



FMVZ-UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

**“EXPRESSÃO DO GENE *FOXE1* EM CULTURAS DE
OSTEOSSARCOMA CANINO”**

Rodolfo Françon Araújo Ventura

Botucatu - SP
Julho - 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

“EXPRESSÃO DO GENE *FOXE1* EM CULTURAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO”

Rodolfo Françon Araújo Ventura

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: **Prof^a. Dr.^a Noeme Sousa Rocha**

Co-Orientadora: **Prof^a. Dr.^a Adriana C. Ferrasi**

Botucatu - SP
Julho – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Ventura, Rodolfo Françon Araújo.

Expressão do gene *FOXE1* em culturas de osteossarcoma canino / Rodolfo Françon Araújo Ventura. – Botucatu : [s.n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Adriana C. Ferrasi

Capes: 50503006

1. Animais domésticos - Doenças. 2. Osteossarcoma. 3. Ultra-sonografia veterinária.

Palavras-chave: Epigenética; *FOXE1*; Osteossarcoma *in vitro*.

Rodolfo Françon Araújo Ventura

**“EXPRESSÃO DO GENE *FOXE1* EM CULTURAS DE
OSTEOSSARCOMA CANINO”**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Noeme Sousa Rocha

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a. Dr^a. Celmira Calderón

Membro

Departamento de Zootecnia

UENP – Luiz Meneghel - Bandeirantes

Botucatu, 01 de Julho de 2011

Meus esforços são dedicados.....

Aos meus pais,

Ailton Françon Ventura e Rita de Cássia Araujo Ventura

Pelo amor incondicional e por acreditarem que meus sonhos seriam possíveis.

Ao meu querido avô, Ari Ventura

Pelo exemplo de vida e pelas tardes nostálgicas que passamos juntos a beira de um lago, enquanto me ensinava o verdadeiro valor da vida.

AGRADECIMENTOS

À **professora Dr^a. Noeme Souza Rocha**, minha orientadora, pelos ensinamentos transmitidos e pelo exemplo de dedicação profissional.

À **professora Dr^a. Adriana Camargo Ferrasi**, minha co-orientadora, pelos ensinamentos no âmbito da biologia molecular e pelas conversas nos momentos difíceis.

A **professora Dr^a. Celmira Calderón**, pelo exemplo de paz, competência e ética profissional. E também por ter me apresentado o mundo da “*Patologia Veterinária*” ao lecionar com carinho e dedicação a disciplina de Anatomia Patológica Veterinária em minha época de graduação.

Ao **professor Dr. Júlio Lopes Sequeira**, pelo exemplo de ética, profissionalismo e sabedoria.

À **professora Fernanda da Cruz Landim Alvarenga**, que disponibilizou o Laboratório de Fertilização *in-vitro*, onde as culturas foram estabelecidas.

Às **professoras Dr^a. Maria Inês de Moura Campos Pardini e Dr^a. Regiane Maria Tommasini Grotto**, pelos conhecimentos transmitidos e por disponibilizarem o Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, onde as análises de metilação e expressão gênica foram realizadas.

Ao meu companheiro de trabalho **Paulo Ricardo de Oliveira Bersano**, por ter sido de fundamental importância para os resultados obtidos neste estudo, e pelo exemplo de dedicação à pesquisa do osteossarcoma canino.

A **Márcia Moleta Colodel , Isabele Ferreira e Marcela Marcondes Pinto Rodrigues**, pelos momentos de alegria e descontração.

A **Maria Valéria Dalanezi, Maury Raul e Claudinei Domingues**, pelo exemplo de humildade e profissionalismo.

Ao **grupo de pesquisa do Hemocentro da FM-UNESP**, pelo conhecimento científico transmitido e pelo auxílio na realização das técnicas de Biologia Molecular.

A minha querida **Thais de Campos Cecchi**, pela compreensão e por ser meu porto seguro nos regressos a Itapeva.

Aos meus **alunos da Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva**, pelo carinho e por serem meus eternos professores.

À **FAPESP, FUNDUNESP, CNPq, FMVZ – UNESP e FM-UNESP**, pela credibilidade concedida e apoio, que possibilitou que este trabalho fosse realizado.

A todos os **membros de minha família**, que me incentivaram e compreenderam minha ausência em determinados momentos.

E em particular ao **Engenheiro de Nosso Universo**, que me proporcionou momentos singulares e o privilégio de poder viver ao lado das pessoas acima citadas.

Dr. Watson:

“E ainda acredito que meus olhos são tão bons quanto os teus.”

Sherlock Holmes:

“Elementar meu caro Watson, mas ainda assim você vê, mas não observa, a diferença é muito clara.”

(Um Escândalo na Boemia).

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
EPÍGRAFE.....	vi
SUMÁRIO	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Gene Forkhead box (<i>FOX</i>)	16
2.1.1. Aspectos gerais	16
2.1.2. Gene Forkhead box E1 (<i>FOXE1</i>)	16
2.2. Metilação	19
2.3. Cultivo celular	20
2.4. Osteossarcoma canino	21
2.4.1. Incidência e fatores de risco	21
2.4.2. Etiologia	22
2.4.3. Sinais clínicos e comportamento biológico	23
2.4.4. Diagnóstico	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivo específico	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Delineamento experimental	26
4.2. Análise citopatológica	26

4.3. Análise histopatológica	27
4.4. Cultivo celular	28
4.4.1. Obtenção e manutenção das amostras	28
4.4.2. Caracterização das culturas	28
4.5. Análise de Metilação	30
4.6. Análise de expressão gênica	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Análise citopatológica	33
5.2. Análise histopatológica	33
5.3. Cultivo e caracterização das culturas	36
5.4. Análise de metilação	38
5.5. Análise de expressão gênica	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	48
8. PERSPECTIVAS	49
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
10. ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO	59
10.1. Artigo	59
10.2. Normas de publicação	88
11. ANEXOS	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos específicos para caracterização de osteoblastos	29
Tabela 2 - Imunomarcção da culturas de Osteossarcoma Canino. Citometria de fluxo.....	38
Tabela 3 - Mensuração de DNA das amostras envolvidas no experimento. Espectrofotometria....	38
Tabela 4 - Análises de metilação das culturas de osteossarcoma canino obtidas por PCR-MSP. ..	39
Tabela 5 - Mensuração de RNA das amostras envolvidas no experimento. Espectrofotometria....	40
Tabela 6 - Mensuração de cDNA das amostras envolvidas no experimento. Espectrofotometria..	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Via de sinalização Shh/Gli/Foxe1. A ligação de Shh com Ptch alivia a inibição de Smo que ativa a transcrição de Gli2, induzindo a transcrição do gene FOXE1..... 19
- Figura 2** – Osteossarcoma. Aspirado de tecido. Células mesenquimais fusiformes pleomorfas com severa anisocitose e anisocariose. Os núcleos revelam cromatina granulosa e enucleólos conspícuos com moderada anisonucleose. Também há densos agregados de matriz mesenquimal imatura (seta). – Giemsa. 400X..... 33
- Figura 3** – OSA 03: osteossarcoma osteoblástico. Grande número de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Em A, notam-se nas áreas próximas das trabéculas (a) células e gigantes multinucleadas (setas). Em B, proliferação de osteoblastos neoplásicos e produção de matriz óssea não mineralizada (osteóide) (setas) – HE. 400X. 34
- Figura 4** – OSA 07: osteossarcoma misto. Produção de matriz óssea maligna com ausência de predomínio celular. Em A, observa-se tecido cartilaginoso maligno (a) – HE. 200X. Em B, nota-se pleomorfismo celular, matriz condróide (a), tecido fibrossarcomatoso (b) – HE. 400X. 35
- Figura 5** - Cultivo celular OSA 13. Observe uma população homogênea de células mesenquimais fusiformes que revelam critérios de malignidade, tais como multinucleações (seta maior) e nucléolos conspícuos (seta menor)..... 36
- Figura 6** – Citometria de fluxo das células provenientes da cultura OSA 13. (A) Controle com células sem nenhuma marcação, (B) Controle com células associadas ao anticorpo secundário, (C) Células marcadas com vimentina e (D) Células marcadas com citoqueratina.. 37

