

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DO IGF2BP-1 NO  
COMPORTAMENTO DO OSTEOSSARCOMA CANINO**

**Discente: Rafaela Bortolotti Viéra**

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DO IGF2BP-1 NO  
COMPORTAMENTO DO OSTEOSSARCOMA CANINO**

**Discente: Rafaela Bortolotti Viéra**

**Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi**

**Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Campos de Sá Rodrigues**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Cirurgia Veterinária

V665c	<p>Viéra, Rafaela Bortolotti</p> <p>Caracterização da função do IGF2BP-1 no comportamento do osteossarcoma canino / Rafaela Bortolotti Viéra. -- Jaboticabal, 2018</p> <p>70 p. : il., tabs., fotos</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Andriço Barboza De Nardi</p> <p>Coorientador: Lucas Campos de Sá Rodrigues</p> <p>1. Biologia molecular. 2. Osteossarcoma. 3. Oncologia veterinária. 4. Medicina comparativa. 5. IGF2BP-1. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DO IGF2BP-1 NO COMPORTAMENTO DO OSTEOSSARCOMA CANINO

**AUTORA: RAFAELA BORTOLOTTI VIÉRA**  
**ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI**  
**COORIENTADOR: LUCAS CAMPOS DE SÁ RODRIGUES**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Dra. Médica Veterinária LIVIA MARIA SOUZA SEMOLIN  
Autônoma / Clínica Veterinária Quatro Patas - Guariba/SP



Prof. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ  
Departamento de Clínica Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto/SP



Dr. Médico Veterinário FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO  
VETPAT - Campinas, SP / Laboratório de Análises Clínicas Veterinário

Jaboticabal, 17 de dezembro de 2018

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

Rafaela Bortolotti Viéra, Nascida em Ribeirão Preto – SP no dia 20 de março de 1987. Realizou o curso de graduação em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Barão de Mauá de janeiro de 2008 a dezembro de 2012. Durante a graduação realizou Iniciação Científica na área de Patologia Clínica sob a orientação da Profa. Dra Ana Paula Massae Nakage Canesin, período o qual desenvolveu grande interesse pela área acadêmica. Em 2013 iniciou seu mestrado pelo programa de Cirurgia Veterinária com ênfase em Oncologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” sob a orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi. Em 2015 defendeu a Dissertação intitulada “Toxicidade do cloridrato de doxorubicina na dose cumulativa de 120mg/m<sup>2</sup>, em cadelas com tumor venéreo transmissível” e no mesmo ano ingressou no Doutorado pela mesma instituição. Durante o Doutorado obteve bolsa de estudos para o Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, pela CAPES e realizou estudo na área de biologia molecular na Penn State University em Hershey, Pensilvânia durante cinco meses (maio a setembro de 2017). Durante o mestrado e doutorado (2013 a 2019) atendeu voluntariamente no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” na Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal o qual obteve conhecimento prático em Oncologia de Pequenos Animais.

## EPÍGRAFE

*“Os rios não bebem sua própria água; as árvores não comem seus próprios frutos. O sol não brilha para si mesmo e as flores não espalham sua fragrância para si. Viver para os outros é uma regra da natureza. (...) A vida é boa quando você está feliz; mas a vida é muito melhor quando os outros estão felizes por sua causa”.*

*Papa Francisco*

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas e a todos os animais que lutam contra o câncer. Somente com a pesquisa e com muitos estudos chegaremos longe para ajudar todos os seres que sofrem desta doença.

Ofereço este trabalho e todos os meus esforços diários a esta luta que sempre será contínua e incansável.

*“Ainda que não se possa curar, sempre é possível cuidar”.*

*Lilian Hannemann-Krause.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço especialmente a primeira pessoa que me inspirou na oncologia veterinária, meu orientador, Prof. Andriago Barboza De Nardi. Tenho muita gratidão pelo seu voto de confiança ao me aceitar como sua orientada. Prof. Andriago, eu realmente me sinto muito abençoada por fazer parte do seu grupo de pesquisa.

O senhor além de uma grande referência na oncologia veterinária, também é um grande exemplo de ser humano e me inspira a ser cada dia melhor. Gostaria de expressar toda minha admiração pela sua humildade e forma humana como trata todas as pessoas e todos os pacientes.

O senhor possui uma luz enorme que o guia e desejo de todo coração que essa luz continue brilhando sempre por caminhos maravilhosos, tanto na sua vida profissional, quanto na vida pessoal.

Posso dizer com toda certeza que essa foi a melhor escolha que fiz na vida, graças a todas as experiências que tive fazendo parte da equipe do Serviço de Oncologia Veterinária da Unesp de Jaboticabal.

Muito obrigada, de todo meu coração.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as bênçãos que ele concedeu em minha vida e por ter me guiado sempre por caminhos que me levaram a realização dos meus sonhos, pois é na fé que encontro forças nos momentos difíceis.

Agradeço a minha mãe Luzia Cleuza Bortolotti, que foi a pessoa que mais incentivou a não desistir do meu sonho de ser veterinária mesmo com todas as dificuldades que enfrentamos pelo caminho, ela sempre fez questão de que eu pudesse ter todas as oportunidades que ela não pode ter na vida. E hoje, conquistando esse título não posso deixar de oferecer esse mérito a ela também.

Agradeço ao meu pai José Luis Viéra, que mesmo não estando mais neste plano sei que me acompanha e me guia quando é necessário. Com certeza ele também foi responsável por todas as minhas conquistas até hoje e fez parte desta jornada comigo.

Agradeço ao meu irmão Leandro e minha cunhada Rafaela, por todo apoio durante esses anos e por me darem o presente mais lindo de todos, minha sobrinha Maria Luísa.

Agradeço a toda minha família pelo apoio e incentivo.

Agradeço imensamente ao meu Coorientador Dr. Lucas Campos de Sá Rodrigues. Um grande pesquisador e profissional exemplar, um ser humano incrível que tive o prazer de conhecer e trabalhar. Tenho muita gratidão por todo conhecimento que recebi através de você.

Agradeço a querida Profa Mirela Tinnuci Costa, por todos os ensinamentos durante esses anos, um grande exemplo de pessoa e profissional. A senhora é uma grande inspiração para mim.

Agradeço a Profa. Annelise Carla Camplesi que sempre me ajudou durante a pós-graduação e está fazendo parte desde momento tão importante para mim, participando da minha banca de defesa.

Agradeço ao Dr. Vladimir Spielgeman do Departamento de Oncologia Pediátrica da Pen State University por ter me recebido durante o período de intercâmbio e por ter permitido a realização de grande parte desta pesquisa em seu laboratório.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Oncologia Pediátrica da Penn State University de Hershey. Irina, Archita, Chethana, Vikash e Tylor. Sou muito grata por todo aprendizado que obtive com ajuda de vocês.

Agradeço ao Dr. Felipe Sueiro pela realização das imuohistoquímicas deste projeto e pelo aceite em participar da minha banca de defesa.

Agradeço ao Prof. Thiago Demarchi Munhoz, que me acompanha desde a graduação e agora é um grande prazer tê-lo em minha banca de defesa.

Agradeço a Dra. Livia Maria Semolin, uma pessoa a qual tenho um grande carinho e estou feliz em poder contar com você em minha banca de defesa.

Agradeço aos meus colegas que fazem ou já fizeram parte do Serviço de Oncologia Veterinária de Jaboticabal durante todos esses anos. Livia semolim, Paulo Jark, Josiane Pazzini, Marília Ferreira, Ana Pascoli, Oscar Sierra, Naziltom dos Reis, Thuanny Nazareth, Juliana Ribeiro, Igor Senhorelo, Giovanni Vargas, Gabriela Toledo, Julielton Barata, Leticia Anai, Pedro Cassino, Roana Cecília, Stella Habib, Jorge Alvarez, Bruna Sena, Aline Nakamura, Bruna Firmo, Celso Brandi, Milena Magrin, Gabriel Montanhim, Isabela Canavari e Marla Frasson. Muito obrigada pela troca de experiências e amizade.

Agradeço as amigas que tornaram tudo mais divertido e leve em Jaboticabal. Tamyris Beluque e Verônica Terrabuio, vocês são muito especiais para mim, pessoas que levam luz por onde passam.

Agradeço às minhas irmãs de Jaboticabal, Marla T. Frasson e Stella M. Habib. Vocês são maravilhosas e mulheres inspiradoras. Não posso me esquecer do nosso menino Pantufa, que também alegra meus dias. Obrigada pelas boas risadas e por compartilharem tantos momentos especiais ao meu lado.

Agradeço a minha grande Amiga Ana Pascoli, mesmo de longe sei que a nossa amizade continua forte e sincera.

Agradeço a minha as minhas grandes amigas Marília Andrade e Jéssica Barros que sempre me apoiaram e torceram por mim desde a época da graduação.

Agradeço a amiga Luísa Gouvêa, conhecê-la foi um grande presente que recebi do universo.

Agradeço a todos os funcionários do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, por contribuírem de alguma forma para a minha formação durante todos esses anos.

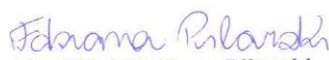
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização da função do CRD-BP no comportamento do osteossarcoma canino**", protocolo nº 019637/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 08 de fevereiro de 2018.

Vigência do Projeto	19/02/2018 a 07/12/2018
Espécie / Linhagem	Canina e murina
Nº de animais	30 amostras de Osteossarcoma canino coletadas de pacientes entre os anos de 2013 a 2015
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Amostras armazenadas em parafina produzidas no Laboratório Vet. Pat. e células adquiridas da empresa ATCC (American Type Culture Collection).

Jaboticabal, 08 de fevereiro de 2018.

  
**Profª Drª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

## **CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DO IGF2BP-1 NO COMPORTAMENTO DO OSTEOSSARCOMA CANINO**

**RESUMO** – A medicina comparativa torna-se cada vez mais importante para obtenção de estudos aprofundados em diversas áreas incluindo a oncologia, possibilitando melhor conhecimento da genética do câncer e desenvolvimentos de novas terapias. A expressão do IGF2BP-1 tem sido correlacionada com lesões pré-neoplásicas e neoplasias de maior agressividade, além de estar correlacionada com mau prognóstico em pacientes oncológicos com melanomas, sarcomas e carcinomas. A proposta geral desta pesquisa é identificar a expressão do IGF2BP-1 em linhagens celulares de osteossarcoma (OSA) canino e murino, bem como correlacionar sua expressão com o comportamento celular e avaliar a intensidade de marcação desta proteína através de imuno-histoquímica em amostras de OSA canino. Os resultados deste ensaio demonstraram que o IGF2BP-1 reduziu o potencial de formação de colônias, aumentou o potencial de invasão e migração celular e gerou aumento da expressão dos genes ABCG2, AXIN2, BTrCP, VEGF, CD133 e C-MYC em células de OSA murino. A expressão deste gene em células de cão aumentou a formação de colônias, reduziu o potencial de invasão e migração celular e o silenciamento parcial do IGF2BP-1 gerou redução da expressão dos genes CCND1, CD133, CMYC e FZD6 em células de OSA canino. O silenciamento parcial do IGF2BP-1 gerou aumento dos genes AXIN-2 e VEGF em células de OSA canino. A imuno-histoquímica é um método eficaz para detecção do IGF2BP-1 em amostras de OSA canino evidenciando marcação citoplasmática forte na maioria das amostras, por meio de análise qualitativa. Com este estudo, podemos entender melhor a complexidade genética do câncer, concluindo que o IGF2BP-1 induz a modificações epigenéticas celulares levando a alterações indutoras ou supressoras tumorais através da ativação de diversas vias que contribuem para regulação do metabolismo celular, proliferação, angiogênese, quimiorresistência entre outras características que podem contribuir para o processo de tumorigênese.

**Palavras-chave:** Oncologia veterinária, sarcoma ósseo, biologia molecular, IMP1, western blot, rt-pcr.

## **THE ROLE OF IGF2BP-1 IN THE BEHAVIOR OF CANINE OSTEOSARCOMA**

**ABSTRACT** – Comparative medicine is becoming increasingly important to obtain studies in several areas including oncology, enabling better knowledge of cancer genetics and developments of new therapies. The expression of IGF2BP-1 has been correlated with pre-neoplastic lesions and neoplasms with more aggressiveness, in addition to being correlated with poor prognosis in cancer patients with melanomas, sarcomas and carcinomas. The general proposal of this research is to identify the expression of IGF2BP-1 in canine and murine osteosarcoma (OSA) cell lines, as well as to correlate its expression with cellular behavior to evaluate the staining intensity of this protein through immunohistochemistry in samples of canine OSA. The results of this assay demonstrated that IGF2BP-1 reduced the potential for colony formation, increased cell invasion and migration potential, and increased expression of genes ABCG2, AXIN2, BTrCP, VEGF, CD133 and C-MYC in murine OSA cells lines. Expression of this gene in canine OSA cells increased colony formation, reduced potential of cell invasion and migration, and partial silencing of IGF2BP-1 generated reduced expression of the CCND1, CD133, CMYC and FZD6 genes in canine OSA cells. Partial silencing of IGF2BP-1 generated increased AXIN-2 and VEGF genes in canine OSA cells. Immunohistochemistry is an effective method for detecting IGF2BP-1 in canine OSA samples showing strong cytoplasmic staining in most of samples through qualitative analysis. In this study, we can better understand the genetic complexity of cancer, concluding that IGF2BP-1 induces cellular epigenetic changes leading to tumor-inducing or suppressive changes through the activation of several pathways that contribute to the regulation of cellular metabolism, proliferation, angiogenesis, chemoresistance among other features that may contribute to the process of tumorigenesis.

**Key words:** Veterinary oncology, bone sarcoma, molecular biology, IMP1, western blot, rt-pcr.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Osteossarcoma Canino.....	3
2.2 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF2BP-1/ CRD-BP/ IMP-1).....	7
2.3 Osteossarcoma Humano e Medicina Comparativa .....	9
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
4.1 Local de Realização do Estudo.....	12
4.2 Linhagens Celulares .....	12
4.3 Cultivo Celular.....	13
4.4 Sistema de Indução de shRNA por Lentivirus pINDUCER .....	13
4.5 Protocolo de Western Blotting.....	14
4.6 Ensaio de Potencial de Formação de Colônias .....	14
4.7 Ensaio de Invasão Celular .....	15
4.8 Ensaio de Migração celular.....	15
<b>4.9 Extração de RNA total.....</b>	<b>16</b>
4.10 Rt-pcr em Tempo Real.....	17
4.11 Software Analisador de Imagens ImageJ® .....	18
4.12 Expressão de IGF2BP-1 em Osteossarcoma Canino através de Imuno-histoquímica.....	18
4.12.1 IGF2BP-1 (D9).....	19
4.12.2 Protocolo de Imuno-histoquímica.....	19
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>21</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
6.1 Western Blot.....	22
6.2 Ensaio de Potencial de Formação de Colônias .....	24
6.2.1 K12 e K12 IGF2BP1 Ensaio de Colônias.....	24
6.2.2 Eva e Eva-shIGF2BP1 Ensaio de Colônias .....	26
6.3 Ensaio de Invasão Celular .....	27

6.3.1 K12 e K12 IGF2BP1.....	27
6.3.2 Eva e Eva shIGF2BP1 .....	28
6.4 Ensaio de Migração Celular .....	30
6.4.1 K12 e K12IGF2BP1.....	30
6.4.2 Eva e Eva shIGF2BP-1 .....	32
6.5 Rt-PCR em Tempo Real.....	34
6.5.1 K12 e K12 IGF2BP-1 .....	34
6.5.2 Eva e Eva shIGF2BP-1 .....	35
6.6 Imuno-histoquímica .....	36
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O IGF2BP-1 (Insulin-like Growth Factor 1), também conhecido como CRD-BP (Coding Region Determinant Binding Protein) ou IMP-1 (Mrna-Binding Protein-1) é uma proteína multifuncional envolvida em diversos processos celulares, como reversão, controle de transdução e localização do RNA mensageiro (mRNA).

Durante o período de desenvolvimento embrionário, o IGF2BP-1 é expresso naturalmente, sendo sua presença essencial para promover a regulação de transcrições da embriogênese. Após este processo, a expressão do IGF2BP-1 torna-se baixa ou ausente em tecidos adultos normais.

O IGF2BP-1 vem sendo estudado por diversos pesquisadores de diferentes áreas que identificaram atividades importantes desempenhadas por esta proteína durante os processos de embriogênese, carcinogênese e quimiorresistência tumoral. O aumento da expressão do IGF2BP-1 foi observado em lesões pré-neoplásicas e neoplasmas de maior agressividade, correlacionando a presença deste gene com um pior prognóstico em pacientes oncológicos.

