JONATHAN MACKOWIAK DA FONSECA

Efeitos da toxina reengenheirada de *Bacillus anthracis* (PA-U2-R200A + PA-L1-I210A + LF) em osteossarcoma canino: estudos *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2019

JONATHAN MACKOWIAK DA FONSECA

Efeitos da toxina reengenheirada de *Bacillus anthracis* (PA-U2-R200A + PA-L1-I210A + LF) em osteossarcoma canino: estudos *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof^{ra}. Dr^a. Maria Lucia Zaidan Dagli

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mackowiak da Fonseca, Jonathan
Efeitos da Toxina Reengenheirada de *Bacillus anthracis* (PA-U2-R200A + PA-L1-I210A + LF) em Osteossarcoma Canino: estudos in vitro / Jonathan Mackowiak da Fonseca; orientadora Maria Lucia Zaidan Dagli. -- São Paulo, 2019.
142 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Neoplasia. 2. Osteossarcoma. 3. Toxina. 4. Apoptose. I. Zaidan Dagli, Maria Lucia , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: Jonathan Mackowiak da Fonseca

Título da Tese: Efeitos da toxina reengenheirada de *Bacillus anthracis* (PA-U2-R200A + PA-L1-I210A + LF) em osteossarcoma canino: estudos *in vitro*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Zaidan Dagli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o candidato

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 18 de abril de 2019
CEUAx N [5645170918](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Maria Lúcia Zaidan Dagli

Área: Patologia Experimental E Comparada

Equipe envolvida: Jonathan Mackowiak Da Fonseca - **executor** (fmvz-usp); Maria Lucia Zaidan Dagli (orientador)

Título do projeto: "Efeitos da toxina reengenheirada de Bacillus anthracis (PA-U2-R200A + PA-L1-I210A + LF) em osteossarcoma canino: estudos in vitro. "

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 17/04/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Dedico essa tese à minha mãe, Ivone Izabel Mackowiak da Fonseca, pelo amor, zelo, por ter me apresentado o fascinante mundo da pesquisa e pela abnegação de seus sonhos em favor de seus filhos. Amo você!

À minha companheira, Marina Pellini da Fonseca, pela compreensão nos momentos difíceis, risadas nos fáceis e apoio incondicional em todas as minhas decisões. A sua companhia me deu forças para continuar em busca dos meus ideais. Amo você!

Ao meu pai, Pedro Paulo da Fonseca, que dedicou sua vida aos filhos, ensinando-nos a ter dignidade, respeito e esperança. Todas as minhas conquistas têm sua participação por todo apoio que me concedeu.

Ao meu irmão, David Mackowiak da Fonseca, por ser o meu grande e verdadeiro amigo em todos os momentos e pela vibração em minhas conquistas.

Às minhas sobrinhas, Clarice e Maria Luiza, que me apresentaram um novo sentido da palavra amor. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora Professora **Maria Lucia Zaidan Dagli**, responsável por me orientar em todos os momentos dessa caminhada. Uma grande profissional e pessoa que eu tenho profunda admiração. Obrigado pela confiança e apoio!*

*À minha grande amiga **Andrea Midory Miyake**, pelo companheirismo, paciência, apoio, risos e experiências compartilhadas. Uma verdadeira amizade! Muito obrigado por tudo!*

*Ao Dr. **Daniel Soares Sanches**, pelos conselhos, apoio técnico, amostras cedidas e auxílio nas análises morfológicas deste trabalho.*

*Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada, **Marghiti, Márcia Nagamine, Murilo, Nayra, Diego, Gabriela, Tatícia, Ayami**, pela amizade, apoio técnico e compartilhamento de momentos muito agradáveis.*

*À **Deus**, pela sua graça, bondade, que estão sempre presentes, sustentando-me e guiando-me em todos os momentos.*

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de doutorado (Nº 141455/2015-2) vigente de 2015 a 2019.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, pelo suporte.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

RESUMO

FONSECA, JM. **Efeitos da toxina reengenheirada de *Bacillus anthracis* (PA-U2-R200A+PA-L1-I210A+LF) em osteossarcoma canino:** estudos *in vitro*. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Interunidades em Biotecnologia, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O osteossarcoma é o tipo mais comum de câncer ósseo em cães e em seres humanos. Os osteossarcomas caninos representam um modelo único para o estudo desse tipo de câncer em humanos, devido a incidência relativamente alta, semelhanças no comportamento biológico, na apresentação clínica e características moleculares. Novas terapias seletivas para tratamento de diferentes tipos de neoplasias estão sendo testadas e algumas com resultados animadores. Uma dessas possíveis terapias seletivas é a que utiliza a toxina do *Bacillus anthracis* modificada geneticamente para que seja citotóxica apenas em tecidos com grande expressão de metaloproteinases (MMPs) e ativadores de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA), que estão associadas ao crescimento tumoral e metástase. O objetivo desse estudo foi analisar a resposta de uma linhagem de osteossarcoma canino (D17) e uma linhagem de osteossarcoma humano (MG63) à toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*, testando, assim, uma possibilidade terapêutica para osteossarcomas. Comparamos as duas linhagens de osteossarcoma com uma linhagem de osteoblastos caninos não neoplásicos (COBS), estabelecida por nosso grupo. Para tanto, inicialmente, avaliou-se, a capacidade de expressão de MMPs e uPA em 21 casos de osteossarcoma canino, com os quais se construiu um bloco único de Microarranjos Teciduais (*Tissue Microarrays* ou TMA) e nas linhagens de osteossarcoma canino utilizadas nesse trabalho.

Em seguida, a toxina modificada de *Bacillus anthracis* (LF+PAL1/PAU2) foi aplicada nas linhagens de osteossarcomas canino D17 e humano MG63 e na linhagem COBS, nas concentrações de 5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml. A viabilidade celular foi avaliada por meio da técnica de MTT. Realizamos também a análise de ciclo celular por citometria de fluxo (FACSCalibur - Becton & Dickinson) para a identificação de apoptose ou necrose após os tratamentos com a toxina. Estudou-se, ainda, a capacidade de migração das células D17 e MG63 em ensaio de “*wound healing*” após o tratamento com a toxina.

Observamos a expressão de MMP2 em 47% e uPAR em 62% dos 21 casos de osteossarcoma em TMA. Verificamos que as duas linhagens de osteossarcoma apresentaram a expressão de

MMPs e uPA, possibilitando que a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* tivesse o efeito seletivo. O teste de citotoxicidade mostrou, após 24 horas, que as duas linhagens de osteossarcoma foram sensíveis à toxina do *Bacillus anthracis* em diferentes concentrações (1571 e 5000ng/ml para MG63 e 5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml para D17, na fração terapêutica da toxina LF+PAL1/PAU2). Identificou-se, por citometria de fluxo, com células marcadas com iodeto de propídeo, que houve predominância de células hipodiploides, indicando que a morte celular ocorreu por apoptose. A migração das células das duas linhagens de osteossarcoma, em ensaio de “wound healing”, foi menor após o tratamento de 24 horas com a toxina. Por fim, observamos que as duas linhagens de osteossarcoma apresentaram, no ensaio de imunofluorescência, a expressão de β -catenina, MAPK, K-RAS, c-Myc, p53, conexina 43; quanto a Bcl-2, apenas a linhagem MG63 apresentou positividade. Como conclusão, demonstrou-se que a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* exerceu efeitos antineoplásicos em linhagens de osteossarcomas canino e humano, determinando nestas células morte por apoptose. A toxina do *Bacillus anthracis* apresentou também citotoxicidade para a linhagem COBS, apenas nas maiores concentrações, determinando parada no ciclo celular em G1. Concluimos dizendo que este foi um estudo pioneiro em osteossarcomas caninos e humanos, pois a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* não havia sido testada nessas neoplasias até o presente. Essa toxina mostrou ser um potencial tratamento promissor para o osteossarcoma e possivelmente para alguns tipos de tumores sólidos que expressam metaloproteinases e uroquinases e merece mais investigação e desenvolvimento.

Palavras-chave: Neoplasia. Osteossarcoma. Toxina. Apoptose.

ABSTRACT

FONSECA, JM. **Effects of engineered *Bacillus anthracis* toxin (PA-U2-R200A+PA-L1-I210A+LF) on canine osteosarcoma: *in vitro* studies.** 2019. Ph. D. these (Biotechnology) - Interunidades em Biotecnologia, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Osteosarcoma is the most common type of bone cancer in dogs and in humans. Canine osteosarcomas represent a unique model for the study of this type of cancer in humans due to relatively high incidence, similarities in biological behavior, clinical presentation and molecular characteristics. New selective therapies for treatment of different types of neoplasm are being tested and some with encouraging results. One of these possible selective therapies is the one that uses the genetically modified *Bacillus anthracis* toxin to be cytotoxic only in tissues with high expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and urokinase plasminogen activators (uPA), which are associated with tumor growth and metastasis. The objective of this study was to analyze the response of a canine osteosarcoma cell line (D17) and a human osteosarcoma cell line (MG63) to the modified toxin of *Bacillus anthracis*, thus testing a therapeutic possibility for the treatment of osteosarcomas. We compared the two strains of osteosarcoma with a cell line of non-neoplastic canine osteoblasts (COBS), established by our group. The ability of expression MMPs and uPA in 21 cases of canine osteosarcoma in a single block of Tissue Microarrays (Tissue Microarrays or TMAs) and in the canine osteosarcoma lines used in this study was evaluated. The modified *Bacillus anthracis* toxin (LF+PAL1/PAU2) was applied to canine osteosarcoma D17 and human osteosarcoma MG63 and COBS cell line at the concentrations of 5, 15, 49, 155, 494, 1571 and 5000ng/ml. Cell viability was assessed by the MTT technique. We also performed the cell cycle analysis by flow cytometry (FACSCalibur - Becton & Dickinson) for the identification of apoptosis or necrosis after the treatments with the toxin. The ability to migrate D17 and MG63 cells in a wound healing assay after treatment with the toxin was also studied. We observed the expression of MMP2 in 47% and uPAR in 62% of the 21 cases of osteosarcoma in TMA. We verified that the two strains of osteosarcoma presented the expression of MMPs and uPA, allowing that the reengineered toxin of *B. anthracis* had the selective effect. The cytotoxicity test showed, after 24 hours, that the two strains of

osteosarcoma were sensitive to the *B. anthracis* toxin at different concentrations (1571 and 5000ng/ml for MG63 and 5, 15, 49, 155, 494, 1571 and 5000ng/ml for D17, in the therapeutic fraction of the toxin (LF+PAL1/PAU2). It was identified by flow cytometry with cells marked with propidium iodide, which had a predominance of hypodiploid cells, indicating that cell death occurred by apoptosis. Migration of the cells from the two osteosarcoma lines in a wound healing assay was lower after the 24-hour toxin treatment. Finally, we observed that, in the immunofluorescence assay, the two strains of osteosarcoma presented the expression of β -catenin, MAPK, K-RAS, c-Myc, p53, connexin 43; as for Bcl-2, only the MG63 line showed positivity. In conclusion, the modified *B. anthracis* toxin has been shown to have anticancer effects in canine and human osteosarcoma strains, killing apoptosis in these cells. The *B. anthracis* toxin also showed cytotoxicity to the COBS lineage, only at the highest concentrations, determining cell cycle arrest at G1. We conclude by saying that this was a pioneering study in canine and human osteosarcomas, because the re-invented toxin of *B. anthracis* had not been tested in these neoplasms until the present. This toxin has been shown to be a potentially promising treatment for osteosarcoma and possibly for some types of solid tumors that express metalloproteinases and urokinase and deserves more research and development.

Keywords: Neoplasm. Osteosarcoma. Toxin. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Eventos chave durante o desenvolvimento do osteossarcoma	27
Figura 2 -	Vias de sinalização que regulam a proliferação e a apoptose	36
Figura 3 -	Estruturas cristalográficas do antígeno protetor (PA) da toxina do <i>Bacillus anthracis</i>	41
Figura 4 -	Estruturas cristalográficas do antígeno protetor (PA) da toxina do <i>Bacillus anthracis</i>	41
Figura 5 -	Estruturas cristalográficas do fator letal (LF) da toxina do <i>Bacillus anthracis</i>	42
Figura 6 -	Estruturas cristalográficas do fator de edema (EF) da toxina do <i>Bacillus anthracis</i>	42
Figura 7 -	Mecanismo de ativação da toxina do <i>Bacillus anthracis</i> natural em células normais	51
Figura 8 -	Mecanismo de ação da toxina do <i>Bacillus anthracis</i> reengenheirada em células tumorais.....	53
Figura 9 -	Modelo de placa de cultivo de 96 poços para o tratamento com a toxina do <i>Bacillus anthracis</i> reengenheirada.....	67
Figura 10 -	Ensaio de imuno-histoquímica em TMA (<i>Tissue microarray</i>) em osteossarcomas caninos e seus respectivos controles.....	71
Figura 11 -	Ensaio de imuno-histoquímica em TMA (<i>Tissue microarray</i>) em osteossarcomas caninos e seus respectivos controles	72
Figura 12 -	Linhagem de osteossarcoma canino (D17)	73
Figura 13 -	Linhagem de osteossarcoma humano (MG63)	74
Figura 14 -	Linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS).....	75
Figura 15 -	Fotomicrografia representativa dos cromossomos em metáfase da linhagem de osteossarcoma canino	77
Figura 16 -	Fotomicrografia representativa da hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com as sondas dos cromossomos 3 e 13 humanos na linhagem de osteossarcoma canino D17	78
Figura 17 -	Fotomicrografia representativa dos cromossomos em metáfase da linhagem de osteossarcoma humano MG63.....	79
Figura 18 -	Fotomicrografia representativa da hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com as sondas dos cromossomos 3 e 13 humanos na linhagem de osteossarcoma humano MG63	80
Figura 19 -	Fotomicrografia representativa dos cromossomos em metáfase da linhagem osteoblástica canina não neoplásica COBS	81

Figura 20 -	Cariótipo da linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS).....	82
Figura 21 -	Fotomicrografia representativa da expressão de β -catenina nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	84
Figura 22 -	Fotomicrografia representativa da expressão de MAPK nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	85
Figura 23 -	Fotomicrografia representativa da expressão de K-RAS nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	86
Figura 24 -	Fotomicrografia representativa da expressão de C-myc nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	87
Figura 25 -	Fotomicrografia representativa da expressão de p53 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	88
Figura 26 -	Fotomicrografia representativa da expressão de conexina 43 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	89
Figura 27 -	Fotomicrografia representativa da expressão de Bcl-2 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	90
Figura 28 -	Fotomicrografia representativa da expressão de MMP2 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	91
Figura 29 -	Fotomicrografia representativa da expressão de MMP9 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	92
Figura 30 -	Fotomicrografia representativa da expressão de uPA nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	93
Figura 31 -	Fotomicrografia representativa da expressão de MT1-MMP nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência	94
Figura 32 -	Fotomicrografia representativa da expressão de Fosfatase alcalina, Osteopontina e SPARC na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) por imunofluorescência	95
Figura 33 -	Fotomicrografia representativa da expressão de MT1-MMP e MMP2 na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) por imunofluorescência.....	96
Figura 34 -	Gráficos em barras que representam a resposta da linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) frente aos quatro tipos de tratamentos em sete concentrações diferentes da toxina reengenheirada	98
Figura 35 -	Gráficos em barras que representam a resposta da linhagem de osteossarcoma canino D17 frente aos quatro tipos de tratamentos em sete concentrações diferentes da toxina reengenheirada	100
Figura 36 -	Gráficos em barras que representam a resposta da linhagem de osteossarcoma humano MG63 frente aos quatro tipos de tratamentos em sete concentrações diferentes da toxina reengenheirada.....	102
Figura 37 -	Estratégia de análise do ciclo celular	103

Figura 38-	Histogramas do ciclo celular da linhagem de osteossarcoma canino D17 após o tratamento com a toxina modificada do <i>Bacillus anthracis</i> (LF+PAL1/PAU2).....	104
Figura 39 -	Histogramas do ciclo celular da linhagem de osteossarcoma humano MG63 após o tratamento com a toxina modificada do <i>Bacillus anthracis</i> (LF+PAL1/PAU2)	105
Figura 40-	Histogramas do ciclo celular da linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) após o tratamento com a toxina modificada do <i>Bacillus anthracis</i> (LF+PAL1/PAU2)	106
Figura 41 -	Dot plot e histogramas nos controles sem tratamento na linhagem de osteossarcoma humana (MG63).....	108
Figura 42 -	Dot plot e histogramas do tratamento com a toxina do <i>Bacillus anthracis</i> LF+PA na concentração de 5000 ng/ml na linhagem de osteossarcoma humano (MG63).....	109
Figura 43 -	Dot plot e histogramas do tratamento com a toxina do <i>Bacillus anthracis</i> LF+PAL1/PAU2 na concentração de 5000 ng/ml na linhagem de osteossarcoma humano (MG63).....	110
Figura 44 -	Largura relativa da lesão no ensaio de capacidade de migração da linhagem de osteossarcoma canino D17 por meio da técnica de <i>Wound Healing</i> , sem a toxina e com a toxina LF+PAL1/PAU2 na concentração de 5000 ng/ml de PA	112
Figura 45 -	Fotomicrografias em contraste de fase nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) após 0 e 24 horas da lesão do ensaio de <i>Wound Healing</i> e tratamento com a porção LF da toxina do <i>Bacillus anthracis</i>	113
Figura 46 -	Fotomicrografias em contraste de fase nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) após 0 e 24 horas da lesão do ensaio de <i>Wound Healing</i> e tratamento com a toxina modificada do <i>Bacillus anthracis</i> (LF+PAL1/PAU2).....	114
Figura 47 -	Largura relativa da lesão no ensaio de capacidade de migração da linhagem de osteossarcoma humano MG63 por meio da técnica de <i>Wound Healing</i> , sem a toxina e com a toxina LF+PAL1/PAU2 na concentração de 5000 ng/ml de PA	116
Figura 48 -	Fotomicrografias em contraste de fase nas linhagens de osteossarcoma humano (MG63) após 0 e 24 horas da lesão do ensaio de <i>Wound Healing</i> e tratamento com a porção LF da toxina do <i>Bacillus anthracis</i>	117
Figura 49 -	Fotomicrografias em contraste de fase nas linhagens de osteossarcoma humano (MG63) após 0 e 24 horas da lesão do ensaio de <i>Wound Healing</i> e tratamento com a toxina modificada do <i>Bacillus anthracis</i> (LF+PAL1/PAU2).....	118

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Padronização da técnica de imuno-histoquímica em <i>Tissue Microarray</i> (TMA) para os anticorpos MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP-2, uPA e uPAR.....	58
Quadro 2 -	Padronização da técnica de imunofluorescência com os anticorpos β -catenina, c-Myc, K-RAS, MAPK, MMP2, MMP9, MT1-MMP, uPA, Osteopontina, Fosfatase alcalina e SPARC.....	65
Quadro 3 -	Concentração final das associações da toxina reengenheirada utilizadas <i>in vitro</i> no ensaio de citotoxicidade.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP
ALP	Fosfatase Alcalina
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
APC	Adenomatous polyposis coli
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATRX	Regulador transcricional
β -cat	β -catenina,
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
BAX	BCl2 associated X, apoptosis regulator
CaC	Cloreto de cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CTNNB1	Catenin Beta 1
CMG2	Capillary morphogenesis gene 2
c-Myc	Oncogene Myc
Conéxons	Unidade morfológica das junções do tipo GAP que consiste da oligomerização de 6 conexinas
COBS	Line Cell Canine Osteoblasts Splitz
<i>Cot-1</i>	<i>DNA</i> used in comparative genomic hybridization
Cx43	Conexina 43; proteína da junção GAP alfa-1
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, corante núcleo celular
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Enzima desoxirribonuclease
DLG-2	Discos homólogos grandes
D17	Linhagem osteossarcoma canino

dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
EC1	Domínio extracelular
ECM	Matriz Extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGF	Fator de crescimento Epidermico
EF	Fator de Edema
EF+PA	Fator de Edema + Antígeno protetor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
ERK1/2	Proteína Quinase Regulada por sinais extracelulares
EUA	Estados Unidos das Americas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FAM	Cromógeno fosforamidite
FMVZ/USP	Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FP59	Fator Letal modificado
G1	Fase de crescimento 1
G2	Fase de crescimento 2
G0	Fase de quiescência
GAP	Junções GAP
GPM4	Receptor de glutamato tabotropico
GH	Hormônio do crescimento
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
H/E	Hematoxilina-Eosina
HERs	Human Epidermal Grow Factor
HRP	Horseradish Peroxidase
ID	Índice de DNA

IP	Iodeto de propídio
KCl	Cloreto de potássio
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LEF	Fator de transcrição
LeTx	Toxina Letal
LF	Fator letal
LF+PA	Fator letal + Antígeno protetor
LSAB	Labeled Streptavidin Biotin
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MDM2	“Murine Doble Minute 2”
MEK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MG63	Linhagem de Osteossarcoma Humano
MSCs	Células tronco mesenquimais
MMP	Metaloproteinases de matriz
MMP-2	Gelatinase A
MMP-3	Stromelisin 1
MMP-7	Matrilisina
MMP-9	Gelatinase B
MMP-11	Stromelisin 3
MMP-13	Matriz Metallopeptidase 13
MMP-14	Matriz Metallopeptidase 14
MT1-MMP	Matriz Metalloproteinase de membrana tipo 1
MTT	[3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo]
NIH 3T3	Linhagem celular de fibroblastos de camundongo
N	N-terminal
NaCl	Cloreto de sódio
OC	Osteocalcina
OSX	Fator de crescimento Osterix
OSAs	Osteossarcomas
PA	Antígeno protetor

Etanol PA	Álcool Etílico Absoluto
Plg	Ativador do plasminogênio
PAI-1	Inibidor do ativador Plg-1
PAI-2	Inibidor do ativador Plg-2
PA63	Heptâmero do antígeno protetor
p14ARF	ARF tumor supressor
PBS	Solução tampão a base de fosfato
PA-L1-I210A	Toxina do <i>Bacillus anthracis</i> reengenheirada para MMPs
PA-U2-R200A	Toxina do <i>Bacillus anthracis</i> reengenheirada para uPAs
PrAg	Antígeno protetor
PrAg20	Produto da clivagem do Antígeno protetor
PrAg83	Antígeno protetor sem clivagem
PrAg-U2	Proteínas PrAg mutadas e preferencialmente ativadas pela uPA
PrAg-U3	Proteínas PrAg mutadas e preferencialmente ativadas pela uPA
PrAg-U4	Proteínas PrAg mutadas e preferencialmente ativadas pela uPA
P53	Proteína supressora de tumor
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido Ribonucléico
RNase A	<i>Ribonuclease A</i>
RB	Retinoblastoma
RUNX2	Fator de transcrição 2
S	Fase de síntese
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Citrato de Sódio salino
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (Gene Osteonectina)
STRO1	Mesenquimal Stem Cell Marker
Src	Rous sarcoma virus
TEM8	Tumor Endotelial Marker 8
TCF	Fator de transcrição
TIMP	Inibidor de metaloproteinases de matriz