Figura 7 - Metilação do gene <i>FOXE1</i> . Observe a banda de 88pb do controle positivo para <i>FOXE1</i> metilado (Seta maior) e a banda com 94pb do controle positivo para <i>FOXE1</i> não metilado (Seta menor).....	39
--	----

Figura 8 - Integridade das amostras de RNA. Observe as subunidades 28s (seta menor) e 18s (seta maior). Pelo UVP Sistema BioDoc-It.....	41
--	----

VENTURA, R.F.A. **Expressão do gene *FOXE1* em culturas de osteossarcoma canino**. 2011,106p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO

O osteossarcoma (OSA) do cão ou sarcoma osteogênico é um tumor primário de comportamento biológico agressivo, prevalente em raças de médio e grande porte com idade entre sete a nove anos. O objetivo do trabalho foi aplicar um modelo experimental *in vitro* do osteossarcoma canino, para servir de suporte ao estudo do gene *FOXE1*, gene supressor tumoral pouco investigado, entretanto de extrema importância na pesquisa do câncer pelo fato de estar envolvido com a via de sinalização HH/GLI2, que regula positivamente o crescimento celular. Foram utilizadas cinco culturas de osteossarcoma, que serviram como subsídio para análise de metilação, imunoexpressão e expressão gênica. Os resultados permitiram validar a cultura celular do osteossarcoma canino, identificar dos padrões de metilação do gene *FOXE1*. Assim, observou-se a aplicabilidade da determinação do padrão de metilação da região promotora de *FOXE1* e a não extrapolação do *primer FOXE1* humano para quantificar a expressão gênica do cão.

Palavra- chave: *FOXE1*, epigenética, osteossarcoma *in vitro*.

VENTURA, R.F.A. **FOXE1 expression in cultured canine osteosarcoma**. 2011, 106p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ABSTRACT

Osteosarcoma (OSA) of the dog or osteogenic sarcoma primary tumor is an aggressive biological behavior, prevalent in breeds of medium and large aged seven to nine years. The objective of this study was to apply an experimental model in vitro canine osteosarcoma, to underpin the study of gene FOXE1, tumor suppressor gene has been little research, though extremely important in cancer research by being involved in the signaling pathway HH / GLI2, which positively regulates cell growth. We used five cultures of osteosarcoma, which served as input for methylation analysis, immunostaining and gene expression. The results validate the canine osteosarcoma cell culture to identify patterns of gene methylation FOXE1. Thus, there was determination of the applicability of the methylation pattern of the promoter region of FOXE1 and no extrapolation of human FOXE1 primer to quantify gene expression of the dog.

Keyword: FOXE1, epigenetics, osteosarcoma in vitro, dog.

1. INTRODUÇÃO

O avanço da ciência no que tange a compreensão genética e molecular em todos os aspectos e desenvolvimento do esqueleto, que abrangem a condrogênese e osteogênese, vem permitindo melhor compreensão das condições distintas e geneticamente heterogêneas das doenças ósseas (KORNAK & MUNDLOS, 2003). Neste contexto, baseado em uma concordata de patologia molecular e embriologia, coloca-se em evidência à aplicabilidade em estudos que cingem a carcinogênese do osteossarcoma e demais doenças ósseas (KARSENTY & WAGNER, 2002).

E um marco positivo para Medicina Veterinária foi à caracterização e publicação do genoma canino (KERSTIN et al., 2005), que permitiu a investigação de bases genéticas do câncer e a oncologia comparada. E enfocando no problema do câncer em pacientes humanos e veterinários, parcerias se estabeleceram abrangendo um grupo multidisciplinar com médicos veterinários, médicos oncologistas, patologistas, cirurgiões, geneticistas e biólogos moleculares, com o intuito de melhor compreender os processos de carcinogênese e progressão tumoral (ALBERTS et al., 1997).

Nada obstante com o advento da Epigenética, foi colocado em foco que as condições que levariam a um câncer não seriam necessariamente provenientes de eventos mutacionais, mas também por mecanismos epigenéticos que compreendem interferências na expressão de genes supressores tumorais ou proto-oncogenes. Estes mecanismos que envolvem a metilação, fosforilação e acetilação de histonas, podem ser hereditários ou ocorrer esporadicamente em função de estímulos ambientais. Deste modo, em consórcio com comunicações atuais, tem-se despertado o interesse pelos genes da família FOX que estão sendo descritos como hipometilados ou hipermetilados em determinados tipos de neoplasias (MATSUBAYASHI et al., 2006; VENZA et al., 2010).

Na grande família dos genes *FOX*, atualmente tem-se levantado a importância ao gene da família *FOXE1* e suas variações epigenéticas, uma vez que atua como um gene supressor tumoral. Portanto quando silenciado pelo fenômeno da metilação, perde sua função e inicia o processo de carcinogênese e progressão tumoral de determinadas neoplasias (KORNAK & MUNDLOS, 2003; EICHBERGER et al., 2004; VENZA et al., 2010).

Com base nestas considerações o presente trabalho teve por objetivo controverter o papel emergente do gene *FOXE1* e seus fatores de transcrição, uma vez que estudos atuais revelam fortes evidências quanto a sua atuação no processo de carcinogênese do osteossarcoma canino (EICHBERGER et al., 2004; DAY & YANG, 2008; VENZA et al., 2010).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gene Forkhead box (*FOX*)

2.1.1. Aspectos gerais

A família dos genes Forkhead Box (*FOX*), fornece instruções indispensáveis para a produção de proteínas que desempenham um papel crítico em diversos processos biológicos, incluindo a homeostase celular (metabolismo, diferenciação, proliferação e apoptose) e a gênese de muitos órgãos e tecidos antes do nascimento. Eles correspondem a 50 genes do genoma humano e 44 do genoma murino, onde são subdivididos em 17 subfamílias (A-R). Eles correspondem a 50 genes do genoma humano e 44 do genoma murino, onde são subdivididos em 17 subfamílias (A-R). E nesta contextualização, os genes individuais destas subfamílias, são ainda designados por um número (KALINICHENCO et al., 2002; STEPHEN & ERIC, 2007).