Alguns mRNAs têm sido associados com diversos processos celulares de diferenciação, migração e invasão celular, implicando no desenvolvimento neoplásico, devido a estimulação de vias que induzem o processo de tumorigênese.

O osteossarcoma (OSA) é a neoplasia óssea mais frequente nos humanos e nos cães. O comportamento biológico e genes envolvidos no desenvolvimento do OSA é um fator em comum em ambas as espécies, sendo a invasão óssea de rápida evolução e alto índice de metástases características que tornam o prognóstico desta neoplasia pobre. O tratamento cirúrgico para ressecção da lesão associado à quimioterapia são considerados atualmente a terapia mais eficaz no controle do OSA.

O entendimento de novas vias relacionadas com o desenvolvimento e a evolução do OSA em cães é uma chave fundamental para promover novas modalidades terapêuticas proporcionando resultados mais eficazes no controle desta doença. Além disso, as características semelhantes entre o OSA em humanos e nos cães faz da espécie canina um excelente modelo de estudo da

doença para a medicina, principalmente por apresentarem alta incidência, com comportamento biológico mais acelerado, proporcionando estudos em tempos mais curtos.

A medicina comparativa torna-se cada vez mais importante para obtenção de estudos aprofundados em diversas áreas incluindo a oncologia. Além dos cães, modelos murinos também contribuem para estudos de OSA, pois possibilitam um entendimento de como diferentes alterações na expressão gênica participam no processo de desenvolvimento e comportamento neoplásico. Além disso, a espécie também possibilita o desenvolvimento de linhagens mutantes com a presença ou ausência de um gene específico, possibilitando melhor conhecimento da genética do câncer e desenvolvimentos de novas terapias.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Osteossarcoma Canino

O osteossarcoma (OSA) é a neoplasia óssea primária mais frequente no cão, com incidência maior que 85% das neoplasias ósseas (EHRHART; RYAN; FAN, 2013; WYCISLO; FAN, 2015). Ocorre principalmente nas raças grandes e gigantes como o Rottweiler, Pastor Alemão, Boxer, Doberman Pinscher e Setter Irlandês (MISDORP; HART, 1979; SPODNICK et al. 1992; BERG 1996; CAVALCANTI et al. 2004; MORELLO et al. 2011; GARDINALLI; MARTELLI, 2015).

A etiologia do OSA não é cientificamente caracterizada, entretanto, algumas hipóteses são citadas. Entre elas fatores predisponentes como peso corporal e sexo. Cães maiores que 40kg são mais propensos a desenvolverem OSA quando comparados com cães menores (Bergman et al., 1996). A maioria dos estudos reportam que a incidência de OSA em machos é maior quando comparado às fêmeas (BRODEY; ABT 1976; JONGEWARD 1985; POOL 1990; SELVERAJAH; KIRPENSTEIN 2010).

Contudo, essa informação se contradiz em outros estudos que referem que as fêmeas também estão predispostas (COOLEY et al., 2002). O mesmo autor refere correlação entre castração precoce e aumento do fator de risco no desenvolvimento do OSA citando que machos e fêmeas castrados com idade inferior a 1 ano estão mais propensos ao desenvolvimento de sarcomas ósseos em relação a machos e fêmeas sexualmente intactos. Os autores também relataram uma relação inversa entre a duração da exposição gonadal ao longo da vida do cão e aumento da incidência de OSA, independente do tamanho ou peso corporal do adulto.

A possibilidade da participação viral, no desenvolvimento do OSA é descrita devido à ocorrência em ninhadas de cães e indução experimental de OSA através de injeção de células tumorais em fetos caninos. Contudo, nenhum agente viral que promova o aparecimento do OSA foi isolado até o momento. Outra hipótese é a ocorrência de OSA em ossos que sustentam maior peso corporal, pois estes

estão mais propensos a sofrerem pequenos traumas de forma contínua ao longo da vida, principalmente nas regiões metafisárias, sendo essa região de maior atividade celular. Essa suposição conclui que essas células mais sensibilizadas são predispostas a apresentarem algum sinal de mutação devido à injúria sofrida continuamente (DALECK et al., 2013).

Fatores associados ao surgimento do OSA também incluem presença de lesões ósseas benignas como osteomielites, displasia fibrosa e infarto ósseo. Além disso, o uso de implantes metálicos e fraturas não tratadas estão relacionados com aumento do risco de desenvolvimento de OSA (RUBIN; FARBER, 2002; DALECK et al., 2013).

Cães de meia idade, entre 6 e 10 anos são os mais acometidos pelo OSA (THOMPSON; POOL 2002; MORELLO et al. 2011), entretanto, pacientes caninos mais jovens, principalmente entre 18 e 24 meses de idade também podem apresentar a doença (MISDORP; HART, 1979).

O OSA é histologicamente caracterizado como um neoplasma composto por células mesenquimais malignas originadas de células tronco ou linhagens osteoblásticas que produzem matriz osteoide (THOMPSON, 2008). Sua classificação apresenta alguns subtipos, de acordo a análise morfológica e características de diferenciação das células neoplásicas, sendo, osteoblástico, fibroblástico, condroblástico, telangiectásico, epitelial, pequenas células e células gigantes (FLETCHER; UNNI; MERTENS, 2002; THOMPSON; POOL, 2008; THOMPSON, 2008). Acredita-se que o OSA se desenvolve primariamente do osteoblasto, mas que tendem a uma diferenciação em outros tecidos fibrosos caracterizando os diversos subtipos apresentados (WILSON et al., 2008).

A localização mais comum vista nos cães é o esqueleto apendicular (75%), seguido do esqueleto axial (25%). A porção distal do rádio e proximal do úmero são os dois sítios mais frequentes do OSA canino. Os membros torácicos são mais acometidos em relação aos membros pélvicos, na proporção de 2:1. Essa ocorrência provavelmente está relacionada à maior sobrecarga de peso, pois os membros torácicos suportam 60% do peso corporal (MOORE, 2001). Além disso, uma maior frequência do surgimento de OSA é observada em regiões de alto índice de proliferação celular, conhecidas como regiões metafisárias, as quais são

localizadas nas extremidades dos ossos longos (MISDORP; HART, 1979; WHIROW, 2013). O OSA primário em costelas possui maior incidência em cães mais jovens entre 4,5 a 5,4 anos de idade (FEENEY et al., 1982; HEYMAN et al., 1992).

Os achados clínicos podem variar de acordo com a localização do neoplasma. Durante o exame físico, observa-se neoformações de consistência firme à palpação (DAVID et al., 2003). Lesões localizadas no esqueleto apendicular provocam claudicação, dor à palpação e aumento de volume quando ocorre acometimento de tecidos moles adjacentes (BRODEY, 1979). Em alguns casos, o OSA pode ser descoberto devido à ocorrência de fratura patológica ou em radiografias de rotina (BRASILEIRO FILHO, 2000). A presença de fratura espontânea em casos de OSA é um achado frequente e sua causa está relacionada à lise da região cortical que fragiliza o osso, levando a este quadro (DALECK et al., 2013). A dor é o principal sinal clínico nesses pacientes (CAMARGO; BAPTISTA, 2004).

O diagnóstico do OSA é baseado no exame físico, radiografia da lesão e punção biópsia aspirativa que contribui para direcionamento da origem da lesão (THOMPSON; POOL, 2002). Além disso, quando há suspeita de OSA recomenda-se realização de radiografias torácicas em três projeções devido à alta incidência de metástases pulmonares. Exames hematológicos são recomendados principalmente como pré-requisitos para pacientes que serão submetidos à cirurgia. Nos casos em que opta-se pela cirurgia com preservação do membro, tomografia computadorizada deve ser realizada para melhor mensuração das margens cirúrgicas. O diagnóstico definitivo é realizado através de biópsia óssea e exame histopatológico (CAMARGO; BAPTISTA, 2004; DALECK et al., 2013).

O tratamento do OSA pode incluir cirurgia, tanto com amputação do membro como com preservação, quimioterapia e radioterapia (BOSTON et al., 2006). A remoção do foco primário da doença é o tratamento mais indicado para promover o controle local da dor no paciente. A técnica de amputação do membro é a mais utilizada na medicina veterinária, pois apresenta uma menor taxa de complicações no pós-operatório, além de redução do tempo anestésico quando comparado com a cirurgia de preservação do membro (SPODNICK et al. 1992;

THOMPSON; POOL 2002; JEHN et al., 2007; SELVARAJAH; KIRPENSTEJIN 2010).

A cirurgia com preservação do membro, ou “Limb Sparing” é indicada principalmente em casos de pacientes com outras afecções concomitantes no esqueleto, por exemplo, displasias, doenças articulares e obesidade, ou ainda nos casos em que os tutores do paciente são relutantes à amputação do membro (JEHN et al., 2007).

Diversos estudos foram realizados para avaliar a eficácia da quimioterapia no tratamento do OSA, demonstrando que os agentes antineoplásicos mais eficientes no controle deste neoplasma são a cisplatina, carboplatina e a doxorubicina (BERG 1996; MOORE et al., 2007; PHILLIPS et al., 2009; SKORUPSKI et al. 2013).

A radioterapia associada à quimioterapia possui resultados satisfatórios em cães, promovendo aumento do tempo médio de sobrevida. Entretanto, é considerada como um tratamento paliativo no OSA, promovendo controle da dor, aumento da funcionalidade do membro com consequente melhora na qualidade de vida do paciente. O custo e a necessidade de anestesiá-lo para o procedimento são fatores limitantes para maior uso desta modalidade de tratamento na rotina oncológica (OBLAK et al., 2012).

## 2.2 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF2BP-1/ CRD-BP/ IMP-1)

O IGF2BP-1 que também é conhecido como CRDBP ou IMP-1 é uma proteína multifuncional que se liga ao RNA mensageiro (mRNA), levando a sua estabilização, determinando sua localização e translação (NIELSEN; NIELSEN; CHRISTIANSEN, 2001; YANIV; YISRAELI, 2002). Essa proteína de ligação de RNA está envolvida em diferentes processos celulares, bem como reversão do mRNA, controle de transdução e localização (IOANNIDIS et al., 2004).

A expressão normal do IGF2BP-1 ocorre em tecidos fetais e neonatais, de modo que, sua presença durante a fase de desenvolvimento embrionário é essencial para promover a regulação de transcrições do processo de embriogenese (CHRISTIANSEN et al., 2009), por outro lado, a expressão do IGF2BP-1 em tecidos adultos é baixa ou ausente (PROKIPCAK; HERRICK; ROSS, 1994; SPIEGELMAN).

A expressão do IGF2BP-1 tem sido correlacionada com algumas formas agressivas de câncer (IOANNIDIS et al., 2003; IOANNIDIS et al., 2004; GU; SHIGEMASA; OHAMA, 2004). Um estudo avaliando diferentes neoplasmas observou expressão do IGF2BP-1 em 72% dos sarcomas e 40% em tecidos hiperplásicos incluindo tecido ósseo, indicando que a presença deste gene é um evento que antecede uma transformação maligna (IOANNIDIS et al., 2001). O IGF2BP-1 também está amplificado em um terço dos casos de carcinoma mamário em humanos, sugerindo sua participação no processo de carcinogênese (DOYLE et al., 2000).

A regulação da expressão do IGF2BP-1 parece ser crítica para o controle adequado de seus alvos e sua superexpressão pode desempenhar um papel importante na proliferação celular anormal, supressão de apoptose, invasão e metástase. Mecanismos que regulam a expressão do IGF2BP-1 ainda não são completamente entendidos (DOYLE et al., 2000; IOANNIDIS et al., 2003).

Foi comprovado que o IGF2BP-1 aumenta a expressão de alguns genes, entre eles c-myc (NOUBISSI et al., 2006),  $\beta$ -TrCP1 (PROKIPCAK; HERRICK; ROSS, 1994), MDR1 (SPARANESSE; LEE, 2007) e GLI1 (NOUBISSI et al., 2009). Além disso, o IGF2BP-1 participa da regulação pós-transcricional de outras

transcrições, como ALCAM, AMIGO2, CD24, colágeno V,  $\alpha$ 1, disaderina, queratina 19, lumican, MMP1, MCAM e synCAM. Essas transcrições codificam proteínas envolvidas na adesão celular, invasão e remodelação da matriz extracelular (VIKESAA et al., 2006).

Noubissi et al. (2010), concluiu que o IGF2BP-1 desempenha um papel importante na desregulação da atividade do c-myc. Alterações nas atividades do c-myc têm sido apontadas como chave fundamental para o processo de tumorigênese em diversos tipos de câncer. A inibição do IGF2BP-1 pode reverter os efeitos do c-myc nessa condição e/ ou outras condições com desregulação da atividade c-myc e expressão de IGF2BP-1.



### 2.3 Osteossarcoma Humano e Medicina Comparativa

O OSA é a neoplasia óssea mais frequente em humanos, ocorrendo principalmente durante a juventude. O sexo masculino possui maior predisposição a este neoplasma e, existem evidências de que crianças negras são mais acometidas em relação às caucasianas. Uma relação entre o rápido crescimento ósseo e o desenvolvimento de OSA é sugerida, pois nota-se que a maioria dos pacientes que apresentam este neoplasma superam a altura estimada para sua idade. Esta informação é semelhante ao observado nos cães, de modo que, o risco de desenvolvimento de OSA é maior em raças de grande porte (PIZZO; POPLACK, 2005).

Um estudo realizado nos Estados Unidos refere que o OSA corresponde a 5% dos cânceres que ocorrem durante a infância. Mais de 15% dos pacientes apresentam metástases pulmonares detectadas clinicamente e estima-se que aproximadamente 80% dos pacientes apresentam micrometástases no momento do diagnóstico. O avanço em terapias antineoplásicas durante os últimos anos, contribuiu para aumento do tempo de sobrevivência dos pacientes, aonde aproximadamente 70% ultrapassam 5 anos, entretanto, o prognóstico do OSA continua sendo reservado em virtude do seu comportamento biológico agressivo (JAFE, 2009).

O cão é um modelo de estudo em pesquisas translacionais de oncologia devido à semelhança biológica com os seres humanos no desenvolvimento espontâneo de neoplasias, bem como sua similaridade genética e alterações moleculares que predispõe ao desenvolvimento do câncer, de modo que, as duas espécies compartilham as mesmas características como presença de doença microscópica ao diagnóstico, resposta terapêutica com a cirurgia e quimioterapia, e principalmente por apresentarem vias moleculares semelhantes no desenvolvimento neoplásico (VAIL, 2000; PALONI; KHANNA, 2008).

A maior incidência do OSA em cães e o menor ciclo de vida comparado aos humanos fazem desta espécie um modelo ainda mais apropriado para evolução dos estudos desse câncer na medicina humana. Muitos esforços têm sido realizados para melhorar a sobrevivência e aumentar a cura dos pacientes,

porém poucas mudanças foram observadas nos últimos 20 a 30 anos (CAUDILL; ARNDT, 2007).

### 3. OBJETIVOS GERAIS

A proposta geral desta pesquisa é identificar a expressão do IGF2BP-1 em linhagens celulares de OSA canino e murino, bem como correlacionar sua expressão com o comportamento celular e avaliar a intensidade de marcação desta proteína através de imuno-histoquímica em amostras de OSA canino.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a expressão de IGF2BP-1 em linhagens celulares de cão e camundongo através de western blot;
- ✓ Realizar a superexpressão e o nocaute do IGF2BP-1 em linhagens celulares de cão e camundongo para obtenção de dois grupos de cada espécie;
- ✓ Realizar ensaios de comportamento celular comparando linhagens celulares com alta e baixa expressão do IGF2BP-1;
- ✓ Avaliar a expressão de genes associados ao aumento da expressão do IGF2BP-1 através de rt-pcr;
- ✓ Padronizar a marcação imuno-histoquímica do IGF2BP-1 em amostras de OSA canino.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local de Realização do Estudo**

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais, sob o protocolo nº019637/17, Jaboticabal/SP.

As amostras de osteossarcoma canino utilizadas neste estudo são provenientes de pacientes atendidos na rotina do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), câmpus de Jaboticabal entre os anos de 2012 a 2016. No momento do estudo as amostras encontravam-se em blocos de parafina confeccionados e armazenados no banco de dados do laboratório de Análises Clínicas Veterinário Vetpat em Campinas – SP.

