo eppendorf e armazenado em gelo à espera de quantificação.

Para a extração de tecido ósseo neoplásico 40 mg de tecido, previamente acondicionado à -80°C, foram cortados em pequenos pedaços, e submetido à lise celular por homogeneização no Tissue Teator^{tu} na velocidade máxima. Todas as etapas foram realizadas com as amostras mantidas à aproximadamente 4°C. As proteínas foram extraídas com tampão de amostra *2xsample buffer2X* (Tris-HCl 1 M, pH 6,8, contendo SDS 10% e glicerol 10%) seguidos de 400µl de 1X solução de trabalho *Working Solution* associado à coquetel cocktail de inibidores de proteases. Em seguida foram transferidos para um microtubo eppendorf de 1,5ml. Centrifugados durante 15 minutos a 13000 r.p.m. a 4°C; o sobrenadante em seguida foi transferido para um novo microtubo eppendorf e armazenado em gelo à espera de quantificação.

A concentração de proteína total foi estimada com o reagente BioRad Protein Assay pelo método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA), conforme descrito a seguir: 10 µl de amostra foram diluídos em 90 µl de solução de trabalho *working solution*, sendo então adicionados 10 µl desta solução à 990 µl do reagente de Bradford, já diluído (1:5). Foi realizada uma curva padrão com soro-albumina bovina adicionando reagente de Bradford em diferentes concentrações. As amostras foram incubadas descansaram por 5 minutos e então o foram quantificadas em Biofotômetro (Eppendorf, Germany). A absorbância de cada amostra foi anotada e foram calculadas as concentrações de proteínas totais de cada amostra utilizada.

4.10 WESTERN BLOT:ANÁLISE DE PROTEÍNAS – WESTERN BLOT (WB)

Esta técnica permite a detecção das proteínas de interesse em um homogenato celular com a ajuda de anticorpos específicos. As proteínas são separadas segundo seu peso molecular tamanho em um gel de poliacrilamida sob condições denaturantes (SDS-PAGE), seguidas de transferência para uma membrana de nitrocelulose ou de PVDF da maneira descrita a seguir: Para a separação das proteínas utilizou-se o método de Laemmli (Laemmli 1970) com gel SDS-PAGE a 13 % . Carregou-se 100 µg de cada amostra, adicionando-se a cada raia solução de carregamento (Azul de Bromofenol, Glicerol, Trizma, DTT) e o marcador de peso molecular na primeira raia (Rainbow full range, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). A eletroforese ocorreu primariamente pelo gel de superfície à 1100V e posteriormente à 1010V no gel de separação, o que levou cerca de 2 horas e meia. Terminada a corrida foram preparadas 4 cubas:

- 1) com/ metanol (10 minutos) - (p/ estabilizar a membrana)
- 2) com/ H₂O destilada (até a membrana afundar) - (p/ estabilizar a membrana)
- 3) com/ tampão de transferência transfer buffer solução de uso (até a hora da transferência) - (mínimo 30 minutos)
- 4) com/ tampão de transferência transfer buffer solução de uso (p/ molhar os papéis de filtro)

Nestas, mergulhou-se as membranas em cada uma; e montou-se os papeis para a transferência como segue:

- a) Mergulhou-se os papéis de filtro no tampão de transferência transfer buffer solução de uso (um de cada vez)
- b) Conforme os papéis foram sendo molhados no Tampão (tampão de transferência transfer buffer solução de uso) – colocou-se (um de cada vez) na cuba de transferência (Figura 2):

- 1) 3 papéis de filtro
- 2) membrana
- 3) Gel
- 4) 3 papéis de filtro

Montada, deu-se seqüência na transferência por 60 minutos e 47mA. Após o termino dos 60 minutos, desmontou-se a transferência, bloqueou-se a membrana com

leite desnatadoSkin Milk à 5% por 2 horas, seguidas de incubação por uma noite *overnight* com o anticorpo primário antiproteína de interesse {anti-Cx43 (policlonal em coelhorabbit, 1:500 ZYMED®), anti-Cx45 (policlonal em cabrigoat, 1:500 CHEMICON®), anti-Cx46 (coelhorabbit, 1:1000 ZYMED®) e anti- β -actina (controle endógeno, monoclonal em camundongomouse, Sigma®, 1:500)}. No dia seguinte após três lavagens com TTBS 1X (10 minutos cada) incubou-se c/ anticorpo secundário (anti-coelhorabbit, 1:10000 DakoCytomation, anti- camundongomouse 1:3000 DakoCytomation, anti-cabrigoat 1: 3000 Santa Cruz) por- 2 horas à- temperatura ambiente. Passadas as horas de incubação com anticorpo secundário realizou-se nova lavagem (3X c/ TTBS 1X, 10 minutos cada). A proteína de interesse foi em seguida revelada graças a anticorpos primários específicos, que foram, eles mesmos, reconhecidos por anticorpos secundários conjugados a uma peroxidase, metabolizando o DAB (Sigma®). Esta enzima permite a catálise de uma reação gerando complexos coloridos que podem ser diretamente reconhecidos. O gel foi corado com solução de Comassie Blue a 0,25%, e descorada com solução descoloranteDe-stain composta por metanol e ácido acético.

4.11 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DO TECIDO

Para extração de RNA total do tecido ósseo normal e neoplásico, os fragmentos anteriormente congelados mantidos à -80°C foram adicionados 600 μ l de Trizol seguidos de maceração. Incubados por 5 minutos em temperatura ambiente e em seguida adicionou-se 100 μ l de clorofórmio e incubou-se por 2 minutos também em temperatura ambiente. Centrifugou-se durante 20 minutos a 12.000 r.p.m. a 4°C e em seguida transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo contendo 500 μ l de isopropanol gelado. Após incubação por 15 minutos à 4°Cno GELO, centrifugou-se durante 20 minutos a 12.000 r.p.m. a 4°C. Após isto, desprezou-se o sobrenadante, foi adicionado 1 ml de etanol 70% tratado com DEPC gelado. Após nova centrifugação durante 10 minutos a 12.000 r.p.m. a 4°C, desprezou-se o sobrenadante re-ssuspendendo o pellet

em 100µl de H₂O MilliQ tratada com DEPC. Por fim colocou-se em Vortex durante 10 minutos e incubados por 10 minutos a 68°C.

O RNA total foi quantificado pela determinação da razão à 260nm e 280nm. Amostras que não possuísem razão A260/280 em torno de 1,8 e que estivessem degradadas na análise em gel de agarose não foram utilizadas. Para confecção do cDNA, foi realizada a transcrição reversa com kit específico (Invitrogen). Para isto, seguimos os passos do fabricante. Cerca de 1µg de RNA total foi tratado com enzima DNase (USB) incubando-se por 15 minutos a temperatura ambiente. Adicionamos então 25 nM de EDTA e incubamos à 65 °C por 10 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 0,5 mg de OligoDT e 10mM de dNTP, incubando por 5 minutos a 65 °C. As amostras foram então tratadas com RNase adicionando 4µl de First Strand Buffer (5x), 0,1 M de DTT e 5000 U de RNase OUT, incubando por 2 minutos à 42 °C. Foram adicionados 10.000 U da enzima Superscript II e incubou-se por mais 50 minutos à 42 °C e depois 15 minutos à 70 °C.