Como consequência do ganho ou perda da função do *FOX*, o destino da célula pode ser alterado podendo iniciar o processo de carcinogênese, bem como a progressão de um câncer. E apesar do conhecimento restrito, embora crescente, estudos revelam fortes evidências que correlacionam o processo de carcinogênese com alteração dos fatores de transcrição Fox (KALINICHENCO et al., 2002; STEPHEN & ERIC, 2007).

Neste pressuposto, os genes da família *FOX* podem atuar como oncogenes, gene supressores tumorais ou indiretamente em vias de sinalização importantes de determinadas funções biológicas. Kalin et al. (2006) relataram a acuidade do gene *FOXM1* na qualidade de um oncogene, sendo que alterações em seus fatores de transcrição aceleraram o desenvolvimento e progressão de carcinomas prostáticos. Todavia, Brunet et al. (2007) e Kops et al. (2002) descreveram a função do gene *FOXO* como supressor tumoral, uma vez que interrompia o ciclo celular e induzia a apoptose; o

que foi confirmado por Paik et al. (2007) quando, ao inibir a função *FOXO* em ratos, predispôs ao desenvolvimento de hemangioma e linfoma tímico.

2.1.2. Gene Forkhead box E1 (*FOXE1*)

Na espécie humana o gene *FOXE1* é localizado em um só “*exon*” no cromossomo 9q22, sendo responsável por codificar uma fosfoproteína conhecida como fator de transcrição tireoidiano (TTF2) também versado como FKHL15 ou TITF-2. Em humanos este gene é expresso nas estruturas faríngeas e folículos pilosos a partir da 9,5 semanas de gestação, atuando como responsável pela diferenciação embriológica destas estruturas e homeostase celular após o nascimento. Portanto, é fato que alterações por meio de mutação ou de mecanismos epigenéticos possam interferir em sua expressão refletindo lesões tireoideanas (agenesia, hipoplasia e carcinomas), fenda palatina, atresia de coana, epiglote bífida (CLIFTON-BLIGH, 1998; PARK & CHATTERJE, 2005; ONO et al., 2007).

Investigações atuais têm despertado o interesse científico com relação a este gene com o intuito de compreender melhor os processos de carcinogênese de diversas neoplasias e não apenas ao carcinoma de tireóide como era previsto inicialmente. Venza et al. (2010) indica a crucial importância do gene *FOXE1* como um supressor tumoral, uma vez que metilado, é sub-expresso ou ausente em carcinoma de células escamosas. Incluso a estas evidências, Bass et al. (2009) relata em humanos a correlação do gene *FOXE1* com carcinomas esofágicos e pulmonares.

O gene *FOXE1* pode atuar também indiretamente no processo de carcinogênese, quando interfere na via de sinalização desencadeada pelo morfogene Hedgehog (Hh), cuja principal importância se propõe a organogênese. Desta forma, quando esta via é danificada, corroboram a diversas doenças ou mesmo com processo de carcinogênese

de carcinomas basocelulares, meningiomas, neoplasias mamárias e pancreáticas (EICHBERGER et al., 2004; MATSUBAYASHI et al., 2006; DAY & YANG, 2008).

Contudo ao insurgir a ação indireta do gene *FOX*, sobressai o fato de que alguns fatores de transcrição Fox interatuam com a via de sinalização Hedgehog (Hh), cuja importância delibera durante a embriogênese e na vida adulta regulando a proliferação, angiogênese e renovação de células tronco (TEH et al., 2002; LACOUR, 2002; EICHBERGER et al., 2004; DAY & YANG, 2008).

O gene Hedgehog (Hh) dos vertebrados, é subclassificado em Sonic Hh (Shh), Indian Hh (Ihh) e Desert (Dhh). Esta família de genes está envolvida com a produção de proteínas que sinalizam a osteogênese embrionária e homeostase óssea pós-nascimento (McMAHON et al., 2003; KIMURA et al., 2008). Em condições naturais, suas proteínas se ligam a outra proteína chamada *Patched* (Ptch) que diminui o efeito inibitório das proteínas *Smoothed* (Smo) que traduzem um sinal para o núcleo, ativando os membros da família Gli que possibilitam a transcrição do gene Hh, que leva a proliferação celular (McMAHON et al., 2003; KIMURA et al., 2008; KIM et al., 2010).

Nesta conjuntura tem sido colocado em evidência que a expressão do gene *FOXE1* é dependente da via Shh/Gli para fazer sua função de diferenciação e controle da homeostase (Figura 1) (EICHBERGER et al., 2004). Neste juízo, Venza et al. (2010) demonstram uma condição epigenética de silenciamento gênico pelo fenômeno de metilação do gene *FOXE1*, o que impede sua transcrição e conseqüente expressão gênica, que teria a função de diferenciação, homeostase celular e supressora tumoral ao regular a via Shh/Gli.

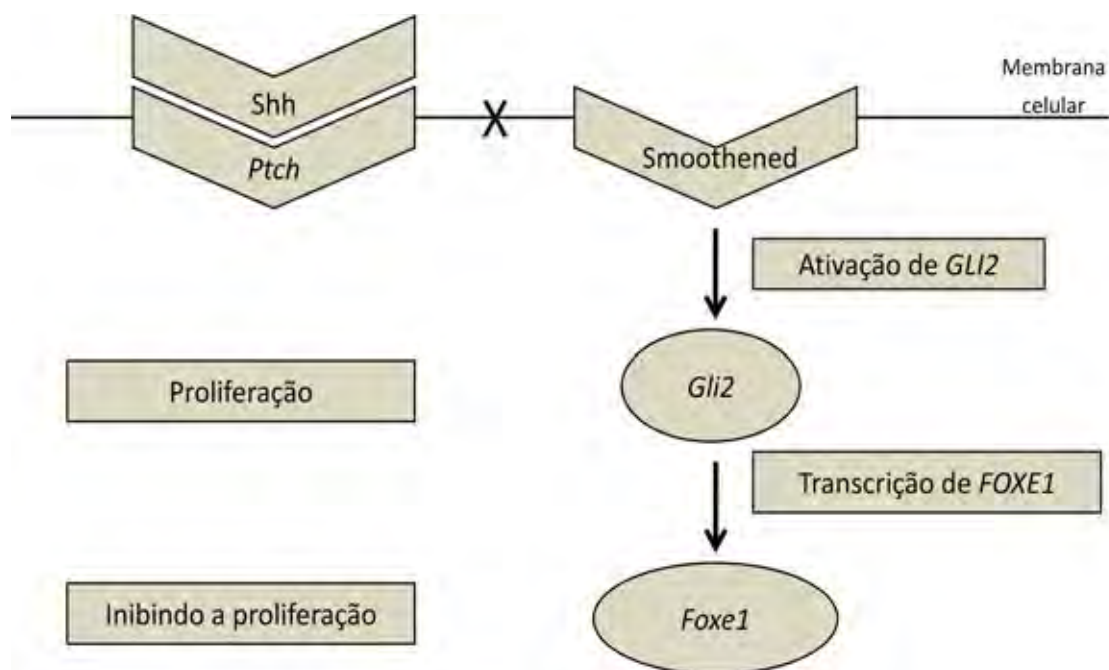


Figura 1 – Via de sinalização Shh/Gli/Foxe1. A ligação de Shh com Ptch alivia a inibição de Smo que ativa a transcrição de Gli2, induzindo a transcrição do gene FOXE1.