As análises imuno-histoquímicas (IHQ) foram realizadas através das mesmas amostras referidas acima, obtidas no banco de dados do laboratório de Análises Clínicas Veterinário Vetpat em Campinas – SP.

Os ensaios de cultivo celular foram realizados na Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, no Laboratório do Departamento de Oncologia Pediátrica.

### **4.2 Linhagens Celulares**

A linhagem murina K12 possui origem de uma variação metastática pulmonar da linhagem K7M2 (ATCC®CRL-2836™) e as linhagens de OSA canino Eva (UWKOS1); Payton (UWKOS3) e Dakota. Todas foram obtidas no banco de dados do Laboratório de Oncologia Pediátrica da Penn State University, Hershey.

A expressão do IGF2BP-1 foi analisada em todas as linhagens celulares através de western blot e Rt-pcr em tempo real a fim de selecionar quais seriam utilizadas posteriormente nos ensaios de comportamento celular.

### 4.3 Cultivo Celular

As linhagens celulares de OSA murino (K12 e K7M2) foram adquiridas da empresa ATCC (American Type Culture Collection), enquanto as linhagens OSA canino (Eva, Payton e Dakota) foram obtidas no banco de células da Penn State University, Hershey.

As células foram cultivadas em meio McCoy's suplementado com 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) e 1% de penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a adesão e confluência em monocamada, conforme descrito (DALTON *et al.*, 1983).

A expressão do IGF2BP-1 foi analisada em todas as linhagens citadas através de western blot, com intuito verificar quais linhagens expressavam o gene naturalmente e quais não expressavam, para posteriormente ser realizado o nocaute ou a indução da expressão gênica obtendo assim uma linhagem celular de OSA murino e uma de OSA canino, em versões com alta e baixa expressão do IGF2BP-1, para realização dos experimentos de comportamento celular.

### 4.4 Sistema de Indução de shRNA por Lentivirus Pinducer

O silenciamento genético, bem como a superexpressão do IGF2BP-1 foi realizado pelo método pINDUCER11, através do kit pInducer11-mir-RUP-PheS (Addgene plasmid # 44363), desenvolvido por Meerbray, *et al.* (2011). Este sistema é capaz de codificar as células com o gene de interesse por meio de lentivírus. Uma vez infectada, a célula é ativada após adição de doxiciclina (DOX) ocorrendo assim transcrição do DNA ou RNA de interesse. Um indicador fluorescente (GFP) constitutivo foi utilizado para isolar e quantificar as populações celulares induzidas geneticamente. Esta técnica de modificação celular foi realizada pelos pesquisadores do Laboratório de Oncologia Pediátrica da Penn State University previamente a realização deste estudo.

#### 4.5 Protocolo de Western Blotting

Para isolar as proteínas, células foram lisadas com solução tampão gelada RIPA (PROMAB Biotechnology, EUA) contendo 1X da mistura de inibidores de protease. As concentrações de proteína foram determinadas utilizando o ensaio de Bradford (Bio-Rad, Filadélfia, PA, EUA) em quantidades equivalentes de proteína de 30µg em cada poço, separadas por gel de SDS-PAGE a 10%. Em seguida, realizou-se eletro transferência para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). Após o processo de transferência das proteínas do gel para a membrana, realizou-se bloqueio com TBS 5% de leite em pó magro e as membranas foram incubadas com anticorpo (IMP-1/ IGF2BP-1/ RabbitmAb - CellSignaling, Cat nº D33A2; diluição 1:1000; e beta-Actin/ RabbitmAb – CellSignalingCat nº 13E5; diluição 1:2000) diluídos em solução de bloqueio e mantidos durante a noite sob 4°C em movimentação. Neste caso o marcador angiogênico beta-Actin foi utilizado como controle, para comprovar a mesma quantidade de proteína em todos os poços do gel.

Após incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-Tween 20 (TBST). Posteriormente, foi realizada incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano IgG (HRP) de cabra anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a diluição de 1:2000 em solução de bloqueio durante 1 hora à temperatura ambiente, sob movimentação.

As membranas foram lavadas novamente em TBST durante três vezes à temperatura ambiente e por último foram adicionados os reagentes de detecção para posterior revelação das imagens. As bandas de proteína foram visualizadas no filme de raio-X utilizando um sistema de detecção por quimioluminescência aumentada (ECL; Beyotime, Xangai, China).

#### 4.6 Ensaio de Potencial de Formação de Colônias

Neste estudo, linhagens celulares de camundongo (K12-IGF2BP1 e K12) e de cão (EVA e EVA-shIGF2BP1), possuindo alta e baixa expressão de IGF2BP1 respectivamente, foram cultivadas em placas de 100mm e após a confluência foi

realizada formação do pellet através de centrifugação. As células foram resuspensas em 2ml de meio de cultivo celular e em seguida diluídas e coradas com solução de typan blue para contagem em câmara de Neubauer. O número de células por ml foi mensurado através do seguinte cálculo:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ células contadas}}{\text{n}^{\circ} \text{ quadrantes (4)}} \times 10^6 = \text{n}^{\circ} \text{ células por ml}$$

Após saber o número de células por ml, foi realizada diluição para obtenção de 100 células, que foram semeadas em placas de 6 poços, mantidas em incubadora 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até a formação das colônias. Cada colônia é definida por constituir pelo menos 50 células.

Ao término do experimento, as colônias foram fixadas com metanol e coradas com Violeta Cristal a 1% para posterior contagem. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.7 Ensaio de Invasão Celular**

No ensaio de invasão celular, as linhagens Eva e K12 foram contadas para determinar a densidade de  $0,5 \times 10^6$  células, que foram dispostas em cada poço revestido com matriz de colágeno no fundo. As células foram dispostas em meio McCoy's livre de soro fetal bovino. Abaixo do poço de matriz colágena havia um poço maior com meio de cultivo McCoy's a 5% de FBS utilizado com quimioatrativo. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células que invadiram a matriz de colágeno foram fixadas e coradas com solução violeta cristal e dispostas em lâminas de microscópio.

#### **4.8 Ensaio de Migração celular**

O protocolo de migração celular baseou-se na metodologia descrita pelo kitRadius™ 96-Well Cell Migration Assay. O kit de ensaio de migração celular

continha uma placa constituída por 96 poços para monitorar as propriedades migratórias das células. Cada poço apresentava em seu centro uma membrana de hidrogel biocompatível, não tóxica, medindo 0,68 mm onde as células não conseguiam aderir.

Neste estudo foram utilizadas as linhagens celulares de camundongo (K12-IGF2BP1 e K12) e de cão (EVA e EVA-shIGF2BP1), possuindo alta e baixa expressão de IGF2BP1 respectivamente. As células foram quantificadas e dispostas a  $0,2 \times 10^6$  células em cada poço e deixadas durante a noite para que aderissem à placa. Após aderência das células, foi realizada a remoção do gel, conforme o protocolo descrito por Radius™ Gel Removal.

Após remoção do gel, foi permitido o processo de migração durante 24 horas. Ao término deste processo, as células foram fixadas e coradas conforme as instruções do kit e posteriormente analisadas em programa analisador de imagens (ImageJ). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.9 Extração de RNA total**

Células de OSA murino e canino com alta e baixa expressão de IGF2BP-1 foram contadas e coletadas através de centrifugação a 1.850 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Foi adicionado 1 ml de TRIzol para cerca de  $5-10 \times 10^6$  células, homogeneizado com uma pipeta. Incubou-se por 5 minutos sob temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio, agitando vigorosamente por 15 segundos, seguido de repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000xg por 15 minutos a 4°C.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo previamente esterilizado. Adicionou-se 500 µl de isopropanol e incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e homogeneizou-se em vortex, suavemente, por 15 segundos. Centrifugou-se a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi colocado para secar por 15 minutos sob temperatura



ambiente e dissolvido em 50 µl de água tratada com DEPC (Chomczynski&Sacchil, 1987).

#### 4.10 Rt-pcr em Tempo Real

O PCR em tempo real foi utilizado para a análise da expressão gênica dos genes, IGF2BP-1, ABCG2, AXIN2, BTrCP, VEGF-a, CD133, CMYC, CCND1 e o GLI-1 para células de OSA murino (K12) e avaliação da expressão dos genes CCND1, CD133, CMYC, FZD6, AXIN-2 e VEGF para células de OSA canino (EVA).

Utilizou-se a metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. A expressão de cada RNAm foi normalizada em relação a expressão do gene da  $\beta_2$ -microglobulina. De acordo com instruções do fabricante do aparelho “Rotor-Gene RG 3000” (CoberttResearch), os ensaios foram realizados em duplicata e a variação no valor de CT (Cyclo of Threshold) entre as duplicatas não ultrapassaram 0,5. Todos os ensaios utilizaram amostra referência e um controle de amplificação ao qual não foi adicionada amostra.

Os experimentos PCR em tempo real foram realizados utilizando-se 250ng/µl de RNA e o SuperScript III Platinum SYBER Green One-StepqRT-PCR Kit (Invitrogen), em volume final de 12,5µl. A condição usual de programação dos ciclos foi 50°C por cinco minutos para síntese de cDNA, 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Foi realizada curva de dissociação no intervalo de variação de temperatura 50 a 99°C, sendo 1°C por etapa de 30 segundos.

Para calcular a quantificação relativa foi utilizado o método  $\Delta\Delta C_T$ , que utiliza a seguinte fórmula:  $\Delta C_T = C_T$  gene alvo –  $C_T$  gene endógeno,  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$  do gene alvo -  $\Delta C_T$  do gene endógeno. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livaket *al.*, 2001).

#### 4.11 Software Analisador de Imagens ImageJ®

O ImageJ® é um software processador e analisador de imagens em Java de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health (Bethesda, Maryland, USA). As imagens das amostras das células foram registradas por uma câmera digital Nikon acoplada a um microscópio com uma objetiva de 40x e transferidas para o computador. Realizou-se seleção das imagens desejadas para quantificação das células através de análise de partículas, bem como análise de área de proliferação celular.

#### 4.12 Expressão de IGF2BP-1 em Osteossarcoma Canino através de Imuno-histoquímica

Um total de 25 amostras de OSA canino, obtidas na rotina do Hospital veterinário “Governador Laudo Natel”, na Unesp de Jaboticabal entre os anos de 2012 a 2016 foram processadas para análise histológica convencional em blocos de parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo<sup>1</sup>, com espessura de 2 µm, na sequência, ficaram em estufa<sup>2</sup> overnight à 37°C, após realizou-se hidratação em diluições crescentes de álcoois<sup>3</sup> e diafanização em xilol<sup>4</sup>, e procedeu-se as colorações específicas.

Os cortes foram corados pelo método histoquímico para posterior análise em microscopia óptica. Utilizou-se Hematoxilina & Eosina para confirmação do diagnóstico de osteossarcoma. Para o estudo imuno-histoquímico, os cortes foram estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxi-silano, Sigma Chemical C.O., USA). Os cortes obtidos foram encaminhados para processamento do IGF2BP-1 (D9) para avaliação da expressão gênica de Insulin

---

<sup>1</sup> Micrótomo rotativo RM2036, Leica Biosystems- Carnaxibe- Portugal.

<sup>2</sup> Estufa Universal – Memmert Azores – Portugal.

<sup>3</sup> Etanol absoluto - Merck Millipore Corporation - Darmstadt, Germany.

<sup>4</sup> Xilol – Quimidrol – Joinville – Santa Catarina – Brasil.

like growth factor 2 mRNA binding proteins (IGF2BP-1) em amostras de osteossarcoma canino.

#### **4.12.1 IGF2BP-1 (D9)**

A imunomarcção da expressão de IGF2BP-1 em osteossarcoma canino foi avaliada pelo anticorpo monoclonal IGF2BP-1 (D19/ Santa Cruz). A absorção do reagente IGF2BP-1 (D19/ Santa Cruz) pelas células após reação com as células neoplásicas foi imunomarcada pelo método do Kit Polímero<sup>5</sup>.

#### **4.12.2 Protocolo de Imuno-histoquímica**

As lâminas foram desparafinadas em imersões com xilol<sup>4</sup>I por 10 minutos, Xilol<sup>4</sup>II por 5 minutos, ambos em temperatura ambiente. Ato contínuo, realizou-se imersões em álcool absoluto<sup>3</sup> I,II,III (100%, 90% e 70% respectivamente, e temperatura ambiente), após, as lâminas foram submetidas à lavagem em água corrente por 10 minutos. A seguir, realizou-se a recuperação antigênica com solução Retrivel pH9, em Banho-maria, por 30 minutos. Na sequência, procedeu-se bloqueio da peroxidase endógena, com incubação em cuvetes, durante 20 minutos com Peróxido de Hidrogênio<sup>6</sup> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comercial à 30% a 10% em Metanol). Ato contínuo, realizou-se duas lavagens em TBS<sup>7</sup>, com intervalo de cinco minutos em cada lavagem. Em câmara úmida realizou-se incubação com Protein Block do Kit<sup>6</sup> (Soro normal), por 5 minutos. A seguir, realizou-se incubação em câmara úmida do IGF2BP-1 (D-9): sc-166344., para identificação de IGF2BP-1 nas diluições de 1:100, durante 120 minutos.

Ao término do período de incubação do anticorpo, realizou-se duas lavagens em TBS, com intervalo de cinco minutos em cada lavagem. Novamente em câmara úmida, procedeu-se emprego do soro de ponto com Post Primary do

---

<sup>5</sup> Novolink<sup>tm</sup> Polymer Detection Systems - Leica Biosystems New Castle Ltd- United Kingdom.

<sup>6</sup> Novolink<sup>tm</sup> Polymer Detection Systems Protein Block - Leica Biosystems New Castle Ltd- United Kingdom.

<sup>7</sup> Novolink<sup>tm</sup> Polymer Detection Systems Post Primary - Leica Biosystems New Castle Ltd- United Kingdom.

Kit<sup>7</sup>, durante 30 minutos. Após, realizou-se duas lavagens em TBS, com intervalo de cinco minutos em cada lavagem. Na sequência, realizou-se incubação do Polímero<sup>8</sup>, em câmara úmida, por 30 minutos.

Posteriormente, realizou-se duas lavagens em TBS, com intervalo de cinco minutos em cada lavagem, e procedeu-se coloração por 5 minutos com o cromógeno DAB (Diaminobenzidina)<sup>9</sup>. A seguir, procedeu-se lavagem em água corrente por 10 minutos, e após, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Mayer<sup>10</sup> por 30 segundos, e novamente submetidas à lavagem em água corrente por 10 minutos. Ao término, as lâminas foram desidratadas em diluições crescentes de álcoois e diafanizadas em xilol<sup>4</sup>, e procedeu-se montagem para análise em microscópio<sup>11</sup>.

Foi realizada análise qualitativa das lâminas de OSA canino, avaliando a intensidade de marcação das células entre forte, moderada, fraca e não marcada. Os resultados foram expostos através da percentagem de cada classificação das amostras.

---

<sup>8</sup> Novolink<sup>tm</sup> Polymer Detection Systems Polymer - Leica Biosystems New Castle Ltd- United Kingdom.

<sup>9</sup> Diaminobenzidine (DAB) Enhanced Liquid Substrate System tetrahydrochloride - Sigma aldrich – Ontário – Canadá.

<sup>10</sup> Mayer's hemalum solution - Merck KGaA – Darmstad – Germany.