4.12 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL TAQMAN

O RT-PCR em tempo real foi realizado em aparelho ABI Prism[®] 7000 (Applied Biosystems, USA). Montou-se a reação como descrito a seguir:

Conexinas 43 e 45, e 18s (controle endógeno): 1 µl do *Assay*, 10 µl do Master Mix, 5 µl de cDNA e 4 µl de água ultrapura tratada com DEPC;

Conexina46 e 18s: 1,25 µl do *Assay*, 12,5 µl do Master Mix, 10 µl de cDNA e 1,25 µl de água ultrapura tratada com DEPC.

As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas rapidamente, sendo então colocadas no aparelho. A reação para as conexinas 43, 45 e 46 e 28s, foram realizadas em 50 ciclos.

Os primers e as sondas TaqMan para as Cx43 e Cx45 e Cx46 e 18s (controle endógeno), que foram utilizados, foram adquiridos e desenhados segundo o fabricante (Applied Biosystems). As seqüências utilizadas para a confecção dos primers e probes

específicos para as conexinas foram depositadas no banco público do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Para a Cx43, foram utilizados os assays:

Para conexina 43: Assay de numero de lote Cf02690400_g1,

GJA1, gap junction protein, alpha 1, 43kDa, C familiaris,

NM_001002951.1 de sequência: GCTAACTACAGTGCAGAACAAAATC.

Para conexina 45 foi utilizado:

CF-CX45-RG19, 96-position tube rack v1

CF-CX45-RG19F ACCGAACTGTCCAATGCTAAGATT 18

CF-CX45-RG19R GGCTGCCATACTGTTGTTTCCT 18

CF-CX45-RG19M1 FAM CAAGGCCAACATCGCC 5 NFQ Forward

Para conexina 46 foi utilizado:

CF-CX46-RG6, 96-position tube rack v1,

CF-CX46-RG6F CTCATCTACCTGGGCCATGTG 18

CF-CX46-RG6R TCGCGCTCCTTCTTCTTCTC 18

CF-CX46-RG6M2 FAM CCATGCGCACGATGTG 5 NFQ Reverse

O número absoluto de cópias dos RNAm das conexinas de cada amostra foi calculado com base nos seus valores de C_t . O número absoluto de cópias dos RNAm foi normalizado ao do 18s, e a análise final da expressão relativa dos genes será realizada segundo o método 2 (Livak et al., 2001).

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparações entre dois grupos (sobrevida) foi usado teste não paramétrico Mann-Whitney.

As correlações entre os dados analisados foram calculados utilizando-se regressão linear e teste não paramétrico de Spearman. GraphPad Prism 2.01

5. RESULTADOS

5.1 APRESENTAÇÃO DOS CASOS

Conforme descrito em material e métodos, foram utilizados 14 animais com tumores ósseos. Dentre estes animais, observamos que 64,3% (9/14) eram machos e 35,7% (5/14) eram fêmeas (Figura 6). No que concerne à idade na qual os tumores foram observados e diagnosticados nos animais, foi possível notar que todos eram considerados adultos, com a idade variando entre 8 e 13 anos com média de 10,5 anos, sendo que não foi possível verificar a idade de 2 animais (Figura 7). Interessante foi reparar que dentre os animais com raça definida (11/14), 91% destes (10/11) eram de raças consideradas grandes ou gigantes, sendo apenas um animal considerado de raça pequena ou média (poodle; Figura 8).

Figura 6 - Distribuição entre os sexos. Num total de 14 animais utilizados nos experimentos, 64,3% eram machos, e 35% eram fêmeas

Figura 7 - Idade dos animais estudados. Os indivíduos estudados, portadores de tumores ósseos, tinham idade variando entre 8 e 13 anos

Figura 8 - Raças acometidas. Dos animais com raça definida as mais acometidas, foram as de porte grande e gigante

5.2 CARACTERÍSTICAS DOS TUMORES

Após cirurgia para retirada dos membros torácicos ou pélvicos foram avaliadas, linfonodos, e margens cirúrgicas. Nenhum animal apresentou comprometimento de margens cirúrgicas ou invasão em linfonodos regionais. Verificou-se que todos os animais acometidos no esqueleto apendicular continham tumores com origem medular sendo então classificados em tumores centrais (ou medulares). As alterações morfológicas macroscópicas comuns em todos os tumores avaliados foram: aumento de volume da região afetada devido ao edema de partes moles adjacentes, reação periosteal, e devido ao tumor; foi observado também congestão intensa, hemorragia e necrose (Figura 10). Invasão de partes moles e fratura patológica foram observados em apenas 1 dos animais estudados (Figura 10). Nos casos de animais eutanasiados (três animais com o comprometimento axial), foi realizado a necropsia. Destes três animais, os dois com comprometimento do crânio, não apresentavam comprometimento de outras regiões por metástases. Porém apresentaram comprometimento de estruturas adjacentes tais como: globo ocular e fossas nasais. Em ambos foi observado em múltiplos focos contendo conteúdo de aspecto purulento. Estas regiões foram descartadas da coleta de materiais. O único animal com tumor originário na costela apresentava, invasão neoplásica em musculatura intercostal e cavidade torácica, com intenso edema e necrose de musculatura intercostal e peitoral associados.

A localização primária dos tumores estudados neste trabalho pode ser dividida entre duas classes: esqueleto apendicular e esqueleto axial (Figura 9). Dentre os animais que apresentavam tumores em esqueleto apendicular (11/14), foi observado que o úmero (4/11) teve maior prevalência, seguido da tíbia (3/11) rádio e crânio (ambos 2/11) e por fim a escápula, costela e fêmur (todos com 1/11). Por outro lado, os animais que apresentavam tumores em esqueleto axial eram localizados ou no crânio (2/3) ou em costela (1/3).