2.2. Metilação

Após a codificação sequencial do genoma nas diferentes espécies, tem sido apontado que alterações epigenéticas são de grande importância na modificação e expressão de um gene (WU & SUN, 2006). Estas alterações acontecem em função de uma série de mecanismos que incluem a modificação de histonas que compreendem a acetilação, fosforilação e metilação do DNA (KANG et al., 2007).

O processo de metilação em mamíferos é mais bem compreendido atualmente, e consiste fundamentalmente em uma modificação covalente do Ácido Desoxirribonucléico (DNA), onde pela ação da enzima DNA metiltransferase (DNMT) um grupamento metil (CH₃) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina do dinucleotídeo Citosina/Guanina (CpG) (WU & SUN, 2006). Este fenômeno permite a manifestação ou silenciamento de um gene, garantindo a diferenciação de células tronco em células especializadas, visto que todas as células contém a mesma carga genética (WU & SUN, 2006; KANG et al., 2007).

Acredita-se que este mecanismo tem um papel importante no processo de carcinogênese de diversos tipos de neoplasias, onde são notados diferentes graus de metilação (hipometilação e hipermetilação) em determinadas ilhas CpG. A hipermetilação tem sido associada à inativação de genes supressores tumorais, em contrapartida, o papel da hipometilação ainda não é bem claro, entretanto as evidências apontam sua associação com a instabilidade cromossômica e ativação de oncogenes (WU & SUN, 2006; SADIKOVIC et al., 2008; VENZA et al., 2010).

2.3.Cultivo celular

Relatada desde o início do século XX, a cultura celular de vertebrados tem-se mostrado como uma excelente técnica de preservação e manutenção de material para estudos, uma vez que as características morfológicas e biológicas são mantidas na maioria das culturas em longo prazo (MISDORP, 1990; FRESHNEY, 2000). Com isso, o domínio da técnica e sua aplicabilidade vêm despertando o interesse de pesquisadores na produção de vacinas antivirais e melhor compreensão das neoplasias (FRESHNEY, 2000).

Os estudos de culturas celulares de tecidos normais e neoplásicos fornecem dados importantes que estão servindo como base para melhor compreensão dos processos de carcinogênese e consequente emprego em estudos terapêuticos (ALBERTS et al., 1997; ATHANASOU, 1999).

Ao trabalhar com a cultura primária existe a necessidade de sua caracterização. No caso de culturas osteoblásticas faz-se necessário a utilização de um conjunto de técnicas a fim de caracterizá-la, sendo assim necessária a avaliação morfológica que é representada por células poligonais, imunoistoquímica e citoquímica. Na imunoistoquímica primeiramente é feita a distinção de sua origem com a utilização da

vimentina (mesenquimal) ou citoqueratina (epitelial), e posteriormente são feitos os marcadores específicos representados pela osteopontina (OPN), osteocalcin (OCN) e osterix (Osx). Quanto à citoquímica, é utilizada a técnica de *Alizarin Red* e *Von Kossa* para evidenciar a presença de matriz óssea mineralizada (IRIE et al., 1998; PERRIEN et al., 2002; TROPEL et al., 2004; GORDON et al., 2007).

2.4.Osteossarcoma canino

2.4.1. Incidência e fatores de risco

O osteossarcoma (OSA) do cão ou Sarcoma osteogênico é um tumor ósseo primário de comportamento biológico agressivo, prevalente em raças de médio e grande porte com idade variável entre sete a nove anos (MISDORP, 1980; WITHROW et al., 1991), o que reflete epidemiologicamente a propensão racial representada pelo Boxer, Doberman, Dogue Alemão, Galgo, Golden Retriever, Pastor Alemão e São Bernardo (MISDORP & HART, 1979; DALECK, 1996; STRAW, 1996; DICKERSON, 2001).

Quanto à tendência sexual é descrita uma discreta sobreposição de machos acometidos em relação às fêmeas. Contíguo a isso, também chama à atenção a maior incidência em animais não castrados, independente do sexo (MISDORP & HART, 1979; DICKERSON, 2001).

O osteossarcoma pode se apresentar na forma esquelética e extra-esquelética, contudo não há dúvidas quanto à raridade do segundo (DICKERSON, 2001). Todavia a apresentação esquelética é subclassificada anatomicamente em apendicular que corresponde a 75% dos casos e axial representando os 25% restantes (DALECK, 1996; DICKERSON, 2001). Na disposição apendicular, a localização tumoral em geral se apresenta próxima a região metafisária abordando parte distal de rádio, úmero proximal,

fêmur distal, além da tíbia proximal e distal, chamando a atenção aos membros inferiores se mostram duas vezes mais acometidos em relação aos membros posteriores (HEYMANN, 1992; DALECK, 1996). A disposição axial mais frequente em raças de pequeno e médio porte envolve, principalmente mandíbula, maxila, cavidade nasal, e por fim costelas que refletem comportamento biológico mais agressivo e incidência maior em animais jovens (DALECK, 1996; DICKERSON, 2001). Por fim, a apresentação extra-esquelética é descrita em tecido mamário, esôfago, baço, fígado, rim, testículo, intestino, vagina, meninge e adrenal (PATNAIK, 1990; THOMSEN & MYERS, 1999; RINGENBERG et al.; 2000; STINSON et al.; 2000).

2.4.2. Etiologia

Alguns fatores podem ser contributivos ao surgimento desta neoplasia, o que implica complicações na consolidação óssea, alterações genéticas, infartos ósseos, micro lesões ósseas, influência hormonal, radiação ionizante e excesso de peso (LINDENBAUM & ALEXANDER, 1984; HAMME et al.; 1995; DALECK, 1996; JOHSON et al.; 1997; CHUN & LORIMIER, 2003).

Evidências apontam a hipótese que o desenvolvimento de uma linhagem mutante de osteossarcoma pode ser induzido pelo estímulo mitótico exacerbado, decorrente de múltiplos traumatismos secundários ao sobrepeso em região de placas fisárias de fechamento tardio (PRITCHARD et al.; 1975; RU et al.; 1998; DICKERSON, 2001; LOUKOPOULOS, 2003).

Também chama à atenção, processos inflamatórios crônicos predisponem a metaplasia de células mesenquimais, que sustenta a etiologia do osteossarcoma esofágico secundário ao parasitismo da *Spirocerca lupi* e o osteossarcoma de glândula

mamária proveniente da metaplasia de células mioepiteliais (BARDET et al.; 1983; PATNAIK, 1990; CHUN & LORIMIER, 2003).

2.4.3. Sinais clínicos e comportamento biológico

O sinal clínico relacionado ao osteossarcoma apendicular se detém em sua multiplicidade à claudicação em graus variados e à tumefação do foco primário da neoplasia. Outra condição é o desconforto, proveniente de microfraturas ou da osteólise, que pode levar a ruptura do periósteo ou em graus mais avançados à fratura total ou parcial do osso acometido (HEYMANN, 1992; HAMMER et al.; 1995; DERNELL et al.; 2001).