<sup>11</sup> Microscópio Nikon eclipse – E200

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

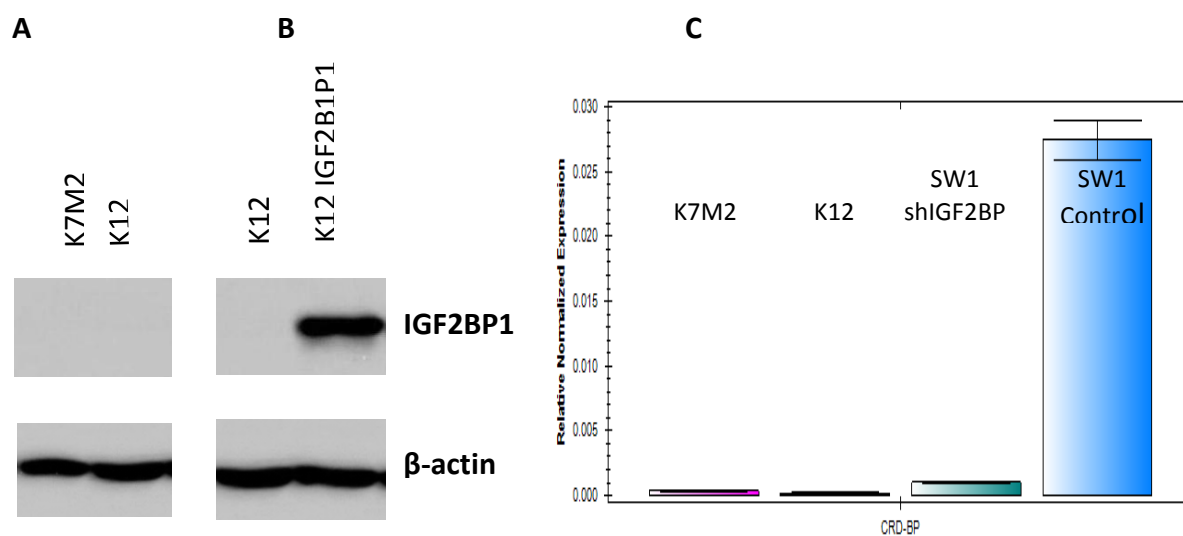
Os resultados foram analisados através do teste de Mann-whitney para determinação das médias entre linhagens celulares com alta ou baixa expressão do IGF2BP-1 utilizando o software Prism5, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA. Resultados de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Western Blot

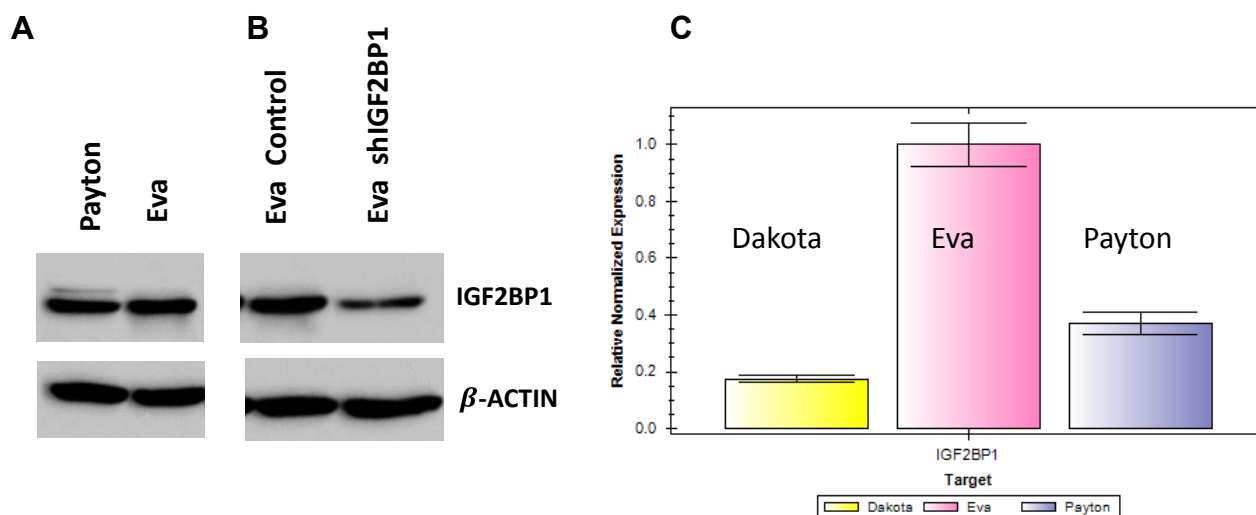
Duas linhagens celulares K12 e K7M2, ambas derivadas de OSA metastáticos espontâneos de camundongos Balb, demonstraram ausência de IGF2BP1, conforme evidenciado no leque de proteínas do western blot (Figura 1A). A indução da expressão gênica através do mRNA IGF2BP1 na linhagem celular K12, promoveu a expressão do IGF2BP1 após tratamento com doxiciclina (Figura 1B).

As expressões de K7M2 e K12 foram comparadas com linhagens celulares de melanoma murino (SW1), utilizadas como controle demonstrando alta expressão em SW1 IGF2BP1 e baixa expressão em SW1 shIGF2BP1 (Figura 1.C). A padronização das proteínas foi através do marcador angiogênico  $\beta$ -Actin.



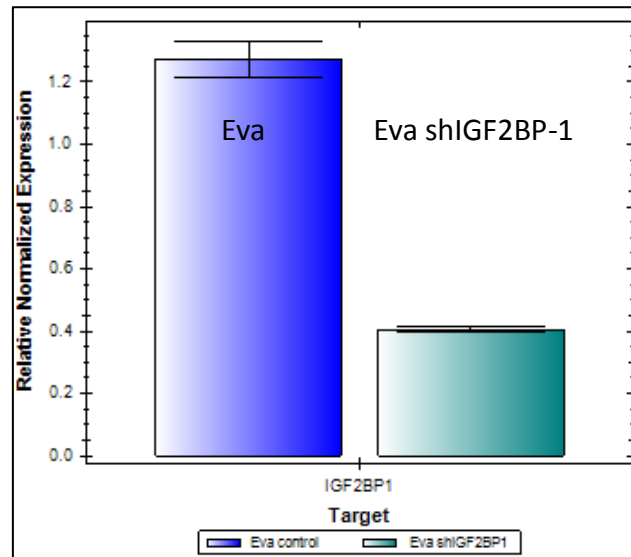
**Figura 1.** Expressões de K7M2 e K12 procedentes da American Type Culture Collection (ATCC). A) Leque de proteína determinado por western blot, evidenciando baixa expressão de IGF2BP1 em duas linhagens murinas metastáticas de osteossarcoma, K12 e K7M2. B) Indução do IGF2BP1 na linhagem celular K12, evidenciando a ausência da expressão do IGF2BP1 em células não tratadas e a presença da expressão gênica em K12 IGF2BP1 Over. C) Expressão do mRNA IGF2BP1 de K7M2 e K12 comparadas com células de melanoma murino SW1, demonstrando alta expressão de IGF2BP1 e baixa expressão em shIGF2BP1. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

As linhagens celulares Payton e Eva de osteossarcoma canino foram cultivadas e as proteínas analisadas através do protocolo de western blot (Figura 2A), evidenciando a presença de IGF2BP1 em ambas. A linhagem Eva foi selecionada para indução do silenciamento genético, a qual apresentou redução parcial da expressão do IGF2BP (Figura 2B). As proteínas foram padronizadas com o marcador angiogênico  $\beta$ -Actin. A expressão do IGF2BP1 foi quantificada em gráfico, demonstrando três diferentes linhagens celulares de osteossarcoma canino, Dakota, Eva e Payton (Figura 2C).



**Figura 2.** Expressões de Dakota, Eva e Payton procedentes American Type Culture Collection (ATCC) Expressão de IGF2BP1 em linhagens celulares primárias de osteossarcoma canino. A) Western blot de 2 linhagens celulares de osteossarcoma primário canino, Payton e Eva. B) Wester blot de Eva controle e Eva shIGF2BP1. C) Expressão do mRNA IGF2BP1 em 3 linhagens celulares diferentes de osteossarcoma canino, Dakota, Eva e Payton. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

Após a técnica de silenciamento genético na linhagem Eva, o mRNA IGF2BP1 foi mensurado, evidenciando redução parcial do IGF2BP1 em relação a expressão normal, conforme a Figura 3.



**Figura 3.** Representação gráfica da expressão do mRNA IGF2BP-1 em linhagem celular Eva controle e Eva shIGF2BP1. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

Posteriormente à obtenção das linhagens celulares murina (K12) e canina (Eva), com alta e baixa expressão de IGF2BP1, os ensaios de comportamento celular foram realizados.

## 6.2 Ensaio de Potencial de Formação de Colônias

### 6.2.1 K12 e K12 IGF2BP1 Ensaio de Colônias

Foi observado formação de colônias após 72 horas de cultivo celular em placa de seis poços, na concentração de 100 células. Cada colônia era composta por no mínimo 50 células, quantificadas sob microscopia óptica de luz após coloração com violeta cristal.

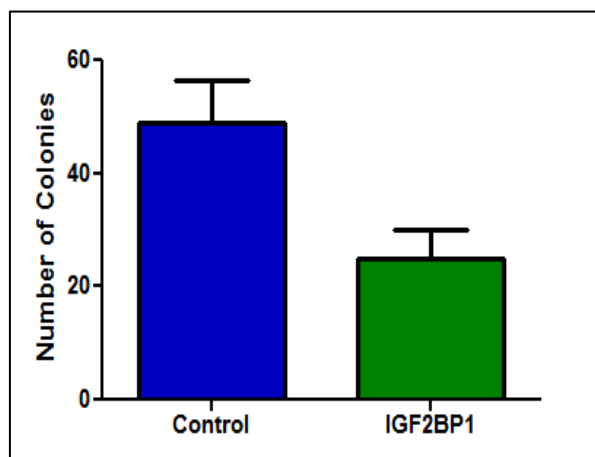


Os cálculos foram baseados na média da contagem das colônias em triplicata, conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Contagem de colônias sobreviventes das linhagens celulares murinas K12 e K12 IGF2BP1. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

K12 – 100 células/ poço		K12 IGF2BP1 – 100 células/ poço	
Contagem de colônias	36	Contagem de colônias	33
	62		26
	49		16
<b>Média</b>	<b>49</b>	<b>Média</b>	<b>25</b>

Foi observada diferença significativa entre os dois grupos de células de osteossarcoma murino, indicando que houve maior sobrevivência de colônias nas células K12, com baixa expressão de IGF2BP1 em relação às células com alta expressão do gene. Sendo assim, a ausência deste mRNA nas células promoveu quase o dobro de formação de colônias em relação ao grupo de células com maior expressão de IGF2BP1, conforme ilustrado na Figura 4.



**Figura 4.** Representação gráfica do ensaio de formação de colônias realizado em placas de seis poços, com clones celulares produzidos de células de osteossarcoma murino K12 (controle) e K12 IGF2BP1. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

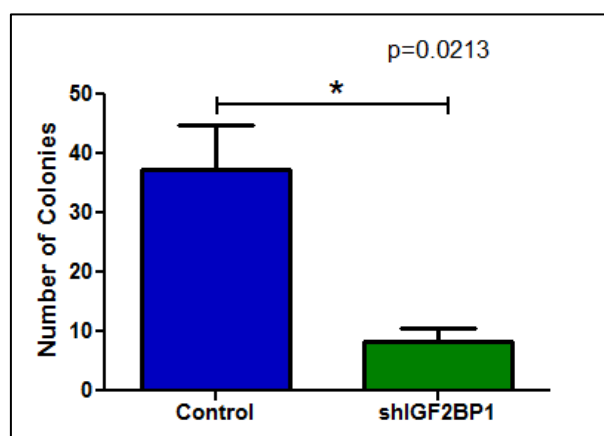
### 6.2.2 Eva e Eva-shIGF2BP1 Ensaio de Colônias

Nas linhagens Eva e Eva-shIGF2BP1 também foi observado formação de colônias após 72 horas de cultivo celular. A quantificação das colônias foi realizada sob microscopia óptica de luz após coloração com violeta cristal e está descrita na Tabela 2.

**Tabela 2.** Contagem de colônias sobreviventes das linhagens celulares caninas Eva e Eva-sh IGF2BP1. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

Eva – 100 células/ poço		Eva-shIGF2BP1 – 100 células/ poço	
Contagem de colônias	36	Contagem de colônias	13
	25		06
	51		06
Média	<b>37,3</b>	Média	<b>8,3</b>

Foi observada diferença significativa ( $p=0.0213$ ) entre os dois grupos de células de osteossarcoma canino, indicando que houve maior sobrevivência de colônias nas células Eva, com maior expressão de IGF2BP1 em relação às células Eva-shIGF2BP1, com menor expressão do gene, conforme ilustrado na Figura 5.

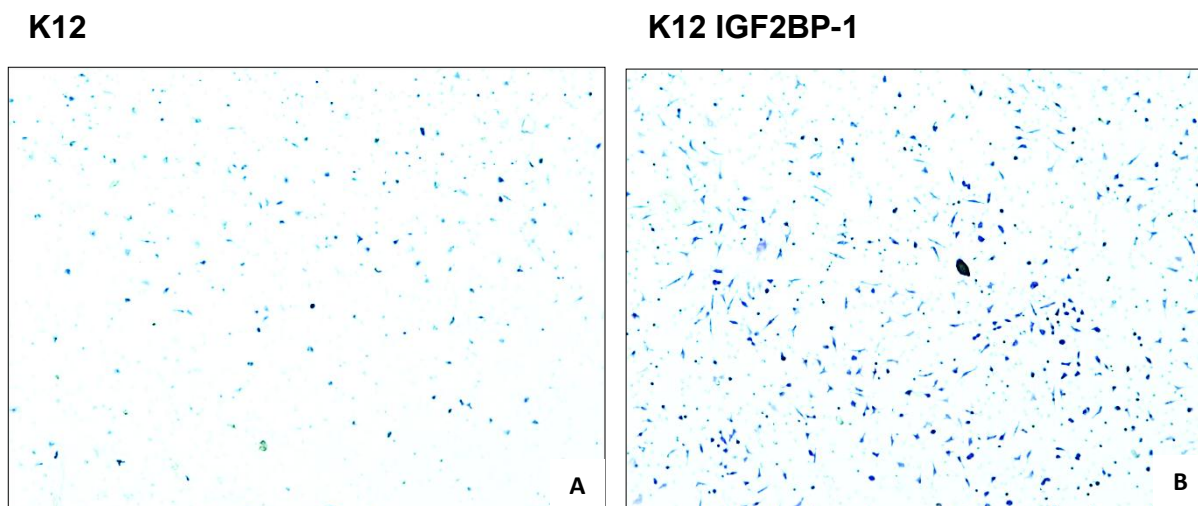


**Figura 5.** Representação gráfica do ensaio de formação de colônias realizado em placas de seis poços, com clones celulares produzidos de células de osteossarcoma canino Eva (controle) e Eva-shIGF2BP1. ( $p=0.213$ ). Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

### 6.3 Ensaio de Invasão Celular

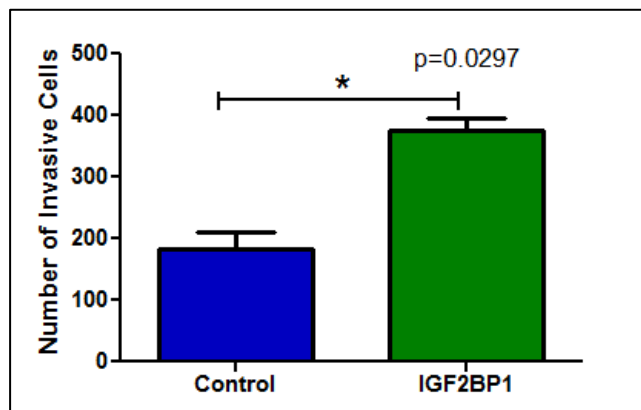
#### 6.3.1 K12 e K12 IGF2BP1

O ensaio de invasão celular com as linhagens K12 e K12 IGF2BP1 de osteossarcoma murino, demonstraram diferença significativa ( $p=0.0297$ ) na quantidade de células que atravessaram a membrana de colágeno, 24 horas após terem sido semeadas a  $0,5 \times 10^6$  células por ml. Os resultados demonstraram que as células com maior expressão de IGF2BP1 apresentaram maior potencial de invasão celular em relação à K12 com baixa expressão do gene. Os dados foram baseados em médias de duplicatas e as imagens representativas das membranas com a concentração de células são demonstradas na Figura 6.