Figura 9 - Ossos acometidos. Semelhante ao descrito na literatura, o esqueleto apendicular foi mais acometido por tumores ósseos, em relação ao esqueleto axial

Figura 10 - Corte longitudinal de osso longo (úmero), com osteossarcoma. Nota-se extensas áreas de necrose e hemorragia, com comprometimento da medula óssea pela massa tumoral. Intensa reação periostal, com comprometimento de partes moles

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TUMORES ÓSSEOS

Após a retirada cirúrgica dos tumores ou seguinte a realização de necropsia, fragmentos dos tumores foram fixados e processados para posterior confecção de lâminas histológicas coradas por H&E. Posteriormente foi realizado o diagnóstico do tipo histológico estudado, levando-se em conta também, dados clínicos, radiográficos e de macroscopia, sendo encontrado maior prevalência de osteossarcomas (OSA). Os subtipos de OSA encontrados foram em ordem de prevalência (Figura 11): OSA osteoblástico produtivo (8/14), OSA condroblástico (3/14), OSA osteoblástico não produtivo (1/14) e OSA indiferenciado (1/14). Foi também encontrado o subtipo tumor ósseo multilobular (TOM; 1/14). Uma breve descrição de cada subtipo é encontrada a seguir:

Osteossarcomas - este tipo tumoral é formado por osteoblastos com variável grau de diferenciação celular, normalmente tendendo a anaplasia, com formato celular variando do volumoso (arredondado) ao alongado (ou fusiforme) precursor osteogênico. As células possuem núcleos hipercromáticos localizados excêntricamente em um citoplasma que tende a basofilia. Possuem pequenos nucléolos evidentes e figuras de mitoses são comumente encontradas. Frequentemente estas células possuem bordas celulares angulares. Os sub-tipos são:

- Osteossarcoma osteoblástico não produtivo: caracterizado pela proliferação de osteoblastos neoplásicos, com discreta ou ausência de produção de matriz osteóide. Associado a osteólise e a discreta reação periostal;

- Osteossarcoma osteoblástico produtivo: caracterizado por apresentar formas líticas e produtivas associadas. Este é o subtipo mais comum de todos os subtipos encontrados em cães;

- Osteossarcoma condroblástico: células malignas mesenquimais produzem matriz osteóide e condróide. Esta produção pode ser conjunta em um mesmo foco ou separadas;

- Osteossarcoma indiferenciado (ou pobremente diferenciado): as células podem produzir a mínima quantidade de osteóide ou espículas de osso tumoral. As células podem variar em aparência desde pequenas que lembram células reticulares de medula

óssea a células grandes e indiferenciadas. Muitos são altamente agressivos produzindo lesões líticas.

Tumor ósseo multilobular: padrão multilobular, constituídas de células fusiformes pleomórficas envolvidas a formação óssea e/ou cartilaginosa.

Figura 11 : Aspecto histológico dos tumores ósseos estudados. Em A) OSA osteoblástico não produtivo; B) tumor ósseo multilobular; C) OSA condroblástico; D) OSA osteoblástico produtivo; E) OSA indiferenciado; F) invasão da medula óssea por OSA osteoblástico produtivo (seta)

5.4 REAÇÃO IMUNOISTOQUIMICA

Com a finalidade de se confirmar os tumores encontrados neste estudo, foram realizadas reações imunoistoquímicas para: comprovação da origem mesenquimal das células tumorais (Vimentina), origem osteoblástica (osteocalcina e osteonectina) e exclusão de possíveis carcinomas (pan-citoqueratina). Todos os tumores estudados tiveram marcação negativa para citoqueratina e positiva para vimentina, osteocalcina e osteonectina (Figura 12).

Figura 12 A- Pannel imunoistoquímico para confirmação do diagnóstico histopatológico. A) e B) marcação positiva para osteocalcina - objetiva de 20x; C) e D) marcacção positiva para osteonectina- objetiva de 20x

Figura 12 B- Paineis imunohistoquímicos para confirmação do diagnóstico histopatológico. Em A marcação positiva para vimentina ; B) marcação negativa para pancitoqueratina ; C) controle positivo para marcação em citoqueratina (ducto biliar, fígado de cão) todos objetiva de 10x

5.5 QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO NOS TUMORES ÓSSEOS

Os OSAs produzem quantidades variáveis de matriz osteóide constituída de principalmente colágeno do tipo I, confirmados pela coloração de Picrossírius em microscopia óptica de luz polarizada. Esta matriz, depositada apresentou-se com forma e bordos irregulares. Não apresentavam trabéculas interconectadas, como as verificadas nas reações ósseas encontradas em processos responsivos a infecções, inflamações e fraturas ósseas (Figuras 13 e 14).

Figura 13 - Densidade volumétrica de colágeno. Variável quantidade de colágeno depositada por osteoblastos neoplásicos para formação de osteoide nos diferentes animais e subtipos histopatológicos estudados (Spearman $r = 0,5201$; $P = 0,0566$; regressão linear $r^2 = 0,2125$; $P = 0,0971$)

Figura 14 – Coloração de Picrosirius em microscopia de luz polarizada. Osteoblastos produzem principalmente colágeno do tipo I fortemente birrefringente, com fibras espessas amarelas ou vermelhas que será mineralizada no processo de ossificação. Não se observou coloração esverdeada relativa a colágeno do tipo III. Em A) aspecto de tecido ósseo normal ao microscópio de luz polarizada ; B) aspecto da matriz osteoide depositada por células do tumor ; C) e D) aspecto da coloração de picrosirius ao microscópio de luz. Diferença na deposição de colágeno entre os animais pode ser verificada

5.6 ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA)

Com o objetivo de se avaliar a proliferação celular tumoral, foi realizada a reação imunoistoquímica para PCNA. Células com marcação positiva para PCNA foram contadas, conseguindo estimativa da proliferação celular nos diferentes tipos tumorais estudados (Figuras 15, 16 e 17).

Figura 15 - Proliferação celular nos subtipos histológicos encontrados.

Figura 16 - Proliferação celular nos animais com tumores ósseos. Índice de proliferação variável entre os animais estudados.

Figura 17 – Fotomicrografia- Reação imunoistoquímica para PCNA. Marcação nuclear positiva para células em proliferação objetiva de 20x.

O índice de proliferação celular (PCNA) demonstra associação discreta, porem sem significância estatística com local de predileção para o aparecimento de tumores espontâneo primários do esqueleto, onde observou-se que os tumores do esqueleto apendicular apresentavam índice de proliferação celular maior que os tumores do esqueleto axial (Apendicular = $31,17 \pm 7,20$ % células PCNA-positivas; Axial = $21,70 \pm 5,77$ % células PCNA-positivas; $P=0,102$) (Figura 18).

Figura 18 - O índice de proliferação celular foi mais alto em tumores primários do esqueleto apendicular quando comparados ao esqueleto axial. O dado demonstra uma discreta porem não significante associação ($P = 0,102$) entre os parâmetros avaliados.

5.7 CARACTERIZAÇÃO DAS Cx43 E Cx46 EM TUMORES ÓSSEOS

5.7.1 CONEXINA 43

Conforme já descrito, um dos principais objetivos deste trabalho era caracterizar a expressão de conexinas em tumores de origem óssea. Para isto avaliamos sua expressão *in situ* por meio de reações imunoistoquímicas, quantificamos seus níveis protéicos por western blot e por fim avaliamos sua expressão gênica, ou seja, quantificamos os níveis do RNA mensageiro destas conexinas.