TIMP-2	Inibidor de metaloproteinases tipo 2
TMA	<i>Tissue microarray</i>
tPA	Ativador Plasminogenio tecidual
uPA	Uroquinase do plasminogenio
uPAR	Receptor de uroquinase do plasminogenio
LET	Lymphoid enhancer-binding factor 1
VPT	Departamento de Patologia Animal
Wnt	<i>(wingless-type mmtv integration site family)</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
cm	Centímetro
M	Molar
mg	Miligramma
g	Gramma
Kg	Quiligramma
h	Hora
mL	Mililitro
μ l	Micro litro
nm	Nanômetros
ng	Nanogramma
pmol	Picomol
μ m	Micrometro
μ M	Micromol
mM	MiliMol
%	Porcentagem
p (valor)	Valor da estatística p ou p-valor
®	Marca registrada
pH	Indicador ácido-básico
°C	Graus Celsius
γ	Gama
δ	Delta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Características Gerais dos Osteossarcomas Caninos e Humanos	26
2.2 Tratamento dos Osteossarcomas Caninos e Humanos	32
2.3 Genes Supressores Tumorais e Oncogenes	35
2.4 Metaloproteínas de Matriz (MMP) e uroquinases (uPA)	38
2.5 A Toxina Reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	39
2.6 Mecanismo de Ação da Toxina Reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	50
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo Geral	54
3.2 Objetivos Específicos	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Ensaio de Imuno-Histoquímica em <i>Tissue Microarray</i> (TMA)	56
4.2 Linhagens de Osteossarcomas Canino (D17) e humano (MG63) e Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS)	58
4.3 Congelamento e Descongelamento das Linhagens Celulares	59
4.4 Caracterização Citogenética das Linhagens D17, MG63 e COBS	60
4.4.1 Obtenção dos Cromossomos em <i>Metáfase</i>	60
4.4.2 Preparo das Lâminas para a Coloração com Giemsa	61
4.4.3 Coloração das Lâminas para a Coloração com Giemsa	61
4.4.4 Análise dos Cromossomos em <i>Metáfase</i>	61
4.5 Ensaio de Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	62
4.6 Ensaio de Imunofluorescência nas Linhagens de Osteossarcomas (D17 e MG63) e Linhagem Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS) sem Tratamento com a Toxina	64
4.7 Ensaio de Citotoxicidade <i>In vitro</i>	66
4.8 Análise do Ciclo Celular nas Linhagens de Osteossarcoma Canino (D17) e Humano (MG63) e na Linhagem Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS)	68
4.9 Determinação da Taxa de Apoptose e Necrose Com o Uso da Técnica de Citometria de Fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídio	68
4.10 Determinação da Taxa de Migração das Linhagens de Osteossarcoma (D17 e MG63) após o Tratamento com a Toxina	69

4.11 Análise Estatística	70
5 RESULTADOS	71
5.1 Ensaio de Imuno-Histoquímica em TMA (<i>Tissue Microarray</i>)	71
5.2 Caracterização das Linhagens de Osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) e Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS)	73
5.3 Ensaios de Imunofluorescência para a Caracterização das Linhagens de Osteossarcoma Canino (D17) e Humano (MG63) e Osteoblástica Canina Normal	83
5.4 Ensaio de Citotoxicidade <i>In vitro</i>	97
5.5 Avaliação do Ciclo Celular Após 24 Horas de Tratamento com a Toxina Modificada do <i>Bacillus anthracis</i> nas Linhagens de Osteossarcomas Canino (D17) e Humano (MG63) e Linhagem Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS).....	103
5.6 Taxa de Apoptose e Necrose após 24 Horas de Tratamento com a Toxina Reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i> por Citometria de Fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídio na Linhagem de Osteossarcoma Humano MG63	107
5.7 Ensaio de Migração (<i>Wound Healing</i>) nas Linhagens D17 e MG63 após 24 horas de Tratamento com a Toxina Reengenheirada do <i>Bacillus anthracis</i>	111
6 DISCUSSÃO	119
7 CONCLUSÃO	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das causas mais frequentes de morte em cães, seguido de traumas, problemas no sistema locomotor, doenças cardiovasculares e neurológicas (BONNETT et al., 2005). O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade não transmissíveis em todo o mundo, perdendo apenas para doença cardiovascular no número de mortes de adultos entre as idades de 30 e 70 anos (SIEGEL et al., 2015)

O osteossarcoma é o tumor ósseo de maior prevalência em seres humanos e em cães. Em cães, o osteossarcoma representa cerca de 4% de todos os tumores, aproximadamente 98% de todos os tumores ósseos do esqueleto e acomete o esqueleto apendicular (JONES et al., 2000; THOMPSON E POOL, 2002). Com alto potencial metastático, em torno de 90% dos casos apresentam metástases no momento do diagnóstico, e morrem devido a essas metástases, principalmente pulmonares (BRODEY; RISER, 1969; LING; MORGAN; POOL, 1974; HEYMAN et al., 1992; LUCROY; PECK; BERRY, 2001).

O osteossarcoma canino é muito semelhante aos osteossarcomas humanos em relação aos aspectos clínicos, radiográficos, morfológicos e biomoleculares (WILSON et al., 2008). Por isso os osteossarcomas caninos têm sido abordados em estudos como modelos para o entendimento de aspectos relacionados com o osteossarcoma humano e, também, no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para ambas as espécies.

Existem muitos modelos para o estudo de tumores ósseos e, esses modelos, quando analisados em conjunto, têm contribuído para uma maior compreensão dos mecanismos de carcinogênese e possíveis abordagens terapêuticas. A toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* tem sido uma importante ferramenta no estudo para possíveis tratamentos para diferentes tipos de neoplasias, já que ela apresenta um efeito citotóxico seletivo em tumores que apresentam grande expressão de metaloproteinases e uroquinases, diferente de células normais.

Sendo assim, temos como objetivo nesse estudo analisar a resposta de uma linhagem de osteossarcoma canino (D17) e uma linhagem celular de osteossarcoma humano (MG63) à toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*, testando, assim, uma possibilidade terapêutica para o tratamento dos osteossarcomas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características Gerais dos Osteossarcomas Caninos e Humanos

Os tumores ósseos e, mais especificamente, os osteossarcomas (OSAs) caninos, são alvos de muitas publicações fazendo a correlação com osteossarcomas em humanos. Essa correlação se deve ao grande número de semelhanças existentes no comportamento biológico das duas espécies (POOL; THOMPSON, 2002).

O osteossarcoma é uma neoplasia heterogênea, com padrões histológicos distintos, constituída por vários tipos celulares que são originados de uma única célula mesenquimal pluripotente ou de osteoblastos imaturos (Figura 1). É uma das mais frequentes neoplasias ósseas malignas. Pertence ao grupo de tumores primitivos que produz tecido ósseo, sendo conhecido, também, como sarcoma osteogênico ou sarcoma osteoblástico (PRÓSPERO, 2001; CAVALCANTI et al., 2004). O osteossarcoma é localmente invasivo, altamente metastático e torna-se progressivamente mais doloroso à medida que cresce e promove a destruição óssea (KRAJARNG et al., 2012).

Figura 1 – Eventos chave durante o desenvolvimento do osteossarcoma

A figura mostra a osteogênese normal das células tronco mesenquimais até os osteócitos *versus* o desenvolvimento do osteossarcoma, acompanhada de alterações genômicas críticas, que impulsionam a transformação celular. ATRX: regulador transcricional ATRX; DLG2: discos homólogos grandes 2; GRM4: receptor de glutamato metabotrópico 4; MSCs: células-tronco mesenquimais; OS: osteossarcoma; RB1: retinoblastoma 1; RUNX2: Fator de transcrição 2 relacionado ao RUNX; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; TP53: proteína tumoral p53. (KANSARA et al., 2014)

Os tumores ósseos primários do esqueleto são comuns em cães, tendo uma incidência de aproximadamente 65 a 85% para osteossarcomas e 15% para condrossarcomas (JONES et al., 2000; DERNELL et al., 2000). Os OSAs caninos acometem 5% de todas as moléstias neoplásicas, 98% dos tumores ósseos primários do esqueleto apendicular (JONES et al., 2000; THOMPSON E POOL, 2002) e atingem cães de raças grandes e gigantes com idade média ou avançada (em torno de 7 anos) (RU et al., 1998). Cães de pequeno porte são raramente acometidos porque as placas de crescimento se fecham precocemente (BERSANO, 2006; OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008; KRAJARNG et al., 2012). A maioria dos casos acomete cães grandes e gigantes, machos, a partir da meia idade, principalmente das raças Greyhound, Cão dos Pirineus, São Bernardo, Dogue Alemão, Setter Irlandês, Doberman, Pastor Alemão, Rottweiler, Golden Retriever, Irish Setter, Boxer, Labrador e Mastiff (DALECK et al., 2006; OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008; ANGSTADT et al., 2011). Cães machos são uma vez e meia mais acometidos que as fêmeas, entretanto, nos osteossarcomas do esqueleto axial, a incidência é maior em fêmeas (NEUWALD et al., 2006). Animais castrados têm menor incidência dessa neoplasia quando comparados aos animais não castrados (BERSANO, 2006). As formas benignas de tumores ósseos em animais domésticos são descritas como incomuns (JONES et al., 2000; POOL; THOMPSON, 2002). Os OSAs possuem alto potencial metastático e 90% dos cães morrem ou são eutanasiados devido a complicações associadas às metástases pulmonares (BRODEY; RISER, 1969; LING; MORGAN; POOL, 1974; HEYMAN et al., 1992; LUCROY; PECK; BERRY, 2001). Osteossarcomas primários também são relatados em local extra ósseo como o retroperitônio, pênis e músculos das coxas. Esta condição é rara, representando apenas 1% dos sarcomas de tecido mole (SHRINGARPURE et al., 2012). Em humanos, 90% dos OSAs também são encontrados em esqueleto apendicular, sendo aproximadamente 50% em fêmur distal, seguido de tíbia proximal e úmero proximal (MORELLO et al., 2011). A maior incidência em humanos ocorre em crianças e adultos jovens, com frequência de 60% nas primeiras duas décadas de vida (OUYANG et al., 2013). Em humanos, o osteossarcoma ocorre com maior frequência em homens do que em mulheres. Pode advir em qualquer idade, no entanto, tem maior incidência na segunda década de vida, durante a fase de crescimento do adolescente. Portanto, é mais comum em

áreas de crescimento ósseo rápido, o que sugere uma relação entre a formação do tumor e o crescimento acelerado (OSBORNE & KHANNA, 2012).

A etiologia dos osteossarcomas ainda é desconhecida e algumas hipóteses têm sido consideradas. É sabido que a transformação maligna de células mesenquimais leva ao desenvolvimento do osteossarcoma, mas as bases genéticas desses eventos ainda não são compreendidas (OSBORNE & KHANNA, 2012). É possível o desenvolvimento de uma linhagem mutante pela indução de sinais mitogênicos, por meio da sensibilização de células das regiões metafisárias dos ossos que sustentam grandes pesos, pois tais regiões são predispostas a pequenos e múltiplos traumas durante o fechamento tardio da placa epifisária (DALECK et al., 2006). Existem relatos de casos após fraturas não tratadas, processos de atraso na consolidação óssea, osteomielite crônica e sítios prévios de fraturas associadas a implantes metálicos ou enxerto cortical. Também o uso da radiação, empregada como tratamento para sarcoma de tecidos moles, tem sido apontado como uma possível causa de osteossarcoma canino (OLIVEIRA & SILVEIRA, 2008).

Modificações genéticas e hormonais são listadas como possíveis causas desse tipo de neoplasia. Alterações em genes supressores de tumores, como o retinoblastoma e o P53, têm sido relacionadas ao surgimento de muitos casos de osteossarcoma em humanos, sendo que a mutação de P53 tem sido expressa no osteossarcoma canino. O hormônio de crescimento, GH, possui um efeito estimulante para o crescimento de linhagens de células de osteossarcomas humanos e caninos, porque a produção local de RNA mensageiro do GH pode gerar um ambiente altamente produtivo para o crescimento das células tumorais (BERSANO, 2006).

As 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 periosteal. Com o passar do tempo, a musculatura do membro afetado torna-se atrófica e os linfonodos responsáveis 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 osteoproliferativo, lise cortical, proliferação periosteal e aumento de tecidos moles. (POOL; THOMPSON, 2002).

Histologicamente, os osteossarcomas são formados por células mesenquimais malignas de células tronco ou linhagens de osteoblastos que produzem osteóide. Existem diferentes subtipos histológicos de osteossarcomas incluindo osteoblástico, fibroblástico, condroblástico e baseiam-se nas características morfológicas e de diferenciação de células tumorais (THOMPSON; POOL, 2008).

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

A combinada aplicação de estudos moleculares, bioquímicos, histoquímicos e ultraestruturais tem definido uma sequência temporal de expressão gênica associado com o desenvolvimento do fenótipo de células ósseas em culturas primárias de osteoblastos. O pico de expressão gênica reflete uma sequência de desenvolvimento da diferenciação de células ósseas caracterizadas principalmente por três principais períodos: proliferação, maturação da matriz extracelular, e mineralização, além de dois pontos de restrição em que as células podem progredir porem não podem passar sem a promoção de certos sinais. A regulação do

crescimento celular ósseo e a expressão de genes específicos têm sido examinadas durante a sequência de desenvolvimento e discutido no contexto: que a expressão de oncogênese em osteoblastos que estão em franca proliferação contribui para a supressão de genes expressos pós-proliferação; que a modulação hormonal do gene é dependente do estado de maturação dos osteoblastos; e que a estrutura da cromatina e a presença de nucleossomos contribuem para a organização tridimensional dos genes promotores que suportam a atividade sinérgica e/ou antagonista de mediadores do crescimento e diferenciação óssea (LIAN; STEIN, 1992, 1995; THOMAS; KANSARA, 2006). O processo de formação óssea é criticamente dependente da coordenação dos processos de proliferação e diferenciação.

Nesse contexto, perturbações dos programas de diferenciação em células tumorais podem resultar em alteração nos processos de sobrevivência celular, crescimento, e proliferação, perda de função especializada, e aquisição de da habilidade de invasão de tecidos vizinhos. Contudo, alguns aspectos do fenótipo de osteoblastos normais diferenciados são claramente preservados no osteossarcoma, e a habilidade das células tumorais produzirem uma matriz aberrante é crucial para o diagnóstico. A Fosfatase alcalina (ALP), um precoce e não específico marcador de linhagem osteoblástica, é frequentemente vista em tumores ósseos. Em contraste, marcadores tardios da diferenciação de osteoblastos como osteocalcina (OC) é discretamente expressa ou não é expressa na maioria dos casos de osteossarcoma. Isso sugere que a diferenciação terminal, porém não a diferenciação por si, é contrária a tumorigênese (THOMAS; KANSARA, 2006). Devido ao programa de diferenciação de osteoblastos ser bem entendido, osteossarcomas representam um excelente modelo para o estudo das relações entre diferenciação e transformação.

Contudo, o desenvolvimento em estágios não pode ser feito definitivamente em células transformadas e em células de osteossarcoma porque a perda do controle do crescimento desconecta a relação existente entre proliferação e diferenciação que são operantes em células diploides normais. Em contraste, as células normais, a constitutiva expressão de marcadores de diferenciação fenotípicos em células transformadas reflete a ausência dos dois importantes pontos de transição, e consequentemente dos três períodos que caracterizam a sequência de desenvolvimento observada em células diploides normais (LIAN; STEIN, 1992). A noção de que linhagens comprometidas e diferenciação terminal são estágios chave na tumorigênese tem muitas implicações significantes. Primeiro sugerem

que reguladores transcricionais da diferenciação podem ter papel ambivalente na tumorigênese, uma vez que residirá inicialmente sobre o comprometimento da linhagem e expansão, e tardiamente sobre os aspectos terminais da diferenciação. Em segundo lugar, provavelmente os mecanismos celulares intrínsecos e extrínsecos estão envolvidos na regulação dos pontos de transição, que podem ser perturbados em cânceres.

O entendimento dos mecanismos biológicos regulatórios que suportam o desenvolvimento no contexto da relação existente entre proliferação/diferenciação prove uma viável base para o entendimento de desordens ósseas e particularmente de células de tumores ósseos, em que estas aberrações nesta relação podem facilitar o diagnóstico e avaliação de uma terapia dirigida (LIAN; STEIN, 1995).

2.2 Tratamento dos Osteossarcomas Caninos e Humanos

O tratamento para OSA, tanto em humanos como em cães, envolve cirurgia para remover tumores primários e, em alguns casos, metástase à distância, combinada com neoadjuvante e/ou quimioterapia adjuvante (TA et al., 2009; SELMIC et al., 2014). A cirurgia envolve a preservação de parte do membro ou a amputação total (LIPTAK et al., 2006; REDDY et al., 2015). A preservação do membro é mais comum em pacientes com tumores de grau baixo (REDDY et al., 2015). A vantagem proposta da cirurgia de preservação do membro em vez de amputação é que esses pacientes têm um melhor retorno à função e, conseqüentemente, maior qualidade de vida do que aqueles submetidos à amputação (MAVROGENIS et al., 2012).

Uma meta-análise recente confirmou que o membro mantido após a cirurgia teve menor incidência de metástase (LI et al., 2016). Relatórios sugerem uma frequência metastática e tempo de sobrevida semelhantes em cães com o membro mantido após a cirurgia em comparação com a abordagem mais convencional de amputação e quimioterapia adjuvante (MITCHELL et al., 2016). O problema para identificar uma diferença significativa nos resultados em cães em comparação com os seres humanos pode estar relacionada a menos número de cães submetidos a procedimentos de manutenção do membro e, portanto, uma experiência mais limitada com o procedimento. Também é possível que diferenças na seleção de casos entre humanos e cães impacte no resultado. Até que um número maior de

casos caninos apareça na literatura, a razão para as diferenças entre os resultados em relação aos humanos permanecem obscuros. O mecanismo responsável pelo prolongamento da sobrevida e intervalo livre de doença nos cães ainda não foi elucidado, mas a hipótese ocorra um aumento da imunidade antitumor (LASCELLES et al., 2005). Esse fenômeno não ocorreu unicamente em cães, mas também foi relatado em humanos, com uma etiologia igualmente incerta (JEYS et al., 2007; CHEN et al., 2015). Nos OSAs humanos, a cirurgia com quimioterapia adjuvante continua a ser o tratamento de escolha (LUETKE et al., 2014; ANDERSON, 2016). O padrão abordagem quimioterápica adjuvante utiliza uma combinação de metotrexato, doxorrubicina e cisplatina usando protocolos de dose alta, moderada ou padrão (WINKLER et al., 1993; ZHANG et al., 2014; FERRARI et al., 2015; WANG et al., 2015). Esta abordagem permaneceu relativamente inalterada por muitos anos. A inclusão de quimioterapias adicionais incluindo ifosfamida encontrou resultados mistos e meta-análises forneceram evidências conflitantes para saber se isso proporciona um benefício claro em todos os casos (FAN et al., 2015; SU et al., 2015). Embora um grande número de modificações do protocolo e terapias experimentais foram relatadas, essas, até o momento, não ofereceram alternativas terapêuticas seguras para a melhora do resultado em indivíduos afetados (FERRARI et al., 2015). Contudo, há evidências sugerindo que seis doses de carboplatina podem ser superior à alternância de doxorrubicina e carboplatina (SKORUPSKI et al., 2016). Em OSAs caninos, a quimioterapia adjuvante com doxorrubicina ou compostos à base de platina incluindo cisplatina e carboplatina foi associada ao aumento do tempo de sobrevida em casos de amputação (BERG, 1996; PHILLIPS et al., 2009; SAAM et al., 2011; ALVAREZ et al., 2014). Os méritos relativos da quimioterapia individual foram avaliados. Resultados de diversos estudos indicam que não existe diferença significativa no intervalo livre da doença ou tempo de sobrevida naqueles cães que receberam no pós-operatório doxorrubicina ou carboplatina ou suas combinações para OSA (SELMIC et al., 2014). No entanto, os cães que receberam carboplatina tiveram menos efeitos colaterais, melhorando a qualidade de vida, uma consideração importante para a maioria dos proprietários. Protocolos combinados com doxorrubicina e carboplatina também foram avaliados por seu potencial benéfico na melhora do intervalo livre de doença e nos tempos de sobrevida (KENT et al., 2004). Este protocolo de combinação foi associado um maior grau de toxicidade induzida pela quimioterapia

(BACON et al., 2008). Um recente estudo prospectivo comparando os resultados da carboplatina sozinha com um protocolo que alternou carboplatina e doxorubicina não mostrou benefício nesse combinação em melhorar a sobrevivência em relação à carboplatina sozinha (SKORUPSKI et al., 2016). Outras publicações (retrospectivas), usando esta combinação, não conseguiram demonstrar um benefício claro da carboplatina como agente único (KENT et al., 2004; BACON et al., 2008). Existem poucas publicações que avaliaram os benefícios de outros agentes quimioterápicos para OSA canino, como a gentamicina. Nenhum estudo observou uma melhoria clara no resultado acima daquele observado pelo uso da carboplatina (MCMAHON et al., 2011).

Artigos mais recentes reportaram o uso de imunoterapia baseado em uma *Listeria monocytogenes* recombinante atenuada que expressava uma proteína HERS/neu mostraram alguns resultados encorajadores (MASON et al., 2016). Cães submetidos a cirurgia (com amputação ou salvando o membro) com quimioterapia pós-operatória com quatro doses de carboplatina foram incluídos neste estudo. Esses cães, 3 semanas após a conclusão do seu protocolo de quimioterapia, receberam o agente de imunoterapia. Houve um aumento global no tempo de sobrevivência e redução na incidência de metástases em comparação com controles históricos. Novos tratamentos terapêuticos, incluindo imunoterapias, também estão sendo investigados e desenvolvidos em humanos dada a incapacidade de melhorar o resultado desses pacientes com OSA nos últimos 30 anos (BOTTER et al., 2014; BISHOP et al., 2016; WAN et al., 2016).

Uma das áreas que pode fornecer melhores abordagens de tratamento para o OSA é a farmacogenômica. Biomarcadores farmacogenéticos e alvos específicos podem fornecer uma possibilidade de tratamento personalizado dos OSAs (VOS et al., 2016; SERRA, HATTINGER, 2017). Essa abordagem ainda é muito recente mas aparece claramente com um grande potencial para a gestão futura nos tratamentos dos OSAs em humanos e cães.

2.3 Genes Supressores Tumorais e Oncogenes

Alterações em genes supressores de tumores, como o retinoblastoma e o P53, têm sido relacionadas ao surgimento de muitos casos de osteossarcoma em humanos, sendo que as mutações de P53 e retinoblastoma têm sido expressas nos osteossarcomas caninos.

O gene p53 foi descrito pela primeira vez em 1979, e inicialmente acreditada ser um oncogene, mas na verdade, foi o primeiro gene supressor de tumor a ser identificado. O p53 tem a função de eliminar e inibir a proliferação de células anormais, prevenindo assim o desenvolvimento neoplásico. Outras proteínas pró apoptóticas reguladoras de apoptose como Bax, são induzidas diretamente pela p53 (Figura 2). O p53 do tipo selvagem, ativa diretamente outros genes com função nas vias de reparo do DNA, incluindo do ribonucleotídeo redutase, p53R2, envolvido no reparo de DNA danificado.

O p53 continua a ser o gene mais comumente mutado em muitas neoplasias comuns em humanos, com mutações principalmente missense. Estima-se que ocorra em 50% de todas as neoplasias. As proteínas mutantes são quase sempre defeituosas na sequência específica de ligação ao DNA e, portanto, para transativação de genes regulados pela proteína do tipo selvagem (SIGAL; ROTTER, 2000). Curiosamente, a proporção de mutações missense em p53 é maior do que a observada em outros genes supressores de tumor, sugerindo que a expressão de p53 mutantes pode conferir vantagem além da perda da função do tipo selvagem (HUSSAIN; HARRIS, 2000). Consistente com esta hipótese, muitos tumores humanos associados p53 mutantes possuem um número de propriedades ausente da proteína do tipo selvagem (SIGAL; ROTTER, 2000). Em uma alta proporção de neoplasias sem mutações, a função p53 é comprometida por outros mecanismos reconhecidos (VOGELSTEIN et al., 2001). A proteína MDM2 liga-se a p53 e promove a ubiquitinação da região C-terminal de p53 e leva a degradação subsequente (Figura 2). O p14ARF interage com o MDM2, impedindo a associação de p53 e MDM2, e assim estabilizando p53 (Figura 2). A degradação do p53 pode, portanto, ser inapropriadamente estimulada pela grande expressão de MDM2 ou por deleção ou silenciamento epigenético de p14ARF. Perda dessa proteína tem sido relatada em várias neoplasias comuns em humanos, particularmente, mas não exclusivamente, aquelas em que o gene p53 é do tipo selvagem. Existe, ainda, outro mecanismo de inativação que envolve o sequestro

citoplasmático da proteína p53, impedindo a localização nuclear da proteína e inibindo assim a sua atividade, perdendo a sua ação supressora de tumor.