**Figura 6.** Imagens representativas de K12 e K12 IGF2BP1 em objetiva de 40x evidenciando a diferença na concentração de células em cada membrana ( $p=0.0297$ ). A) K12 com baixa expressão de IGF2BP-1. B) K12 IGF2BP-1 com alta expressão de IGF2BP-1. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

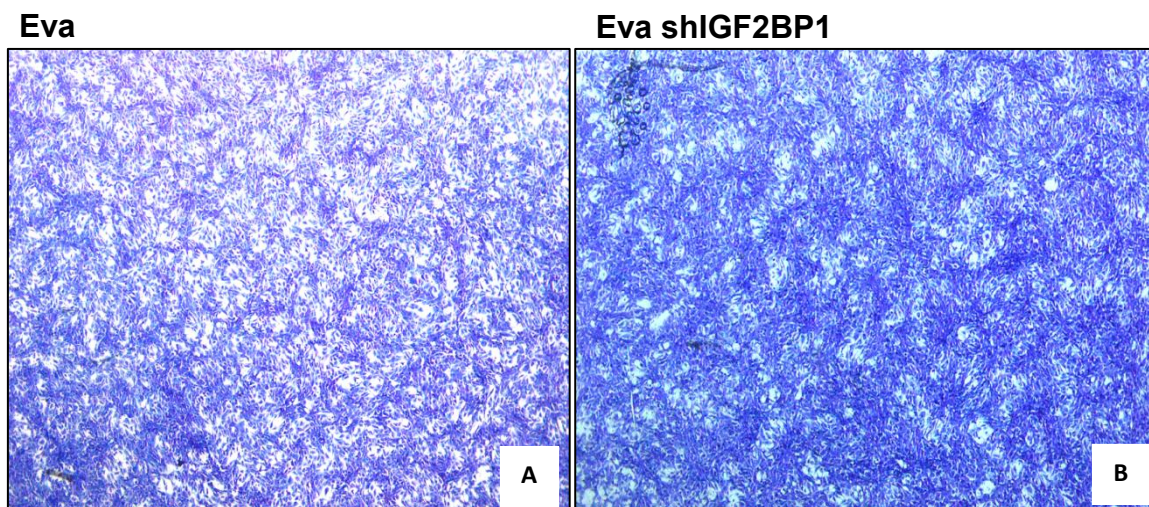
A invasão celular está representada na Figura 8.



**Figura 8.** Representação gráfica da invasão celular avaliada por ensaio de membrana colágena para linhagens de osteossarcoma murino K12 e k12 IGF2BP1. Cada gráfico em barra representa o número de células que atravessaram a membrana de colágeno após 24 horas de cultivo a  $0,5 \times 10^6$  cel/ml. As células foram coradas e contadas em toda extensão das membranas através de programa analisador de imagens (ImageJ<sup>®</sup>). Os dados foram representados através da média de duplicatas.  $p=0.0297$ ; Teste T Student. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

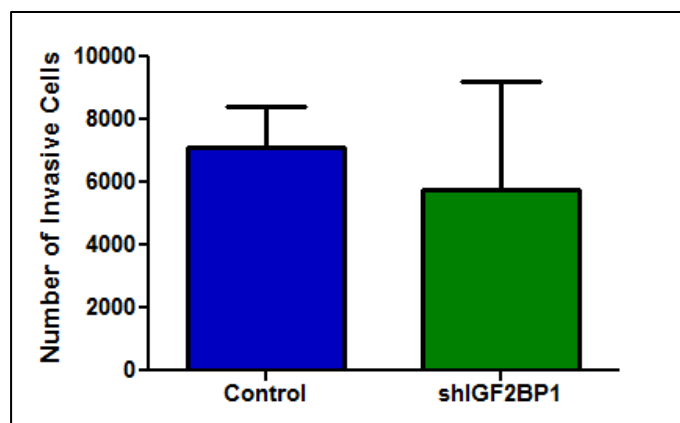
### 6.3.2 Eva e Eva shIGF2BP1

Os ensaios de invasão celular com as linhagens Eva e Eva shIGF2BP1 de osteossarcoma canino, demonstraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na quantidade de células que atravessaram a membrana de colágeno, 24 horas após terem sido semeadas a  $0,5 \times 10^6$  células por ml. Na linhagem canina, os resultados demonstraram que as células com menor expressão de IGF2BP1 apresentaram maior potencial de invasão celular em relação à Eva com alta expressão do gene. Os dados foram baseados em médias de duplicatas e as imagens representativas das membranas com a concentração de células são demonstradas na Figura 9.



**Figura 9.** Imagens representativas de Eva e Eva shIGF2BP1 em objetiva de 40x demonstrando a concentração de células em cada membrana ( $p=<0,05$ ). A) Eva com alta expressão de IGF2BP-1. B) Eva shIGF2BP-1 com baixa expressão de IGF2BP-1. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

O número de células Eva e Eva shIGF2BP1 que atravessaram a membrana colágena está representada na Figura 10.



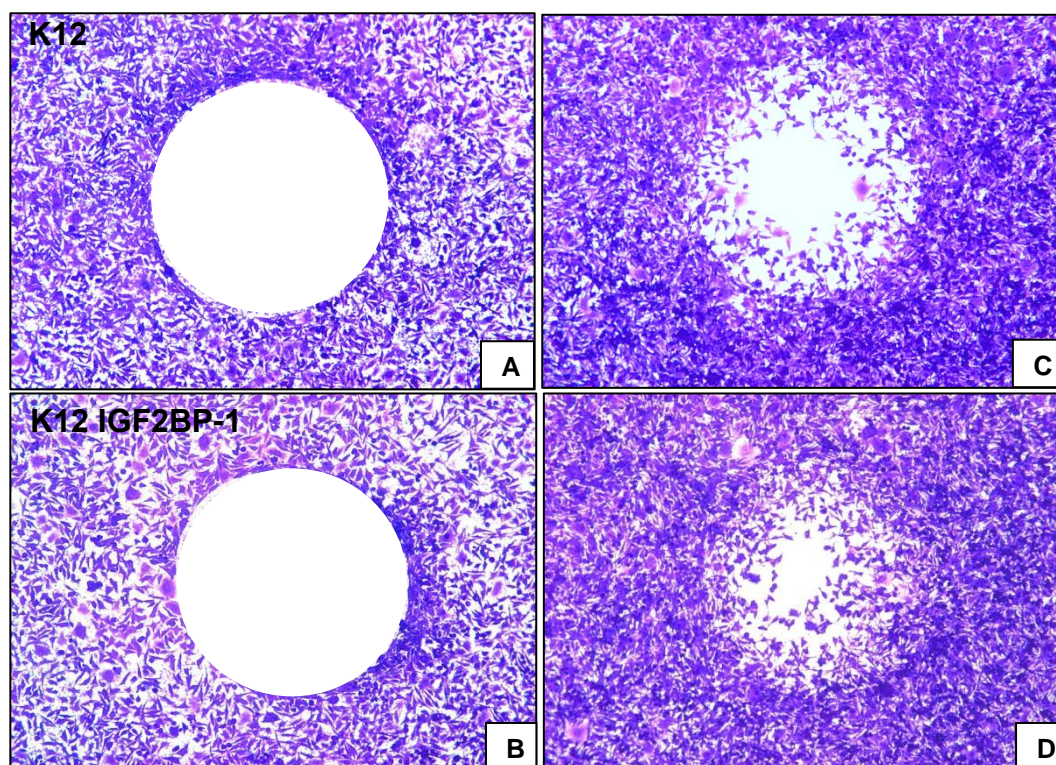
**Figura 10.** Representação gráfica da invasão celular avaliada por ensaio de membrana colágena para linhagens de osteossarcoma canino Eva e Eva shIGF2BP1. Cada gráfico em barra representa o número de células que atravessaram a membrana de colágeno após 24 horas de cultivo a  $0,5 \times 10^6$  cel/ml. As células foram coradas e contadas em toda extensão das membranas através de programa analisador de imagens (ImageJ®). Os dados foram representados através da média de duplicatas ( $p=<0,05$ ). Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

## 6.4 Ensaio de Migração Celular

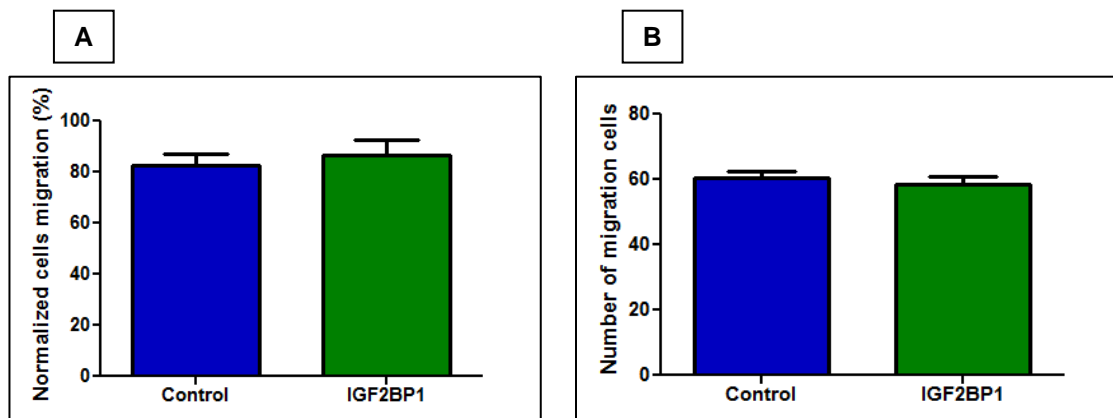
### 6.4.1 K12 e K12IGF2BP1

Após migração durante 24 horas das linhagens murinas K12 e K12 shIGF2BP-1 semeadas a  $0.2 \times 10^6$  células por poço, foi realizada coloração e as células submetidas ao software analisador de imagens (ImageJ<sup>®</sup>) o qual avaliou-se a distância percorrida pelas duas linhagens e a concentração de células que se proliferaram no centro (Figura 11).

Embora visivelmente as células K12 IGF2BP1 tenham percorrido uma distância maior, a análise não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os tipos celulares, como observados nos gráficos A e B (Figura 12).



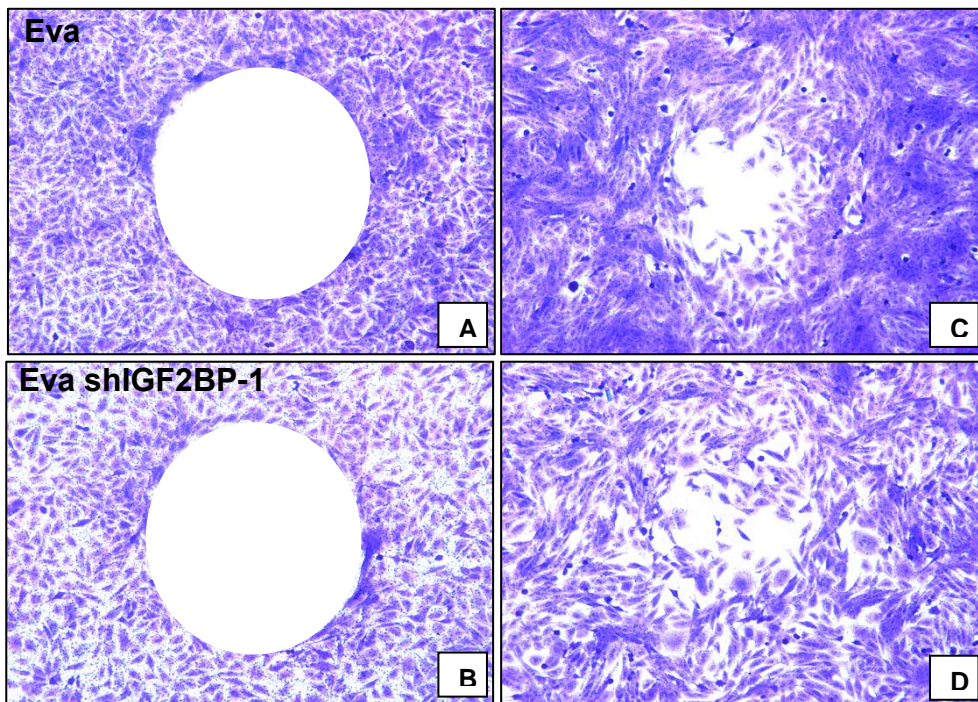
**Figura 11.** Imagens representativas de K12 e K1 IGF2BP1 em objetiva de 40x demonstrando a migração celular. Ensaio de migração com células cultivadas a  $0.2 \times 10^6$  células por poço. Após remoção do gel as células migraram durante 24 horas. A) e B) K12 e K1 IGF2BP1 indicando posição inicial antes da migração celular. C) e D) K12 e K1 IGF2BP1 após 24 horas de migração. Ensaio realizado em triplicata. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.



#### 6.4.2 Eva e Eva shIGF2BP-1

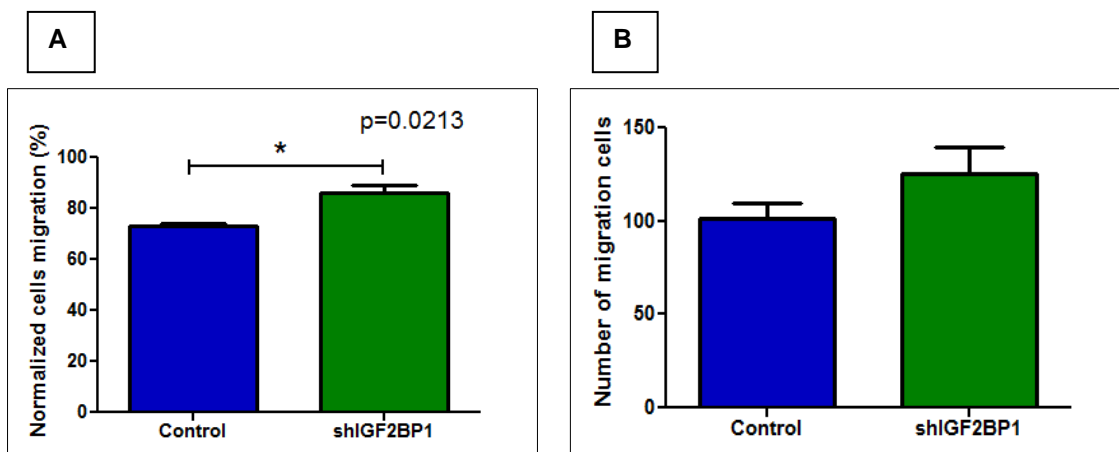
Após migração durante 24 horas das linhagens caninas Eva e Eva shIGF2BP-1 semeadas a  $0.3 \times 10^6$  células por poço, foi realizada coloração e as células submetidas ao analisador de imagens (ImageJ<sup>®</sup>), o qual avaliou-se a distância percorrida pelas duas linhagens e a concentração de células que se proliferaram no centro da placa (Figura 13).

Foi observado que a linhagem canina Eva shIGF2BP-1 apresentou maior distância percorrida e maior concentração de células que se proliferaram no centro da placa em relação à linhagem Eva com maior expressão do IGF2BP-1. Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p=0.0213$ ), conforme a Figura 14.



**Figura 13.** Imagens representativas de Eva e Eva shIGF2BP1 em objetiva de 40x demonstrando a migração celular ( $p=0.0213$ ). Ensaio de migração com células cultivadas a  $0.3 \times 10^6$  células por poço. Após remoção do gel as células migraram durante 24 horas. A) e B) Eva e Eva shIGF2BP-1 indicando posição inicial antes da migração celular. C) e D) Eva e Eva shIGF2BP-1 após 24 horas de migração. Ensaio realizado em triplicata. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.