O osteossarcoma axial reflete sinais clínicos diversificados de acordo com a sua localização, cavidade oral (disfagia), caudal a mandíbula e órbita (exoftalmia), região nasal (deformidade facial) e costelas (aumento de volume) (MISDORP, 1980; BARDE et al.; 1983; HEYMANN, 1992).

Ao abordarmos comportamentalmente esta neoplasia, é sabido que biologicamente ela condiz com um alto potencial de invasão local e de metástases, nas diferentes formas e apresentações (SPODNICK et al.; 1992). Refletindo a condição de 98% dos casos de osteossarcoma apendiculares serem positivos para micro-metástases em pulmão, fígado, linfonodos e trato gastrointestinal, no momento do diagnóstico (DICKERSON, 2001).

2.4.4. Diagnóstico

O diagnóstico é baseado na anamnese, sinais clínicos, exames citológicos e radiográficos. Contudo a fim de se estabelecer um diagnóstico definitivo, descartando a possibilidade de uma osteomielite ou procurando a determinação exata ao tipo do

tumor, uma biópsia é necessária, salientando que a coleta de material deve conter o bordo da lesão, uma vez que o centro é repleto por tecido necrótico (LINDENBAUM & ALEXANDER, 1984; DALECK, 1996).

O exame citológico reflete células mesenquimais fusiformes pleomórficas individualizadas, abundante material osteóide eosinofílico extracelular e critérios de malignidade elevados chamando à atenção as binucleações e multinucleações.

Do ponto de vista histológico as diferentes categorias do osteossarcoma possuem uma questão convergente representada pela proliferação de células mesenquimais com produção de matriz osteóide (MARINA et al., 2004). Contudo os critérios adotados para classificação histológica dos tumores ósseos dos animais domésticos, em especial o osteossarcoma, seguem o modelo proposto pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (AFIP), que reconhece três grandes subtipos mais frequentes representados pelo osteoblástico (produtivo e não produtivo), fibroblástico e condroblástico; e menos frequentes os subtipos teleangiectásico, tipo células gigantes, pobremente diferenciados e mistos ou combinados (DALECK, 1996; KIRPENSTEIJN et al., 2002).

Quanto aos diagnósticos por imagem, a cintilografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética são outras possibilidades que superam a radiografia (LAMB, 1990; McENTEE, 1997). Contudo, é fato que o exame radiográfico, por questão de logística e custo, suplanta os demais exames de imagem uma vez que fornece evidências que auxiliam no estabelecimento do diagnóstico (LAMB, 1990). Os padrões radiológicos encontrados no osteossarcoma são divididos em lesões líticas (osteolítico), proliferativas (osteoblástico) e mistas quando os dois padrões estão presentes, ressaltando o fato de que os osteossarcomas apendiculares raramente ultrapassam a articulação (LAMB, 1990; MISDORP, 1990).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Aplicar um modelo de estudo experimental *in vitro* do osteossarcoma canino, para servir de suporte ao estudo do gene *FOXE1*, visto que ele é um gene supressor tumoral pouco investigado, entretanto de extrema importância na pesquisa do câncer pelo fato de estar envolvido com a via de sinalização HH/GLI2 que regula positivamente o crescimento celular. Com isso, sendo possível monitorar do comportamento biológico do osteossarcoma.

3.2. Objetivo específico

- Determinar o padrão de metilação da região promotora de *FOXE1* pela técnica de PCR específica para detecção de metilação (PCR-MSP).

- Verificar a expressão gênica de *FOXE1* com análise relativa por PCR em Tempo Real.

- Verificar a possível relação entre o padrão de metilação de *FOXE1* com a expressão gênica verificada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

O presente trabalho foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, *campus* Botucatu (Anexo 1). A inclusão dos pacientes foi condicionada ao consentimento escrito dos proprietários (Anexo 2), após o esclarecimento sobre o protocolo experimental, o qual incluiu o exame citopatológico, histopatológico, manutenção de culturas de células neoplásicas *in vitro* e a publicação dos dados em revistas especializadas no assunto.

No seu desenvolvimento foi utilizado para composição das culturas, material biológico de cinco peças cirúrgicas correspondentes a membros apendiculares de cinco cães sem restrição de sexo e idade, com o diagnóstico clínico e citológico de osteossarcoma, atendidos no Hospital Veterinário entre março de 2009 e janeiro de 2011. Também foi obtido um fragmento de uma fratura óssea de um cão de 7 anos de idade do atendimento do Serviço de Cirurgia da presente Instituição, que serviu de controle para avaliação de osteoblastos normais.

4.2. Análise citopatológica

Os cães com suspeita clínica de osteossarcoma foram encaminhados à coleta de material para análise citopatológica por citologia aspirativa por agulha fina (CAAF). Para tanto, foram utilizadas seringas descartáveis de 10 ml, agulhas descartáveis e citoaspirador de Valeri. Após a anti-sepsia local, foi realizada a punção da massa, seguida da aplicação da pressão negativa, fazendo-se o posicionamento da agulha sem que ela saísse da massa tumoral, por conseguinte a pressão negativa foi relaxada e a agulha retirada da massa.

A agulha foi desacoplada da seringa, um pequeno volume de ar foi aspirado para dentro da mesma para expulsar o conteúdo contido no canhão da agulha sobre as lâminas de microscopia, e o material foi imediatamente entendido. As amostras foram secas ao ar, fixadas com metanol e coradas pelo método de Giemsa, para posterior análise em microscópio óptico Leica Digital Module R (DMR) – Leica.

O diagnóstico de osteossarcoma corados por Giemsa seguiu o modelo proposto por Raskin (2003) e Withrow & Macewen's (2007), onde é descrito a presença células mesenquimais (osteoblastos) variando de fusiformes a arredondadas, pleomorfismo intenso, núcleos variando de arredondados a ovalados, multinucleações, nucléolos conspícuos ora únicos ora duplos, severa anisonucleose, figuras de mitose atípica e presença de matriz osteóide.

4.3. Análise histopatológica.

Os fragmentos de tecido neoplásico foram fixados em formalina tamponada 10%, posteriormente descalcificadas em Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) e encaminhadas ao Laboratório de Histopatologia da FMVZ- UNESP, campus Botucatu; onde foram incluídas em parafina, cortadas com espessura de 4 micrômetros, e coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina, para posterior análise em microscópio óptico Leica Digital Module R (DMR) – Leica. A classificação dos tumores seguiu o modelo proposto pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (AFIP), que para o OSA são sete, entretanto só foi utilizada a do osteossarcoma osteoblástico e do osteossarcoma misto.