Figura 2 – Vias de sinalização que regulam a proliferação e a apoptose

FONTE: <https://resources.saylor.org/wwwresources/archived/site/wpcontent/uploads/2011/01/Cell-Signaling-Pathways.pdf>

A β-catenina é uma proteína situada no citoplasma que é codificada pelo gene CTNNB1, localizado no cromossomo 3p21 em humanos e no cromossomo 23 em cães. Ela é multifuncional, pois tem papel importante como proteína de adesão e como fator de transcrição nas vias de sinalização, principalmente as relacionadas com a via Wnt (*wingless-type MMTV integration site family*) (Figura 2) (KRAUS et al., 1994; MACDONALD et al., 2009). A via de sinalização Wnt é uma rede de proteínas que passa sinais de receptores na superfície da célula através do citoplasma e finalmente para o núcleo da célula aonde uma

cascata de sinalização conduz à expressão de genes-alvo (Figura 2) (WALLINGFORD; HABAS, 2005; HABAS, 2006).

O tipo mais comum de adesão intercelular acontece através das junções aderentes, elas são importantes para manter a arquitetura tecidual e polaridade celular, limitando a movimentação e proliferação celular. A β -catenina fica numa posição intermediária ligada ao domínio citoplasmático da E-caderina numa extremidade e na outra se liga a α -catenina (ALBERTS et al., 2006). Numa mesma célula, existem dois complexos distintos de ligação das E-caderina/catenina. Uma extremidade da β -catenina e da γ -catenina liga-se ao domínio citoplasmático da E-caderina, enquanto a outra extremidade das β -cateninas ou das γ -cateninas se une as α -cateninas na rede de microfilamentos de actina do citoesqueleto. Em resumo, um complexo vai ser composto pela E-caderina, β -catenina e α -catenina e o outro representado pela E-caderina, γ -catenina e α -catenina (NOLLET, 1999; BEAVON, 2000; WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000).

Na ausência de sinais mitóticos externos, a β -catenina é sequestrada em um complexo com a proteína APC (*adenomatous polyposis coli*), um dos principais elementos da maquinaria proteolítica celular, onde a β -catenina livre é fosforilada e degradada. Normalmente, a quantidade de β -catenina livre no citoplasma é pequena e a elevação no teor de β -catenina livre é o resultado da inativação do sistema APC ou ativação da via WNT-1 (WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000). A maioria das mutações do gene APC resulta em uma proteína truncada que continua com a capacidade de formar complexos, mas não degrada a β -catenina, resultando no aumento da β -catenina livre no citoplasma e sua translocação para o núcleo, a qual se liga a fatores de transcrição TCF/LET que levam a ativação inapropriada da expressão gênica (NOLLET, 1999; MOON et al., 2004; IWAI et al., 2005; GAO et al., 2005; SCULLY et al., 2005).

A ativação da sinalização de Wnt induz a expressão de Conexina 43 (Cx43) via atividade transcricional da β -catenina e resulta no aumento de acúmulo da proteína Cx43 e na formação de canais *gap junction*. Em resposta à sinalização Wnt, a β -catenina co-localiza-se com a própria proteína Cx43 como parte de um complexo na placa de *junção gap* (GAELLE et al., 2018).

2.4 Metaloproteinases de Matriz (MMP) e uroquinases (uPA)

As metaloproteinases e uroquinases são proteases com grande expressão em diferentes tipos de tecidos tumorais e linhagens de células neoplásicas, sendo restritas em tecidos normais. Essa característica despertou a atenção dos cientistas para novas terapias contra o câncer, direcionadas a um alvo molecular.

As MMPs fazem parte de uma família de enzimas capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular (ECM), como o colágeno, laminina, fibronectina, elastina e proteoglicanos. A progressão tumoral num tecido tende a aumentar os níveis de diferentes tipos de MMPs. Os mais frequentemente encontrados são MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-13 e MMP-14. Os modelos atuais veem as MMPs como atuantes durante a invasão tumoral e metástase, decompondo a matriz extracelular tecidual e dissolvendo as membranas basais epiteliais e endoteliais, permitindo assim que as células tumorais invadam através do estroma e dos vasos sanguíneos. Certas MMPs também podem participar da neoangiogênese tumoral, porque são seletivamente suprarreguladas em células endoteliais em proliferação em tecidos tumorais (CHAMBERS, et al., 1997). Além disso, um grupo de MMPs incompletamente caracterizadas pode contribuir para o crescimento sustentado de focos tumorais estabelecidos pela clivagem do ectodomínio de pró-formas ligadas à membrana de fatores de crescimento, liberação de peptídeos que são mitógenos para células tumorais e/ou células endoteliais vasculares tumorais (ARRIBAS et al., 1996; MERLOS-SUAREZ et al., 1998). Além das MMPs, o sistema ativador de uroquinase plasminogênio (uPA) está relacionado com etapas da progressão da neoplasia como a gênese tumoral proliferação, migração, adesão celular e angiogênese do tumor. A degradação da ECM também faz parte da função desempenhada pelas uroquinases. Esse sistema consiste na uPA, no receptor de uPA (uPAR) e seu inibidor primário, o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) (DUFFY, 2004).

Segundo Bailey et al. (2006), expressão de uPA e uPAR ocorre em todo o trato urinário dos cães. Em tumores mamários malignos de cães a expressão de uPA pode ser considerada um fator prognóstico. A grande expressão da uPA foi relacionada ao maior tamanho do tumor, em relação à uma grande expressão do Ki-67 e ao crescimento invasivo. Também foi relacionado ao maior grau histológico do tumor, à presença de metástases em linfonodos regionais, ao desenvolvimento de metástases à distância, à menor sobrevida global e à menor sobrevida livre da doença (SANTOS et al., 2011).

Em vista da presença de MMPs e uPAs mais frequentemente nos tecidos tumorais, no ano de 2000, Liu, Bugge, Leppla e colaboradores iniciaram os estudos da toxina do *Bacillus anthracis* reengenheirada para o tratamento do câncer. Essas toxinas modificadas foram chamadas de PAL1-I210A e PAU2-R200A e seriam ativadas especificamente pela presença de MMPs e uPAs ativas e expressas nos tumores.

2.5 A Toxina do Reengenheirada *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis, o agente etiológico do antraz, é uma bactéria Gram positiva, em forma de bastonete, que forma esporos altamente resistentes a condições ambientais adversas, incluindo calor, luz ultravioleta, radiação, pressão e agentes químicos. Esses esporos podem sobreviver por décadas em solos contaminados, são altamente infecciosos e são geralmente fatais se ingeridos ou inalados. A resistência dos esporos torna o antraz passível de desenvolvimento como uma arma biológica. Portanto, o *Bacillus anthracis* tem sido motivo de preocupação como um patógeno com potencial para ser usado como um agente de guerra biológica. Em 2001, o mundo viu o primeiro ataque terrorista de antraz efetivo nos EUA, resultando em 11 casos confirmados de antraz por inalação com 5 mortes (LIU, SCHUBERT, BUGGE, LEPPLA, 2003).

A toxina do *Bacillus anthracis* é única porque sua ativação proteolítica ocorre na superfície da célula antes da intoxicação (LEPPLA, 2000). Como as infecções naturais por *Bacillus anthracis* são raras e poucas pessoas foram imunizadas contra o antraz, a quantidade de anticorpos pré-existentes para a toxina do *Bacillus anthracis* é baixa ou ausente. Em contraste, muitos pacientes têm anticorpos pré-existentes contra as toxinas usadas atualmente, especialmente as imunotoxinas, devido a imunizações infantis. A presença de

tais anticorpos foi mostrado para modificar alvo farmacocinética da toxina e provavelmente prejudica a eficácia antitumoral.

Os dois fatores de virulência de *Bacillus anthracis* são a cápsula de ácido poli-D-glutâmico, que inibe a fagocitose, e a toxina secretada pelo *Bacillus anthracis* (SMITH et al., 1955).

A toxina secretada pelo *Bacillus anthracis* é composta pelo antígeno protetor (PA), o fator de edema (EF) e o fator letal (LF). Progressos substanciais no sentido de compreender a estrutura e a função da toxina do *Bacillus anthracis* foram feitos nos últimos anos. Isso inclui a visualização completa das estruturas cristalográficas do antígeno protetor (PA) (Figura 3 e 4) (PETOSA et al., 1997), do fator letal (LF) (Figura 5) (PANNIFER et al., 2001) e do fator de edema (EF) (Figura 6) (DRUM et al., 2002).

Figura 3 - Estruturas cristalográficas do antígeno protetor (PA) da toxina do *Bacillus anthracis*

Visão ortogonal do antígeno protetor (PA) da toxina do *Bacillus anthracis* com domínios coloridos. (Fonte: PETOSA et al., 1997)

Figura 4 - Estruturas cristalográficas do antígeno protetor (PA) da toxina do *Bacillus anthracis*

Heptâmero do antígeno protetor (PA63). a) Visão axial colorida. b) Vista do poro formado com três monômeros removidos para revelar o interior do heptâmero. c) Visão lateral da imagem a. d) Lúmen do heptâmero, visto em b. (Fonte: PETOSA et al., 1997)

Figura 5 - Estruturas cristalográficas do fator letal (LF) da toxina do *Bacillus anthracis*

Representação da fita do fator letal (LF) da toxina do *Bacillus anthracis* com domínios coloridos. (Fonte: PANNIFER et al., 2001)

Figura 6 - Estruturas cristalográficas do fator de edema (EF) da toxina do *Bacillus anthracis*

Representação da fita da calmodulina associada ao fator de edema (EF) da toxina do *Bacillus anthracis*. (Fonte: DRUM et al., 2002)

O antígeno protetor (PA), também chamado de PrAg, é composto por quatro domínios que correspondem a regiões funcionais previamente definidas pela análise de grandes fragmentos produzidos pela clivagem da tripsina e quimotripsina. O Domínio 1 (resíduos 1 - 258) contém dois íons de cálcio fortemente ligados e uma grande alça flexível (resíduos 162 - 175), que é clivada por uma furina ou proteases semelhantes a furina durante a ativação proteolítica na superfície da célula após ligação a um receptor TEM8 ou CMG2 (MOLLOY et al., 1992). A proteólise de PrAg83, produz um fragmento amino-terminal de 20 kDa (PrAg20), que é liberado, e o fragmento carboxi-terminal de 63 kDa (PrAg63), que permanece ligado ao receptor e auto-associa-se para formar um heptâmero em forma de anel (PETOSA et al., 1997; MILNE et al., 1994). A análise cristalográfica por raios X do PrAg mostrou que a heptamerização é estericamente bloqueada até a remoção do PrAg20 NH₂-terminal (PETOSA et al., 1997). Estudos recentes de mutagênese revelaram que o local de ligação de LF e EF no PrAg abrange a interface subunidade-subunidade dentro do heptâmero PrAg63 (CUNNINGHAM et al., 2002). Assim, LF e EF podem ligar-se apenas à forma oligomérica do PrAg63 e não ao PrAg63 monomérico (MOGRIDGE et al., 2002). Sob condições de saturação, um heptâmero PrAg63 pode ligar-se no máximo em três moléculas de LF ou EF (MOGRIDGE et al., 2002a; MOGRIDGE et al., 2002b). Um recente trabalho mostra que a oligomerização do PrAg63 não apenas fornece o sítio de ligação para LF e EF, mas também desencadeia internalização do complexo da toxina em endossomos por meio de uma solução mediada por pontes lipídicas dependente de clatrina (ABRAMI et al., 2003). Uma diminuição no pH faz com que o heptâmero PrAg63 se insira nas membranas endossomais formando um canal, por onde LF e EF translocam-se para o citosol (WESCHE et al. 1998; LIU et al., 2003).

Pesquisas com camundongos *knockout* para os receptores de superfície CMG2 e TEM8 mostram que o receptor CMG2 é fisiologicamente mais relevante para a ação da toxina do *Bacillus anthracis* *in vivo* (LIU et al., 2009). Camundongos *knockout* para CMG2 não foram resistentes a LF+PA e EF+PA, mas resistiram a infecção do *Bacillus anthracis*. Em contrapartida, camundongos *knockout* para TEM8 continuaram suscetíveis às duas toxinas e a infecção do *Bacillus anthracis*. Já camundongos *knockout* para os dois tipos de receptores foram completamente resistentes às duas toxinas e a infecção do *Bacillus anthracis* (LIU et al., 2009).

O Domínio 2 (resíduos 259 - 487) contém várias formas de inserção do canal na membrana. Também tem uma grande alça flexível (resíduos 303 - 319) que é implicada na inserção de membranas e na formação de canais (PETOSA et al., 1997; SINGH et al., 1994). O Domínio 3 (resíduos 488 - 595) parece ter um papel na oligomerização do PrAg63 (MOGRIDGE et al., 2001). E o Domínio 4 (resíduos 596 - 735), está vagamente associado com os outros três domínios e está envolvido na ligação ao receptor.

O PrAg é a parte central da toxina do *Bacillus anthracis*, servindo como veículo de entrega para ligação e translocação de LF e EF no citosol das células. A combinação de PrAg e LF, denominada toxina letal (LeTx), mata animais (BEALL et al., 1962; EZZELL et al., 1984) e células, incluindo alguns macrófagos murinos (FRIEDLANDER, 1986), mas não mostra citotoxicidade evidente para a maioria dos outros tipos de células (HANNA et al., 1992). LF é uma metaloprotease zinco-dependente que cliva várias proteínas-quinase ativadas por mitógeno (MAPKKs - *mitogen-activated protein kinase kinases*) em suas regiões amino-terminais (DUESBERY et al., 1998; VITALE et al., 1998). Ainda permanecem pouco claros como esta clivagem dispara os efeitos letais da toxina e se há mais substratos celulares relevantes para a toxicidade. A combinação de PrAg e EF, chamada toxina edema, causa edema quando injetado subcutaneamente em animais experimentais. O EF é um adenilatociclase dependente de cálcio e calmodulina que eleva as concentrações intracelulares de cAMP (LEPPLA, 1982), causando assim diversos efeitos nas células, incluindo a deficiência de fagocitose (O'BRIEN et al., 1985) (Figura 7).

LF é uma metaloprotease que foi originalmente identificada para clivar MAPKK1 e MAPKK2 em dois estudos independentes (DUESBERY et al., 1998; VITALE et al., 1998). Sete MAPKKs foram identificadas e LF cliva todos os membros da família, com exceção da MAPKK5 (VITALE et al., 2000). Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK - *mitogen-activated protein kinase*) são altamente conservadas entre eucariotos e funciona na transdução de uma variedade de sinais extracelulares (LEWIS et al., 1998). Ativação constitutiva de sinalização de MAPK também contribui para muitos aspectos do câncer humano e a via tem sido considerada como um potencial alvo terapêutico (COHEN et al., 1999). Duesbery, Vande Woude e colaboradores demonstraram que o LeTx foi muito eficaz na inibição da ativação de MAPK em células NIH 3T3 transformadas por H-ras (DUESBERY et al., 1998). O tratamento de células transformadas com LeTx fez com que

revertessem para uma morfologia não transformada e inibiram suas habilidades de formar colônias em ágar e invadir o Matrigel. Além disso, o LeTx inibiu o crescimento de células transformadas por ras implantados em camundongos atímicos em concentrações sem toxicidade para o animal. No entanto, foi interessante notar que LeTx teve apenas um efeito modesto na proliferação celular em células NIH 3T3 transformadas por ras. Como o LeTx causou uma diminuição significativa neovascularização tumoral *in vivo*, a atividade antitumoral do LeTx pode ser devido a efeitos antiangiogênicos. Este resultado é consistente com o dado de que o receptor TEM8 do PrAg está expresso no endotélio tumoral (ST CROIX et al., 2000; CARSON-WALTER et al., 2001).

Em outro estudo, Koo, Vande Woude e colaboradores observaram que as linhagens celulares de melanoma humano do quadro drogas antineoplásicas do *National Cancer Institute* especialmente sensíveis a LeTx e a uma pequena molécula inibidora de MAPKK, PD98059, mostrando que a inibição da sinalização MAPK com LeTx ou PD98059 induz uma resposta apoptótica em células de melanoma humano (KOO et al., 2002). Em contraste, melanócitos humanos normais não sofrem apoptose, mas param na Fase G1 do ciclo celular em resposta à inibição de MAPK. Nenhum outro tipo de tumor foi claramente sensível a LeTx ou PD98059 (KOO et al., 2002). Esses achados indicam que a via MAPK fornece um sinal de sobrevivência essencial para os melanomas. A inibição da sinalização MAPK *in vivo* com LeTx também induziu apoptose, resultando em um efeito completo ou regressão de tumores de xenoenxerto de melanoma humano em camundongos atímicos em concentrações de toxina toleradas pelo hospedeiro animal. Devido à sua natureza catalítica, LF em uma concentração de apenas 0,07 nM pode inativar proteoliticamente a maioria das MAPKK1 de células de ovário de hamster chinês após incubação com as células por 90 min (Liu e Leppla, dados não publicados). Esta capacidade catalítica pode tornar o LeTx mais eficaz do que pequenas moléculas inibidoras de MAPKK na segmentação da via da MAPK em melanomas. Além disso, LF tem vantagem sobre as pequenas moléculas inibidoras pois pode ser especificamente direcionado para células tumorais. LF é o maior fator de virulência do *Bacillus anthracis*. A toxina teve uma diminuição de 1000 vezes em sua virulência quando o gene LF é inativado em uma cepa *Bacillus anthracis* (PEZARD et al., 1999). Mesmo assim, a toxina não é tão potente comparada a outras toxinas proteicas que foram usadas em alvos tumorais (por exemplo, DT, ricina). O papel exato do LeTx na infecção e suas ações

patogênicas permanecem incertas. Isso levanta questões sobre o uso do LeTx não modificado como um agente terapêutico. As toxicidades e efeitos colaterais *in vivo* do uso de LeTx nativo, portanto, precisam ser cuidadosamente avaliados no curso de desenvolvê-lo como uma terapia possível. Devido a estas preocupações, é necessário que o uso do LeTx seja feito de forma específico para células tumorais. Por isso, foi desenvolvido proteínas PrAg direcionadas para os tumores específicos.

A necessidade de que o PrAg seja ativado na superfície da célula-alvo permite a possibilidade de reprojeter esta proteína para tornar sua ativação dependente de outras proteases, não sendo a furina, que estão presentes na superfície da célula-alvo. Isso é possível pelo fato de que muitas células tumorais expressam certas proteases associadas à superfície celular para promover seu crescimento invasivo. As duas proteases associadas à superfície celular que estão mais ligadas ao crescimento de células tumorais são as matrizes de metaloproteases (MMPs) (STETLER-STEVENSON et al., 1993) e o ativador de uroquinase plasminogênica (uPA) (DANO et al., 1999; ANDREASEN et al., 2000).

As MMPs constituem uma família de proteases dependentes de zinco, multidomínio, endopeptidases neutras que desempenham um papel tanto na remodelação tecidual quanto na destruição patológica da matriz extracelular (STETLER-STEVENSON et al., 1993; BIRKEDAL-HANSEN, 1995). Os membros da família das MMPs as collagenases ligadas à membrana, estromelisinases e gelatinases. As MMPs tem uma grande expressão em tipos de tecidos tumorais e linhagens celulares tumorais, e está correlacionado com a invasão tumoral e metástase (STETLER-STEVENSON et al., 1993). Os modelos atuais defendem que as MMPs agem durante invasão tumoral e metástase, modificando proteoliticamente o ambiente extracelular, para facilitar o crescimento de células tumorais, motilidade, invasão e angiogênese (CHAMBERS, MATRISIAN, 1997; BUGGE, 2002). As atividades catalíticas das MMPs são altamente reguladas. As MMPs são expressas como zimogênios que são ativados pela proteólise de um pró-peptídeo N-terminal que bloqueia a fenda do sítio ativo (SPRINGMAN et al., 1990; MURPHY et al., 1999). Por meio desses mecanismos de controle, a atividade de MMPs parecem estar restritas à superfície de células tumorais.

O reconhecimento do papel das MMPs no desenvolvimento e metástase do tumor, incentivaram o desenvolvimento inibidores sintéticos de MMPs como potencial agentes

terapêuticos (BROWN, 1995; BROWN, GIAVAZZI, 1995; DRUMMOND, BECKETT, 1999). A eficácia destes agentes dirigidos por MMP sugerem a possibilidade do uso de outras estratégias antitumorais seletivas por MMPs que poderiam ser eficientes em diferentes tumores. Das MMPs existentes, a MMP-2 (gelatinase A), a MMP-9 (gelatinase B) e a membrana tipo 1 MMP (MT1-MMP) são relatadas como as mais relacionadas à invasão e metástase em vários tipos de tumores humanos (STETLER-STEVENSON et al., 1993).

Para explorar os papéis das MMPs como agentes antitumorais, duas proteínas PrAg do antraz ativadas por MMP, PA-L1 e PA-L2, foram construídas (LIU et al., 2000). Nessas duas proteínas, o sítio de reconhecimento da furina, o RKKR, foi substituído pelas sequências GPLGMLSQ e GPLGLWAQ, que são suscetíveis à clivagem por MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP e, provavelmente, outros membros da família MMP. Essas duas sequências foram modeladas após a clivagem do sítio de MMP na cadeia $\alpha 1$ do colágeno tipo I, mas contêm substituições que aumentam a clivagem por MMP-2 e MMP-9. Quando combinadas com FP59 (uma fusão de LF e o domínio de ribolização de ADP da exotoxina A de *Pseudomonas*), essas proteases PrAg mutadas mostraram uma seletividade para matar diferentes linhagens celulares tumorais humanas que expressam grande quantidade de MMP, incluindo fibrossarcoma humano, câncer de mama e melanoma. Além disso, essas proteases PrAg mutadas mataram as células tumorais que apresentavam significativa expressão de MMP, enquanto poupavam células normais cultivadas no mesmo meio de cultura, indicando que a ativação do PrAg ocorreu na superfície da célula tumoral e não no sobrenadante. Este trabalho demonstrou que novas especificidades podem ser conferidas no PrAg, substituindo o sítio da furina por uma sequência apropriada de substrato.

Em nosso trabalho, usamos a toxina modificada FP59 apenas para demonstrar a presença dos receptores marcador tumoral 8 (TEM8 ou ANTXR1) ou gene para morfogênese capilar 2 (CMG2 ou ANTXR2) nas linhagens analisadas.