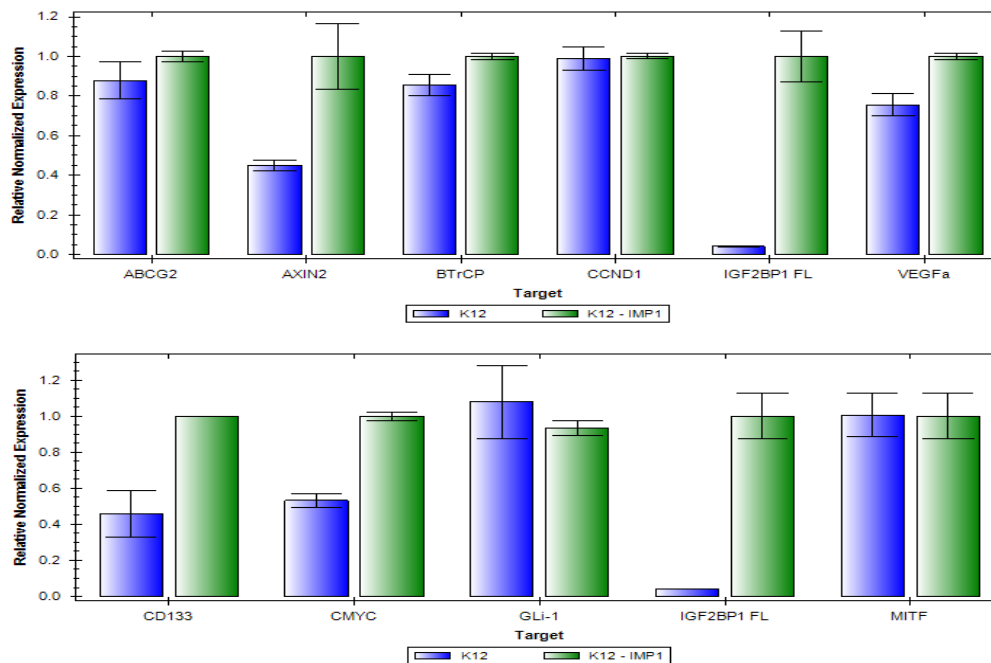


**Figura 14.** Representação gráfica do ensaio de migração celular de Eva e Eva shIGF2BP1. A) Porcentagem de distância da placa em que as células Eva (controle) e EvashIGF2BP-1 migraram durante 24 horas após a remoção do gel. As células foram semeadas a  $3.0 \times 10^6$  células/ poço. Os dados foram obtidos a partir da média  $\pm$  de três triplicatas. B) Número de células Eva (controle) e Eva shIGF2BP-1 que migraram 24 horas após a remoção do gel. Os dados foram obtidos a partir da média  $\pm$  de três triplicatas. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

## 6.5 Rt-PCR em Tempo Real

### 6.5.1 K12 e K12 IGF2BP-1

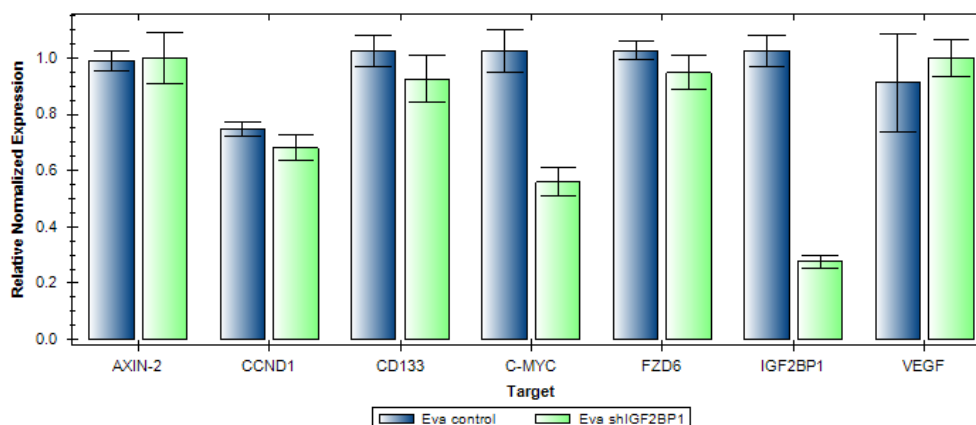
O impacto da superexpressão de IGF2BP-1 em células de osteossarcoma murino K12, gerou aumento da expressão de alguns genes avaliados por RT-PCR, entre eles o ABCG2, AXIN2, BTrCP, VEGF-a, CD133 e o CMYC. O gene CCND1 não demonstrou diferença e o GLI-1 apresentou-se reduzido nas células com maior expressão de IGF2BP-1 (Figura 15).



**Figura 15.** Impacto da superexpressão do IGF2BP-1 em células de osteossarcoma metastático murino K12. Gráficos em barras representando análise de RT-PCR para expressão do mRNA IGF2BP-1 e genes marcados (normalizados com RPS-18-1) em relação às amostras controle. Os dados foram expressos como médias $\pm$ SEM. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

### 6.5.2 Eva e Eva shIGF2BP-1

O impacto do silenciamento genético parcial do IGF2BP-1 em células de osteossarcoma canino Eva, gerou redução da expressão de alguns genes avaliados por RT-PCR, entre eles, CCND1, CD133, CMYC e FZD6. Os genes AXIN-2 e VEGF apresentaram aumento nas células com menor expressão de IGF2BP-1 (Figura 16).

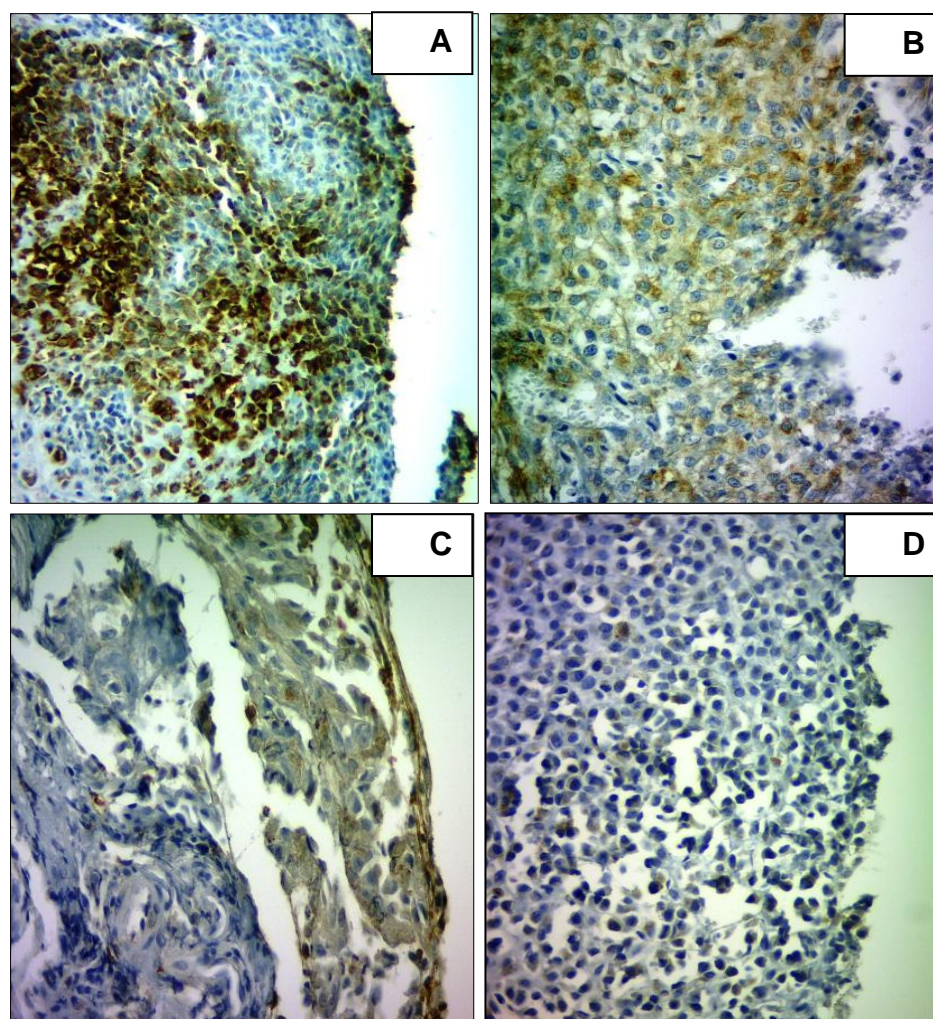


**Figura 16.** Impacto do silenciamento do IGF2BP-1 em células de osteossarcoma primário canino. Gráficos em barras representam análise de RT-PCR para a expressão do mRNA IGF2BP-1 e genes marcados (normalizados com GAPDH) em relação as amostras controle. Os dados foram expressos como médias $\pm$ SEM. Universidade Estadual da Pensilvânia, Hershey, 2017.

## 6.6 Imuno-histoquímica

As imunomarcações em 25 amostras de OSA canino foram consideradas forte, moderada, fraca ou ausente de acordo com a intensidade de coloração.

Das 25 amostras de OSA canino analisadas obtivemos 48% com marcação forte, 36% com marcação moderada, 8% com marcação fraca e 8% de amostras não marcadas, conforme demonstrado na Figura 17.



**Figura 17.** Expressão de IGF2BP-1 em OSA canino. Fotomicrografia demonstrando marcação citoplasmática forte (A), moderada (B), fraca (C) e não marcada (D). Magnificação de 400x. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

## 7. DISCUSSÃO

A expressão anormal do IGF2BP-1 tem sido descrita em diversos tipos de cânceres, indicando que disfunções deste gene estão relacionadas com alterações no comportamento biológico celular de proliferação, migração, invasão, diferenciação entre outros processos que ocorrem durante a formação neoplásica. O conhecimento da participação deste gene com o desenvolvimento do câncer poderá proporcionar alternativas para diagnóstico e tratamento de diversos tumores, incluindo o OSA (NAMLOS et al., 2012).

No presente estudo, avaliamos a expressão gênica do IGF2BP-1 através de western blot. Para isso, foram cultivadas duas linhagens de OSA murino (K7M2 e K12) e três linhagens celulares de osteossarcoma canino (Payton, Eva e Dakota). Das linhagens murinas, nenhuma expressou IGF2BP-1 naturalmente e as linhagens caninas expressaram o gene em diferentes proporções. Todas as amostras foram padronizadas através do marcador angiogênico  $\beta$ -Actin, para comprovar que havia a mesma quantidade de proteína em todas as bandas.

Após avaliar a expressão do IGF2BP-1, por meio de wester blot, foi selecionada uma linhagem celular de OSA murino e uma de OSA canino para dar sequência aos ensaios de comportamento celular. Foi utilizada linhagem celular murina K12, a qual conforme demonstrado no ensaio de western blot, não apresentou expressão natural do IGF2BP-1, portanto, foi realizada a indução da expressão do gene, obtendo-se assim a mesma linhagem celular murina com expressão do IGF2BP-1 e sem expressão do mesmo gene. A linhagem canina selecionada foi a Eva, a qual expressou naturalmente o IGF2BP-1, neste caso, realizamos o nocaute do IGF2BP-1 para obtermos duas versões desta linhagem. Dessa forma, tanto na linhagem canina (EVA), quanto na linhagem murina (K12) foram obtidas em versões com alta e baixa expressão do IGF2BP-1, a fim de correlacionarmos a expressão deste gene em experimentos de comportamento celular.

O processo de indução da expressão do IGF2BP-1, bem como o de silenciamento do gene foi realizado através do sistema de engenharia genética pINDUCER11 (MEERBREY et al., 2010). Este sistema é capaz de codificar as

células com o gene de interesse por meio de lentivírus. Uma vez infectada, a célula é ativada após adição de doxiciclina (DOX) ocorrendo assim transcrição do DNA ou RNA de interesse. Um indicador fluorescente (GFP) constitutivo foi utilizado para isolar e quantificar as populações celulares induzidas geneticamente. Além da fluorescência para validação da técnica, também foi realizado um novo western blot para avaliar a presença de IGF2BP-1 nas linhagens celulares após a alteração gênica.

Neste contexto, a linhagem de OSA murino K12 (sem expressão de IGF2BP-1), após a técnica molecular pINDUCER ganhou uma nova versão nomeada de K12 IGF2BP-1 (com expressão de IGF2BP-1). A linhagem canina EVA (com alta expressão de IGF2BP-1) passou a ter uma versão com a expressão de IGF2BP-1 reduzida (EVA shIGF2BP-1), após o processo de silenciamento genético. Posteriormente, as proteínas das quatro linhagens citadas foram extraídas para realização do western blot, com intuito de quantificar a expressão do IGF2BP-1. Os ensaios de comportamento celular procederam-se após a padronização das linhagens celulares murina e canina.

No ensaio de formação de colônias, foi observada diferença significativa entre os dois grupos de células de OSA murino, indicando que houve maior sobrevivência de colônias nas células K12, com baixa expressão de IGF2BP-1 em relação às células K12 IGF2BP-1, com alta expressão do gene. Sendo assim, a ausência deste mRNA nas células promoveu quase o dobro de formação de colônias em relação ao grupo de células com maior expressão de IGF2BP-1. Em relação ao ensaio de formação de colônias com as linhagens de OSA canino, obteve-se diferença significativa ( $p=0.0213$ ) entre os dois grupos de células, com maior sobrevivência de colônias nas células Eva, com maior expressão de IGF2BP-1 em relação às células Eva-shIGF2BP-1, com menor expressão do gene. Resultado contrário em relação às linhagens de células da espécie murina.

A maior sobrevivência das células de OSA murino K12 com baixa expressão de IGF2BP-1 foi oposta aos resultados de outros autores que citam a presença deste gene como essencial para sobrevivência de diversos tipos de células neoplásicas (IOANNIDIS et al., 2005; ELCHEVA et al., 2008; MONGROO et al., 2011; CRAIG; SPIEGELMAN 2012). A alta expressão de IGF2BP-1 foi

descrita em células de melanoma, neoplasia mamária, neoplasia de ovário e câncer colorretal (BELL et al., 2013).

Outro estudo realizado por Fakhraldeen, et al. (2015) refere que a presença da expressão IGF2BP-1 mesmo baixa, foi necessária para a formação de colônias em células de tumor de mama murino. Os achados das pesquisas citadas acima corroboram com os resultados obtidos na linhagem celular de OSA canino deste estudo, em que as células EVA com alta expressão de IGF2BP-1 apresentaram maior número de formação de colônias em relação à EVA nocauteada para IGF2BP-1.

Os ensaios de formação de colônias detectam células que conseguiram manter a capacidade de se reproduzir mesmo após terem sido submetidas a tratamentos que possam causar a morte reprodutiva das células como resultado de danos aos cromossomos, apoptose, entre outros fatores que possam impedir a replicação celular (BROWN; ATTARDI, 2005). Estudos realizados neste sistema fornecem informações comparadas às células neoplásicas residuais após diversos tipos de tratamento, como quimioterapia, radioterapia e sua capacidade de proliferação continuada que possa gerar recidiva tumoral (FRANKEN et al., 2006).

A relação exata da expressão do IGF2BP-1 com o desenvolvimento de diversos tipos cânceres ainda não é completamente entendida (FAKHRALDEEN et al., 2015), portanto, podemos sugerir que exista uma diferença entre espécies e tipos celulares em que a participação do IGF2BP-1 possa variar.

O ensaio de invasão celular com as linhagens K12 e K12 IGF2BP1 de OSA murino, demonstraram diferença significativa ( $p=0.0297$ ) na quantidade de células que atravessaram a membrana de colágeno, 24 horas após terem sido semeadas a  $0,5 \times 10^6$  células por ml. Os resultados demonstraram que as células com maior expressão de IGF2BP1 apresentaram maior potencial de invasão celular em relação à K12 com baixa expressão do gene. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo avaliando biomarcadores responsáveis por quimiorresistência e doença progressiva em OSA canino realizado por O'Donoghue (2011), o qual avaliou linhagens celulares de OSA canino com alta

expressão de IGF2BP-1 e constatou que após a realização do silenciamento genético as células apresentaram menor capacidade de invasão.

Contudo, obtivemos resultados distintos nos ensaios de invasão celular com a Linhagem de OSA canino EVA, aonde o índice de invasão celular foi maior nas células EVA shIGF2BP-1, nocauteada para o IGF2BP-1 ( $p < 0,05$ ). Embora a alta expressão de IGF2BP-1 esteja associada a menor tempo de sobrevida e maior taxa de metástases em diversos tipos de cânceres, também foi observado papel supressor tumoral exercido pelo IGF2BP-1 em câncer de mama (GU; PAN; SINGER, 2009; GU et al., 20012; WANG et al., 2016) e de cólon (BELL et al., 2013; HAMILTON et al., 2015), indicando que a presença deste gene inibiu o crescimento e a invasão de células tumorais, sugerindo que possa haver dois caminhos distintos entre a participação deste gene no desenvolvimento neoplásico. Esta ação contraditória descrita na literatura sobre a interferência do IGF2BP-1 em testes de comportamento celular pode ser justificada pelo fato de que as células neoplásicas já estudadas pertenciam a diferentes origens e diferentes condições, podendo estimular respostas distintas para o desenvolvimento ou a supressão tumoral (HUANG et al., 2018).

No presente estudo, o ensaio de migração com a linhagem celular de OSA murino não apresentou diferença estatística em relação ao índice migratório celular, entretanto, nota-se visivelmente que a placa migratória da linhagem K12 IGF2BP-1, com superexpressão do gene apresentou maior concentração de células e maior distância percorrida em relação à linhagem K12 com baixa expressão de IGF2BP-1. Nas linhagens caninas, observamos diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p = 0.0213$ ), em que Eva shIGF2BP-1 apresentou maior distância percorrida e maior concentração de células que se proliferaram no centro da placa em relação à linhagem Eva com maior expressão do IGF2BP-1.

Achados opostos foram observados no estudo de O'Donoghue (2011), o qual obteve redução da taxa de invasão e migração em linhagens celulares de OSA canino após realização do nocaute do IGF2BP-1 nas células. Em outro estudo com OSA humano, a alta expressão de IGF2BP-1 detectada por western



blot também foi correlacionada ao aumento da taxa de proliferação, migração e invasão celular (QU et al., 2016).