4.4.Cultivo celular

4.4.1. Obtenção e manutenção das amostras

Prontamente, ao recebimento da peça cirúrgica que correspondeu ao membro apendicular com o diagnóstico anátomo-clínico de osteossarcoma, procedeu-se sob condições assépticas a coleta de amostras de células neoplásicas. Primeiramente, foram coletados fragmentos ósseos das regiões de transição entre osso normal e osso neoformado, que foram acondicionados em solução de Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4. Posteriormente, no Laboratório de Fertilização *in vitro* e Cultivo Celular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ- UNESP, campus Botucatu, os fragmentos foram mantidos em solução tripsinizada a temperatura de 37°C por 60 minutos com homogenizador magnético. Por imediato, a solução foi centrifugada e descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* e esta solução foi acondicionada em *garrafas* apropriadas com meio de cultivo DMEM alta glicose (Dulbecco's Modified Essential Médium), suplementado com soro fetal bovino (10%), combinação de penicilina (100U/mL) com streptomicina (100mg/mL) e anfotericina-B (2,5µg/mL). As amostras foram incubadas em estufa de CO₂ a 5%, umidade 95% e temperatura de 37°C para o cultivo e manutenção.

4.4.2. Caracterização das culturas

Após quatro passagens foi realizada a caracterização morfológica das culturas que compreenderam células cubóides e, por conseguinte, realizada a técnica citoquímica de *Alizarin Red* que corou positivamente matriz osteóide.

Posteriormente, as culturas foram submetidas à caracterização imunocitoquímica com o auxílio da citometria de fluxo, onde se utilizou um painel imunomarcador para osteoblastos (Tabela 1).

Tabela 1 - Anticorpos específicos para caracterização de osteoblastos.

Clone	Especificação	Laboratório	Marcação
U7034	EPOSTM Anti-Vimentin/HRP, Clone Vim 3B4	Dako	Citoplasma
U7022	EPOSTM Anti-Human Cytokeratin/HRP, Clone MNF116	Dako	Citoplasma
AB13418	AC monoclonal de cam anti Osteocalcina, clone OC4-30	Abcam	Citoplasma
SC73631	Ac monoclonal de cam anti Osteopontina	Santa Cruz	Citoplasma
AB22552	Sp7 / Osterix antibody	Abcam	Núcleo

Para a caracterização imunocitoquímica, as células foram ressuspensas em 3 mL de solução de tripsina a 37°C por cinco minutos, em seguida a mesma foi bloqueada com a adição de meio de cultivo completo com 20% de soro fetal bovino. Depois foram centrifugadas por 10 minutos a 2.000 RPM, o *pellet* foi ressuspensado em 1mL de PBS pH 7,2. Feito isso, as células foram fixadas com paraformaldeído a 5% (BD®). Em seguida realizou-se uma nova centrifugação por 10 minutos a 2.000 RPM, ressuspensão, e o material foi lavado com PBS, permeabilizado por 15 minutos com Fix&Perm (Invitrogen®), lavadas por mais duas vezes com PBS pH 7,2.

Finalmente a solução resultante foi acondicionadas em 100µL desta solução em 7 tubos plásticos para FACS Calibur da BD®. Posteriormente, foram instilados os respectivos anticorpos primários (Tabela 1) nos tubos previamente identificados, sendo que dois deles compreenderam os controles, sendo um o autofluorescente (sem nenhuma marcação) e o outro o controle com anticorpo secundário. Ficaram encubadas de 12 a 14h em temperatura de 4°C.

No dia seguinte foi instilado o anticorpo secundário fluorescente (FITC - Millipore) e após 1h realizou a leitura no Citômetro de fluxo Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Calibur da BD®, do Hemocentro da FM - UNESP, campus Botucatu.

4.5. Análise de Metilação

O DNA foi extraído a partir de 5×10^6 células das culturas de osteossarcoma caracterizadas via o Protocolo de extração de DNA - QIAamp® DNA Blood Mini Kit–50 (Quiagen®), em seguida o produto da extração foi quantificada com o auxílio de um espectrofotômetro, e posteriormente conservada em freezer -80°C ; que permaneceu até o momento do tratamento com bissulfito de sódio, onde as citosinas não metiladas foram convertidas em uracila .

Este produto foi submetido a PCR específica para detecção de metilação (PCR-MSP), conforme a técnica descrita por Hermann et al. (1996) (Anexo 3). Contudo, para realização da PCR-MSP foram utilizadas duas apresentações diferentes de enzimas DNA polimerase, representadas pela GoTaq® Green Master Mix e GoTaq® DNA Polimerase. Além disso, também se utilizou *primers* para a situação de DNA não metilado, onde os iniciadores foram transcritos pela cadeia de oligonucleotídeos sense 5' TTT GTA GGG TTG GAG ATT TAT G 3' e anti-sense 5' AAA ACA CAA AAA CAA CAA ATT C 3' que ampliaram de modo específico um região de 94 pares de base. Em contrapartida, a situação de DNA metilado foi utilizado um *primer* sense 5' TCG TAG GGT TGG AGA TTT AC 3' e anti-sense 5' GAA ACG AAA ACA ACG AAA TCG 3' que correspondeu a uma região de 88 pares de bases.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese no aparelho The PowerPac™ HC-Bio-Rad® em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (SAMBROOK et al., 2001) (Anexo 4) e corados com nitrato de prata (SANGUINETTI et al., 1994).

Como controles positivos foram utilizadas amostras de genes metilados e não metilados previamente sequenciados, e a sua autenticidade foi comparada com as sequências de bancos genômicos públicos.

4.6. Análise de expressão gênica

O Ácido Ribonucléico (RNA) foi extraído a partir de 5×10^6 células de culturas de osteossarcoma previamente caracterizadas, segundo o Protocolo de extração de RNA - RNeasy® Mini Kit-50 (Quiagen®), o resultado do processo foi quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro. Posteriormente, estas amostras foram conservadas em freezer -80°C até que fossem encaminhadas para análise da expressão. Concomitantemente foi realizada a análise da pureza deste RNA pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 6% (Anexo 5) no aparelho Electrophoresis Power Supply- EPS 200 (BioSurplus®), sendo documentado pelo UVP Sistema BioDoc-It.

A partir do RNA obtido foi sintetizada uma fita de DNA complementar (cDNA), segundo o protocolo do kit MultiScribe transcriptase reversa (Applied Biosystems®), que serviu como matéria prima para as análises de expressão gênica.

A partir de $5\mu\text{l}$ de cDNA e TaqMan® e do Universal PCR Master MIX, a técnica de RT-PCR foi realizada em duplicata, tanto com *primers FOXE1* - TaqMan® quanto para o controle endógeno com β -Actina Endogena Humana - TaqMan® (cod. Prod. 4326315E). O sistema Taqman® se baseou em sonda fluorescente que permitiu a detecção de um produto específico da PCR, conforme seu acúmulo durante os ciclos da reação.

A sonda foi constituída por um corante repórter fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda estava intacta, a proximidade do *quencher* reduziu bastante a fluorescência emitida pelo corante repórter por meio da transferência de energia por ressonância de fluorescência. Quando a sonda se anelou a sequência antes dos *primers* e clivou por meio da atividade da nuclease 5' da Taq-DNA polimerase, enquanto o *primer* era estendido. A clivagem da sonda separou o corante repórter do *quencher*, aumentando o sinal da fluorescência

emitida pelo repórter. A fluorescência foi monitorada em tempo real com um aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®) e seu respectivo programa para quantificação da expressão gênica.