Outro alvo potencial para a terapia do câncer é o uPA. O uPA e seu receptor celular (uPAR) possuem significativa expressão por praticamente todos tumores humanos e pode ser considerado um marco de conversão maligna (DANO et al., 1999; ANDREASEN et al., 2000; ANDREASEN et al., 1997). A íntima associação entre expressão de uPA na superfície celular e transformação maligna foi desmonstrado em tumores diferentes como o carcinoma pulmão, cólon, mama, estômago, pâncreas, cabeça e pescoço, pele, útero, ovários, cérebro,

melanoma, sarcoma de tecidos duros e moles e leucemia mielica e monocítica. O uPA e o uPAR são expressos em níveis muito baixos em tecidos normais, mas a expressão é rapidamente induzida em resposta à lesão tecidual, fornecendo assim proteólise extracelular essencial para o reparo tecidual e remodelação (DANO et al., 1999; ROMER et al., 1996; LUND et al., 2000; HEYMANS et al., 1999). O uPA é secretado como uma única enzima de cadeia (pro-uPA) com atividade intrínseca muito baixa e é convertido para a forma ativa, duas cadeias de uPA, pela plasmina (NIELSEN et al., 1982). O uPA de duas cadeias, por sua vez, é um potente ativador do plasminogênio (Plg) que cliva entre R⁵⁶⁰-V⁵⁶¹ em Plg, dando origem à plasmina ativa. Esta propriedade de Plg ativa um ciclo de feedback poderoso que resulta na geração de ambos, plasmina e uPA ativo de duas cadeias. A formação de uPA de duas cadeias e plasmina precisam da secreção de pró-uPA e Plg na superfície celular, mediada pela ligação entre pro-uPA, uPAR e Plg para expressão de receptores na superfície celular (DANO et al., 1999). O resultado líquido deste ciclo de feedback é a geração eficiente e localizada de uPA e plasmina ativos na superfície da célula. A ativação de Plg por uPA é regulada por dois inibidores fisiológicos, inibidores do ativador Plg-1 e 2 (PAI-1 e PAI-2) (CUBELLIS et al., 1989; ELLIS et al., 1990; BAKER et al., 1990), e possivelmente outras serpinas, como maspin (BILIRAN, SHENG et al., 2001). A Plasmina produzida pela ativação do sistema Plg na superfície celular Plg é relativamente protegido de seu inibidor primário α_2 -antiplasmina (PLOW et al., 1986; HALL et al., 1991; ELLIS et al., 1991). Ao contrário do uPA, a plasmina é uma protease relativamente inespecífica, capaz de degradar a fibrina e várias outras glicoproteínas e proteoglicanos da matriz extracelular (LIOTTA et al., 1981). Portanto, ativação da Plg na superfície celular facilita a invasão e metástase de células tumorais por dissolução de barreiras de tecido de restrição. Além disso, a ativação de Plg na superfície celular pode facilitar a degradação da matriz através da ativação de MMPs latentes (WERB et al., 1977). A plasmina também pode ativar fatores de crescimento, tais como fator de crescimento transformador- β , que modula interações estromais na expressão de enzimas e neoangiogese tumoral (MIGNATTI, RIFKIN, 1996).

Para explorar a expressão preferencial de uPA na superfície celular nos tumores, um conjunto de proteínas PrAg da toxina modificada do antraz foi construído no qual o sítio de ativação da furina foi substituído por sequências de reconhecimento uPA (LIU et al., 2001). O ativador Plg tecidual (tPA), outro ativador de Plg fisiológico, possui um alto grau

de similaridade estrutural e compartilha o mesmo substrato fisiológico (Plg) e inibidores (PAI-1 e PAI-2) como uPA. Ao contrário da uPA, que normalmente funciona em células tumorais, o tPA é expresso e secretado por células endoteliais e está principalmente envolvido na dissolução do coágulo. Portanto, o objetivo no design de proteínas PrAg dependentes de uPA é evitar a ativação cruzada por tPA, a fim de minimizar a toxicidade potencial para os vasos sanguíneos. A bem sucedida discriminação entre o uPA e o tPA foi possível graças ao trabalho de Madison e colaboradores (KE et al., 1997a; KE et al., 1997b) que usaram métodos de exibição de fagos para identificar sequências de peptídeos que são clivados com alta eficiência e alta seletividade por uPA ou tPA. As sequências otimizadas de substrato uPA, GSGRSA e GSGKSA, foram utilizadas para substituir o local de furina RKKR no PrAg, e produziram proteínas PrAg mutadas, PrAg-U2 e PrAg-U3, que são eficientemente e preferencialmente ativadas pela uPA (LIU et al., 2001). Em contrapartida, quando o sítio da furina foi substituído pela sequência preferida de reconhecimento de tPA, QRGRSA, o PrAg-U4 resultante foi preferencialmente ativado pelo tPA. Além disso, quando combinado com FP59, PrAg-U2 e PrAg-U3 mataram seletivamente células tumorais que expressam uma grande quantidade de receptores para uPA, enquanto mostrou baixa toxicidade em células que expressavam tPA, tais como células endoteliais vasculares humanas. Em contraste, o PrAg-U4 mostrou menor citotoxicidade dependente do uPA, mas matou eficientemente células que expressavam tPA.

A atividade antitumoral e a toxicidade do PrAg-U2 foram avaliadas *in vivo* (LIU, AARONSON, MITOLA et al., 2003). Quando o PrAg nativo foi administrado com o FP59, foi extremamente tóxico para os ratos, resultando em danos rápidos e fatais aos seus órgãos. Substituindo a sequência de ativação de furina com a sequência artificial uPA, houve grande diminuição da toxicidade do PrAg-U2 nos ratos. PrAg-U2 foi ativado por uPA na superfície celular nos ratos e exibiu potente citotoxicidade nas células tumorais e em um espectro de tumores transplantados de diversas origens, podendo erradicar alguns tipos de tumores sólidos estabelecidos.

A criação da toxina *Bacillus anthracis* ativada por uPA também fornece uma ferramenta molecular para testar paradigmas estabelecidos sobre a ativação de Plg na superfície celular mediada por uPA *in vivo*. O papel crucial de uPAR na superfície celular, mediada por uPA e ativação de Plg, é bem definido bioquimicamente (DANO et al., 1999),

mas a função de uPAR *in vivo* foi recentemente discutida devido ao fenótipo mais leve de camundongos uPAR^{-/-} comparados com camundongos uPA^{-/-} (BUGGE et al, 1995; BUGGE et al, 1996; CARMELIET et al, 1998) e pelo relato de que certas células cultivadas potencializam a mediação de uPA com ativação de Plg na ausência de uPAR (LONGSTAFF et al, 1999). Para determinar o papel de uPA na superfície celular na ativação do PrAg-U2, uma série de linhagens de camundongos com deficiências completas em uPA, uPAR, Plg e PAI-1 foram testadas com PrAg-U2 + FP59 (LIU, AARONSON, MITOLA et al., 2003). Uma toxicidade residual foi observada nos ratos selvagens com doses mais elevadas de PrAg-U2 ($\geq 40 \mu\text{g}$) + FP59 ($10 \mu\text{g}$), e todos os camundongos selvagens testados com $200 \mu\text{g}$ de PrAg-U2 + FP59 tornaram-se doentes terminais, com citotoxicidade observada em áreas com células T no baço, nos linfonodos, medula óssea, córtex suprarrenal e osteoblastos, identificando regiões como locais com atividade de uPA na superfície celular uPA *in vivo*. Portanto, PrAg-U2 é o primeiro agente descrito que pode detectar atividade da uroquinase na superfície celular *in vivo*. Esses dados estabelecem que uPAR e Plg são cofatores essenciais na atividade de uPA *in vivo*, tanto no contexto de ativação fisiológica de Plg, quanto na superfície da célula tumoral.

2.6 Mecanismo de Ação da Toxina Reengenheirada do *Bacillus anthracis*

As três partes da toxina são individualmente atóxicas para as células, exceto quando o complexo de PA, EF e LF são associados (LEPPLA SH, 2000, EZZELL et al., 1984; LIU & LEPPLA, 2003; LIU, LEUNG & LEPPLA, 2007; SCHAFER et al., 2011; LIU et al., 2013).

A ação citotóxica da toxina selvagem do *Bacillus anthracis* tem o seguinte mecanismo de ação. O PA liga-se aos receptores da superfície da célula endotelial, chamados marcador tumoral 8 (TEM8 ou ANT XR1) ou gene para morfogênese capilar 2 (CMG2 ou ANT XR2), onde é clivada por uma protease do grupo das furinas na membrana celular, transformando-se em PA63 ativa. Essa interação resulta na formação de um complexo ativo heptamérico (PA63), que é um canal para translocar EF e LF para o citosol. A citotoxicidade da toxina ocorre pela ação de EF, uma adenilato ciclase, que aumenta os níveis de adenosina

3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) ou pela ação de LF, uma metaloprotease de zinco, que cliva e inativa o MEK (*mitogen activated protein kinase*), bloqueando assim a via ERK (*extracellular regulated kinase*) e a via MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (LEPPLA, 1982; DUESBERY et al., 1998; SCHAFER et al., 2011) (Figura 7).

Figura 7 - Mecanismo de ativação da toxina do *Bacillus anthracis* natural em células normais

O antígeno protetor da toxina do *Bacillus anthracis* (PA) é clivado pela furina (1) para habilitar a ligação com um dos dois conhecidos receptores de superfície celular (2), *tumor endothelial marker 8* (TEM8 ou ANTXR1) ou *capillary morphogenesis gene 2* (CMG2 ou ANTXR2). Um complexo ativo heptamérico de PA se forma (PA₆₃) e o fator letal (LF) e o fator de edema (EF) se ligam a esse complexo (3). Quando PA forma um octâmero, até quatro moléculas efetoras podem se ligar na interseção das moléculas de PA e internalizar por endocitose mediada pelo receptor (4). A acidificação no endossomo resulta na formação de um poro pelo PA (5). LF e EF desdobram-se parcialmente e o *N-terminal* desdobrado é puxado através do poro por um mecanismo de catraca. LF e EF desdobrados se reorganizam no citosol (6) e exibem suas funções enzimáticas. EF cataliza a formação de AMPc citosólico (7) e LF cliva várias MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), assim como Nlrp1 (8). (Fonte: BACHRAN, LEPPLA, 2016)

Como citado anteriormente, as uPAs e as MMPs são proteases com significativa expressão em vários tipos tumorais, em metástases agressivas e raramente estão presentes

em células normais (HOEKSTRA et al., 2001). A toxina do *Bacillus anthracis* foi reengenheirada para ser ativada somente pela uPA ou MMPs, atuando seletivamente em diferentes tipos de tumores. LIU et al. (2000) construíram versões mutadas de PA, em que o sítio de clivagem com protease do grupo das furinas, presente na membrana celular, foi substituído por uma sequência de aminoácidos que seria clivada, somente pelas MMPs, recebendo o nome de PAL1 (LIU et al., 2000) e outra área que seria clivada somente pela uPA, chamada PAU2 (LIU, BUGGE, LEPPLA, 2001) (Figura 8).

Para aumentar ainda mais a especificidade ao tumor, a toxina do *Bacillus anthracis* foi novamente reconstruída para ser dependente de ativação de ambas proteases, uPA e MMPs. Essa toxina, então, é constituída por três componentes: PAU2-R200A, ativada pela uPA, PAL1-I210A ativada por MMP e uma porção de LF enzimática ou FP59 (FP) construída a partir da exotoxina A da *Pseudomonas aeruginosa* fusionada com a LF, que passou a ser utilizada nos ensaios de toxicidade por ser 50 vezes mais potente que LF (LIU et al., 2005; ARORA & LEPPLA, 1993). De todas as combinações, a PAU2-R200A e PAL1-I210A administradas em combinação com LF enzimática pareceu ter o melhor índice terapêutico para os estudos *in vivo* (SCHAFER et al., 2011).

Figura 8 - Mecanismo de ação da toxina do *Bacillus anthracis* reengenheirada em células tumorais

O antígeno protetor (PA) pode ser mutado para conter sítios de restrição para proteases tumor-seletivas, como as metaloproteinases (MMP) e uroquinase ativador de plasminogênio (uPA). No ambiente tumoral, as MMPs ou uPA clivam a PA mutada e ativam a ligação entre o fragmento de PA 63-kDa com o receptor alvo (ANTXR1 ou ANTXR2) e os oligômeros são montados. O fator letal (LF) da toxina do *Bacillus anthracis* ou a fusão de proteínas contendo o domínio LF N-terminal se ligam ao oligômero de PA. O complexo é endocitado e o pH baixo no endossomo resulta na formação de um poro através do oligômero de PA. LF ou domínio LF N-terminal desdobram-se e translocam-se para o citosol da célula cancerosa. LF cliva MAPK quinases e ocorre uma sinalização celular. As proteínas da toxina que entraram na célula cancerosa interferem na síntese de proteínas, induzem dano no DNA e ocorre apoptose. (Fonte: BACHRAN & LEPLA, 2016)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* (PA-U2-R200A + PA-L1-I210A + LF) ativada pela uPA e MMPs em linhagem de osteossarcoma canino.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a expressão de uPA e MMPs em casos de osteossarcomas caninos pela técnica de imuno-histoquímica em Microarranjos Teciduais (*Tissue Microarray* ou TMA).
2. Caracterizar a linhagem de osteossarcomas canino (D17) e a linhagem de osteossarcoma humano (MG63) por meio de análises citogenéticas.
3. Estabelecer e caracterizar a linhagem de osteoblastos caninos não neoplásicos (COBS) por meio de análises citogenéticas e imunomarcações.
4. Avaliar a expressão de uPA, MMP2, MMP9, MT1-MMP, β -catenina, c-Myc, K-RAS, Bcl-2 e MAPK por meio de ensaios de imunofluorescência nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e osteossarcoma humano (MG63).
5. Avaliar os efeitos da toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* nas linhagens de osteossarcomas canino (D17) e humano (MG63), comparando com a linhagem de osteoblastos não neoplásicos de cão (COBS).
6. Avaliar o ciclo celular após o tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* nas linhagens de osteossarcomas canino (D17) e humano (MG63) e na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS).
7. Avaliar as taxas de apoptose e de necrose após o tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* na linhagem de osteossarcoma humano (MG63) pela técnica de citometria de fluxo com marcação de Anexina V e Iodeto de propídio.

8. Avaliar a taxa de migração celular após o tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* nas linhagens de osteossarcomas canino (D17) e humano (MG63) pelo método de *Wound healing*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto, número: 5645170918, foi analisado e aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-FMVZ).

4.1 Ensaio de Imuno-Histoquímica em *Tissue Microarray* (TMA)

A técnica de *Tissue microarray* (TMA) fornece os meios para análise de alto rendimento de múltiplos tecidos e células. São apresentados sob a forma de pequenos núcleos de 1 mm na montagem, recuperados de tecidos representativos selecionados microscopicamente, em um único bloco TMA receptor. O número e tamanho de núcleos num bloco de TMA pode variar de aproximadamente quarenta núcleos de 2 mm para centenas de núcleos de 0,6 mm. A vantagem do uso da tecnologia TMA é que grande quantidade de dados pode ser rapidamente obtida usando uma única reação de imuno-histoquímica, para evitar variabilidade experimental. Além disso, apenas uma quantidade limitada de tecido é necessária, o que permite a análise de um grande número de pacientes.

Vinte e uma amostras parafinadas de osteossarcoma canino, fornecidas pelo Pós-doutorando Daniel Soares Sanches do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada da FMVZ-USP, foram submetidas à análise histopatológica para a confecção do TMA. O patologista e pós-doutorando Daniel Soares Sanches, analisou os blocos de parafina e selecionou três áreas por bloco como sendo osteossarcoma. Esses blocos com as áreas marcadas, foram enviados ao Laboratório de Investigação em Patologia Hepática (LIM 14) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e a técnica Aline Kawassaki Assato, retirou essas áreas cilíndricas com o auxílio de uma agulha com espessura entre 1,0 e 1,5 mm e, em seguida, organizou esses cilindros em um novo bloco incluído em parafina. Com o bloco de TMA pronto, lâminas em branco foram cortadas para a realização da imuno-histoquímica com os seguintes anticorpos: metaloproteinase-2 (MMP-2), metaloproteinase de membrana tipo 1 (MT1-MMP), inibidor de metaloproteinase-2 (TIMP-2), uroquinase ativador de plasminogênio (uPA) e receptor para uroquinase (uPAR). (Quadro 1) (LIU et al., 2000; HOFMMAN et al., 2000; RAMOS-VARA et al., 2000; ARESU et al., 2011). Algumas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para analisar a estrutura dos osteossarcomas.

As lâminas com as amostras de osteossarcoma para as reações de imuno-histoquímica foram desparafinizadas e hidratadas, em xilol e graduações decrescentes de etanol. Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica em banho-maria em uma solução tampão citrato (pH 6,0), por 12 minutos em panela de pressão. Após o resfriamento das lâminas, essas foram lavadas com solução tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M e pH 7,4, por 5 minutos com três repetições. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena, por sua vez, foi realizado utilizando incubação em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, por 20 minutos. Para o bloqueio de ligações inespecíficas as lâminas foram incubadas com leite *Skim Milk* a 5% e incubadas por 40 minutos a temperatura ambiente. Foi retirado o excesso desse reagente e incubado com anticorpo primário. Os anticorpos foram diluídos na titulação desejada com diluente de anticorpo TNB e deixados no gelo até o momento do uso. As lâminas foram incubadas em câmara úmida com seus respectivos anticorpos *overnight* 4°C. No dia seguinte o excesso do anticorpo primário foi removido e as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS com 0,05% de *tween* 20 (pH 7,2) sob agitação por 5 minutos. Realizamos a incubação com anticorpo secundário anti-mouse ou anti-rabbit por 1 hora a temperatura ambiente. Após essa incubação, foi retirado o excesso do reagente e as lâminas foram lavadas com o tampão de lavagem. O complexo antígeno anticorpo foi revelado empregando-se o cromógeno à base de diaminobenzidina (*DAB Chromogen* - Spring - Cód. DABC-004). Uma gota de DAB foi utilizada para 1 ml do diluente (Spring - DAB Substrate Cód. DABS-125). Foram aplicados nos cortes uma gota do DAB diluído e foram incubados por 1 minuto em temperatura ambiente. Após incubação, o excesso do cromógeno foi retirado com papel filtro e as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, seguido de 3 banhos rápidos de água destilada. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de *Harris*, e as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, em 3 banhos rápidos de água destilada. As lâminas foram passadas rapidamente em 2 banhos de água amoniacal 0,5%, para conferir tom azulado à coloração. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e em 3 banhos rápidos de água destilada. Após as reações, as lâminas foram lavadas, desidratadas em bateria de etanol (70%, 80%, 95% e absoluto) e montadas em *Entellan* (SEM, Hatfield, PA, EUA). Como controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por tampão PBS.

Após o ensaio de imuno-histoquímica nas lâminas de osteossarcoma em TMA,

classificamos as marcações dos anticorpos como positivas ou negativas e apresentamos os dados em porcentagem.

Quadro 1 - Padronização da técnica de imuno-histoquímica em *Tissue Microarray* (TMA) para os anticorpos MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP-2, uPA e uPAR

ANTICORPO	EMPRESA	CÓDIGO	ORIGEM	MONOCLONAL POLICLONAL	DILUIÇÃO	TEMPERATURA
MMP2	Abcam	Ab86607	Camundongo	Monoclonal	1-5 µg/ml	- 20°C
MMP9	Abcam	Ab76003	Coelho	Monoclonal	1:50-100	- 20°C
MT1-MMP	Abcam	Ab53712	Coelho	Policlonal	1:50-100	- 20°C
TIMP-2	Abcam	Ab1828	Camundongo	Monoclonal	1:25-50	- 20°C
uPA	Santa Cruz	Sc14019	Coelho	Policlonal	1:50-500	4°C
uPAR	Dako	M7294	Camundongo	Monoclonal	1:25-50	2-8°C

(Fonte: FONSECA, 2019)

4.2 Linhagens de Osteossarcomas Canino (D17) e humano (MG63) e Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS)

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo com o número 5645170918.

Foram utilizadas duas diferentes linhagens de osteossarcoma em nossos experimentos: uma linhagem comercial de osteossarcoma canino, a D17, e uma linhagem comercial de osteossarcoma humano, a MG63. Como linhagem controle, estabelecemos em cultura, uma linhagem osteoblástica canina não neoplásica que chamamos de COBS (Canine Osteoblasts Spitz).

A linhagem de osteossarcoma canino D17 foi adquirida comercialmente da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, USA) (ATCC® CCL-183™).

Essa linhagem é oriunda de um cão fêmea, raça *poodle*, com 11 anos de idade e na passagem 227. As células são aderentes e com morfologia epitelial.

A linhagem de osteossarcoma humano MG63 foi adquirida comercialmente da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, USA) (cód: ATCC® CRL-1427™). Essa linhagem é oriunda de um homem com 14 anos de idade. As células são aderentes e com morfologia fibroblástica.

Como controle, estabelecemos uma linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) oriunda de um raspado de calo ósseo de uma fratura na tíbia de um cão fêmea, raça Spitz-alemão-anão, conhecido como Lulu da Pomerânia, com idade de 10 meses. Chamamos essa linhagem de COBS.

As duas linhagens de osteossarcoma tiveram a mesma metodologia para cultivo e tratamentos com a toxina do *Bacillus anthracis* reengenheirada. As linhagens de osteossarcoma foram cultivadas em meio de controle constituído por DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100-100µg/ml penicilina-estreptomicina (*Gibco*), em estufa a 5% de CO₂ e atmosfera umidificada a 37°C. Já a linhagem COBS foi isolada e cultivada em um meio completo específico para crescimento de osteoblasto canino (*Canine osteoblast growth medium*, cód: CN417500, Sigma)

4.3 Congelamento e Descongelamento das Linhagens Celulares

Para o congelamento das linhagens, inicialmente elas foram lavadas com PBS, e então tripsinizadas por 10 minutos em estufa de CO₂, a 37°C. Depois de verificado o destacamento celular ao microscópio, as células foram coletadas e, em seguida, adicionou-se meio de cultura DMEM com 10% de FBS para a inativação da tripsina. A suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos a 1200rpm. Terminada a centrifugação, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM. Uma alíquota foi coletada e contada automaticamente no contador automático de células (Countess™- Life Technologies), e a concentração ajustada para 10⁶ células/ml com a mistura de congelamento (10% DMSO + 90% Suspensão de células em FBS). A suspensão, já com DMSO, foi

aliquotada em criotubos (Corning®) devidamente identificados, e esses, foram acondicionados em reservatório próprio para congelamento (Mr Frosty, Nalgene) e então colocados em *freezer* a -80°C. Depois de congelados os criotubos foram retirados rapidamente do *freezer* e colocados em tambor contendo nitrogênio líquido até o momento de sua utilização.

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

4.4 Caracterização Citogenética das Linhagens D17, MG63 e COBS

4.4.1 Obtenção dos Cromossomos em Metáfase

Decorridas 24 horas de incubação em estufa à 37°C, foi efetuada a etapa de colchicinização. Para tanto, foram adicionados 100 µl de colchicina [0,16 µg/mL] para cada 5 mL de volume final de cultura, e incubado em estufa à 37°C por 1 hora.

Após a colchicinização o conteúdo da garrafa de cultura foi transferido para um tubo *falcon* de 15 ml, lavamos a garrafa contendo as células com 4 ml de PBS 1x e foi realizada a tripsinização para recolher as células, que então foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a 37°C. Cuidadosamente, o sobrenadante foi desprezado com auxílio de uma pipeta Pasteur e o *pellet* foi ressuspendido com o ajuste do volume do frasco para 5 mL com solução hipotônica (KCl 0,075M) a uma temperatura de 37°C, esta solução foi adicionada com o auxílio de uma pipeta Pasteur. O tubo foi incubado em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. Após esse período, o tubo foi retirado do banho-maria, colocado em temperatura ambiente ao qual foi adicionado 8 gotas de fixador gelado (75% de metanol e 25% de ácido acético) e homogeneizado, permanecendo assim por mais 10 minutos à 37°C.