Para verificar se existe expressão de Cx43 por osteoblastos neoplásicos, foi realizada a reação de imunofluorescência, na qual se pôde observar marcação positiva para a Cx43, localizada geralmente entre as células indicando localização em membrana plasmática, por vezes apresentando pontos intra-citoplasmáticos (Figuras 19 e 20) (Quadro 1). Além disto, quantificou-se os níveis da Cx43 por western blot tendo como referência a B-actina. Foi possível verificar certa variação tanto na imunofluorescência quanto na detecção por Western blot nos níveis protéicos da Cx43. Por fim, a análise do mRNA mensageiro da Cx43 demonstrou também variação discreta (Figura 21).

Figura 19 - fotomicrografia de marcação imunoistoquímica para Cx43 em tecido ósseo normal. Em A, marcação nuclear por iodeto de propídeo ; B, marcação positiva para Cx43 e em C, sobreposição das duas imagens

Figura 20 - Fotomicrografia de Imunofluorescência para Cx43. Padrão de marcação e intensidade variáveis entre os animais estudados. Em A objetiva de 40x ; B,C,D objetiva de 20x

Animal	IHC Cx43 (1-3 +)	IHC Cx46 (1-3)
T2	++	++
T3	++	+
T4	+	+++
T5	+++	+++
T7	+	++
T11	+	++
T12	+++	++
T13	++	+
T14	++	+++
T15	++	++
T16	+	++
T17	+++	+
T18	+++	++
T19	+	++

Quadro 1 - Estimativa de marcação positiva para as Cx43 e Cx46. Os valores foram dados em relação à intensidade e número de marcações positivas observadas ao microscópio, com sistema de epi-fluorescência acoplado. Marcação graduada em discreto (+), Moderado (++) e intenso (+++).

Figura 21 - A) Análise de Cx43 por Western blot. O coração foi utilizado como controle endógeno da reação. A análise do tecido ósseo normal não refletiu em resultados satisfatórios quanto à expressão protéica para cx43 ou B-actina (controle endógeno). Contudo a densitometria dos níveis de Cx43 nos tumores ósseos demonstrou discreta variação no perfil de expressão da Cx43 em tumores ósseos

Figura 22 - Expressão gênica da Cx43 nos tumores ósseos e osso normal.

O grau de expressão da Cx43 avaliado pela imunofluorescência demonstrou correlação positiva com os níveis da Cx43 pela técnica de Western blot (Spearman $r = 0,5521$; $P = 0,0407$; regressão linear $r^2 = 0,2955$; $P = 0,0455$) (Figuras 22 e 23). Porém não foi observada correlação entre a quantificação densitométrica dos western blots da Cx43 com os níveis de expressão gênica (Spearman $r = -0,1604$; $P = 0,5838$; regressão linear $r^2 = 0,1834$; $P = 0,1266$). Ao se considerar o índice de proliferação celular (PCNA) com relação aos níveis de Cx43, demonstrou-se correlação inversa discreta, ou seja, quanto maior a quantidade de Cx43 menor o número de células positivas para o PCNA (Spearman $r = -0,4039$; $P = 0,1521$; regressão linear $r^2 = 0,1782$; $P = 0,1327$; Figura 24).

Correlação entre imunofluorescência e Western blot para Cx43

Figura 23- Correlação entre a expressão da Cx43 em tumores ósseos por Imunoistoquímica e Western blot. Observou-se correlação positiva (Spearman $r = 0,5521$; $P = 0,0407$; regressão linear $r^2 = 0,2955$; $P=0,0455$).

PCNA x IHC Cx43

Figura 24- O índice de proliferação celular demonstrou associação negativa porem sem significância estatística ($P = 0,152$), com o índice de expressão de Cx43 nos tumores ósseos estudados.

5.7.2 CONEXINA 46

A Cx46 foi encontrada principalmente em volta do núcleo (marcação perinuclear), porém em alguns casos observou-se marcação nuclear ou em membrana plasmática (Figura 25). Índice de marcação positiva (Quadro 1). A expressão de proteínas pela técnica de western blot para a Cx46 revelou discreta variação entre os tumores estudados , da mesma maneira que na imunofluorescência (Figuras 26 e 27). Os níveis de RNA mensageiro demonstraram variáveis níveis de expressão gênica nos tumores ósseos quando comparados com tecido ósseo normal (Figura 28).

Figura 25- Fotomicrografia de marcação imunoistoquímica para Cx46 em tecido ósseo normal. Em A, marcação nuclear por iodeto de propideo ; B, marcação positiva para Cx46 e em C, sobreposição das duas imagens

Figura 26- Fotomicrografia de imunofluorescência para Cx46. Padrão de marcação e intensidade variável entre os animais com marcação perinuclear positiva. Ae D ; objetiva de 40x, A eC objetiva de 20x

Figura 27- A) Western blot para expressão da conexina 46. A análise do tecido ósseo normal não refletiu em resultados satisfatórios quanto à expressão protéica para Cx46 ou B-actina (controle endógeno). A expressão de Cx46 também demonstrou variação quanto aos níveis da Cx46 em tumores ósseos.

Figura 28 - Expressão gênica da Cx46 nos tumores ósseos e osso normal. Variáveis níveis de expressão entre os tumores, e entre os tumores e o tecido ósseo normal.

5.8 SOBREVIDA DOS ANIMAIS ACOMETIDOS POR TUMOR

O tempo médio de sobrevida a partir da cirurgia, excluindo-se os animais que foram eutanasiados ou por apresentarem tumores no esqueleto axial foi de 256 ± 190 dias (mediana = 227; intervalo: 30 – 553 dias). Porém este valor médio de sobrevida é subestimado já que se deve levar em conta que dois animais ainda continuaram vivos até a confecção deste trabalho (Figura 29). A partir destes valores, consideraram-se dois grupos dividindo-se metade dos animais para cada grupo, sendo o primeiro grupo com animais com sobrevida entre 30 e 153 dias. O outro grupo, considerado com maior taxa de sobrevida variou entre 184 e 553 dias. Ao compararmos estes grupos, foi possível

notar certa tendência de menor índice de proliferação celular aos animais com maior sobrevida se comparados aos que morreram mais rapidamente ($p=0,11$; Figura 30). Não foi possível verificar qualquer tendência de correlação entre o período de sobrevida dos animais com os outros dados avaliados neste trabalho.

Curva de Kaplan-Meier

Figura 29 - Curva de sobrevida de Kaplan-Meier

Sobrevida x PCNA

Figura 30 - Comparação do índice de proliferação celular em animais com sobrevida menor que 160 dias ou maior que 180 dias.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar a expressão das conexinas 43 e 46 em tumores ósseos primários de cães. Além disso, buscou-se verificar a existência de possíveis correlações entre as conexinas e o índice de proliferação celular (PCNA), a produção de matriz e com a sobrevida dos animais pós-cirurgia. Além disso, tentou-se estudar a conexina Cx45, também expressa por osteoblastos, contudo não se obteve uma padronização satisfatória das metodologias que dependiam dos anticorpos anti-Cx45. Desta maneira, os dados referentes a Cx45 não foram descritos nesta dissertação.