5. RESULTADOS

5.1. Análise citopatológica

O resultado das análises citopatológicas das amostras dos animais estudados, foram positivas para neoplasia de células mesenquimais (osteoblastos) com produção de matriz osteóide (Figura 2).

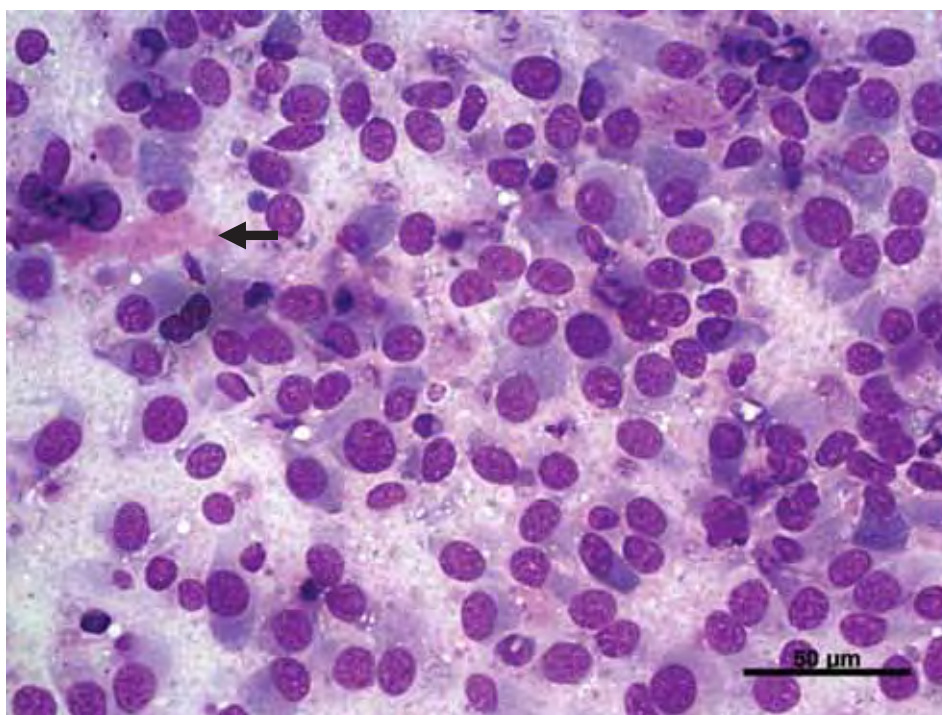


Figura 2 – Osteossarcoma. Aspirado de tecido. Células mesenquimais fusiformes pleomorfas com severa anisocitose e anisocariose. Os núcleos revelam cromatina granular e nucléolos conspícuos com moderada anisonucleose. Também há densos agregados de matriz mesenquimal imatura (seta). – Giemsa. 400X.

5.2. Análise histopatológica

O resultado das análises histopatológicas dos fragmentos que foram destinados às culturas: OSA 03, OSA 08, OSA 10 e OSA 13, corresponderam a osteossarcomas osteoblástico, salvo o OSA 07 que foi osteossarcoma misto (Figuras 3 e 4 respectivamente).

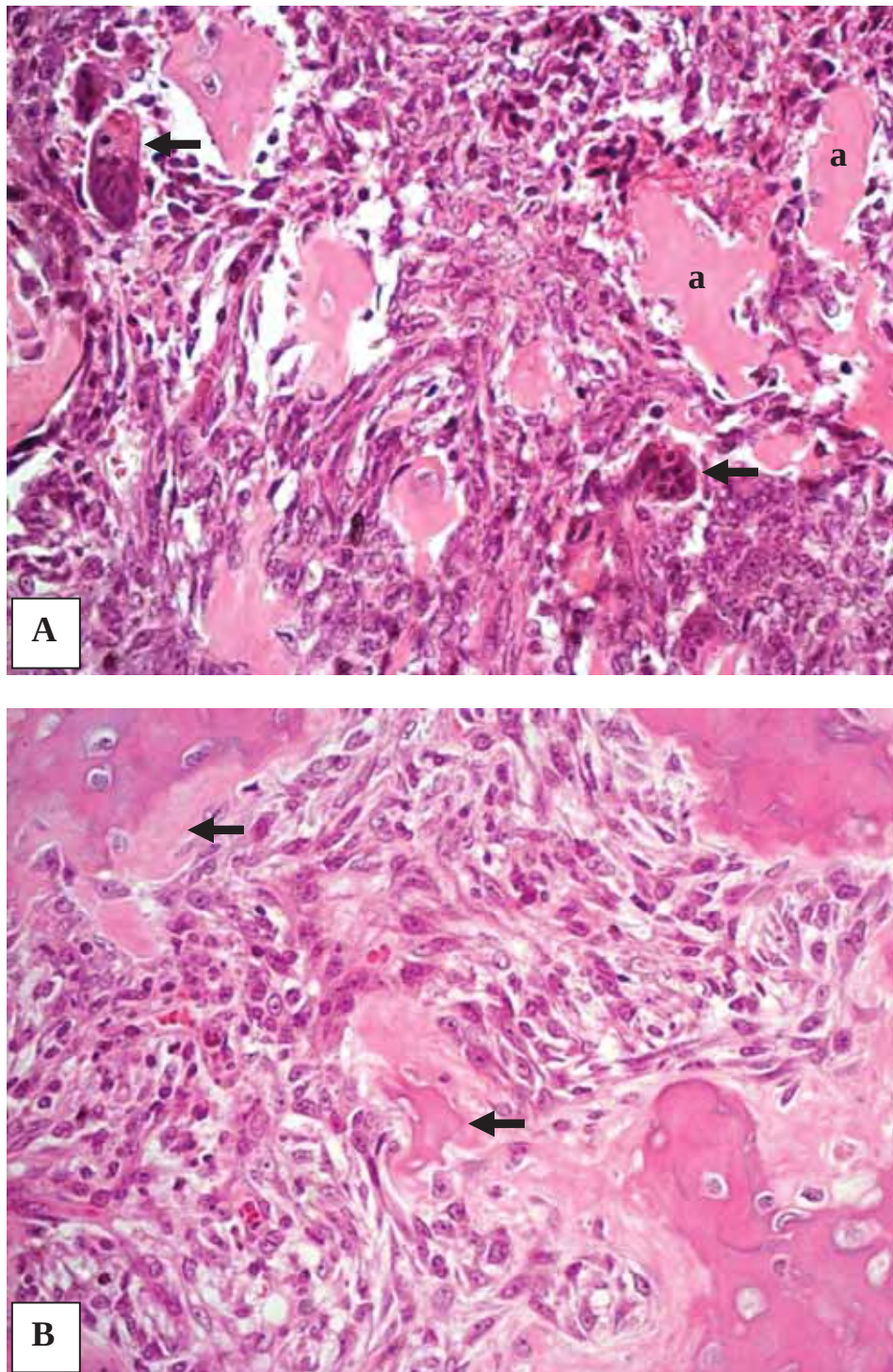


Figura 3 – OSA 03: osteossarcoma osteoblástico. Grande número de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Em A, notam-se nas áreas próximas das trabéculas (a) células e gigantes multinucleadas (setas). Em B, proliferação de osteoblastos neoplásicos e produção de matriz óssea não mineralizada (osteóide) (setas) – HE. 400X.