Decorrido o período de hipotonização, o material foi submetido à centrifugação de 1500 rpm durante 5 minutos, e para a fixação do material o sobrenadante foi descartado e o

volume do frasco foi ajustado para 5 mL com fixador gelado. O conteúdo foi homogeneizado e submetido novamente a centrifugação de 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado com o auxílio da pipeta Pasteur e o *pellet* foi ressuspendido com o fixador gelado, ajustando o volume para 5 mL. Esse procedimento foi realizado mais 2 vezes para retirar restos celulares da preparação. Por fim o pellet de células foi ressuspendido em 1 ml de fixador gelado e armazenado em freezer -20°C até o momento de fazer a lâmina para ver as metáfases e realizar as colorações e análise.

4.4.2 Preparo das Lâminas para a Coloração com Giemsa

Depois de realizadas todas as etapas do processamento do material, resultando na obtenção de um *pellet* de preparação citogenética, a diluição do material foi ajustada com o fixador de forma que o material não ficasse saturado. A lâmina utilizada foi limpa com álcool absoluto e gaze. A lâmina limpa foi mergulhada em água destilada e, em seguida, foi segurada de uma forma com que a gota com o material de citogenética escorresse pela lâmina depois de pingado com um auxílio de uma pipeta Pasteur. Após a secagem do material (24 horas em temperatura ambiente), as lâminas ficaram prontas para serem submetidas às técnicas de coloração.

4.4.3 Coloração das Lâminas de Citogenética com Giemsa

As lâminas foram incubadas por 30 segundos em uma solução de tripsina diluída 1:250 em Tampão Dulbecco's e, em seguida, a reação de digestão foi bloqueada com um rápido mergulho das lâminas em uma solução de Tampão Dulbecco's acrescido de 5% de soro fetal bovino. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa (1:30) por 10 minutos e lavadas com água destilada. Após a secagem, as lâminas foram submetidas à análise.

4.4.4 Análise dos Cromossomos em Metáfase

Os cromossomos em metáfase para a montagem dos cariótipos das linhagens D17 e MG63 foram capturados no microscópio Axionshop 2 plus (Zeiss) e analisados no

programa Icaros 3 (MetaSystem) no Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP).

4.5 Ensaio de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada para detectar inserções, exclusões, duplicações e translocações nos cromossomos. O protocolo utilizado foi baseado na metodologia de WEI et al., 2002. Foram utilizadas duas sondas para o mapeamento físico dos cromossomos 3 e 13 humanos. As sondas das bibliotecas cromossômicas foram isoladas a partir do DNA genômico. A reação foi realizada usando o kit da Roche (Biotin-nick e DIG-nick). Sendo a Biotina marcada com FITC e a Digoxigenina marcada com Rodamina que é vermelha. A reação continha cerca de 1 μ g de DNA genômico, 4 μ l do mix do kit (dNTPs marcados e enzimas DNase e Taq DNA polimerase) e água ultrapura para um volume final de 20 μ l. Reação foi incubada por 90 minutos a 15°C e 10 minutos a 60°C. A marcação foi checada em gel de agarose. E as sondas armazenadas a -20°C até o momento de fazer a precipitação.

Foi necessário realizar a supressão das às sondas, pois o DNA genômico contém sequências repetitivas que irão hibridar inespecificamente nos outros cromossomos se não forem suprimidas. Usamos o *Human Cot-1 DNA* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nessa supressão. Para cada reação de hibridação é necessário 200ng de DNA para FISH de bibliotecas genômicas e o *Human Cot-1 DNA* (concentração final de 10ng/ μ l - aproximadamente 130 μ g). Para precipitar a sonda, usamos 10% de seu volume de acetato de sódio 3,0 molares e 2,5 vezes o volume de etanol PA gelado. Incubamos por 15 minutos a -80°C. Centrifugamos a 13.200 rpm por 15 min em centrífuga refrigerada. Dispensamos o sobrenadante e lavamos o *pellet* com 200 μ l etanol 70% gelado e, em seguida, centrifugamos a 13.200 rpm 5 min. Dispensamos o sobrenadante, secamos o *pellet* em estufa a 37°C. Adicionamos 20 μ l de meio de hibridização, para ressuspender o *pellet*, e em seguida, incubamos por 5 minutos 37°C. A sonda marcada e ressuspensa em meio de hibridização podem ser estocadas a -20°C, sendo muito estáveis.

Com as sondas já em meio de hibridação, preparamos as lâminas para realizarmos a reação de hibridação. Descongelamos as lâminas e marcamos a área a ser hibridada. As lâminas foram colocadas em um banho de 2x SSC (Invitrogen Life Technologies), a 37°C por uma hora e, posteriormente, transferidas para outro banho de 2x SSC a temperatura ambiente. Desidratamos as lâminas em temperatura ambiente em 3 banhos sucessivos de 3 minutos (50% etanol, 75% e 100%), deixamos as lâminas secarem à temperatura ambiente. As lâminas foram tratadas com 100µg/ml de RNase em tampão 2X salino-citrato de sódio (SSC) e 50 µg/ml de pepsina em 0,01 N HCl. O DNA tumoral foi marcado por *nick translation* com Biotin-16-desoxiuridina trifosfato (dUTP), e o DNA de referência obtido da placenta (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foi marcado com digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemanha). O tamanho final dos fragmentos rotulados foi de 600 a 1500 bp.

Quantidades iguais do tumor e amostras de DNA de referência (500 ng) foram misturadas e precipitadas com 20 µg de DNA humano Cot-1 marcado (Invitrogen Life Technologies). As amostras de DNA foram dissolvidas em 5µl de mistura de hibridação (consistindo em 50% de formamida/tampão SSC 2X e 1,25 de 40% de sulfato de dextrano/1,25 de água deionizada) e desnaturadas durante 8 min a 73°C. As lâminas da metáfase foram desnaturadas em 70% de formamida/tampão 2X SSC (pH 7,0) durante 3 min a 70 °C e depois desidratadas em etanol (70, 85 e 100%). A mistura de hibridização foi aplicada às lâminas que foram hibridizadas por 2 a 3 dias a 37 °C em câmara úmida.

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 50% de formamida/tampão 2X SSC a 43°C durante 15 min. Os sinais de hibridação das sondas genômicas do tumor foram detectados por duas camadas de avidina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e amplificadas com uma camada de anticorpo monoclonal de cabra anti-avidina de coelho (1:100; nº cat.VL 201-3215 Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA), enquanto os sinais das sondas de DNA de referência foram visualizados com fragmentos Fab anti-digoxina conjugados com isotiocianato de tetrametil-rodamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os cromossomos foram contrastados com DAPI (Sigma-Aldrich).

4.6 Ensaio de Imunofluorescência nas Linhagens de Osteossarcomas (D17 e MG63) e Linhagem Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS) sem Tratamento com a Toxina

As células foram cultivadas sobre uma lamínula em placas de 6 poços. Após 2 dias de cultivo em meio de cultura *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), este foi removido, e as células lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% por 20 minutos a -20°C. As células foram submetidas a exposição antigênica com tampão EDTA pH 9,0 aquecido a 90°C por 20 minutos. Após a exposição antigênica as lamínulas foram lavadas com PBS 1x acrescido de Triton-X 100. Em seguida, as lamínulas foram incubadas em câmara úmida, *overnight* e a 4°C, com anticorpos apresentados no Quadro 2. No dia seguinte as lâminas foram lavadas com PBS contendo 0,1% Triton X-100 e incubadas com os anticorpos secundários monoclonais ou policlonais marcados com Alexa flúor 488 ou 568 (Dako, Carpinteria, CA, USA, 1:100) durante 60 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS contendo 0,1% Triton X-100 e montadas com Vectashield para evitar o esgotamento da fluorescência (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) e vedadas com esmalte.

Quadro 2 – Dados dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência.

ANTICORPO	EMPRESA	CÓDIGO	ORIGEM	MONOCLONAL POLICLONAL	DILUIÇÃO	TEMPERATURA
β-catenina	Invitrogen	138400	Camundongo	Monoclonal	1:100	- 20°C
Conexina 43	Zimed	35-5000	Camundongo	Monoclonal	1:100	- 20°C
p53	Serotec	MCA 909	Camundongo	Monoclonal	1:101	- 20°C
c-Myc	Abcam	Ab32072	Coelho	Monoclonal	1:100	- 4°C
K-RAS	Abcam	Ab180772	Coelho	Policlonal	1:200	- 4°C
MAPK	Cell Signaling	2532	Coelho	Policlonal	1:100	- 20°C
MMP2	Abcam	Ab86607	Camundongo	Monoclonal	1-5 µg/ml	- 20°C
MMP9	Abcam	Ab76003	Coelho	Monoclonal	1:50-100	- 20°C
MT1-MMP	Sigma	Ab6070	Coelho	Policlonal	1:100	- 4°C
uPA	Santa Cruz	Sc14019	Coelho	Policlonal	1:50-500	- 4°C
Osteopondina	Abcam	Ab8448	Coelho	Policlonal	1:100	- 20°C
Fosfatase alcalina	Abcam	Ab108337	Coelho	Monoclonal	1:100	- 4°C
SPARC	Abcam	Ab135601	Coelho	Policlonal	1:100	- 20°C

(Fonte: FONSECA, 2019)

4.7 Ensaio de Citotoxicidade *In vitro*

A toxina do *Bacillus anthracis* utilizada nesse projeto foi produzida e modificada pelo Dr. Shihui Liu do Laboratório de Doenças Parasitárias (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA*) e está sendo mantida em *freezer* à temperatura de -80°C . Para a utilização da toxina no ensaio de citotoxicidade, foram utilizadas quatro tipos de associações (Quadro 3).

Quadro 3 - Concentração final das associações da toxina reengenheirada utilizadas *in vitro* no ensaio de citotoxicidade

ASSOCIAÇÕES DA TOXINA UTILIZADAS	
LF (500 ng/ml)	PA (0-5000* ng/ml)
	PAU2R200A + PAL1I210 (0-5000* ng/ml)
FP (100 ng/ml)	PA (0-5000* ng/ml)
	PAU2R200A + PAL1I210 (0-5000* ng/ml)

* em diluição seriada de 0, 5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml (Fonte: FONSECA, 2019)

As linhagens foram cultivadas em meio de controle constituído por DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100-100µg/ml penicilina-estreptomicina (*Gibco*) em estufa a 5% de CO_2 e atmosfera umidificada a 37°C . As células foram plaqueadas com 150µl de suspensão de $0,7 \times 10^4$ células/ml em DMEM, com confluência de 70%, 24 horas antes de serem incubadas com a toxina reengenheirada.

Após 24 horas de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o ensaio MTT baseado na metabolização dos sais de tetrazolium (3-) 4,5- dymethylthiazol-2-(yl)-2,5-(diphenyl tetrazolium bromide) pelas mitocôndrias de células metabolicamente ativas. As células foram tratadas com concentrações variando de 1ng a 1mg. Após o tempo de incubação com os tratamentos, foi adicionado 10 µl/poço de MTT (5mg/ml) para 100 µl de meio. A placa foi incubada em estufa com atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 a 37°C , por 3 horas. Em seguida, as placas contendo as células tratadas foram centrifugadas

foi adicionado 100 µl de solução de HCl em isopropanol (HCl 0,04N em isopropanol) em cada poço, pipetando-se lentamente os poços para a dissolução dos cristais formados. Após 10 minutos, as linhagens foram submetidas à leitura de densidade óptica em espectrofotômetro (*Multi Skan Therm Scientific*), com comprimento de onda de 570nm (VEGA-AVILA & PUGSLEY, 2011; SCHAFER et al., 2011; LIU et al., 2003). (Figura 9).

Figura 9 - Modelo de placa de cultivo de 96 poços para o tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* reengenheirada

PA PAL1/PAU2 ng/ml		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5000	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2
B	1571	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2
C	494	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2
D	155	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2
E	49	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2
F	15	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2
G	5	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PA	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2	LF + PAL1/PAU2
H	0	LF	LF	LF	LF	LF	LF	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM

LF em concentração fixa de 500ng/ml associada à PA (colunas de 1-6) e PAL1/PAU2 (colunas de 7-12). O mesmo esquema foi utilizado para a placa FP 100ng/ml. (Fonte: FONSECA, 2019)

4.8 Análise do Ciclo Celular nas Linhagens de Osteossarcoma Canino (D17) e Humano (MG63) e na Linhagem Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS)

A distribuição das células pelas fases do ciclo celular foi estudada pela técnica da impregnação nuclear do Iodeto de propídio (IP). O IP é conhecido por intercalar-se entre as fitas de DNA, em células que foram previamente permeabilizadas pela fixação em etanol 70%. Para isso, 10^6 células de cada linhagem foram previamente permeabilizadas pela fixação em etanol PA (Merck) por até 3 dias (-20°C). Então, as células foram lavadas três vezes com PBS (5 minutos, 1200 RPM) e incubadas com 200 μL de solução contendo 20 $\mu\text{g/ml}$ de IP, 200 $\mu\text{g/ml}$ RNase A e 0,1% de triton 100x em PBS. Após 15 minutos de incubação no escuro, 10000 eventos foram adquiridos por citometria de fluxo no aparelho FACSCalibur (Becton & Dickinson) por meio do programa *CellQuestPro*. A análise dos dados de fluorescência e das porcentagens de células em cada fase do ciclo celular foi realizada por meio do programa *Flowjo (Tree Star)* versão 10 e *Flowjo* versão 7.6.1 (*Tree Star Inc*, Asland, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de células nas fases G1, G0/G1, S ou G2/M. Os dados foram representados em histogramas.

4.9 Determinação da Taxa de Apoptose e Necrose Com o Uso da Técnica de Citometria de Fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídio

Foi utilizado kit comercial contendo *Alexa® Fluor 488 annexin V* (Molecular Probes, EUA) e Iodeto de Propídio (PI) para a marcação das células. O kit consiste dos componentes: A- Alexa Fluor® 488 annexin em solução 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.4, 0.1% albumina de soro bovino, B – Iodeto de propídio (PI) a 1 mg/mL (1,5 mM) em água deionizada, e C – 5X tampão de ligação da anexina contendo 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12,5 mM CaCl₂. O componente C é diluído em água deionizada na proporção de 1:4 para obtenção do tampão. O componente B é diluído no tampão na proporção de 1:9, obtendo PI a 100 $\mu\text{g/ml}$. A solução para marcação das células foi preparada sendo adicionado 2 μl do componente A e 1 μl de PI para cada 100 μl de tampão.

As linhagens de osteossarcoma foram cultivadas em placas de 30 mm (2×10^5 células), contendo 2 ml de DMEM+SFB10%+PS durante 24 horas. Após receber os diferentes regimes de tratamento e períodos de incubação, o meio de cultura foi removido, as células foram tripsinizadas e recolhidas em tubo para citometria, sendo ressuspensas em 100 μ l da solução anexina/PI, incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, sendo a aquisição dos dados feita no citometro FACSCalibur® (Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, CA, EUA) medindo-se a emissão de fluorescência em 530 nm e 575 nm com excitação de 488 nm, sendo observado ao menos dez mil eventos e utilizando-se o programa FlowJo® para análise dos dados obtidos.

A determinação da taxa de apoptose foi realizada utilizando o ensaio de citometria de fluxo com Anexina V, onde a fosfatidilserina se liga nas células em apoptose determinando sua marcação e o iodeto de propídio se liga nas células em necrose.

4.10 Determinação da Taxa de Migração das Linhagens de Osteossarcoma (D17 e MG63) após o Tratamento com a Toxina

As linhagens de osteossarcoma foram cultivadas e tratadas com a toxina segundo os mesmos protocolos anteriores. Utilizamos placas de 12 poços para cultivar as linhagens. Depois de atingida a confluência de 100%, em ambiente estéril, fizemos uma fissura de continuidade na monocamada com uma ponteira de 200 μ l. Em seguida, o meio de cultura e os detritos celulares foram aspirados. Um novo meio de cultura foi adicionado lentamente. Nesse momento, foi tirada a primeira foto para ter o parâmetro inicial (tempo zero). A placa foi colocada em uma estufa com temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas foi tirada outra foto em microscópio invertido para verificar a evolução do fechamento da fissura de continuidade na monocamada. Para determinar a taxa de migração, fotografamos três campos e medimos a área total da fissura de continuidade na monocamada em relação ao tamanho do campo no início (0h) e comparamos a área da fissura de continuidade na monocamada em relação à área do campo 24 horas depois. Fizemos a média entre os três campos. Os resultados foram apresentados em porcentagem.

4.11 Análise Estatística

Para a confecção dos gráficos e análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 8. O teste estatístico utilizado foi a Análise de variância de uma via (One way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Dunnett. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de Imuno-Histoquímica em TMA (*Tissue Microarray*)

As figuras 10 e 11 ilustram o ensaio de imuno-histoquímica em TMA realizado nos 21 casos de osteossarcoma canino. Observamos a expressão do anticorpo MMP2 em 10 dos 21 casos de osteossarcoma analisados no ensaio de imuno-histoquímica em TMA, ou seja, 47,61% dos casos analisados. Observamos, também, a expressão do anticorpo uPAR em 13 dos 21 casos de osteossarcomas analisados no ensaio de imuno-histoquímica em TMA, ou seja, 61,90% dos casos analisados.

Figura 10 - Ensaio de imuno-histoquímica em TMA (*Tissue Microarray*) em osteossarcomas caninos

Aumento de 4x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 11 - Ensaio de imuno-histoquímica em TMA (*Tissue microarray*) em osteossarcomas caninos e seus respectivos controles

Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

5.2 Caracterização das Linhagens de Osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) e Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS)

Foram utilizadas duas diferentes linhagens de osteossarcoma em nossos experimentos: uma linhagem comercial de osteossarcoma canino, a D17, e uma linhagem comercial de osteossarcoma humano, a MG63. Como linhagem controle, estabelecemos uma linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS).

A linhagem de osteossarcoma canino D17 foi adquirida comercialmente da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, USA) (ATCC® CCL-183™). Essa linhagem é oriunda de um cão fêmea, raça *poodle*, com 11 anos de idade e na passagem 227. As células são aderentes e com morfologia epitelial (Figura 12).

Figura 12 - Linhagem de osteossarcoma canino (D17)

Imagem representativa da linhagem de osteossarcoma canino (D17). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

A linhagem de osteossarcoma humano MG63 foi adquirida comercialmente da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, USA) (cód: ATCC® CRL-1427™). Essa linhagem é oriunda de um homem com 14 anos de idade. As células são aderentes e com morfologia fibroblástica (Figura 13).

Figura 13 - Linhagem de osteossarcoma humano (MG63)

Imagem representativa da linhagem de osteossarcoma humano (MG63). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Como controle, estabelecemos uma linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) oriunda de um raspado de calo ósseo de uma fratura na tíbia de um cão fêmea, raça Spitz-alemão-anão, conhecido como Lulu da Pomerânia, com idade de 10 meses (Figura 14).

Figura 14 - Linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS)

A: Imagem representativa de um fragmento de osso que deu origem à linhagem osteoblástica canina não neoplásica COBS. **B:** Imagem representativa da linhagem COBS após tripsinização. **C e D:** Imagens representativas da linhagem COBS sem tripsinização. Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Foram realizadas análises para verificação do número de cromossomos e rearranjos que cada linhagem apresenta por coloração de Banda G. Realizamos, também, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH - *fluorescence in situ hybridization*) com sondas dos cromossomos 3 e 13 humanos para a confirmação da caracterização das linhagens de osteossarcomas utilizadas no estudo.

Nós observamos que a linhagem de osteossarcoma canino D17 é oriunda de uma fêmea e possui células diploides que apresentam 64 cromossomos, com múltiplos rearranjos e cromossomos marcadores derivados dos rearranjos, que foram apontados pelas flechas indicadas na figura 15.

Confirmamos que a linhagem D17 é canina com a realização do experimento de hibridização fluorescente *in situ* (FISH - *fluorescence in situ hybridization*) com sondas dos cromossomos 3 e 13 humanos e observamos que não houve marcações nessa linhagem (Figura 16).

Figura 15 – Fotomicrografia representativa dos cromossomos em metáfase da linhagem de osteossarcoma canino D17.

As setas apontam os rearranjos nos cromossomos. Aumento de 100x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 16 - Fotomicrografia representativa da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com as sondas dos cromossomos 3 e 13 humanos na linhagem de osteossarcoma canino D17

Ausência de marcação nos cromossomos 3 e 13 humanos. Aumento de 100x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Na linhagem de osteossarcoma humano MG63, observamos que é oriunda de um homem e que apresenta células pseudo hipotriploides com 62 cromossomos e múltiplos rearranjos e múltiplos cromossomos marcadores derivados dos rearranjos (Figura 17).

Confirmamos que a linhagem MG63 é humana, quando realizamos o experimento de hibridização fluorescente *in situ* (FISH - *fluorescence in situ hybridization*) com sondas dos cromossomos 3 (verde) e 13 (vermelho) humanos e observamos que houve marcações positivas para os dois cromossomos nessa linhagem (Figura 18).

Figura 17 – Fotomicrografia representativa dos cromossomos em metáfase da linhagem de osteossarcoma humano MG63

Aumento de 100x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 18 - Fotomicrografia representativa da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com as sondas dos cromossomos 3 e 13 humanos na linhagem de osteossarcoma humano MG63

Marcação positiva para o cromossomo 3 em verde e para o cromossomo 13 em vermelho. Aumento de 100x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Não foi possível a montagem dos cariótipos das linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) devido ao grande de rearranjos encontrados entre os cromossomos.

Observamos que a linhagem osteoblástica canina não neoplásica COBS, que foi estabelecida em nosso laboratório, oriunda de uma fêmea, possui células somáticas com 78 cromossomos ($2n=78$), ou seja, com um padrão numérico normal da espécie *Canis lupus familiaris* (Figura 19 e 20). Sendo assim, foi possível usar essa linhagem como controle de todos os experimentos.

Figura 19 – Fotomicrografia representativa dos cromossomos em metáfase da linhagem osteoblástica canina não neoplásica COBS

Aumento de 100x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 20 – Cariótipo da linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS)

Aumento de 100x. (Fonte: FONSECA, 2019)

5.3 Ensaaios de Imunofluorescência para a Caracterização das Linhagens de Osteossarcoma Canino (D17) e Humano (MG63) e Osteoblástica Canina Normal

Realizamos ensaios de imunofluorescência com diferentes marcadores nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) e osteoblástica canina normal, sem tratamento com a toxina, para verificar o padrão de expressão basal desses marcadores.

Observamos a expressão de β -catenina (Figura 21), MAPK (Figura 22), K-RAS (Figura 23), c-Myc (Figura 24), p53 (Figura 25), conexina 43 (Figura 26), Bcl-2 (Figura 27), MMP2 (Figura 28), MMP9 (Figura 29), uPA (Figura 30) e MT1-MTT (Figura 31) em ambas as linhagens de osteossarcoma.

Figura 21 - Fotomicrografia representativa da expressão de β -catenina nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 22 - Fotomicrografia representativa da expressão de MAPK nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 23 - Fotomicrografia representativa da expressão de K-RAS nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 24 - Fotomicrografia representativa da expressão de C-myc nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 25 - Fotomicrografia representativa da expressão de p53 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 26 - Fotomicrografia representativa da expressão de conexina 43 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 27 - Fotomicrografia representativa da expressão de Bcl-2 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 28 - Fotomicrografia representativa da expressão de MMP2 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 29 - Fotomicrografia representativa da expressão de MMP9 nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 568 (vermelho). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 30 - Fotomicrografia representativa da expressão de uPA nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 31 - Fotomicrografia representativa da expressão de MT1-MMP nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

A linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) foi estabelecida em nosso laboratório e foi isolada de um fragmento de fratura óssea de um cão. Para confirmar que essas células eram ósseas, testamos alguns marcadores ósseos como a osteopondina, fosfatase alcalina óssea e SPARC.