Dados clínicos gerais e patológicos obtidos no presente estudo confirmaram as observações anteriormente descritas sobre osteossarcomas e os tumores ósseos. Sarcomas primários do esqueleto perfazem um largo e heterogêneo grupo de neoplasmas. Dentro deste grupo de tumores, a linhagem celular mais comumente encontrada é a de células ósseas mais especificamente osteoblastos. Entre os tumores ósseos o osteossarcoma é o que apresenta maior incidência com valores entre 65 e 85% (JONES et al., 2000; DERNELL et al., 2001). Dos 19 animais atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, no período de fevereiro do ano de 2006 a junho de 2007, 14 animais (73,68%) apresentavam tumores primários do esqueleto. Destes, 13 cães (92,8%) possuíam osteossarcoma e 1 cão (7,14%) apresentava o subtipo histológico chamado de tumor ósseo multilobular, tumor este, que possui em sua constituição, células com diferenciação osteoblástica. Dados semelhantes foram descritos em diversos trabalhos (JONES et al., 2000; DERNELL et al., 2001; POOL, THOMPSON, 2002). O diagnóstico de tumores ósseos é baseado em achados clínicos, radiográficos e histopatológicos (BOOSINGER et al., 1994). A reação imunoistoquímica não auxilia no diagnóstico devido à ausência de marcadores altamente específicos para osteoblastos. Na medicina humana, segundo Dabbs (2002), tem-se incluído anticorpos anti-osteocalcina (OC) e anti-osteonectina (ON), como parte do diagnóstico histopatológico. OC é uma das muitas proteínas não colagenosas encontradas no osso adulto, sendo a mais específica das duas porém não tão sensível. A ON é não somente muito sensível como também é encontrada em vários tipos celulares incluindo osteoblastos ativos e

osteócitos jovens. Reage com fibroblastos, e certas células epiteliais sendo então menos específica (FRANCHI et al., 1999; CERILLI, 2002). Como esperado na reação imunoistoquímica dos tumores estudados, confirmou-se a origem mesenquimal (Vimentina), descartaram-se eventuais carcinomas (Citoqueratina) e obteve-se marcação positiva para OC e ON sugerindo origem osteoblástica. Outro fator utilizado para o diagnóstico de osteossarcoma, foi o de produção de matriz osteóide por osteoblastos neoplásicos pela técnica de coloração especial picrossírius no qual pôde-se observar a existência de variação na quantidade de matriz que foi depositada, contudo todos os tumores formaram sua matriz a partir de colágeno do tipo I. Após o diagnóstico, verificou-se prevalência de osteossarcomas. Os subtipos de osteossarcoma encontrados incluem: OSA osteoblástico produtivo, OSA osteoblástico não produtivo, OSA indiferenciado, OSA condroblástico e Tumor ósseo multilobular. O osteossarcoma ocorre principalmente em cães de meia idade (média de sete anos) e em raças de porte grande ou gigante (não se observa predileção racial), sendo que em 75% dos casos acomete o esqueleto apendicular e os 25% restantes afetam o esqueleto axial (JUBB et al., 1993; JONES et al., 2000 ; POOL; THOMPSON, 2002). Semelhante ao descrito foi observado 12 dos 14 animais estudados tinham idade variando entre 8 e 13 anos com média de 10,5 anos. Embora não exista predileção racial, o Rotweiller foi o mais acometido seguido de animais sem raça definida (SRD). Ainda neste contexto, as raças de porte grande e gigante foram as mais acometidas. O esqueleto apendicular foi mais acometido quando comparado com o esqueleto axial. Outro dado semelhantemente à o descrito na literatura, foram os dados sobre o osso e a localização da lesão neste trabalho foi em relação ao osso acometido e a região do osso acometido. O local de predileção do aparecimento de osteossarcoma é a região metafisária do úmero proximal, rádio e ulna distal, fêmur distal e tibia proximal, podendo se expandir para ossos adjacentes com a sua evolução (BURK, 1996). O úmero proximal (4 cães) teve maior prevalência, seguido da tibia proximal e distal (3 cães) rádio distal e crânio (ambos 2 cães), escapula, costela e fêmur distal (1 cão). Dado interessante foi o de que o índice de proliferação celular (PCNA) foi mais alto em cães que foram acometidos pelo esqueleto apendicular. Tem sido relacionados ao PCNA, dados de sobrevida e indícios de malignidade em osteossarcomas humanos (WANG, 2006). Interessantemente, neste estudo verificou-se que o esqueleto apendicular possui maior índice de proliferação medido pelo PCNA com discreta tendência a significância estatística devido

principalmente ao número reduzido de animais, sugerindo maior agressividade por parte dos tumores comuns a estas regiões anatômicas. Outra comparação realizada foi do PCNA e taxa de sobrevida. Verificou-se que existiu certa tendência de menor índice de proliferação celular nos animais com maior sobrevida se comparados aos que morreram mais rapidamente.

Tem sido demonstrado que o tecido ósseo é um tecido dinâmico que é constantemente influenciado por diversos estímulos, que incluem fatores hormonais, fatores de crescimento e estímulos mecânicos. Para que exista homeostasia deste tecido, é necessário que exista um coordenado controle da fisiologia óssea, orquestrado principalmente pelos osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A perda deste importante controle fisiológico pode levar entre outros, a uma perda do controle da divisão celular a ao aparecimento de tumores. O desenvolvimento de um neoplasma representa um conjunto de contínuos, discretos e independentes eventos genéticos ou epigenéticos que conferem as células, novas características, como o aumento da taxa de proliferação celular, potencial metastático e resistência a respostas imunomediadas e a drogas que induzem a morte celular. Os tumores ósseos e mais especificamente os osteossarcomas caninos são alvo de muitas publicações sendo feita correlação com osteossarcomas de humanos. Isto é principalmente devido a ambos terem semelhante comportamento biológico (POOL; THOMPSON, 2002). O estudo de moléculas envolvidas no processo de diferenciação, indução, promoção, e proliferação celular e sua correlação com tecidos normais e neoplásicos, são de extrema importância, visto a necessidade da busca de melhores fatores prognósticos, e de terapêutica, assim como de prevenção para neoplasias. Neste contexto têm sido realizado inúmeros trabalhos, nos quais se observaram que as junções do tipo gap, formadas pelas conexinas, estariam envolvidas em processos fisiológicos do tecido ósseo, como a ossificação, modelação e remodelação, assim como em processos patológicos como os processos tumorais. Como descrita na introdução deste trabalho, as células do tecido ósseo normal assim como as neoplásicas comunicam-se através de fatores solúveis, porém as interações intercelulares podem estar diretamente envolvidas na manutenção da homeostasia do tecido ósseo (UDAGAWA et al., 1989). A participação direta das conexinas, nos processos de desenvolvimento, diferenciação e regulação de crescimento vem sendo descrita em diversos trabalhos (LOEWENSTEIN, 1979 ; YAMASAKI ; NAUS, 1996 ; TROSKO ; RUCH, 1998 ; LEVIN, 2001 ; EVANS ; MARTIN, 2002 ; WEI et al., 2004).