Estudos realizados com carcinomas hepatocelulares em humanos correlacionaram o aumento da expressão do IGF2BP-1 com menor sobrevida, maior tamanho tumoral, pouca diferenciação celular, estágios avançados da doença, aumento da progressão tumoral, alta taxa de invasão e migração celular, além de pior prognóstico após a cirurgia (ZHANG et al., 2015; YUAN; MENG; WANG 2017; ZHOU et al., 2017; JIANG et al., 2017; ZHOU et al., 2017). O aumento do IGF2BP-1 também foi associado ao aumento do índice de crescimento tumoral e resistência quimioterápica em melanomas (FORTIS et al., 2017; KIM et al., 2018; ELCHEVA et al., 2008).

Em inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro*, mRNAs relacionados ao câncer foram encontrados incluindo PTEN, ACTB, MAPK4, MKI67, c-MYC e CD44. Através da regulação desses mRNAs, o IGF2BP-1 foi identificado como responsável por desempenhar importantes funções na proliferação e crescimento celular de tecidos normais e tecidos tumorais, bem como na adesão, apoptose, migração e invasão de células tumorais (BELL et al., 2013).

O fato do IGF2BP-1 estar ligado ao desempenho de papéis importantes na proliferação e crescimento celular de tecidos normais e tumorais o levou a ser considerado um alvo terapêutico promissor no tratamento de diversos tipos de cânceres, bem como o uso de inibidores de células mediadas por IGF2BP-1. Entretanto, estudos mais recentes identificaram ação supressora tumoral no crescimento neoplásico e desenvolvimento de metástases ligadas a este gene (HAMILTON et al., 2015; WANG et al., 2016).

O impacto da superexpressão de IGF2BP-1 em células de osteossarcoma murino K12, gerou aumento da expressão de alguns genes avaliados por *rt-pcr*, entre eles, ABCG2, AXIN2, BTrCP, VEGF, CD133 e o c-MYC. Além disso, o silenciamento genético parcial do IGF2BP-1 em células de osteossarcoma canino Eva, gerou redução da expressão dos genes avaliados por *rt-pcr*, CCND1, CD133, c-MYC e FZD6. Os genes AXIN-2 e VEGF apresentaram aumento nas células com menor expressão de IGF2BP-1.

Em estudos com células de carcinoma hepatocelular a elevação da expressão de IGF2BP-1 promoveu aumento do c-MYC, similar ao nosso estudo. Além disso, observaram maior expressão do marcador de proliferação celular Ki67, correlacionando esses achados com maior índice de multiplicação celular, apoptose, invasão e metástase (WANG et al., 2015; YUAN; MENG; WANG, 2017).

Em outro estudo com melanoma, observou-se que a expressão de IGF2BP-1 promoveu resistência quimioterápica, enquanto a inibição do gene resultou em melhores efeitos da quimioterapia sobre as células além da redução das características tumorigênicas (KIM et al., 2018). Em outro estudo, o nocaute do IGF2BP-1 reduziu os níveis de c-MYC, que contribui para a supressão da atividade do NF-Kb, reduzindo a proliferação de células de melanoma e indução de apoptose. Dessa forma, o IGF2BP-1 poderia ser considerado um alvo de quimiorresistência para melanomas (ELCHEVA et al., 2008).

Diversos estudos correlacionam a superexpressão de IGF2BP-1 com o aumento da expressão de proto-oncogênes e vias de sinalização que predispõe ao desenvolvimento de tumores, sobrevivência das células neoplásicas e resistência a fármacos antineoplásicos (KIM et al., 2018). Mais estudos investigando a participação de outros genes induzidos pela expressão do IGF2BP-1 são necessários para melhor entendimento da sua ação no OSA.

Neste estudo a marcação imuno-histoquímica do IGF2BP-1 ocorreu no citoplasma das células neoplásicas. Forte marcação foi observada em 48% das amostras de OSA canino, 36% com marcação moderada, 8% com marcação fraca e 8% de amostras não apresentaram marcação para IGF2BP-1.

A eficácia da detecção de IGF2BP-1 através de IHQ já foi descrita em diversos tipos de cânceres, como adenocarcinoma pulmonar (KATO et al., 2007; BELL et al., 2013), carcinoma de células escamosas pulmonar (IOANNIDIS et al., 2004; SHI et al., 2017), neoplasia mamária (BELL et al., 2013; FAKHRALDEEN et al., 2015), carcinoma de bexiga (KESSLER et al., 2017), carcinoma hepatocelular (ZHOU et al., 2015; ZHANG et al., 2015), carcinoma colorretal (BELL et al., 2013; HAMILTON et al., 2015), rabdiosarcoma (FAYE et al., 2015) carcinoma ovariano (KOBEL et al. 2007; BELL et al., 2013), coriocarcinoma (DANDA et al.,

2016) e retinoblastoma (HSIEH et al., 2013). Apenas em carcinomas de bexiga a alta expressão de IGF2BP-1 encontrada na marcação IHQ foi correlacionada com maior tempo de sobrevida, nas demais neoplasias, o IGF2BP-1 foi equivalente a fatores que levam a um prognóstico desfavorável.

O'Donoghue (2011), em sua tese de doutorado avaliou a expressão de IGF2BP-1 em amostras de OSA canino através de IHQ e observou que a localização celular da proteína variou entre as amostras com algumas apenas demonstrando coloração citoplasmática, enquanto outras demonstraram coloração citoplasmática e nuclear. Entretanto, a localização celular de IGF2BP1 nem a intensidade e frequência de coloração foram fatores prognóstico neste conjunto de dados.

Neste estudo, observamos apenas coloração citoplasmática evidenciada pela IHQ, entretanto, devido à falta de informações clínicas dos pacientes não obtivemos dados suficientes para correlacionarmos a intensidade de marcação do IGF2BP-1 com o prognóstico. Acreditamos que essas informações devem ser mais exploradas em estudos futuros.

## 8. CONCLUSÃO

- O western blot foi um método eficaz para quantificar a expressão do IGF2BP-1 em células de OSA canino e murino;
- O IGF2BP-1 reduziu o potencial de formação de colônias, aumentou o potencial de invasão e migração celular e gerou aumento da expressão dos genes ABCG2, AXIN2, BTrCP, VEGF, CD133 e C-MYC em células de OSA murino;
- O IGF2BP-1 aumentou a formação de colônias, reduziu o potencial de invasão e migração celular e o silenciamento parcial do IGF2BP-1 gerou redução da expressão dos genes CCND1, CD133, CMYC e FZD6 em células de OSA canino;
- O silenciamento parcial do IGF2BP-1 gerou aumento dos genes AXIN-2 e VEGF em células de OSA canino;
- O IGF2BP-1 induz a modificações epigenéticas celulares levando a alterações indutoras ou supressoras tumorais;
- A IHQ foi um método eficaz para detecção do IGF2BP-1 citoplasmática em amostras de OSA canino.

## 9. REFERÊNCIAS

AMERONGEN V. R.; NUSSE, R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. **Development**, 2009.136, 3205-3214.

BELL, J. L.; WACHTER, K.; MUHLECK, B.; PAZAITIS, N.; KOHN, M.; LEDERER, M.; et al. Insulin like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? **Cell Mol Life Sci.** 2013; 70(15):2657–75.

BERGMAN PJ, MACEWEN EG, KURZMAN ID et al (1996) Amputation and carboplatin for treatment of dogs with osteosarcoma: 48 cases (1991 to 1993). **J Vet Intern Med** 10(2):76–81.

BERG J (1996) Canine osteosarcoma: amputation and chemotherapy. **Vet Clin North Am Small Anim Pract** 26(1):111–121

MORELLO E, MARTANO M, BURACCO P (2011) Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. **Vet J** 189(3):268–277.

BIELACK, S. S.; KEMPF-BIELACK, B.; DELLING G.; EXNER, G. U.; FLEGE, S.; HELMKE, K.; KOTZ, R.; SALZER-KUNTSCHIK, M.; WERNER, M.; WINKELMANN, W.; ZOUBEK, A.; JÜRGENS, H.; WINKLER, KURT . Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. **Journal of Clinical Oncology**. 2002 vol. 20no. 3 776-790.

BOSTON SE, EHRHART NP, DERNELL WS et al (2006) Evaluation of survival time in dogs with stage III osteosarcoma that undergo treatment: 90 cases (1985–2004). **J Am Vet Med Assoc** 228(12):1905–1908.

BRODEY RS (1979) The use of naturally occurring cancer in domestic animals for research into human cancer: general considerations and a review of canine skeletal osteosarcoma. **Yale J Biol Med** 52:345– 361.

BRODEY RS, ABT DA (1976) Results of surgical treatment in 65 dogs with osteosarcoma. **J Am Vet Med Assoc** 168(11):1032–1035.

BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat. Rev. Cancer* 5, 231–237 (2005).

DANDA R, GANAPATHY K, SATHE G, MADUGUNDU AK, RAMACHANDRAN S, KRISHNAN UM, et al. Proteomic profiling of retinoblastoma by high resolution mass spectrometry. **Clin Proteomics**. 2016;13:29.

CAMARGO, O. P.; BAPTISTA, A. M. Conduta atual nas lesões ósseas metastáticas. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 39, n. 6, p. 273-281, 2004.

CAI, Y.; MOHSENY, A. B.; KARPERIEN, M.; HOGENDOORN, P. C.; ZHOU, G.; CLETON-JANSEN, A. M. 2010. Inactive Wnt/ $\beta$ -catenin Pathway in Conventional High-grade Osteosarcoma. **Journal of Pathology**., 220: 24–33. doi:10.1002/path.2628

CAUDILL, J. S.; ARNDT, C. A. Diagnosis and management of bone malignancy in adolescence. *Adolescent medicine: state of the art reviews*, v. 18, n. 1, p. 62-78, ix, 2007.

CAVALCANTI JM, AMSTALDEN EMI, GUERRA JL, MAGNA LC (2004) Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. **Braz J Vet Res Anim Sci** 41(5).

CHRISTIANSEN, J., et al. 2009. IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes. **Journal of Molecular Endocrinology**, 43:187-195

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CLETON-JANSEN, A. M.; ANNINGA, J. K.; BRIAIRE-DE BRUIJN, I. H.; ROMEO, S.; OOSTING, J.; EGELER, R. M.; GELDERBLUM, H.; TAMINIAU, A. H.; HOGENDOORN, P. C. Profiling of High-Grade Central Osteosarcoma and its Putative Progenitor Cells Identifies Tumourigenic Pathways. **Br J Cancer**. 2009 Dec 1;101(11):1909-18. doi: 10.1038/sj.bjc.6605405. Epub 2009 Nov 3.

COLLINS I, WORKMAN P: New approaches to molecular cancer therapeutics. **Nature Chemical Biology** 2006, 2(12):689-700. 16.

COOLEY, D. M.; WATERS, J. Skeletal neoplasms of small dogs: a retrospective study and literature review. 1997. **Journal American Animal Hospital Association**. 33(1): p. 11-23.

CRAIG, J. T.; GUZMAN, M.; L.; NOBLE M. "Cancer stem cells." **New England Journal of Medicine** 355.12 (2006): 1253-1261.

CRAIG, E. A., AND SPIEGELMAN, V. S. (2012) Inhibition of coding region determinant binding protein sensitizes melanoma cells to chemotherapeutic agents. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 83–87

DO AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, 2011.

DOYLE, G. A.; BOURDEAU-HELLER, J. M.; COULTHARD, S., et al. Amplification in Human Breast Cancer of a Gene Encoding A C-MycMrna-Binding Protein. **Cancer Research**, 2000; 60:2756–9.

EHRHART, N. P.; RYAN, S. D.; FAN, T. M. Tumors of the Skeletal System. Whitrow, S. J.; Vail, D. M. **Small Animal Clinical Oncology 5<sup>th</sup> Edition**. 2013, Saunders Elsevier 763p.

EHRHART, N. P.; RYAN, S. D.; FAN, T. M. Tumors of the Skeletal System, in **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology 5<sup>th</sup> ed.**, Whitrow, S. J.; Vail, D. M. 2013, Saunders Elsevier: St. Louis, MI. p. 463–503.

ELCHEVA, I., TARAPORE, R. S., BHATIA, N., AND SPIEGELMAN, V. S. (2008) Overexpression of mRNA-binding protein CRD-BP in malignant melanomas. **Oncogene** 27, 5069–5074.

ELISEEV, R. A.; DONG, Y-F.; SAMPSON, E.; ZUSCIK, M. J.; SCHWARZ, E. M.; O'KEEFE, R. J.; ROSIER, R. N.; DRISSI, M. H. Runx2-mediated activation of the Bax gene increases osteosarcoma cell sensitivity to apoptosis. **Oncogene**. 2008, 27: 3605-3614. 10.1038/sj.onc.1211020.

ESCUTENAIRE, S. et al. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. **Archives of virology**, v. 152, n. 1, p. 41-58, 2007.

FAYE MD, BEUG ST, GRABER TE, EARL N, XIANG X, WILD B, et al. IGF2BP1 controls cell death and drug resistance in rhabdomyosarcomas by regulating translation of cIAP1. **Oncogene**. 2015;34(12):1532–41.

FAKHRALDEEN, S. A.; ROOPRA, R. J. C. A.; CHIN, E. N., HUANG, W.; CASTORINO, J.; WISINSKI, K. B.; KIM, T.; SPIEGELMAN, V. S.; ALEXANDER, C. M. Two Isoforms of the RNA Binding Protein, Coding Region Determinant-binding Protein (CRD-BP/IGF2BP1), are Expressed in Breast Epithelium and Support Clonogenic Growth of Breast Tumor Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 290, no. 21, pp. 13386 –13400, 2015.

FEENEY DA, JOHNSTON GR, GRINDEM CB, et al: Malignant neoplasia of canine ribs: clinical, radiographic, and pathologic findings, **J Am Vet Med Assoc** 180:927–933, 1982.

FLETCHER CDM, UNNI KK, MERTENS F (eds). World Health Organization Classification of Tumours.Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.**IARC Press**:Lyon, France, 2002.

FORTIS SP, ANASTASOPOULOU EA, VOUTSAS IF, BAXEVANIS CN, PEREZ SA, MAHAIRA LG. Potential prognostic molecular signatures in a preclinical model of melanoma. **Anticancer Res**. 2017; 37(1):143–8.

FRANKEN, N. P; RODERMOND, H. M, STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. **Clonogenic assay of cells in vitro**. Laboratory for Experimental Oncology and Radiobiology (LEXOR). 2006.

GELLASCH, K. L.; KALSCHEUR, V. L.; CLAYTON, M. K.; et al: Fatigue Microdamage in the Radial Predilection Site for Osteosarcoma in Dogs, **American Journal Veterinary Research** 63:896–899, 2002.

GIBBS, C. P.; KUKEROV, V. G.; REITH, J.; TCHIGRINOVA, O.; SUSLOV, O. N.; SCOTT, E. W.; GHIVIZZANI, S. C.; IGNATOVA, T. N.; STEINDLER, D. A. Stem-Like Cells in Bone Sarcomas: Implications for Tumorigenesis.[Neoplasia](#). Volume 7, Issue 11, November 2005, Pages 967-976.



GORLICK, R.; MEYERS, P. A. Osteosarcoma necrosis following chemotherapy: innate biology versus treatment-specific. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 25, n. 11, p. 840-841, 2003.

GOSWAMI, S.; TARAPORE, R. S.; TESLAA, J. J.; GRINBLAT, Y.; SETALURI, V.; SPIEGELMAN, V. S. MicroRNA-340-mediated Degradation of Microphthalmia-associated Transcription Factor mRNA is Inhibited by the Coding Region Determinant-binding Protein. 2010. **The Journal of Biological Chemistry** 285, 20532-20540.

GU L, SHIGEMASA K, OHAMA K. Increased expression of IGF II mRNA-binding protein 1 mRNA is associated with an advanced clinical stage and poor prognosis in patients with ovarian cancer. **Int J Oncol**. 2004;24(3):671-8.

HAMILTON, K. E.; CHATTERJI, P.; LUNDSMITH, E. T.; ANDRES, S. F.; GIROUX, V.; HICKS, P. D. et al. Loss of stromal IMP1 promotes a tumorigenic microenvironment in the colon. **Mol Cancer Res**. 2015;13(11):1478–86. 17.

HEARE, T.; HENSLEY, M. A.; DELL'ORFANO, S. Bone tumors: osteosarcoma and Ewing's sarcoma. **Current opinion in pediatrics**, v. 21, n. 3, p. 365-372, 2009.