Observamos a expressão de osteopondina, fosfatase alcalina óssea e SPARC na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) (Figura 32). Observamos, também, uma expressão de MMP2 e MT1-MMP nessa linhagem osteoblástica canina não neoplásica (Figura 33) menor que em osteossarcomas.

Figura 32 - Fotomicrografia representativa da expressão de fosfatase alcalina, osteopondina e SPARC na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde) e DAPI (azul). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 33 - Fotomicrografia representativa da expressão de MT1-MMP e MMP2 na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) por imunofluorescência

Alexa flúor 488 (verde) e DAPI (azul). Aumento de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

5.4 Ensaio de Citotoxicidade *In vitro*

Observamos que LF e FP isoladamente não foram citotóxicas em todas as células testadas, tendo a viabilidade celular comparada às mesmas células sem o tratamento, confirmando que a toxina é dependente da outra porção da toxina, a PA nativa para demonstrar citotoxicidade.

Após 24h de tratamento com a toxina, a associação de LF e PA com as concentrações de 49, 155, 494, 1571 e 5000 ng/ml de PA foram significativamente citotóxicas, ou seja, houve uma diminuição das densidades ópticas na leitura pelo teste imunoenzimático, na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS), quando comparadas às mesmas células sem tratamento (0 ng/ml de PA) (Figura 34A).

A associação de LF e PAL1/PAU2 com as concentrações de 494 e 5000 ng/ml de PA foram significativamente citotóxicas, ou seja, houve uma diminuição das densidades ópticas na leitura pelo teste imunoenzimático, na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS), quando comparadas às mesmas células sem tratamento (0 ng/ml de PA) (Figura 34B).

Quando analisamos as associações entre FP e PA na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS), observamos citotoxicidade estatisticamente significante, ou seja, diminuição das densidades ópticas, nas concentrações 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml de PA, em relação às mesmas células sem tratamento (Figura 34C).

Nas associações entre FP e PAL1/PAU2 na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS), observamos significante diminuição das densidades ópticas em todas as concentrações analisadas (5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml de PA) em relação às mesmas células sem tratamento (Figura 34D).

Figura 34 - Gráficos em barras que representam a resposta da linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) frente aos quatro tipos de tratamentos em sete concentrações diferentes da toxina reengenheirada

A: osteoblastos caninos tratados com a associação LF+PA; B: osteoblastos caninos tratados com a associação LF+PAL1/PAU2. C: osteoblastos caninos tratados com a associação FP+PA; D: osteoblastos caninos tratados com a associação FP+PAL1/PAU2. Análise estatística ANOVA de uma via para a linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS). Os tratamentos foram comparados com a mesma célula sem tratamento (somente LF ou FP59). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (Fonte: FONSECA, 2019)

As associações de LF e PA em todas as concentrações (5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml de PA), após 24h de exposição à toxina, foram significativamente citotóxicas, ou seja, houve diminuição nas densidades ópticas nas leituras pelo teste imunoenzimático, na linhagem de osteossarcoma canino D17, quando comparado às mesmas células sem tratamento (Figura 35A).

Já a associação entre LF e PAL1/PAU2, mostrou ser, também, significativamente citotóxica, ou seja, com diminuição da densidade óptica em todas as concentrações (5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml de PA) na linhagem de osteossarcoma canino D17, quando comparado às mesmas células sem tratamento (Figura 35B).

Quando analisamos as associações entre FP e PA e entre FP e PAL1/PAU2 na linhagem D17, observamos citotoxicidade estatisticamente significativa, ou seja, diminuição da densidade óptica, em todas as concentrações analisadas (5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml de PA), quando comparado às mesmas células sem tratamento (Figura 35C e D).

Figura 35 - Gráficos em barras que representam a resposta da linhagem de osteossarcoma canino D17 frente aos quatro tipos de tratamentos em sete concentrações diferentes da toxina reengenheirada

A: osteossarcomas caninos (D17) tratados com a associação LF+PA; **B:** osteossarcomas caninos (D17) tratados com a associação LF+PAL1/PAU2. **C:** osteossarcomas caninos (D17) tratados com a associação FP+PA; **D:** osteossarcomas caninos (D17) tratados com a associação FP+PAL1/PAU2. Análise estatística ANOVA de uma via para a linhagem de osteossarcoma canino (D17). Os tratamentos foram comparados com a mesma célula sem tratamento (somente LF ou FP59). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (Fonte: FONSECA, 2019)

A associação de LF e PA, com as concentrações 5, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml de PA, foram significativamente citotóxicas, ou seja, houve diminuição das densidades ópticas na leitura pelo teste imunoenzimático, na linhagem de osteossarcoma humano MG63, quando comparada às mesmas células sem a toxina (Figura 36A).

Já a associação entre LF e PAL1/PAU2, mostrou ser, também, significativamente citotóxica, ou seja, houve diminuição das densidades ópticas, com as duas maiores concentrações (1571 e 5000ng/ml de PA) da toxina reengenheirada na linhagem de osteossarcoma canino MG63, quando comparada às mesmas células sem a toxina (Figura 36B).

Quando analisamos as associações entre FP e PA e entre FP e PAL1/PAU2 na linhagem de osteossarcoma humano MG63, observamos citotoxicidade estatisticamente significativa, ou seja, diminuição das densidades ópticas, em todas as concentrações analisadas (5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml de PA) às mesmas células sem a toxina (Figura 36C e D).

Figura 36 - Gráficos em barras que representam a resposta da linhagem de osteossarcoma humano MG63 frente aos quatro tipos de tratamentos em sete concentrações diferentes da toxina reengenheirada

A: osteossarcomas humanos (MG63) tratados com a associação LF+PA; **B:** osteossarcomas humanos (MG63) tratados com a associação LF+PAL1/PAU2. **C:** osteossarcomas humanos (MG63) tratados com a associação FP+PA; **D:** osteossarcomas humanos (MG63) tratados com a associação FP+PAL1/PAU2. Análise estatística ANOVA de uma via para a linhagem de osteossarcoma humano (MG63). Os tratamentos foram comparados com a mesma célula sem tratamento (somente LF ou FP59). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (Fonte: FONSECA, 2019)

5.5 Avaliação do Ciclo Celular Após 24 Horas de Tratamento com a Toxina Modificada do *Bacillus anthracis* nas Linhagens de Osteossarcomas Canino (D17) e Humano (MG63) e Linhagem Osteoblástica Canina Não Neoplásica (COBS)

A figura 37 ilustra a estratégia de análise utilizada no experimento do ciclo celular em todas as linhagens.

Na análise do ciclo celular, observamos que a via de morte celular após o tratamento foi a apoptose, tanto na linhagem de osteossarcoma canino D17 (Figura 38), quanto na linhagem de osteossarcoma humano MG63 (Figura 39). Em contrapartida, na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS), mesmo com a sensibilidade das células em relação à toxina na maior concentração, ocorreu uma parada do ciclo celular na fase G1 (Figura 40).

Figura 37 – Estratégia de análise do ciclo celular

A: Dot plot representativo da seleção da população da célula tumoral; **B:** Dot plot de seleção das células; **C:** Histograma que representa as diferentes fases do ciclo celular cujo *software* FlowJo define automaticamente e define a porcentagem de cada fase. A análise foi realizada da mesma forma para todas as amostras. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 38 – Histogramas do ciclo celular da linhagem de osteossarcoma canino D17 após o tratamento com a toxina modificada do *Bacillus anthracis* (LF+PAL1/PAU2)

Histograma do ciclo celular da linhagem de osteossarcoma canina D17 após 24 horas de tratamento com a toxina. **A:** toxina LF; **B:** toxina LF+PAL1/PAU2 50 ng/ml. **C:** toxina LF+PAL1/PAU2 500 ng/ml; **D:** toxina LF+PAL1/PAU2 5000 ng/ml. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 39 – Histogramas do ciclo celular da linhagem de osteossarcoma humano MG63 após o tratamento com a toxina modificada do *Bacillus anthracis* (LF+PAL1/PAU2)

Histograma do ciclo celular da linhagem de osteossarcoma humano MG63 após 24 horas de tratamento com a toxina. **A:** toxina LF; **B:** toxina LF+PAL1/PAU2 50 ng/ml. **C:** toxina LF+PAL1/PAU2 500 ng/ml; **D:** toxina LF+PAL1/PAU2 5000 ng/ml. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 40 – Histogramas do ciclo celular da linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) após o tratamento com a toxina modificada do *Bacillus anthracis* (LF+PAL1/PAU2)

Histograma do ciclo celular da linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) após 24 horas de tratamento com a toxina. **A:** toxina LF; **B:** toxina LF+PAL1/PAU2 50 ng/ml. **C:** toxina LF+PAL1/PAU2 500 ng/ml; **D:** toxina LF+PAL1/PAU2 5000 ng/ml. (Fonte: FONSECA, 2019)

5.6 Taxa de Apoptose e Necrose após 24 Horas de Tratamento com a Toxina Reengenheirada do *Bacillus anthracis* por Citometria de Fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídio na Linhagem de Osteossarcoma Humano MG63

A técnica de citometria de fluxo com marcação de Anexina V e iodeto de propídio foi realizada com o objetivo de avaliar a taxa de apoptose e necrose após 24 horas de tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*. Os resultados mostram que após 24 horas de tratamento com a toxina LF+PA 5000 ng/ml do *Bacillus anthracis*, a taxa de apoptose na linhagem de osteossarcoma MG63 foi maior que a mesma linhagem sem tratamento (6,46% para MG63 tratada com a toxina e 3,06% para MG63 não tratada) e maior, também, quando comparamos a linhagem tratada com a toxina LF+PAL1/PAU2 5000 ng/ml do *Bacillus anthracis* em relação à mesma linhagem não tratada (5,41% para MG63 tratada com a toxina e 3,06% para MG63 não tratada) (Figura 41, 42 e 43). Não observamos diferenças nas taxas de necrose entre os grupos tratado e o não tratado (Figura 41, 42 e 43).

Figura 41 – Dot plot e histogramas nos controles sem tratamento na linhagem de osteossarcoma humana (MG63)

(Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 42 – Dot plot e histogramas do tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* LF+PA na concentração de 5000 ng/ml na linhagem de osteossarcoma humano (MG63)

(Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 43 – Dot plot e histogramas do tratamento com a toxina do *Bacillus anthracis* LF+PAL1/PAU2 na concentração de 5000 ng/ml na linhagem de osteossarcoma humano (MG63)

(Fonte: FONSECA, 2019)

5.7 Ensaio de Migração (*Wound Healing*) nas Linhagens D17 e MG63 após 24 horas de Tratamento com a Toxina Reengenheirada do *Bacillus anthracis*

A técnica de *wound healing* foi realizada com o objetivo de avaliar a capacidade de migração das células após a lesão na monocamada celular com ou sem a toxina do *Bacillus anthracis*.

Os resultados mostram que após 24h de tratamento com apenas a porção LF da toxina, que é atóxica, a linhagem de osteossarcoma canino D17 teve boa capacidade crescer e migrar em direção ao espaço deixado pela fissura de continuidade na monocamada, fechando-o parcialmente, semelhante ao controle sem a toxina (Figura 44 e 45).

Em contrapartida, os resultados mostraram que após 24h de tratamento com a toxina LF+PAL1/PAU2 em todas as concentrações, principalmente na maior concentração (5000 ng/ml de PA), a linhagem de osteossarcoma canino D17 perdeu de forma significativa a capacidade de crescer e migrar em direção ao espaço deixado pela fissura de continuidade na monocamada (Figura 44 e 46).

Figura 44 – Largura relativa da lesão no ensaio de capacidade de migração da linhagem de osteossarcoma canino D17 por meio da técnica de *Wound Healing*, sem a toxina e com a toxina LF+PAL1/PAU2 na concentração de 5000 ng/ml de PA.

Grupos: Controle sem tratamento e tratado com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* LF+PAL1/PAU2 na concentração de 5000 ng/ml de PA em osteossarcomas caninos D17.
 *** $p < 0,001$ em relação ao controle 24h. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 45 – Fotomicrografias em contraste de fase nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) após 0 e 24 horas da lesão do ensaio de *Wound Healing* e tratamento com a porção LF da toxina do *Bacillus anthracis*.

Linhagem de osteossarcoma canino (D17) sem tratamento (Controle 0h e 24h) e com tratamento com a porção LF da toxina do *Bacillus anthracis* (LF 0h e 24h). Aumento em objetiva de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 46 – Fotomicrografias em contraste de fase nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) após 0 e 24 horas da lesão do ensaio de *Wound Healing* e tratamento com a toxina modificada do *Bacillus anthracis* (LF+PAL1/PAU2).

Linhagem de osteossarcoma canino (D17) sem tratamento (Controle 0h e 24h) e com tratamento com a toxina LF+PAL1/PAU2 (LF+PAL1/PAU2 0h e 24h). Aumento em objetiva de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Na linhagem de osteossarcoma humano MG63, os resultados mostram que após 24h de tratamento com apenas a porção LF da toxina, que é atóxica, essa linhagem teve boa capacidade crescer e migrar em direção ao espaço deixado pela fissura de continuidade na monocamada, fechando-o parcialmente, semelhante ao controle sem a toxina do *Bacillus anthracis* (Figura 48).

Em contrapartida, os resultados mostraram que após 24h de tratamento com a toxina LF+PAL1/PAU2 em todas as concentrações, principalmente na maior concentração (5000 ng/ml de PA), a linhagem de osteossarcoma humano MG63 perdeu de forma significativa a capacidade de crescer e migrar em direção ao espaço deixado pela fissura de continuidade na monocamada (Figura 47 e 49).

Figura 47 – Largura relativa da lesão no ensaio de capacidade de migração da linhagem de osteossarcoma humano MG63 por meio da técnica de *Wound Healing*, sem a toxina e com a toxina LF+PAL1/PAU2 na concentração de 5000 ng/ml de PA.

Grupos: Controle sem tratamento e tratado com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* LF+PAL1/PAU2 na concentração de 5000 ng/ml em osteossarcomas humanos MG63. * $p < 0,05$ em relação ao controle 24h. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 48 – Fotomicrografias em contraste de fase nas linhagens de osteossarcoma humano (MG63) após 0 e 24 horas da lesão do ensaio de *Wound Healing* e tratamento com a porção LF da toxina do *Bacillus anthracis*.

Linhagem de osteossarcoma humano (MG63) sem tratamento (Controle 0h e 24h) e com tratamento com a porção LF da toxina do *Bacillus anthracis* (LF 0h e 24h). Aumento em objetiva de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

Figura 49 – Fotomicrografias em contraste de fase nas linhagens de osteossarcoma humano (MG63) após 0 e 24 horas da lesão do ensaio de *Wound Healing* e tratamento com a toxina modificada do *Bacillus anthracis* (LF+PAL1/PAU2).

Linhagem de osteossarcoma humano (MG63) sem tratamento (Controle 0h e 24h) e com tratamento com a toxina LF+PAL1/PAU2 (LF+PAL1/PAU2 0h e 24h). Aumento em objetiva de 40x. (Fonte: FONSECA, 2019)

6 DISCUSSÃO

Novas terapias seletivas para tratamento de diferentes tipos de neoplasias estão sendo testadas e algumas com resultados animadores. Uma dessas possíveis terapias seletivas é a que utiliza a toxina do *Bacillus anthracis* modificada geneticamente para que seja citotóxica apenas em tecidos com grande expressão de matriz de metaloproteinases (MMPs) e ativadores de uroquinases plasminogênio (uPA), que estão associados ao crescimento tumoral e metástase. Dados da literatura mostram uma expressão significativamente maior desses marcadores em tecidos tumorais do que em tecidos normais, que possuem baixa expressão desses marcadores (HOEKSTRA et al., 2001).

A toxina do *Bacillus anthracis* consiste em três polipeptídeos: antígeno protetor (PA, também chamado de PrAg), fator letal (LF) e fator de edema (EF). Esses três, individualmente, não são tóxicos e podem se agrupar na superfície das células de mamíferos. A ação citotóxica da toxina selvagem do *Bacillus anthracis* tem o seguinte mecanismo de ação: o PA liga-se aos receptores da superfície da célula endotelial, chamados marcador tumoral 8 (TEM8 ou ANT XR1) ou gene para morfogênese capilar 2 (CMG2 ou ANT XR2), onde é clivado por uma protease do grupo das furinas na membrana celular, transformando-se em PA63 ativa. Essa interação resulta na formação de um complexo ativo heptamérico (PA63), que é um canal para translocar EF e LF para o citosol. A citotoxicidade da toxina ocorre pela ação de EF, uma adenilato ciclase, que aumenta os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) ou pela ação de LF, uma metaloprotease de zinco, que cliva e inativa o MEK (*mitogen activated protein kinase*), bloqueando assim a via ERK (*extracellular regulated kinase*) e a via MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (LEPPLA, 1982; DUESBERY et al., 1998; SCHAFER et al., 2011).

Antes de testar se essa toxina modificada seria efetiva em linhagens de osteossarcoma canino e humano, primeiramente realizamos um ensaio de *Tissue microarray* (TMA) para verificar presença de expressão de MMP e uPa em blocos de osteossarcoma em parafina.

Nos 21 casos de osteossarcoma canino que analisamos, observamos a expressão de MMP2 em 10 dos 21 casos de osteossarcoma analisados no ensaio de imuno-histoquímica em TMA, ou seja, 47,61% dos casos analisados. Observamos, também, a expressão de uPAR

(receptor de uPA) em 13 dos 21 casos de osteossarcomas analisados no ensaio de imunohistoquímica em TMA, ou seja, 61,90% dos casos analisados. Nossos resultados corroboram com os dados da literatura (HOEKSTRA et al., 2001), que mostram uma expressão significativamente maior desses marcadores em tecidos tumorais do que em tecidos normais, que possuem baixa expressão desses marcadores. Esses dados permitiram afirmar que a ação citotóxica da toxina reengenheirada poderia ocorrer nas linhagens de osteossarcoma analisadas (D17 e MG63), pois ação da toxina é dependente da presença de proteases como as MMPs e uPAs, tornando assim, uma ação seletiva, já que em tecidos normais a expressão desses marcadores é baixa ou ausente.

Para entender melhor os resultados das respostas da toxina nas diferentes linhagens de osteossarcoma, realizamos uma caracterização citogenética dessas células. A linhagem de osteossarcoma canino D17, que foi adquirida comercialmente, é oriunda de um cão fêmea, raça *poodle*, com 11 anos de idade e estava na passagem 227 no momento do experimento. As células são aderentes e com morfologia epitelial, são diploides com 64 cromossomos, apresentam múltiplos rearranjos e cromossomos marcadores derivados dos rearranjos. Por meio do experimento de hibridização fluorescente *in situ* (FISH - *fluorescence in situ hybridization*) com sondas dos cromossomos 3 e 13 humanos, confirmamos que a linhagem D17 não é humana, pois não observamos marcações para essas sondas humanas nessa linhagem.

A linhagem de osteossarcoma humano MG63, também adquirida comercialmente, é oriunda de um homem com 14 anos de idade, possui células aderentes e com morfologia fibroblástica. Essas células são pseudo hipotriploides com 62 cromossomos e múltiplos rearranjos e cromossomos marcadores derivados dos rearranjos. Por meio do experimento de hibridização fluorescente *in situ* (FISH - *fluorescence in situ hybridization*) com sondas dos cromossomos 3 e 13 humanos, confirmamos que a linhagem MG63 é humana, pois observamos marcações positivas para as duas sondas humanas nessa linhagem.

A número de cromossomos de uma célula somática canina normal é 78 ($2n=78$). As duas linhagens de osteossarcoma estudadas, D17 e MG63, possuem uma quantidade menor de cromossomos devido a uma grande quantidade de rearranjos. Essa grande quantidade de rearranjos nos cromossomos das duas linhagens de osteossarcoma impossibilitou que

fossem montados os cariótipos, mesmo com o auxílio de um programa específico para a organização dos cromossomos. Essa grande variação cromossômica nas duas linhagens pode explicar algumas variações nos resultados obtidos nesse trabalho.

Como controle, estabelecemos uma linhagem osteoblástica canina não neoplásica, que chamamos de COBS, oriunda de um raspado de calo ósseo de uma fratura na tíbia de um cão fêmea, raça Spitz-alemão-anão, conhecido como Lulu da Pomerânia, com idade de 10 meses. Observamos nessa linhagem a expressão de marcadores ósseos como a fosfatase alcalina, osteopontina e SPARC. Também verificamos que essa linhagem apresenta baixa expressão de MMP2 e MMP-MT1.

Para verificar a expressão de MMP e uPA, além de outros marcadores, nas linhagens de osteossarcoma D17 e MG63, realizamos ensaios de imunofluorescência. Observamos a expressão de β -catenina, MAPK, K-RAS, c-Myc, MMP2, MMP9, uPA, MT1-MMP, p53 e conexina 43 em ambas as linhagens de osteossarcoma.

A expressão de MMP2, MMP9, MT1-MMP e uPA nos mostrou que essas linhagens de osteossarcoma poderiam ser sensíveis à toxina modificada do *Bacillus anthracis*, pois ela foi modificada para ter uma ação citotóxica seletiva. Essa confirmação permitiu que partíssemos para os ensaios de citotoxicidade da toxina nessas linhagens de osteossarcoma.

A β -catenina é uma proteína situada no citoplasma que é codificada pelo gene CTNNB1, localizado no cromossomo 3p21 em humanos e no cromossomo 23 em cães. Ela é multifuncional, pois tem papel importante como proteína de adesão e como fator de transcrição nas vias de sinalização, principalmente as relacionadas com a via Wnt (*wingless-type MMTV integration site family*) (KRAUS et al., 1994; MACDONALD et al., 2009). Na ausência de sinais mitóticos externos, a β -catenina é sequestrada em um complexo com a proteína APC (*adenomatous polyposis coli*), um dos principais elementos da maquinaria proteolítica celular, onde a β -catenina livre é fosforilada e degradada (WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000).

Nossos resultados mostraram que a expressão de β -catenina na linhagem canina D17 foi exclusivamente nuclear, demonstrando maior atividade transcricional nessa linhagem, o que explica um índice proliferativo maior que na linhagem de osteossarcoma humano MG63.

Em contrapartida, na linhagem humana MG63 a β -catenina apresentou marcações na membrana celular e em alguns núcleos marcações puntiformes, demonstrando menor atividade transcricional.

β -catenina é uma proteína multifuncional cuja atividade depende de sua localização subcelular. Quando a β -catenina está na membrana plasmática, ela é um componente das junções de adesão celular, enquanto quando ocorre a acumulação citosólica, leva a um aumento da localização nuclear e atividade transcricional (XING et al., 2008). A ativação da sinalização de Wnt induz a expressão de Conexina 43 (Cx43) via atividade transcricional da β -catenina e resulta no aumento de acúmulo da proteína Cx43 e na formação de canais *gap junction*. Em resposta à sinalização Wnt, a β -catenina co-localiza-se com a própria proteína Cx43 como parte de um complexo na placa de *junção gap* (AI ET al., 2000; OLSON et al., 2018; MOORER et al., 2017; RINALDI et al., 2014; TALHOUK et al., 2013; SWOPE et al., 2012; DU et al., 2009). Alguns estudos sugerem que o sequestro da β -catenina pela Cx43 serviria para reduzir o seu potencial de transativação da β -catenina (MOORER et al., 2017). Spagnol e colaboradores em 2018, confirmaram que a β -catenina interage diretamente com o domínio carboxi-terminal da Cx43, e que essa interação seria inibida pela fosforilação de Src dos resíduos Cx43CT Y265 e Y313 (SPAGNOL et al., 2018). Por outro lado, Moorer e colaboradores observaram que em um modelo de rato que os osteoblastos tinham um truncamento da Cx43CT (K258stop) gerando um códon de parada, tinham a β -catenina ativa reduzida, juntamente com proteína cinase C e quinase 1/2 regulada por sinal extracelular, levando à uma alteração na proliferação, diferenciação, processamento do colágeno e organização. (MOORER et al., 2017). Nossos resultados demonstraram que a expressão de conexina 43 na linhagem de osteossarcoma canino D17 foi preferencialmente nuclear e na linhagem de osteossarcoma humano MG63 a expressão foi preferencialmente na membrana celular.