A principal conexina observada nestes estudos foi a Cx43. Através de reações imunoistoquímicas, observamos que semelhante aos dados encontrados por estes autores em estudos *in vitro*, a Cx43 é expressa no tecido ósseo normal. Ela foi encontrada localizada e distribuída de forma regular, envoltas aos vasos sanguíneos dos canais de Havers, muitas vezes colocalizadas com as lacunas, lugar estes onde se encontram albergados os osteócitos. No local onde esta localização não pôde ser observada acredita-se que como osteócitos se comunicam entre si, e com outras células entre elas osteoblastos, por meio de prolongamentos em canalículos, que a marcação observada estaria nas junções destes canalículos. Achados (*in vitro*) semelhantes foram encontrados por Stains e Civitelli (2005) sobre a expressão da Cx43 em osteócitos. Outros experimentos *in vitro*, porém com linhagens celulares de osteossarcoma murinos, demonstraram variação entre as conexinas expressas. Lecanda et al (1998), demonstrou que a linhagem ROS 17/2. 8 expressa a conexina 43 e se mantém bem acoplada, contudo a linhagem de sarcoma osteogênico UMR 106-01 expressa predominantemente Cx45 e é pobremente acoplada. A linhagem MLO-Y4, uma linhagem de osteócitos de ratos, expressa Cx43 e não expressa Cx45 (YELLOWLEY et al., 2000). Outras duas linhagens U2OS de osteossarcoma humano e MC3T3-E1 de osteoblastos também expressam Cx43 (YELLOWLEY, 2000; SAITO et al., 2007). No presente estudo observou-se que nos osteossarcomas caninos, a Cx43 está presente, e se apresenta localizada no citoplasma e membrana citoplasmática entre células adjacentes, distribuída de forma pontual e desorganizada, com variável grau de marcação entre os animais. Interessantemente o tipo histológico Tumor ósseo multilobular somente expressou Cx43 em osteoblastos e condroblastos neoplásicos, e não foi observada marcação, ou foi vista em discretos pontos, entre as células fusiformes que se encontram envoltos aos ninhos de osso e cartilagem.

Segundo muitos autores, as células normais comunicam-se entre si via junções do tipo gap e mantêm a homeostasia tecidual. Ao contrário, células tumorais rejeitariam esta comunicação e negligenciariam o controle homeostático provindo de tecidos vizinhos (YAMASAKY ; NAUS 1990). Muitos experimentos *in vivo* e *in vitro* em que genes das conexinas foram transfectados para linhagens de células deficientes em comunicação via junções do tipo gap, foi observado redução da proliferação tumoral, ou não produção desta. Outra observação feita foi que as conexinas exerceriam diferencial efeito supressor de tumor, dependendo do tipo celular em que elas são

expressas (YAMASAKI, 1996). Estas observações nos levaram a crer que, possivelmente a Cx43, poderia ter expressão gênica diminuída em osteossarcomas caninos, quando comparados, a expressão nos tecidos ósseos normais. Contudo foi observado, que não existem grandes variações na expressão gênica entre o tecido ósseo normal e o neoplásico de cães. Uma vez visto que as conexinas possuem semelhante expressão gênica para Cx43, foi pensado se a expressão desorganizada e discretamente heterogênea de conexinas nas células do tecido ósseo neoplásico observada poderia, ser um fator positivo, a favor da perda de controle da proliferação celular. Porém descartou-se esta idéia, devido à observação de Moorby e Patel (2001), de que a Cx43 poderia afetar o crescimento das células neoplásicas na ausência da formação de junções gap. De fato, nossos achados comparando o índice de proliferação celular (PCNA) com relação aos níveis de Cx43, demonstram correlação inversa discreta, ou seja, quanto maior a quantidade de Cx43 menor o número de células positivas para o PCNA. Este dado é independente de formações na membrana citoplasmática, visto que se obtiveram correlação positiva entre os achados pelas técnicas de western blot e o grau de marcação de reações imunoistoquímicas. O por quê e como as conexinas estariam agindo na patofisiologia de osteossarcomas caninos permanece não esclarecido. Porém embora não tenha sido estudado neste trabalho, sugere-se que alterações na fosforilação das conexinas poderiam levar a perturbação das junções do tipo gap normais, e isto conseqüentemente resultar em descontrole da proliferação celular (YAMASAKI, 1996).

Durante a diferenciação dos osteoblastos *in vitro*, a expressão de Cx43 aumenta (DONAHUE, 2000; SCHILLER et al., 2001), e uma vez retardada a diferenciação de osteoblastos, pela inibição da comunicação via junções do tipo gap, ocorre redução da habilidade de formar matriz extracelular mineralizada, e uma redução da expressão de genes associados com a diferenciação de osteoblastos (LECANDA et al., 1998; DONAHUE, 2000; SCHILLER et al., 2001). Essa observação nos levou a realizar um estudo para verificar se existe correlação entre os níveis de expressão de Cx43 e a quantidade de matriz osteóide produzida nos tumores ósseos, no qual pode-se observar que embora não tenha sido notada diferenças estatisticamente significativas, principalmente devido ao número reduzido de animais avaliados, existe uma tendência à correlação positiva, discreta entre estes dados.

Koval et al (1997) demonstraram em seu estudo que a linhagem de osteossarcoma UMR 106-01 e a linhagem de osteoblastos calvária expressam Cx46 com peso molecular de 53kDa. Em contraste, a Cx46 expressa por osteoblastos foi predominantemente localizada em um compartimento intracelular perinuclear que segundo os autores, parecia ter aspecto de região trans-golgi determinada pela imunofluorescência. Pequena quantidade de Cx46 teria sido encontrado na superfície celular. No mesmo experimento, foi citado que a Cx46, apresentava bandas na membrana de Western blot, com dois pesos moleculares, de 68kDa e 53kDa dados estes vistos em outros estudos (JIANG et al., 1993 ; KONIG ; ZAMPIGHI, 1995). As bandas de 68 kDa corresponderiam a forma fosforilada, de Cx46. A existência defeitos na fosforilação da Cx46 foi descartada visto que no mesmo estudo, foram observadas formas fosforiladas de Cx43. No presente estudo foi observado que a Cx46 é expressa nos osteoblastos neoplásicos envoltos aos núcleos celulares, em graduação variável como descrito por Koval et al (1997). Porém a expressão gênica pelo qPCR, revelou que a maior parte do animais expressavam quantidades menores de Cx46 quando comparados a expressão em ossos normais. Nestes pode-se notar que semelhante aos dados da Cx43, a marcação no tecido ósseo apresentou-se co-localizadas nas regiões em que se encontravam as lacunas, mostrando que osteócitos imaturos e maduros expressam Cx46 também em região perinuclear. Interessantemente os resultados da expressão gênica demonstraram que existe pequena variação entre os tumores ósseos. É necessário que exista oligomerização, ou seja, a formação de um hemi-canal em um compartimento intracelular antes que possa migrar para membrana citoplasmática (KUMAR et al., 1995) . Quando avaliada a expressão de Cx46, por western blot, verificou-se não existir correlação positiva, com o índice de expressão conseguidas nas diversas técnicas desenvolvidas. Estes dados não correlacionados sugerem que pode existir um acúmulo destas proteínas na forma de monômeros como é descrito por Koval et al (1997). Não se sabe ainda a qual a função desempenhada, e se existe alguma correlação com efeitos supressores de tumor em tecidos ósseos normais e neoplásicos.