HEYMAN SJ, DIEFENDERFER DL, GOLDSCHMIDT MH, et al: Canine axial skeletal osteosarcoma: a retrospective study of 116 cases (1986 to 1989), **Vet Surg** 21:304, 1992.

HSIEH YT, CHOU MM, CHEN HC, TSENG JJ. IMP1 promotes choriocarcinoma cell migration and invasion through the novel effectors RSK2 and PPME1. **Gynecol Oncol**. 2013;131(1):182–90.

IOANNIDIS, P.; TRANGAS, T.; DIMITRIADIS, E.; SAMIOTAKI, M.; KYRIAZOGLU, I.; TSIAPALIS, C. S. M.; KITTAS, C.; AGNANTIS, N.; NIELSEN, F. C.; NIELSEN, J.; CHRISTIANSEN, J.; PANDIS, N. C-myc and igf-ii mrna-binding protein (crd-bp/imp-1) in benign and malignant mesenchymal tumors. (2001). **Int. J. Cancer**: 94, 480–484.

IOANNIDIS P, MAHAIRA L, PAPADOPOULOU A, et al. 8q24 Copy number gains and expression of the c-myc mRNA stabilizing protein CRD-BP in primary breast carcinomas. **Int J Cancer**. 2003;104(1):54-9.

IOANNIDIS, P.; KOTTARIDI, C.; DIMITRIADIS, E.; et al. Expression of the RNA-binding protein CRD-BP in brain and non-small cell lung tumors. **Cancer Lett.** 2004;209(2):245-50.

IOANNIDIS, P., MAHAIRA, L. G., PEREZ, S. A., GRITZAPIS, A. D., SOTIROPOULOU, P. A., KAVALAKIS, G. J., ANTSAKLIS, A. I., BAXEVANIS, C. N., AND PAPAMICHAIL, M. (2005) CRD-BP/IMP1 expression characterizes cord blood CD34 stem cells and affects c-myc and IGF-II expression in MCF-7 cancer cells. **J. Biol. Chem.** 280, 20086–20093.

JAFFE N: Adjuvant chemotherapy in osteosarcoma: An odyssey of rejection and vindication. In Pediatric and Adolescent Osteosarcoma, **Cancer Treatment and Research**. Edited by: Jaffe N, Bielack SS, Bruland OS. New York: Springer; 2009:152.

JIANG, T.; LI, M.; LI, Q.; GUO, Z.; SUN, X.; ZHANG, X.; et al. MicroRNA-98-5p inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma via targeting IGF2BP1. **Oncol Res.** 2017;25(7):1117–27.

JONGEWARD SJ (1985) Primary bone tumors. **Vet Clin N Am Small Anim Pract** 15:609–641. V.3 N.1 JAN/JUN 2015 P. 13-30.

KAGER, L., et al. "Primary Metastatic Osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols." **Journal of Clinical Oncology** 21.10 (2003): 2011-2018.

KANSARA, M.; TSANG, M.; KODJABACHIAN, L.; SIMS, N. A.; TRIVETT, M. K.; EHRICH, M.; DOBROVIC, A.; SLAVIN, J.; CHOONG, P. F. M.; SIMMONS, P. J.; DAWID, I. B.; THOMAS, D. M. Wnt Inhibitory Factor 1 is Epigenetically Silenced in Human Osteosarcoma, and Targeted Disruption Accelerates Osteosarcomagenesis in Mice. **J Clin Invest.** 2009;119(4):837-851.

KATO T, HAYAMA S, YAMABUKI T, ISHIKAWA N, MIYAMOTO M, ITO T, et al. Increased expression of insulin-like growth factor-II messenger RNA-binding protein 1 is associated with tumor progression in patients with lung cancer. **Clin Cancer Res.** 2007;13(2 Pt 1):434–42.

KESSLER SM, LEDERER E, LAGGAI S, GOLOB-SCHWARZL N, HOSSEINI K, PETZOLD J, et al. IMP2/IGF2BP2 expression, but not IMP1 and IMP3, predicts

poor outcome in patients and high tumor growth rate in xenograft models of gallbladder cancer. **Oncotarget**. 2017;8(52):89736–45.

KIM, T.; HAVIGHURST, T.; KIM, K.; ALBERTINI, M.; XU, Y.G.; SPIEGELMAN, V. S. Targeting insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) in metastatic melanoma to increase efficacy of BRAF (V600E) inhibitors. **Mol Carcinog**. 2018.

KOBEL, M.; WEIDENSDORFER, D.; REINKE, C.; LEDERER, M.; SCHMITT, W. D.; ZENG, K.; THOMSEN, C.; HAUPTMANN, S.; HUTTELMAIER, S.: Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. **Oncogene** 2007, 26(54):7584-7589

KOHN, A. D.; MOON, R. T. Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -Catenin-independent pathways Volume 38, Issues 3–4, September–October, 2005, Pages 439–446. **Frontiers in calcium signaling**.

LIU, C.; KELNAR, K.; LIU, B.; CHEN, X.; CALHOUN-DAVIS, T.; LI, H.; WIGGINS, J. F. 2011. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. **Nature medicine**, 17(2), 211-215.

LEMM, I.; ROSS, J.: Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. **Molecular and Cellular Biology** 2002, 22(12):3959-3969.

LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 781-810, 2004.

MACDONALD, B. T.; YOKOTA, C.; TAMAI, K.; ZENG, X.; HE, X. Wnt Signal Amplification via Activity, Cooperativity, and Regulation of Multiple Intracellular PPPSP Motifs in the Wnt Co-receptor LRP6. 2008. **The journal of biological chemistry** vol. 283, NO. 23, pp. 16115–16123.

MAROTTA, L. L.; ALMENDRO, V.; MARUSYK, A.; SHIPITSIN, M.; SCHEMME, J.; WALKER, S. R.; WU, Z. 2011. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+ CD24–stem cell–like breast cancer cells in human tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, 121(7), 2723.

MEERBREY KL, HU G, KESSLER JD, ROARTY K, LI MZ, FANG JE, HERSCHKOWITZ JI, BURROWS AE, CICCIA A, SUN T, SCHMITT EM, BERNARDI RJ, FU X, BLAND CS, COOPER TA, SCHIFF R, ROSEN JM, WESTBROOK TF, ELLEDGE SJ. The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011 Mar 1;108(9):3665-70.

MEYERS, P. A.; GORLICK, R. Osteosarcoma. *Pediatric Clinics of North America*, v. 44, n. 4, p. 973-989, 1997.

MIRABELLO, L.; TROISI, R. J.; SAVAGE, S. A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the surveillance, epidemiology, and end results program. **Cancer**. 2009;115:1531–43.

MISDORP, W.; HART, A. Some Prognostic and Epidemiologic Factors in Canine Osteosarcoma. 1979. **Journal of the National Cancer Institute**;62:537–545p.

MONGROO, P. S., NOUBISSI, F. K., CUATRECASAS, M., KALABIS, J., KING, C. E., JOHNSTONE, C. N., BOWSER, M. J., CASTELLS, A., SPIEGELMAN, V. S., AND RUSTGI, A. K. (2011) IMP-1 displays cross-talk with K-Ras and modulates colon cancer cell survival through the novel proapoptotic protein CYFIP2. *Cancer Res*. 71, 2172–2182.

MOORE, A. S. Osteosarcoma in dogs: managing a destructive disorder. **Veterinary Medicine**, v. 96, n. 7, p. 539-546, 2001.

NAMLOS HM, MEZA-ZEPEDA LA, BAROY T, OSTENSEN IH, KRESSE SH, KUIJJER ML, et al. Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by microRNAs. *PLoS One*. 2012;7:e 48086.

NIELSEN , F. C.; NIELSEN, J.; CHRISTIANSEN, J. A Family of IGF-II mRNA Binding Proteins (IMP) Involved in RNA Trafficking. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**. 2001;234:93–99.

NIELSEN, A. F.; GLOGGNITZER, J.; MARTINEZ, J. MicroRNAs Cross the Line: The Battle for mRNA Stability Enters the Coding Sequence. 2009. **Molecular Cell** 35.

NOUBISSI, F. K.; ELCHEVA, I.; BHATIA, N.; SHAKOORI, A.; OUGOLKOV, A.; LIU, J.; MINAMOTO, T.; ROSS, J.; FUCHS, S. Y.; SPIEGELMAN, V. S. CRD-BP

Mediates Stabilization of  $\beta$ -Trcp1 and C-MycMrna in Response to Beta-Catenin Signalling. **Nature**. 2006; 441:898–901.

NOUBISSI, F. K.; GOSWAMI, S.; SANEK, N. A.; et al. Wnt Signaling Stimulates Transcriptional Outcome of the Hedgehog Pathway by Stabilizing GLI1 mRNA. **Cancer Research**. 2009;69:8572–8.

OBLAK ML, BOSTON SE, HIGGINSON G et al (2012) The impact of pamidronate and chemotherapy on survival times in dogs with appendicular primary bone tumors treated with palliative radiation therapy. **Vet Surg** 41(3):430–435.

O'DONOGHUE, L. E. **Biomarkers of Disease Progression and Chemotherapeutic Resistance in Canine Osteosarcoma**. Tese - Department of Clinical Sciences In partial fulfillment of the requirements - Colorado State University Fort Collins, Colorado, 2011.

PAOLONI M, KHANNA C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nat Rev Cancer**. 2008;8(2):147–56.

PALONI, M. D. S.; LANA, S., et al. Canine Tumor Cross-Species Genomics Uncovers Targets Linked To Osteosarcoma Progression. **BMC Genomics** 2009; 10: 625-628.

PIZZO P A; POPLACK D G. **Principles And Practice Of Pediatric Oncology - 5th Edition**. Dez. 2005.

PROKIPCAK, R. D.; HERRICK, D. J.; ROSS, J. Purification and properties of a protein that binds to the C-terminal coding region of human c-myc mRNA. **J Biol Chem**. 1994; 269:9261–9269.

POOL RR (1990) Tumors of bone and cartilage. In: **Tumors in Domestic Animals (3rd Edit)** JE Moulton (Ed.), University of California press, Berkeley (1990), pp.157–230.

PROKIPCAK RD, HERRICK DJ, ROSS J. Purification and properties of a protein that binds to the C-terminal coding region of human c-myc mRNA. **J Biol Chem**. 1994;269(12):9261-9.

QU, Y.; PAN, S.; KANG, M.; DONG, R.; ZHAO, J. MicroRNA-150 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting IGF2BP1. **Tumour Biol.** 2016;37(4): 5275–84.

RU, G.; TERRACINI, B.; GLICKMAN, L.T. Host Related Risk Factors for Canine Osteosarcoma. **Vet J**, 1998. 156(1): p. 31-9.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RUNGE, S.; NIELSEN, F. C.; NIELSEN, J.; LYKKE-ANDERSEN, J.; WEWER, UM.; CHRISTIANSEN, J. (2000). H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. **J BiolChem** 275: 29562–29569.

SELVARAJAH GT, KIRPENSTEIN J (2010) Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. **Vet J** 185(1):28–35.

SHACKLETON, M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different **Seminars in Cancer Biology**, Volume 20, Issue 2, Pages 85-92. 2010.

SHI R, YU X, WANG Y, SUN J, SUN Q, XIA W, et al. Expression profile, clinical significance, and biological function of insulin-like growth factor 2 messenger RNA-binding proteins in non-small cell lung cancer. **Tumour Biol.** 2017;39(4).

SPARANESI D, LEE CH. CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. **Nucleic Acids Res.** 2007;35(4):1209-21.

SPIEGELMAN, V. S.; SLAGA, T. J.; PAGANO, M.; MINAMOTO, T.; RONAI, Z.; FUCHS, S. Y. Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor. **Mol Cell.** 2000. May;5(5):877-82.

SPODNICK GJ, BERG J, RAND WM et al (1992) Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978–1988). **J Am Vet Med Assoc** 200(7):995–999.

STAAL, F. J. T.; LUIS T. C.; TIEMESSEN M. M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. **Nature Reviews Immunology** 8, 581-593 (August 2008).

TARAPORE, R. S., SIDDIQUI, I. A., SALEEM, M., ADHAMI, V. M., SPIEGELMAN, V. S., & MUKHTAR, H. 2010. Specific targeting of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in human melanoma cells by a dietary triterpenelupeol. *Carcinogenesis*, 31(10), 1844-1853.

THOMPSON, K. G.P.R. Tumors of Bones. *Tumors in Domestic Animals*, ed. M. DJ. 2008: Ames, IA: **Iowa State Press**. 245–318.

THOMPSON KG, POOL RR. Tumors of bones. In: **Meuten DJ, ed. Tumors in Domestic Animals**. Ames, IA: Iowa State Press; 2008:245–318.

VAIL D M M E. Sponaneouslyoccurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer Invest**. 2000;18(8):781–92.

VARMUS H: The New Era in Cancer Research. **Science** 2006, 312(5777):1162-1165.

VIKESAA J, HANSEN TV, JONSON L, *et al*. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. **EMBO J**. 2006;25(7):1456-68.

XINWEI, H., HONG, Z.; XIAORAN, G.; ZONGXIN, Z.; HAIBO, C.; XIANGYANG, K. Insulin-Like Growth Factor 2 Mrna-Binding Protein 1 (IGF2BP1) in Cancer. **Journal of Hematology & Oncology** (2018) 11:88.

XU, Y.; ZHENG, Y.; LIU, H.; LI, T. Modulation of IGF2BP1 by long non-coding RNA HCG11 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via MAPK signaling transduction. **Int J Oncol**. 2017;51(3):791–800.

WAN, W.; XIA, S.; KALIONIS, B.; LIU, L.; LI, Y. The Role of Wnt Signaling in the Development of Alzheimer's Disease: A Potential Therapeutic Target? **BioMed Research International**. Volume 2014 (2014).

WANG, G.; HUANG, Z.; LIU, X.; HUANG, W.; CHEN, S.; ZHOU, Y.; *et al*. IMP1 suppresses breast tumor growth and metastasis through the regulation of its target mRNAs. **Oncotarget**. 2016;7(13):15690–702.

WILSON, H., *et al.*, Isolation and Characterisation of Cancer Stem Cells from Canine Osteosarcoma. **Vet J**, 2008. 175(1): p. 69-75.

WITHROW, S. J.; POWERS, B. E.; STRAW, R. C.; et al. Comparative Aspects of Osteosarcoma: Dog versus man. **Clin Orthop Relat Res.** 1991;270:159–168.

WU, L.; FAN, J.; BELASCO, J. G. MicroRNAs Direct Rapid Dead Enylation of mRNA. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2006;103:4034–4039.

WYCISLO, K. L.; FAN, T. M.. The Immunotherapy of Canine Osteosarcoma: A Historical and Systematic Review. 2015. **Journal of Veterinary Internal Medicine**; 29:759–769p.

WU, R.; TANG, Y.; ZANG, W. et al. MicroRNA-128 Regulates the Differentiation of Rat Bone Mesenchymal Stem Cells Into Neuron-like Cells by Wnt Signaling. **Mol Cell Biochem** (2014) 387: 151.

YANIV K, YISRAELI JK. The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. **Gene.** 2002;287(1-2):49-54.

YUAN, P.; MENG, L.; WANG, N. SOX12 upregulation is associated with metastasis of hepatocellular carcinoma and increases CDK4 and IGF2BP1 expression. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2017;21(17):3821–6.

ZHANG, L.; ZHOU, W.; VELCULESCU, V. E. Kern, sE, Hruban, RH, Hamilton, sR, Vogelstein, B. and Kinzler, KW (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. **Science**, v. 276, p. 1268-1272.

ZHANG, J.; CHENG, J.; ZENG, Z.; WANG, Y.; LI, X.; XIE, Q.; et al. Comprehensive profiling of novel microRNA-9 targets and a tumor suppressor role of microRNA-9 via targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget.** 2015;6(39):42040–52.

ZHOU, X.; ZHANG, C. Z.; LU, S. X.; CHEN, G. G.; LI, L. Z.; LIU, L. L.; et al. miR-625 suppresses tumour migration and invasion by targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma. **Oncogene.** 2015;34(8):965–77.

ZHOU, J.; BI, C.; CHING, Y.Q.; CHOOI, J. Y.; LU, X; QUAH, J. Y.; et al. Inhibition of LIN28B impairs leukemia cell growth and metabolism in acute myeloid leukemia. **J Hematol Oncol.** 2017;10(1):138.