Para analisar a expressão da via MAPK, iniciamos nossa análise pela proteína K-RAS, que está no início da via da MAPK. Na linhagem de osteossarcoma canino D17, o K-RAS apresentou expressão citoplasmática moderada, porém, na linhagem de osteossarcoma humano MG63, apresentou uma expressão citoplasmática forte em quase todas as células, demonstrando a atividade do K-RAS nessa via. A MAPK também foi analisada diretamente e apresentou marcação citoplasmática nas duas linhagens de osteossarcoma. Para analisar a

atividade da via MAPK *dowstream*, observamos a expressão do gene c-Myc vimos uma grande expressão nuclear nas duas linhagens de osteossarcoma. Diante desses resultados, podemos concluir que a via MAPK está ativa nas duas linhagens de osteossarcoma usadas nesse projeto, via importante para induzir a morte celular pela ação da toxina.

Para tentar explicar o comportamento das células dos osteossarcomas humano e canino frente ao tratamento com a toxina reengenheirada de *Bacillus anthracis*, analisamos a expressão de p53 por imunofluorescência. A p53 é a proteína guardiã do ciclo celular. Observamos que a p53 está exclusivamente citoplasmática nas duas linhagens de osteossarcoma, o que justifica as alterações genéticas, pois indica que p53 foi sequestrado no citoplasma perdendo sua ação como gene supressor o que, consequentemente, levou um acúmulo de danos no DNA dessas linhagens.

Analisamos também o oncogene Bcl-2, que tem a característica de ser anti-apoptótico. Observamos que Bcl-2 tem grande expressão na linhagem de osteossarcoma humano MG63, ao contrário da linhagem de osteossarcoma canino D17. Esse dado explica o motivo da linhagem de osteossarcoma humano MG63 ser mais resistente à toxina do que a linhagem de osteossarcoma canino D17.

Testamos a citotoxicidade da toxina modificada do *Bacillus anthracis* nas linhagens de osteossarcoma canino e humano e na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) para verificar se essas linhagens são sensíveis ao tratamento. Observamos que LF e FP isoladamente não foram citotóxicas em todas as linhagens testadas, tendo a viabilidade celular comparada a das células sem o tratamento, confirmando que a toxina é dependente da associação com PA para demonstrar a sua citotoxicidade. Na linhagem de osteossarcoma canino D17, a associação de LF e PA em todas as concentrações de PA (5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml) foram significativamente citotóxicas, ou seja, houve uma diminuição na densidade óptica na leitura pelo teste imunoenzimático, quando comparado às mesmas células sem a toxina. Já a associação entre LF e PAL1/PAU2, toxina terapêutica, mostrou ser, também, significativamente citotóxica, ou seja, com diminuição da densidade óptica em todas concentrações de PA, quando comparado às mesmas células sem a toxina. Verificamos, também, que as associações entre FP e PA e entre FP e PAL1/PAU2 na linhagem D17, a citotoxicidade foi estatisticamente significante, ou seja, houve diminuição

da densidade óptica, em todas as concentrações analisadas em relação às mesmas células sem a toxina. Essa maior mortalidade de FP em relação à LF já era esperada, pois a toxina FP é 50 vezes mais potente que a LF. Essa diminuição da viabilidade celular demonstra que existem receptores para a toxina do *Bacillus anthracis* (TEM8 ou CMG2) e proteases do tipo furina para clivarem essa PA e iniciarem a internalização da FP para o citosol e, assim, causar a ribolização da EF-2 do ribossomo, causando a morte celular.

Verificamos, a partir do ensaio do ciclo celular, que a via dessa morte celular foi por apoptose na linhagem de osteossarcoma canino D17. Esses resultados corroboram com a literatura que mostra que a toxina do *Bacillus anthracis*, dentro da célula tumoral, interfere na síntese de proteínas, causa dano no DNA e, conseqüentemente, induz a apoptose (BACHRAN & LEPPLA, 2016).

Na linhagem de osteossarcoma humano MG63, os resultados foram semelhantes aos observados na linhagem de osteossarcoma canino D17. A associação de LF e PA, com as concentrações 5, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml de PA, foram significativamente citotóxicas, ou seja, houve diminuição nas densidades ópticas na leitura pelo teste imunoenzimático, quando comparada às mesmas células sem a toxina. Já a associação entre LF e PAL1/PAU2, mostrou ser, também, significativamente citotóxica, ou seja, houve diminuição da densidade óptica, com as duas maiores concentrações (1571 e 5000ng/ml) de toxina reengenheirada, às mesmas células sem a toxina. Esse resultado mostra que essas células da linhagem humana MG63, assim como a linhagem canina D17, possuem receptores para uroquinase/metaloproteínas e para a toxina do *Bacillus anthracis* (TEM8 ou CMG2) para internalizar o LF, causando assim essa sensibilidade às diferentes concentrações da toxina.

Quando analisamos as associações entre FP e PA e entre FP e PAL1/PAU2 na linhagem de osteossarcoma humano MG63, observamos citotoxicidade estatisticamente significante, ou seja, diminuição da densidade óptica, em todas as concentrações analisadas (5, 15, 49, 155, 494, 1571 e 5000ng/ml) em relação às mesmas células sem a toxina. Essa maior mortalidade de FP em relação à LF já era esperada, pois essa porção FP é 50 vezes mais potente que LF. Essa citotoxicidade demonstra que existem receptores para a toxina do *Bacillus anthracis* (TEM8 ou CMG2) e proteases do tipo furina para clivarem essa PA e

iniciarem a internalização da FP para o citosol e, assim, causar a ribolização da EF-2 do ribossomo, causando a morte celular.

Podemos concluir, com esses resultados, que os osteossarcomas canino e humano foram sensíveis ao tratamento com a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*, que causou a morte de boa parte das células em todos os experimentos, e que a toxina LF com PAL1/PAU2 é a menos agressiva devido a sua seletividade, sendo, portanto, a mais indicada terapeuticamente. Autores sugerem que essa citotoxicidade da toxina do *Bacillus anthracis* é devido a ação do fator letal LF, que é uma metaloproteinase de zinco que cliva proteína quinase ativada por MAPKKs em suas regiões N-terminais (DUESBERY et al., 1998) e Nlrp1 (LEVINSOHN et al., 2012). A clivagem de Nlrp1 por LF causou a ativação de inflamassomas, liberação de IL-1 β e piroptose de macrófagos em linhagens de camundongos e ratos (LEVINSOHN et al., 2012). A clivagem de MAPKKs interrompe vários caminhos de sinalização, incluindo os caminhos ERK1/2, JNK/SAPK e p38, todos com importantes funções celulares tais como proliferação e regulação do ciclo celular, mas também modulação imunológica e sobrevivência contra insultos. Verificamos, a partir do ensaio do ciclo celular, que a via dessa morte celular foi por apoptose nessa linhagem, como observado na linhagem de osteossarcoma canino D17. Esses resultados corroboram com a literatura que mostra que a toxina do *Bacillus anthracis*, dentro da célula tumoral, interfere na síntese de proteínas, causa dano no DNA e, consequentemente, induz a apoptose (BACHRAN & LEPPLA, 2016).

A linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) apresentou sensibilidade à toxina modificada do *Bacillus anthracis*, ou seja, diminuição significativamente estatística apenas em duas das três maiores concentrações 494 e 5000ng/ml da toxina terapêutica (LF+PAL1/PAU2). Isso mostra que essa linhagem apresenta os receptores para a toxina do *Bacillus anthracis* (TEM8 ou CMG2), porém, a expressão de MMP2 e MT1-MMP é baixa, justificando maior resistência em relação às linhagens de osteossarcomas. Além disso, o ensaio do ciclo celular mostrou que essa linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS) não apresentou morte celular via apoptose como as outras duas linhagens de osteossarcoma, mas apenas uma parada no ciclo celular na fase G1.

A análise de migração celular foi realizada nas duas linhagens de osteossarcoma visando observar a capacidade de migração que essas linhagens teriam após o tratamento com as diferentes concentrações da toxina. Observamos que as duas linhagens de osteossarcoma tiveram a sua capacidade de migração comprometida após o tratamento com a toxina terapêutica em todas as concentrações, mostrando que a proliferação diminuiu, sendo que na linhagem D17 essa diminuição da proliferação foi mais acentuada, corroborando com os resultados de citotoxicidade por MTT, já que essas células mostraram-se mais sensíveis à toxina.

Concluimos dizendo que este foi um estudo pioneiro em osteossarcomas caninos e humanos, pois a toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* não havia sido testada nestas neoplasias até o presente. Essa toxina mostrou ser um potencial tratamento promissor para o osteossarcoma e possivelmente para alguns tipos de tumores sólidos que expressam metaloproteinases e uroquinases e merece mais investigação e desenvolvimento.

7 CONCLUSÃO

A toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis* apresentou efeito antineoplásico na linhagem de osteossarcoma canino D17, bem como, na linhagem de osteossarcoma humano MG63, diminuindo a viabilidade celular e causando morte por apoptose. Os blocos de TMA de osteossarcoma canino apresentaram a expressão de metaloproteinase 2 (MMP2) e receptor de ativador de uroquinase plasminogênio (uPAR), sugerindo que os osteossarcomas caninos seriam sensíveis à toxina modificada do *Bacillus anthracis*. A caracterização das linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) demonstrou que apresentam diferenças cromossômicas numéricas, porém não foi possível a construção dos cariótipos devido ao grande número de rearranjos. A linhagem osteoblástica canina não neoplásica COBS, usada como controle, apresentou um cariótipo com 78 cromossomos, igual à de células somáticas normais da espécie *Canis lupus familiaris*. Essa linhagem apresentou a expressão de marcadores ósseos como fosfatase alcalina, osteopontina e SPARC, além da expressão de metaloproteinase 2 (MMP2) e MMP-MT1. Observamos pelo ensaio de imunofluorescência que as linhagens de osteossarcoma (D17) e humano (MG63) expressam: β -catenina, MAPK, K-RAS, c-Myc, MMP2, MMP9, uPA, MT1-MMP, p53 e Conexina 43. Na linhagem osteoblástica canina não neoplásica (COBS), observamos a expressão de marcadores ósseos como a fosfatase alcalina, osteopontina e SPARC. Também verificamos que essa linhagem apresenta baixa expressão de MMP2 e MMP-MT1. As linhagens de osteossarcoma canino e humano foram sensíveis à diferentes concentrações da fração da toxina terapêutica (LF+PAL1/PAU2), sugerindo que essa toxina é um potencial tratamento para alguns tipos de tumores sólidos, como o osteossarcoma, que expressam metaloproteinases e uroquinases e merece mais investigação e desenvolvimento. Observamos também que a linhagem COBS, usada como controle, foi sensível à toxina terapêutica apenas em duas das maiores concentrações (494 e 5000ng/ml). Observamos que as duas linhagens de osteossarcoma foram sensíveis à diferentes concentrações da fração da toxina terapêutica (LF+PAL1/PAU2) e a via principal de morte celular foi a apoptose. Na linhagem COBS, que também foi sensível à toxina terapêutica, não apresentou morte por apoptose, mas somente uma parada do ciclo celular na fase G1. Os resultados da citometria de fluxo para Anexina V e iodeto de propídio mostraram que a linhagem de

osteossarcoma humano (MG63) apresentou morte celular por apoptose após o tratamento de 24 horas com a toxina modificada do *Bacillus anthracis*. O ensaio de migração realizado nas linhagens de osteossarcoma canino (D17) e humano (MG63) demonstrou que a fração da toxina terapêutica (LF+PAL1/PAU2) após 24 horas de tratamento, em todas as concentrações, inibiu a migração e o fechamento da fissura de continuidade na monocamada, mostrando que o tratamento diminuiu a capacidade de migração das duas linhagens de osteossarcoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMI, L.; LIU, S.; COSSON, P.; LEPPLA, S.H.; VAN DER GOOT, F.G. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-independent process. **J. Cell Biol**, 160:321-328, 2003.
- AI, Z.; FISCHER, A.; SPRAY, D.C.; BROWN, A.M.; FISHMAN, G.I. Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. **J. Clin. Investig**, 105, 161–171, 2000.
- ALVAREZ, F.J.; KISSEBERTH, W.; HOSOYA, K.; LARA-GARCIA, A.; KOSAREK, C.; MURAHARI, S.; AU, J.L.; WIENTJES, M.G.; COUTO, J.; COUTO, G. Postoperative adjuvant combination therapy with doxorubicin and noncytotoxic suramin in dogs with appendicular osteosarcoma. **J Am Anim Hosp Assoc**, 50:12–8, 2014.
- ANDERSON, M.E. Update on survival in osteosarcoma. **Orthop Clin North Am**. 47:283–92, 2016.
- ANDREASEN, P.A.; EGELUND, R.; PETERSEN, H.H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. **Cell Mol. Life Sci**, 57:25-40, 2000.
- ARESU, L.; GIANTIN, M.; MORELLO, E.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; GARBISA, S.; ARICÒ, A.; BRADASCHIA, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. **BMC Veterinary Research**, 7, 33, 2011.
- ARORA, N.; LEPPLA, S.H. Residues 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. **Journal of Biological Chemistry**, 268(5), 3334-3341, 1993.
- ARRIBAS, J.; COODLY, L.; VOLLMER, P.; KISHIMOTO, T. K.; ROSE-JOHN, S.; AND MASSAGUE, J. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. **J. Biol. Chem.**, 271:11376–11382, 1996.
- BACHRAN, C.; LEPPLA, S.H. Tumor Targeting and Drug Delivery by Anthrax Toxin. **Toxins**, 8, 197; 2016.
- BACON, N.J.; EHRHART, N.P.; DERNELL, W.S.; LAFFERTY, M.; WITHROW, S.J. Use of alternating administration of carboplatin and doxorubicin in dogs with microscopic metastases after amputation for appendicular osteosarcoma: 50 cases (1999–2006). **J Am Vet Med Assoc**, 232:1504–10, 2008.
- BAILEY, T.R.; PAULSEN, D.B.; SEHGAL, I.; HOSGOOD, G. Immunohistochemical staining of urokinase plasminogen activator-like and urokinase plasminogen activator receptor-like proteins in the urinary tract of healthy dogs. **Am J Vet Res**, 67:1628-34, 2006.

BAKER, M.S.; BLEAKLEY, P.; WOODROW, G.C.; DOE, W.F. Inhibition of cancer cell urokinase plasminogen activator by its specific inhibitor PAI-2 and subsequent effects on extracellular matrix degradation. **Cancer Res**, 50:4676-4684, 1990.

BEALL, F.A.; TAYLOR, M.J.; THORNE, C.B. Rapid lethal effect in rats of a third component found upon fractionating the toxin of *Bacillus anthracis*. **J. Bacteriol**, 83:1274-1280, 1962.

BEAVON, I. R. G. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. **Europe Journal Cancer**, Oxford, v.36, n. 13, p. 1607-1620, 2000.

BERG, J. Canine osteosarcoma: amputation and chemotherapy. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, 26:111–21, 1996.

BERSANO, P.R.O. Expressão imunoistoquímica da ciclooxigenase-2 (Cox2) e quantificação das regiões organizadas de nucléolos (NORs) nos diferentes padrões histológicos do osteossarcoma canino. 120f. **Dissertação (Magister Scientiae)**, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

BILIRAN, H. JR.; SHENG, S. Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin. **Cancer Res**, 61:8676-8682, 2001.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr. Opin. Cell Biol**, 7:728-735, 1995.

BISHOP, M.W.; JANEWAY, K.A.; GORLICK, R. Future directions in the treatment of osteosarcoma. **Curr Opin Pediatr**, 28:26–33, 2016.

BONNETT B, EGENVALL A, HEDHAMMAR A, OLSON P. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995–2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. **Acta Vet Scand**. 46:105–20, 2005.

BOTTER, S.M.; NERI, D.; FUCHS, B. Recent advances in osteosarcoma. **Curr Opin Pharmacol**, 16:15–23, 2014.

BRODEY, R.S.; RISER, W.H. Canine osteosarcoma. A clinicopathologic study of 194 cases. **Clin Orthop Relat Res**, 62, 54-64, 1969.

BROWN, P.D. Matrix metalloproteinase inhibitors: a novel class of anticancer agents. **Adv. Enzyme Regul**. 35:293-301, 1995.

BROWN, P.D.; GIAVAZZI, R. Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumour activity. **Ann. Oncol**, 6:967-974, 1995.

BUGGE, T.H. Proteolysis in carcinogenesis. In: *Head and Neck Cancers*. Gutkind JS, Jacobs JR, Lippman SM (Eds.), **Academic Press** - San Diego, 137-149, 2002.

BUGGE, T.H.; FLICK, M.J.; DANTON, M.J.; et al. Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93:5899-5904, 1996.

BUGGE, T.H.; SUH, T.T.; FLICK, M.J.; et al. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is not essential for mouse development or fertility. **J. Biol. Chem**, 270:16886-16894., 1995.

CARMELIET, P.; MOONS, L.; DEWERCHIN, M.; et al. Receptor independent role of urokinase-type plasminogen activator in pericellular plasmin and matrix metalloproteinase proteolysis during vascular wound healing in mice. **J. Cell Biol**, 140:233-245, 1998.

CARSON-WALTER, E.B.; WATKINS, D.N.; NANDA, A.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W.; ST CROIX, B. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. **Cancer Res**, 61:6649-6655, 2001.

CAVALCANTI, J.N.; AMSTALDEN, E.M.I.; GUERRA, J.L.; MAGNA, L.C. Osteossarcoma em cães: estudo clínico-morfológico e correlação prognóstica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 41, 5, 299- 305, 2004.

CHAMBERS, A.F.; MATRISIAN, L.M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **J. Natl. Cancer Inst**, 89:1260-1270, 1997.

CHEN, Y.U.; XU, S.F.; XU, M.; YU, X.C. Postoperative infection and survival in osteosarcoma patients: reconsideration of immunotherapy for osteosarcoma. **Mol Clin Oncol**, 3:495–500, 2015.

COHEN, P. The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors. **Curr. Opin. Chem. Biol**, 3:459-465, 1999.

CUBELLIS, M.V.; ANDREASEN, P.; RAGNO, P.; MAYER, M.; DANO, K.; BLASI, F.; Accessibility of receptor-bound urokinase to type-1 plasminogen activator inhibitor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86:4828-4832, 1989.

CUNNINGHAM, K.; LACY, D.B.; MOGRIDGE, J.; COLLIER, R.J. Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99:7049-7053, 2002.

DALECK, C.R.; CANOLA, J.C.; STEFANES, S.A.; SHOCKEN, P.F.L.; DE NARDI, A.B. Estudo retrospectivo de osteossarcoma primário dos ossos da pelve em cães em um período de 14 meses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 43, 1, 125-131, 2006.

DANO, K.; ROMER, J.; NIELSEN, B.S.; et al. Cancer invasion and tissue remodeling cooperation of protease systems and cell types. **APMIS**, 107:120-127, 1999.

DERNELL, W.S.; STRAW, R.C.; WITHOROW, S.J. Tumors of the skeletal system. **Small Animal Clinical Oncology**, 3.ed. Philadelphia: USA, p 378-417, 2001.

DRUM, C.L.; YAN, S.Z.; BARD, J.; SHEN, Y.Q.; LU, D; SOELAIMAN, S.; GRABAREK, Z.; BOHM, A.; TANG, W.J. Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. **Nature**, 415:396-402 2002.

DRUMMOND, A.H.; BECKETT, P.; BROWN, P.D. et al. Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer. **Ann. NY Acad. Sci**, 878:228-235, 1999.

DU, W.J.; LI, J.K.; WANG, Q.Y.; HOU, J.B.; YU, B. Lithium chloride preconditioning optimizes skeletal myoblast functions for cellular cardiomyoplasty in vitro via glycogen synthase kinase-3-catenin signaling. **Cells Tissues Organs**, 190, 11–19, 2009.

DUESBERY, N.S.; WEBB, C.P.; LEPPLA, S.H; GORDON, V.M.; KLIMPEL, K.R.; COPELAND, T.D.; AHN, N.G.; OSKARSSON, M.K.; FUKASAWA, K.; PAULL, K.D.; VANDE WOUDE, G.F. Proteolytic inactivation of MAPkinase-kinase by anthrax lethal factor. **Science**, 280:734-737, 1998.

DUFFY, M.J. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. **Current Pharmaceutical Design**, V 10, Issue 1, 2004.

ELLIS, V.; BEHRENDT, N.; DANO, K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell associated and isolated receptor. **J. Biol. Chem**, 266:12752-12758, 1991.

ELLIS, V.; WUN, T.C.; BEHRENDT, N.; RONNE, E.; DANO, K. Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogenactivator inhibitors. **J. Biol. Chem**. 265:9904-9908, 1990.

EZZELL, J.W.; IVINS, B.E.; LEPPLA, S.H. Immunoelectrophoretic analysis, toxicity, and kinetics of *in vitro* production of the protective antigen and lethal factor components of *Bacillus anthracis* toxin. **Infect. Immun**, 45:761-767, 1984.

FAN, X.L.; CAI, G.P.; ZHU, L.L.; DING, G.M. Efficacy and safety of ifosfamide-based chemotherapy for osteosarcoma: a meta-analysis. **Drug Des Dev Ther**, 9:5925–32, 2015.

FERRARI, S., SERRA, M. An update on chemotherapy for osteosarcoma. **Expert Opin Pharmacother**, 16:2727–36, 2015.

FRIEDLANDER, A.M. Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. **J. Biol. Chem**, 261:7123-7126, 1986.

GAO, S.; EIBERG, H.; KROGDAHL, A.; LIU, C-J.; SORENSEN J. A. Cytoplasmic expression of E-cadherin and B-catenin with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. **Journal Oral Pathology Medicine**, v. 34, n. 2, p. 116-119, 2005.

HABAS, R. Canonical Wnt signaling: an unexpected new player. **Development Cell**, v. 11, n. 2, p. 138-139, 2006.

HALL, S.W.; HUMPHRIES, J.E.; GONIAS, S.L. Inhibition of cell surface receptor-bound plasmin by alpha 2- antiplasmin and alpha 2-macroglobulin. **J. Biol. Chem**, 266:12329-12336, 1991.

HANNA, P.C.; KOCHI, S.; COLLIER, R.J. Biochemical and physiological changes induced by anthrax lethal toxin in J774 macrophage-like cells. **Mol. Biol. Cell**. 3:1269-1277, 1992.

HEWITT, C.J.; NEBE-VON-CARON, G. An industrial application of multiparameters flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. **Cytometry**, 44, 179-187, 2001.

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**, 21, 4, 304-310, 1992.

HEYMANS, S.; LUTTUN, A.; NUYENS, D.; et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. **Nat. Med**, 5:1135-1142, 1999.

HOEKSTRA, R.; ESKENS, F.A.; VERWEIJ, J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. **Oncologist**, 6 (5), 415-27, 2001.

HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. **Mutat Res**, 462:311-322, 2000.