7. CONCLUSÕES

O tecido ósseo normal e o tecido ósseo neoplásico de cães estudados neste trabalho apresentaram semelhantes níveis de expressão gênica da conexina 43;

Osteossarcomas expressam a conexina 43 de forma heterogênea, sendo esta e são localizadas no citoplasma, e também na membrana citoplasmática;

O tecido ósseo normal e o tecido ósseo neoplásico apresentam diferentes níveis de expressão gênica da conexina 46;

Osteossarcomas expressam conexina 46 que co-localizam com a região perinuclear.

REFERÊNCIAS

- BOOSINGER, T. R.; DAMNRICH, K.; LARSEN, S.; MIRSDORP, W.; POOL, R. R.; SLAYTER, M. R. **Histological classification of bone and joints tumors of domestic animals**. Washington, D.C. : Armed Forces Institute of Pathology, 1994. v.1, p. 1-50, (Série 2).
- BRODEY, R. S.; RISER, W. H. Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. **Clin Orthop Relat Res**, v. 62, n., p. 54-64, 1969.
- BURK, R. L. Radiation therapy in the treatment of oral neoplasia. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 26, n. 1, p. 155-163, 1996.
- CERELLI, L.; WICK, M. Immunohistology of soft tissue and osseous neoplasms. In: ZORAB, R. ed, **Diagnostic Immunohistochemistry**. New York: Churchill Livingstone. 2002. p. 72-73, 101-102.
- CIVITELLI, R.; BEYER, E. C.; WARLOW, P. M.; ROBERTSON, A. J.; GEIST, S. T.; STEINBERG, T. H. Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. **J Clin Invest**, v. 91, n. 5, p. 1888-1896, 1993.
- CRUCIANI, V.; MIKALSEN, S. O. Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. **Biol Cell**, v. 94, n. 7-8, p. 433-443, 2002.
- DAS SARMA, J.; LO, C. W.; KOVAL, M. Cx43/beta-gal inhibits Cx43 transport in the Golgi apparatus. **Cell Commun Adhes**, v. 8, n. 4-6, p. 249-252, 2001.
- DAS SARMA, J.; MEYER, R. A.; WANG, F.; ABRAHAM, V.; LO, C. W.; KOVAL, M. Multimeric connexin interactions prior to the trans-Golgi network. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 22, p. 4013-4024, 2001.
- DONAHUE, H. J.; LI, Z.; ZHOU, Z.; YELLOWLEY, C. E. Differentiation of human fetal osteoblastic cells and gap junctional intercellular communication. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, n. 2, p. C315-322, 2000.
- DERNELL, W. S.; STRAW, R.C.; WITHOROW, S.J. Tumors of the skeletal system. In: WITHOROW SJ, MACEWEN EG **Small Animal Clinical Oncology** 3.ed. Philadelphia: USA, 2001. p 378-417.
- DICKERSON, M. E.; PAGE, R. L.; LADUE, T. A.; HAUCK, M. L.; THRALL, D. E.; STEBBINS, M. E.; PRICE, G. S. Retrospective analysis of axial skeleton

osteosarcoma in 22 large-breed dogs. **J Vet Intern Med**, v. 15, n. 2, p. 120-124, 2001.

EVANS, W. H.; MARTIN, P. E. Gap junctions: structure and function (Review). **Mol Membr Biol**, v. 19, n. 2, p. 121-136, 2002.

EWART, J. L.; COHEN, M. F.; MEYER, R. A.; HUANG, G. Y.; WESSELS, A.; GOURDIE, R. G.; CHIN, A. J.; PARK, S. M.; LAZATIN, B. O.; VILLABON, S.; LO, C. W. Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. **Development**, v. 124, n. 7, p. 1281-1292, 1997.

FANBURG, J. C.; ROSENBERG, A.E.; WEAVR, D. L.; LESLIE, K. O.; MANN, K. G.; TAATJES, D. J.; TRACY, R.P. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in the diagnois of osteosarcoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 108, p 464- 473, 1997.

FRANCHI A, CMIN CE, SANTUCCI M: Submicroscopic and immunohistochemical profile of surface osteosarcomas. **Ultrastruct Pathologic** , v. 23, p. 233-240, 1999.

GAY, C. V.; WEBER, J. A. Regulation of differentiated osteoclasts. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 10, n. 3-4, p. 213-230, 2000.

GELLASCH, K. L.; KALSCHEUR, V. L.; CLAYTON, M. K.; MUIR, P. Fatigue microdamage in the radial predilection site for osteosarcoma in dogs. **Am J Vet Res**, v. 63, n. 6, p. 896-899, 2002.

GUILLOTIN, B.; BOURGET, C.; REMY-ZOLGADRI, M.; BAREILLE, R.; FERNANDEZ, P.; CONRAD, V.; AMEDEE-VILAMITJANA, J. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. **Cell Physiol Biochem**, v. 14, n. 4-6, p. 325-332, 2004.

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). **Vet Surg**, v. 21, n. 4, p. 304-310, 1992.

HOENERHOFF, M. J.; KIUPEL, M.; ROSENSTEIN, D.; POOL, R. R. Multipotential osteosarcoma with various mesenchymal differentiations in a young dog. **Vet Pathol**, v. 41, n. 3, p. 264-268, 2004.

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. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p 757-760, 1998.

HUANG, G. Y.; WESSELS, A.; SMITH, B. R.; LINASK, K. K.; EWART, J. L.; LO, C. W. Alteration in connexin 43 gap junction gene dosage impairs conotruncal heart development. **Dev Biol**, v. 198, n. 1, p. 32-44, 1998.

JACOBSON, R. A. **The comparative pathology of the tumor of bone**. Charles C. Thomas, Springfield, IL: 1971.

JIANG, J. X.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Posttranslational phosphorylation of lens fiber connexin46: a slow occurrence. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 34, n. 13, p. 3558-3565, 1993.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Esqueleton System. In: **Veterinary pathology**. 6 ed. Williams & Wilkins, Pennsylvania: 2000. p. 1191-1201..
JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER N. Bones and joints . In: JUBB, K.V. F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**.4ed. Academic Press: California, EUA, 1993. v.1, p. 733-738.

KONIG, N.; ZAMPIGHI, G. A. Purification of bovine lens cell-to-cell channels composed of connexin44 and connexin50. **J Cell Sci**, v. 108 (Pt 9), n., p. 3091-3098, 1995.

KOVAL, M.; HARLEY, J. E.; HICK, E.; STEINBERG, T. H. Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. **J Cell Biol**, v. 137, n. 4, p. 847-857, 1997.

KRUTOVSKIKH, V. A.; MESNIL, M.; MAZZOLENI, G.; YAMASAKI, H. Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins. **Lab Invest**, v. 72, n. 5, p. 571-577, 1995.

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. **Mol Biol Cell**, v. 9, n. 8, p. 2249-2258, 1998.

LECANDA, F.; WARLOW, P. M.; SHEIKH, S.; FURLAN, F.; STEINBERG, T. H.; CIVITELLI, R. Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. **J Cell Biol**, v. 151, n. 4, p. 931-944, 2000.

LEVIN, M. , Isolation and community: a review of the role of gap junctional communication in embryonic patterning. **Journal of membrane biological** v .185. p 177-192, 2001.

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. **J Am Vet Med Assoc**, v. 165, n. 1, p. 55-67, 1974.

LOEWENSTEIN, W. R. Junctional intercellular communication and the control of growth. **Biochim Biophys Acta**, v. 560, n. 1, p. 1-65, 1979.

LUCROY, M. D.; PECK, J. N.; BERRY, C. R. Osteosarcoma of the patella with pulmonary metastases in a dog. **Vet Radiol Ultrasound**, v. 42, n. 3, p. 218-220, 2001.

MARTINEZ, A. D.; HAYRAPETYAN, V.; MORENO, A. P.; BEYER, E. C. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. **Circ Res**, v. 90, n. 10, p. 1100-1107, 2002.

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

MISDORP, W.; HART, A. A. Some prognostic and epidemiologic factors in canine osteosarcoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 62, n. 3, p. 537-545, 1979.

MOORE, G. E.; MATHEY, W. S.; EGGERS, J. S.; ESTEP, J. S. Osteosarcoma in adjacent lumbar vertebrae in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 217, n. 7, p. 1038-1040, 2000.

NOZAKI K, OKUYAMA K, KADOSAWA T, NAKAYAMA H, GOTO N, SASAKI N, TAKEUCHI A. Cloning of canine osteosarcoma cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, p 23-28, 1994.

POOL, R. R.; THOMPSON, K. G. **Tumors of bones**. In ; Tumors in domestic animals. Iowa EUA: State press, 2002. p245-318.

PORTER, A. G; GURLEY, A.M; ROTH S.I. **Bone**. In: STENBERG S.S. Histology for Pathologists. 2ed Philadelphia: USA, 1997. p 85-105.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poult Sci**, v. 79, n. 7, p. 1024-1032, 2000.

RODAN, S. B.; WESOLOWSKI, G.; YOON, K.; RODAN, G. A. Opposing effects of fibroblast growth factor and pertussis toxin on alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, and type I collagen mRNA levels in ROS 17/2.8 cells. **J Biol Chem**, v. 264, n. 33, p. 19934-19941, 1989.

ROSE, B.; MEHTA, P. P.; LOEWENSTEIN, W. R. Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 5, p. 1073-1075, 1993.

SAITO, T.; SATO, H.; VIRGONA, N.; HAGIWARA, H.; KASHIWAGI, K.; SUZUKI, K.; ASANO, R.; YANO, T. Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. **Cancer Lett**, v. 253, n. 2, p. 249-257, 2007.

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, n. 4, p. 362-369, 2001.

STAINS, J. P.; CIVITELLI, R. Gap junctions in skeletal development and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1719, n. 1-2, p. 69-81, 2005.

TORRES, L. N.; MATERA, J. M.; VASCONCELLOS, C. H.; AVANZO, J. L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; DAGLI, M. L. Expression of connexins 26 and 43 in canine hyperplastic and neoplastic mammary glands. **Vet Pathol**, v. 42, n. 5, p. 633-641, 2005.

TROSKO, J. E.; CHANG, C. C.; MADHUKAR, B. V.; KLAUNIG, J. E. Chemical, oncogene and growth factor inhibition gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. **Pathobiology**, v. 58, n. 5, p. 265-278, 1990.

TROSKO, J. E.; RUCH, R. J. Cell-cell communication in carcinogenesis. **Front Biosci**, v. 3, n., p. d208-236, 1998.

UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; AKATSU, T.; SASAKI, T.; YAMAGUCHI, A.; KODAMA, H.; MARTIN, T. J.; SUDA, T. The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. **Endocrinology**, v. 125, n. 4, p. 1805-1813, 1989.

VILLARS, F.; GUILLOTIN, B.; AMEDEE, T.; DUTOYA, S.; BORDENAVE, L.; BAREILLE, R.; AMEDEE, J. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 282, n. 4, p. C775-785, 2002.

WANG, W.; LUO, H.; WANG, A. Expression of survivin and correlation with PCNA in osteosarcoma. **J Surg Oncol**, v. 93, n. 7, p. 578-584, 2006.

WARN-CRAMER, B. J.; LAU, A. F. Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1662, n. 1-2, p. 81-95, 2004.

WEBER, P. A.; CHANG, H. C.; SPAETH, K. E.; NITSCHKE, J. M.; NICHOLSON, B. J. The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities. **Biophys J**, v. 87, n. 2, p. 958-973, 2004.

WEI, C. J.; XU, X.; LO, C. W. Connexins and cell signaling in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 20, n., p. 811-838, 2004.

WEISBRONE E. S. Bone and joints. In: MCGAVIN D. M; ZACHARY F. J. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**; 4 ° ed. Philadelphia: USA, 2007. p 1041- 1064.

WILLECKE, K.; EIBERGER, J.; DEGEN, J.; ECKARDT, D.; ROMUALDI, A.; GULDENAGEL, M.; DEUTSCH, U.; SOHL, G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. **Biol Chem**, v. 383, n. 5, p. 725-737, 2002.

WOLKE, R. E.; NIELSEN, S. W. Site incidence of canine osteosarcoma. **J Small Anim Pract**, v. 7, n. 7, p. 489-492, 1966.

YAMAGUCHI, D. T.; MA, D.; LEE, A.; HUANG, J.; GRUBER, H. E. Isolation and characterization of gap junctions in the osteoblastic MC3T3-E1 cell line. **J Bone Miner Res**, v. 9, n. 6, p. 791-803, 1994.

YAMASAKI, H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 11, n. 7, p. 1051-1058, 1990.

YAMASAKI, H.; NAUS, C. C. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1199-1213, 1996.

YELLOWLEY, C. E.; LI, Z.; ZHOU, Z.; JACOBS, C. R.; DONAHUE, H. J. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. **J Bone Miner Res**, v. 15, n. 2, p. 209-217, 2000.

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.