IWAI, S.; KATAGIRI, W.; KONG, C.; AMEKAWA, S.; NAKAZAWA, M.; YURA, Y. Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of β -catenin in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, n. 12, p. 773-782, 2005.

JEYS, L.M.; GRIMER, R.J.; CARTER, S.R.; TILLMAN, R.M.; ABUDU, A. Post operative infection and increased survival in osteosarcoma patients: are they associated? **Ann Surg Oncol**, 14:2887-95, 2007.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Esqueleton System. **Veterinary pathology**, 6 ed. Williams & Wilkins, Pennsylvania: 1191-1201, 2000.

KANSARA M, TENG MW, SMYTH MJ, THOMAS DM. Translational biology of osteosarcoma. **Nat Rev Cancer**, 14:722-35, 2014.

KE, S.H.; COOMBS, G.S.; TACHIAS, K.; COREY, D.R.; MADISON, E.L. Optimal subsite occupancy and design of a selective inhibitor of urokinase. **J. Biol. Chem**, 272:20456-20462, 1997.

KE, S.H.; COOMBS, G.S.; TACHIAS, K.; NAVRE, M.; COREY, D.R.; MADISON, E.L. Distinguishing the specificities of closely related proteases. Role of P3 in substrate and inhibitor discrimination between tissue type plasminogen activator and urokinase. **J. Biol. Chem.**, 272:16603-16609, 1997.

KENT, M.S.; STROM, A.; LONDON, C.A.; SEGUIN, B. Alternating carboplatin and doxorubicin as adjunctive chemotherapy to amputation or limb-sparing surgery in the treatment of appendicular osteosarcoma in dogs. **J Vet Intern Med**, 18:540–4, 2004.

KOO, H.M.; VANBROCKLIN, M.; MCWILLIAMS, M.J.; LEPPLA, S.H.; DUESBERY, N.S.; WOUDE, G.F. Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99:3052-3057, 2002.

KRAUS, C.; LIEHR, T.; HÜLSKEN, J.; BEHRENS, J.; BIRCHMEIER, W.; GRZESCHIK, K. H.; BALLHAUSEN, W. G. Localization of the human β -catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. **Genomics**, v. 23, n. 1, p. 272- 274, 1994.

LASCELLES, B.D.; DERNELL, W.S.; CORREA, M.T.; LAFFERTY, M.; DEVITT, C.M.; KUNTZ, C.A.; STRAW, R.C.; WITHROW, S.J. Improved survival associated with postoperative wound infection in dogs treated with limb-salvage surgery for osteosarcoma. **Ann Surg Oncol**, 12:1073–83, 2005.

LEPPLA, S.H. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 79:3162-3166. 51, 1982.

LEPPLA, S.H. Anthrax toxin. In: *Bacterial Protein Toxins*, 1st Ed., Aktories K, Just I (Eds), **Springer**, Berlin. 445-472, 2000.

LEVINSOHN, J.L.; NEWMAN, Z.L.; HELLMICH, K.A.; FATTAH, R.; GETZ, M.A.; LIU, S.; SASTALLA, I.; LEPPLA, S.H.; MOAYERI, M. Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. **PLoS Pathog.** 8, 2012.

LEWIS, T.S.; SHAPIRO, P.S.; AHN, N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades. **Adv. Cancer Res**, 74:49-139., 1998.

LI, X.; ZHANG, Y.; WAN, S.; LI, H.; LI, D.; XIA, J.; YUAN, Z.; REN, M.; YU, S.; LI, S.; YANG, Y.; HAN, L.; YANG, Z. A comparative study between limb-salvage and amputation for treating osteosarcoma. **J Bone Oncol**, 5:15–21, 2016.

LIAN J. B.; STEIN, G. S. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. **Iowa Orthopaedic Journal**, v. 15, n., p. 118-140, 1995.

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

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, 1, 55-67, 1974.

LIOTTA, L.A.; GOLDFARB, R.H.; BRUNDAGE, R.; SIEGAL, G.P.; TERRANOVA, V.; GARBISA, S. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. **Cancer Res**, 41:4629-4636, 1981.

LIPTAK, J.M.; DERNELL, W.S.; EHRHART, N.; LAFFERTY, M.H.; MONTEITH, G.J.; WITHROW, S.J. Cortical allograft and endoprosthesis for limb-sparing surgery in dogs with distal radial osteosarcoma: a prospective clinical comparison of two different limb-sparing techniques. **Vet Surg**, 35:518–33, 2006.

LIU, L.; KUMAR, S.K.; SEDGHIZADEH, P.P.; JAYAKAR, A.N.; SHULER, C.F. Oral squamous cell carcinoma incidence by subsite among diverse racial and ethnic populations in California. **Journal Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, 105, 4, 470-480, 2008.

LIU, L.; SCHUBERT, R.L.; BUGGE, T.H.; LEPLA, S.H. Anthrax toxin: structures, functions and tumour targeting. **Expert Opin. Biol. Ther**, 3(5):843-853, 2003.

LIU, S.; AARONSON, H.; MITOLA, D.J.; LEPLA, S.H.; BUGGE, T.H. Potent antitumor activity of a urokinase-activated engineered anthrax toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100:657-662, 2003.

LIU, S.; BUGGE, T.H.; LEPLA, S.H. Targeting of tumor cells by cell surface urokinase plasminogen activator-dependent anthrax toxin. **The Journal of biological chemistry**, 276, 17976–84, 2001.

LIU, S.; CROWN, D.; MILLER-RANDOLPH, S.; MOAYERI, M.; WANG, H.; HU, H.; MORLEY, T.; LEPLA, S.H. Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA**, 106:12424–12429, 2009.

LIU, S.; LEPLA, S.H. Cell surface tumor endothelium marker 8 cytoplasmic tail-independent anthrax toxin binding, proteolytic processing, oligomer formation, and internalization. **The Journal of biological chemistry**, 278, 5227–5234, 2003.

LIU, S.; NETZEL-ARNETT, S.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; LEPLA, S.H. Tumor Cell-selective Cytotoxicity of Matrix Metalloproteinase-activated Anthrax Toxin, **Cancer Research**, 60, 6061–6067, 2000.

LIU, S.; ZHANG, Y.; HOOVER, B.; LEPLA, S.H. The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin. **Toxins**, 5, 1–8, 2013.

LIU, S.; REDEYE, V.; KUREMSKY, J.G.; KUHNEN, M.; MOLINOLO, A.; BUGGE, T.H.; LEPPLA, S.H. Intermolecular complementation achieves high-specificity tumor targeting by anthrax toxin. **Nature Biotechnology**, 23, 725–730, 2005.

LIU, S.; LEUNG, HJ; LEPPLA, SH. Characterization of the interaction between anthrax toxin and its cellular receptors. **Cellular microbiology**, 9, 977–987, 2007.

LONGSTAFF, C.; MERTON, R.E.; FABREGAS, P.; FELEZ, J. Characterization of cell-associated plasminogen activation catalyzed by urokinase-type plasminogen activator, but independent of urokinase receptor (uPAR, CD87). **Blood**, 93:3839-3846, 1999.

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

LUETKE, A.; MEYERS, P.A.; LEWIS, I.; JUERGENS, H. Osteosarcoma treatment-where do we stand? A state of the art review. **Cancer Treat Rev**, 40:523–32, 2014.

LUND, L.R.; BJORN, S.F.; STERNLICHT, M.D.; et al. Lactational competence and involution of the mouse mammary gland require plasminogen. **Development**, 127:4481-4492, 2000.

MASON, N.J.; GNANANDARAJAH, J.S.; ENGILES, J.B.; GRAY, F.; LAUGHLIN D, GAURNIER- HAUSSE A, WALLECHA A, HUEBNER M, PATERSON Y. Immunotherapy with a HER2-targeting listeria induces HER2-specific immunity and demonstrates potential therapeutic effects in a phase i trial in canine osteosarcoma. **Clin Cancer Res**, 22:4380–90, 2016.

MAVROGENIS, A.; ABATI, C.; ROMAGNOLI, C.; RUGGIERI, P. Similar survival but better function for patients after limb salvage versus amputation for distal tibia osteosarcoma. **Clin Orthop Relat Res**. 470:1735–48, 2012.

MCMAHON, M.; MATHIE, T.; STINGLE, N.; ROMANSIK, E.; VAIL, D.; LONDON, C. Adjuvant carboplatin and gemcitabine combination chemotherapy postamputation in canine appendicular osteosarcoma. **J Vet Intern Med**, 25:511–7, 2011.

MERLOS-SUAREZ, A., FERNANDEZ-LARREA, J., REDDY, P., BASELGA, J., AND ARRIBAS, J. Pro-tumor necrosis factor- α processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing. **J. Biol. Chem.**, 273:24955–24962, 1998.

MIGNATTI, P.; RIFKIN, D.B. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. **Enzyme Protein**, 49:117-137, 1996.

MILNE, J.C.; FURLONG, D.; HANNA, P.C.; WALL, J.S.; COLLIER, R.J. Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells. **J. Biol. Chem**, 269:20607-20612, 1994.

MITCHELL, K.E.; BOSTON, S.E.; KUNG, M.; DRY, S.; STRAW, R.C.; EHRHART, N.P.; RYAN, S.D. Outcomes of limb-sparing surgery using two generations of metal

endoprosthesis in 45 dogs with distal radial osteosarcoma. A veterinary society of surgical oncology retrospective study. **Vet Surg**, 45:36–43, 2016.

MOGRIDGE, J.; CUNNINGHAM, K.; COLLIER, R.J. Stoichiometry of anthrax toxin complexes. **Biochemistry**, 41:1079-1082, 2002.

MOGRIDGE, J.; CUNNINGHAM, K.; LACY, D.B.; MOUREZ, M.; COLLIER, R.J. The lethal and edema factors of anthrax toxin bind only to oligomeric forms of the protective antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 99:7045-7048, 2002.

MOGRIDGE, J.; MOUREZ, M.; COLLIER, R.J. Involvement of domain 3 in oligomerization by the protective antigen moiety of anthrax toxin. **J. Bacteriol**, 183:2111-2116, 2001.

MOLLOY, S.S.; BRESNAHAN, P.A.; LEPLA, S.H.; KLIMPEL, K.R.; THOMAS, G. Human furin is a calciumdependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. **J. Biol. Chem**, 267:16396-16402, 1992.

MOON, R. T.; KOHN, A. D.; FERRARI, G. V. de.; KAYKAS, A. WNT and beta-catenin signaling: diseases and therapies. **Nature Reviews Genetic**, v. 5, n. 9, p. 691-701, 2004.

MOORER, M.C.; HEBERT, C.; TOMLINSON, R.E.; IYER, S.R.; CHASON, M.; STAINS, J.P. Defective signaling, osteoblastogenesis and bone remodeling in a mouse model of connexin 43 C-terminal truncation. **J. Cell Sci**, 130, 531–540, 2017.

MORELLO, E.; MARTANO, M.; BURACCO, P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. **Vet J**, 189:268–77, 2006

MURPHY, G.; STANTON, H.; COWELL, S.; et al. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. **APMIS**, 107:38-44, 1999.

NEUWALD, E.B.; VELGA, D.C.; OLIVEIRA, E.C.; CONTESINI, E.A. Osteossarcoma craniano em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34, 215-219, 2006

NIELSEN, L.S.; HANSEN, J.G.; SKRIVER, L.; et al. Purification of zymogen to plasminogen activator from human glioblastoma cells by affinity chromatography with monoclonal antibody. **Biochemistry**, 21:6410-6415, 1982.

NOLLET, F.; BERX, G.; VAN ROY, F. The role of the e-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 2, p.77-85, 1999.

O'BRIEN, J.; FRIEDLANDER, A.; DREIER, T.; EZZELL, J.; LEPLA, S. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. **Infect. Immun**, 47:306-310, 1985.

OLIVEIRA, F.; SILVEIRA, P.R. Osteossarcoma em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.10, 2008.

OLSON, D.J.; CHRISTIAN, J.L.; MOON, R.T. Effect of wnt-1 and related proteins on gap junctional communication in *Xenopus* embryos. **Science**, 252, 1173–1176, 1991.

OSBORNE, T.S.; KHANNA, C. A Review of the Association between Osteosarcoma Metastasis and Protein Translation. **Journal of Comparative Pathology**, 146, 132-142, 2012.

OUYANG, L.; LIU, P.; YANG, S.; YE, S.; XU, W.; LIU, X. A three-plasma miRNA signature serves as novel biomarkers for osteosarcoma. **Medical Oncology**, 30, 340, 2013.

PANNIFER, A.D.; WONG, T.Y.; SCHWARZENBACHER, R.; RENATUS, M.; PETOSA, C.; BIENKOWSKA, J.; LACY, D.B.; COLLIER, R.J.; PARK, S.; LEPLA, S.H.; HANNA, P.; LIDDINGTON, R.C. Crystal structure of the anthrax lethal factor. **Nature**, 414:229-233, 2001.

PETOSA, C.; COLLIER, R.J.; KLIMPEL, K.R.; LEPLA, S.H.; LIDDINGTON, R.C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. **Nature**, 385:833-838, 1997.

PEZARD, C.; BERCHE, P.; MOCK, M. Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. **Infect. Immun**, 59:3472-3477, 1999.
Pharm Des, 10(1):39-49, 2004.

PHILLIPS, B.; POWERS, B.E.; DERNELL, W.S.; STRAW, R.C.; KHANNA, C.; HOGGE, G.S.; VAIL, D.M. Use of single-agent carboplatin as adjuvant or neoadjuvant therapy in conjunction with amputation for appendicular osteosarcoma in dogs. **J Am Anim Hosp Assoc**, 45:33–8, 2009.

PLOW, E.F.; FREANEY, D.E.; PLESCIA, J.; MILES, L.A. The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. **J. Cell Biol**, 103:2411-2420, 1986.

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

PRÓSPERO, J.D. Tumores ósseos. São Paulo: **Editora Roca Ltda.**, 280p, 2001.

RAMOS-VARA, J.A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; DEL PIERO, F.; DIAL, S.; EHRHART, E.J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V.E. Suggested Guidelines for Immunohistochemical Techniques in Veterinary Diagnostic Laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 20, 393-413, 2008.

REDDY, K.I.A.; WAFI, H.; GASTON, C.L.; GRIMER, R.J.; ABUDU, A.T.; JEYS, L.M.; CARTER, S.R.; TILLMAN, R.M. Does amputation offer any survival benefit over limb

salvage in osteosarcoma patients with poor chemonecrosis and close margins? **Bone Joint J**, 97(B):115–20, 2015.

RINALDI, F.; HARTFIELD, E.M.; CROMPTON, L.A.; BADGER, J.L.; GLOVER, C.P.; KELLY, C.M.; ROSSER, A.E.; UNEY, J.B.; CALDWELL, M.A. Cross-regulation of Connexin43 and catenin influences differentiation of human neural progenitor cells. **Cell Death Dis**, 5, e1017, 2014.

ROMER, J.; BUGGE, T.H.; PYKE, C.; et al. Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. **Nat. Med**, 2:287–292, 1996.

RU, G.; TERRACINI, B.; GLICKMAN, L.T. Host related risk factors for canine osteosarcoma. **Vet J**, 156:31–39, 1998.

SAAM, D.E.; LIPTAK, J.M.; STALKER, M.J.; CHUN, R. Predictors of outcome in dogs treated with adjuvant carboplatin for appendicular osteosarcoma: 65 cases (1996–2006). **J Am Vet Med Assoc**, 238:195–206, 2011.

SANTOS, A.; LOPES, C.; MARQUES, R.M.; AMORIM, I; RIBEIRO, J.; FRIAS, C.; *et al.* Immunohistochemical analysis of urokinase plasminogen activator and its prognostic value in canine mammary tumours. **Vet J.**, 89(1):43–83, 2011.

SCHAFER, J.M.; PETERS, D.E.; MORLEY, T.; LUI, S.; MOLINOLO, A.A.; LEPLA, S.H.; BUGGE, T.H. Efficient targeting of head and neck squamous cell carcinoma by systemic administration of a dual uPA and MMP-activated engineered anthrax toxin. **PloS one**, 6, e20532, 2011.

SCULLY, C.; BAGAN, J-V.; BLACK, M.; CARROZZO, M.; EISEN, D.; ESCUDIER, M.; FARTHING, P.; KUFFER, R.; MUZIO, L. L.; MIGNOGNA, M.; PORTER, S.R. Number 1 Epithelial biology. **Oral Disease**, v. 11, n. 2, p. 58–71, 2005.

SELMIC, L.E.; BURTON, J.H.; THAMM, D.H.; WITHROW, S.J.; LANA, S.E. Comparison of carboplatin and doxorubicin-based chemotherapy protocols in 470 dogs after amputation for treatment of appendicular osteosarcoma. **J Vet Intern Med**, 28:554–63, 2014.

SERRA, M.; HATTINGER, C.M. The pharmacogenomics of osteosarcoma. **Pharmacogenomics J**. 17:11–20, 2017.

SHRINGARPURE, S. S.; KUMAR, A.; SHANKAR, S.; MENON, M. A case of primary extraosseous penile osteosarcoma and review of the literature. **Indian Journal of Urology**, 28, 102–104, 2012.

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2015. **CA Cancer J Clin**, 65:5–29, 2015.

SIGAL, A.; ROTTER, V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. **Cancer Res**, 60:6788-6793, 2000.

SILVA, T.L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J.C. Citometria de fluxo funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, 32-40, 2001.

SINGH, Y.; KLIMPEL, K.R.; ARORA, N.; SHARMA, M.; LEPLA, S.H. The chymotrypsin-sensitive site, FFD315, in anthrax toxin protective antigen is required for translocation of lethal factor. **J. Biol. Chem**, 269:29039-29046, 1994.

SKORUPSKI, K.A.; UHL, J.M.; SZIVEK, A.; ALLSTADT FRAZIER, S.D.; REBHUN, R.B.; RODRIGUEZ, C.O. JR. Carboplatin versus alternating carboplatin and doxorubicin for the adjuvant treatment of canine appendicular osteosarcoma: a randomized, phase iii trial. **Vet Comp Oncol**, 14:81-7, 2016.

SMITH, H.; KEPPIE, J.; STANLEY, J.L. The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. V. the specific toxin produced by *B. anthracis* in vivo. **Br. J. Exp. Pathol**, 36:460-472, 1955.

SPAGNOL, G.; TREASE, A.J.; ZHENG, L.; GUTIERREZ, M.; BASU, I.; SARMIENTO, C.; MOORE, G.; CERVANTES, M.; SORGEN, P.L. Connexin43 Carboxyl-Terminal Domain Directly Interacts with β -Catenin. **Int. J. Mol. Sci.** 19(6), 1562, 2018.

SPRINGMAN, E.B.; ANGLETON, E.L.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; VAN WART HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a 'cysteine switch' mechanism for activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87:364-368, 1990.

ST CROIX, B.; RAGO, C.; VELCULESCU, V.; et al. Genes expressed in human tumor endothelium. **Science**, 289:1197-1202, 2000.

STETLER-STEVENSON, W.G.; AZNAVOORIAN, S.; LIOTTA, L.A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. **Ann. Rev. Cell Biol**, 9:541-573, 1993.

SU, W.; LAI, Z.; WU, F.; LIN, Y.; MO, Y.; YANG, Z.; WU, J. Clinical efficacy of preoperative chemotherapy with or without ifosfamide in patients with osteosarcoma of the extremity: meta-analysis of randomized controlled trials. **Med Oncol**, 32:481, 2015.

SWOPE, D.; CHENG, L.; GAO, E.; LI, J.; RADICE, G.L. Loss of cadherin-binding proteins β -catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis. **Mol. Cell. Biol**, 32, 1056-1067, 2012.

TA, H.T.; DASS, C.R.; CHOONG, P.F.M.; DUNSTAN, D.E. Osteosarcoma treatment: state of the art. **Cancer Metastasis Rev**, 28:247-63, 2009.

TALHOUK, R.S.; FARES, M.B.; RAHME, G.J.; HARIRI, H.H.; RAYESS, T.; DBOUK, H.A.; BAZZOUN, D.; AL-LABBAN, D.; EL-SABBAN, M.E. Context dependent reversion of tumor phenotype by connexin-43 expression in MDA-MB231 cells and MCF-7 cells: Role of β -catenin/connexin43 association. *Exp. Cell Res*, 319, 3065–3080, 2013.

THOMPSON, K.G.; POOL, R.R. Tumors of bones. In: MEUTEN DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. Ames, IA: **Iowa State Press**, 245–318, 2008.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M.K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, 54, 10–14, 2011.

VITALE, G.; BERNARDI, L.; NAPOLITANI, G.; MOCK, M.; MONTECUCCO, C. Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. **Biochem. J**, 352 (Pt 3):739-745, 2000.

VITALE, G.; PELLIZZARI, R.; RECCHI, C.; NAPOLITANI, G.; MOCK, M.; MONTECUCCO, C. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 248:706-711, 1998.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, 408:307-310, 2001.

VOS, H.I.; COENEN, M.J.; GUCHELAAR, H.J.; TE LOO, D.M. The role of pharmacogenetics in the treatment of osteosarcoma. **Drug Discov Today**, 21:1775–86, 2016.

XING, Y.; TAKEMARU, K.; LIU, J.; BERNDT, J.D.; ZHENG, J.J.; MOON, R.T.; XU, W. Crystal structure of a full-length-catenin. **Structure**, 16, 478–487, 2008.

WALLINGFORD, J. D.; HABAS, R. The development biology of Dishelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. **Development**, v. 132, n. 20, p. 4421-4436, 2005.

WAN, J.; ZHANG, X.; LIU, T. Strategies and developments of immunotherapies in osteosarcoma. **Oncol Lett**, 11:511–20, 2016.

WANG, W.G.; WAN, C.; LIAO, G.J. The efficacy of high dose versus moderate dose chemotherapy in treating osteosarcoma: a systematic review and meta-analysis. **Int J Clin Exp Med**, 8:15967–74, 2015.

WEI, F.; NI, J.; WU, S.S.; LIU, H.; XU, X.; HAN, Y.L.; CAI, Y.; ZHANG, J.W.; CHEN, X.J.; PANG, H. Cytogenetic studies of esophageal squamous cell carcinomas in the northern Chinese population by comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet**. 138:38–43. 2002.

WERB, Z.; MAINARDI, C.L.; VATER, C.A.; HARRIS, E.D. JR. Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. **N. Engl. J. Med**, 296:1017-1023, 1977.

WESCHE, J.; ELLIOTT, J.L.; FALNES, P.O.; OLSNES, S.; COLLIER, R.J. Characterization of membrane translocation by anthrax protective antigen. **Biochemistry**, 37:15737-15746, 1998.

WIJNHOFEN, B. P.; DINJENS, W. N.; PIGNATELLI, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. **British Journal Surgery**, v. 87, n. 8, p. 992-1005, 2000.

WILSON, H.; HUELSMEYER, M.; CHUN, R.; YOUNG, K.M.; FRIEDRICHS, K.; ARGYLE, D.J. Isolation and characterization of cancer stem cells from canine osteo- sarcoma. **Vet J**, 175:69–75, 2008.

WINKLER, K.; BIELACK, S.S.; DELLING, G.; JURGENS, H.; KOTZ, R.; SALZER-KUNTSCHEK, M. Treatment of osteosarcoma: experience of the cooperative osteosarcoma study group (COSS). **Cancer Treat Res**, 62:269–77, 1993.

ZHANG, F.Y.; TANG, W.; ZHANG, Z.Z.; HUANG, J.C.; ZHANG, S.X.; ZHAO, X.C. Systematic review of high-dose and standard-dose chemotherapies in the treatment of primary well-differentiated osteosarcoma. **Tumour Biol**, 35:10419–27, 2014.