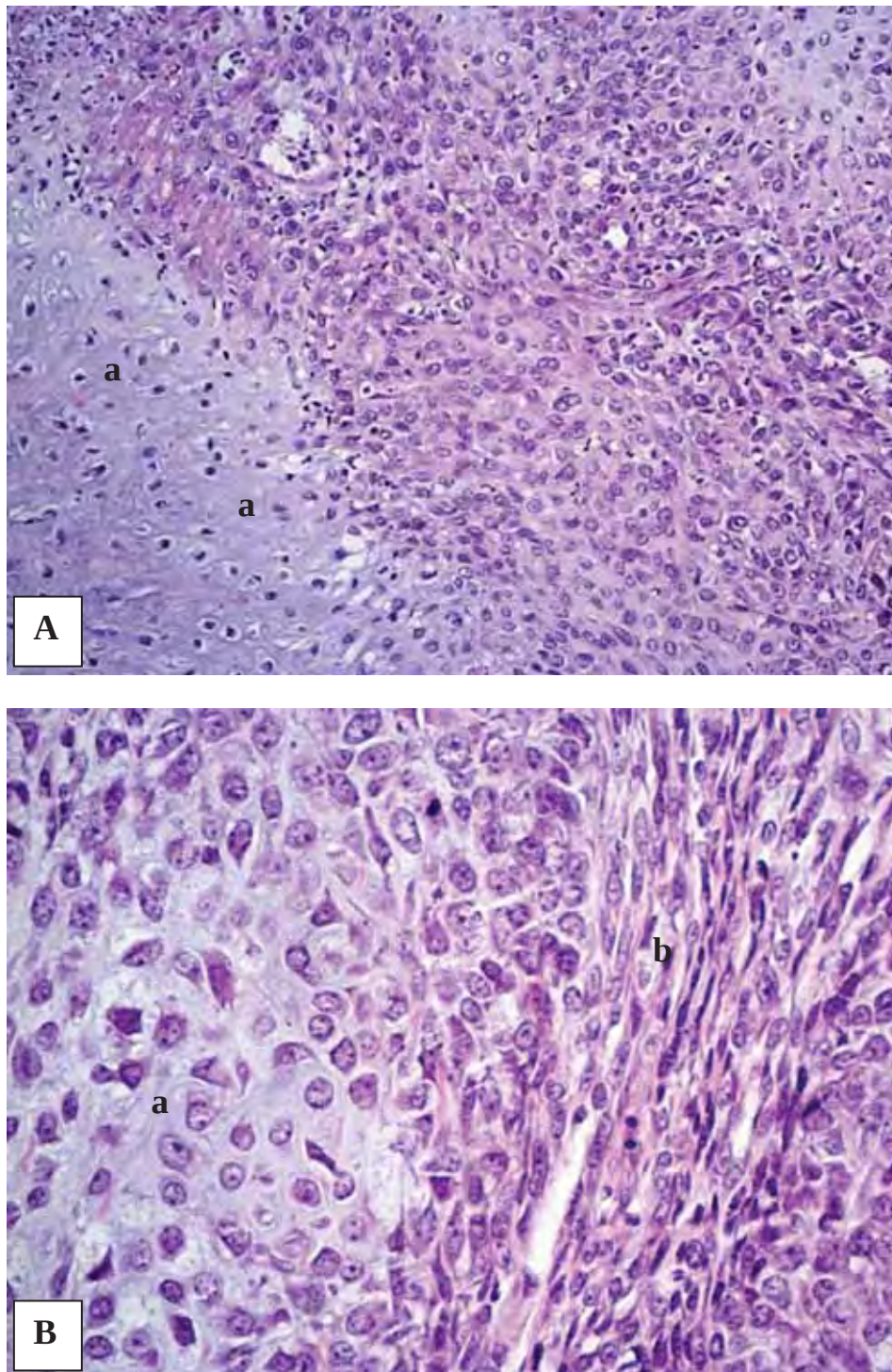


Figura 4 – OSA 07: osteossarcoma misto. Produção de matriz óssea maligna com ausência de predomínio celular. Em A, observa-se tecido cartilaginoso maligno (a) – HE. 200X. Em B, nota-se pleomorfismo celular, matriz condróide (a), tecido fibrossarcomatoso (b) – HE. 400X.

5.3.Cultivo e caracterização das culturas

Obtiveram-se cinco culturas de osteossarcoma que corresponderam à caracterização morfológica e citoquímica, chamando atenção aos altos critérios de malignidade (Figura 5).

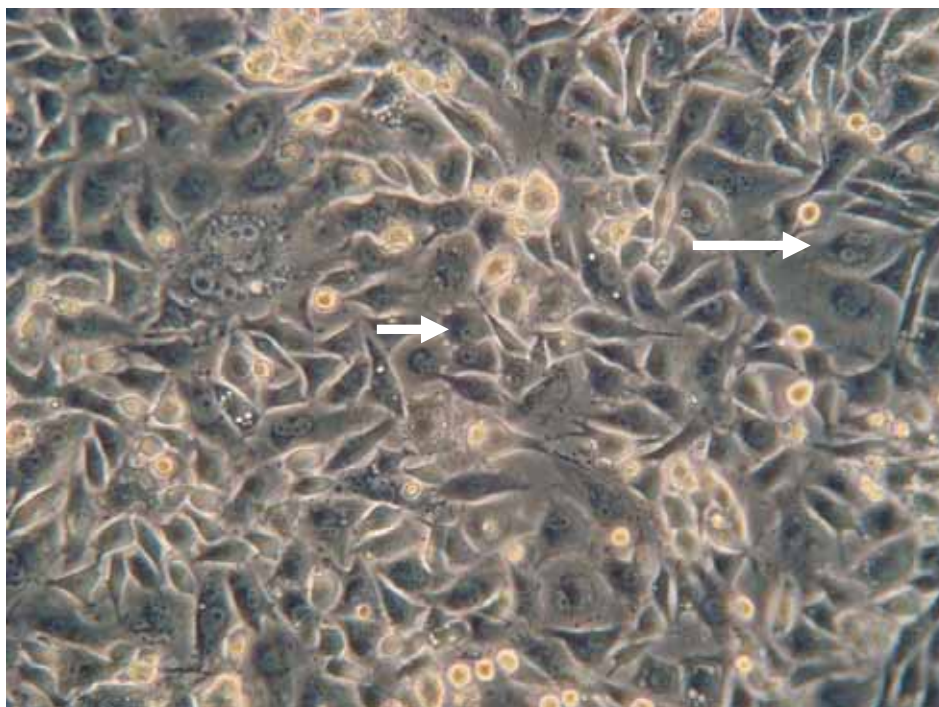


Figura 5 – Cultivo celular OSA 13. Observe uma população homogênea de células mesenquimais fusiformes que revelam critérios de malignidade, tais como multinucleações (seta maior) e nucléolos conspícuos (seta menor).

Pela caracterização por citometria de fluxo (Figura 6) foi observada alta expressão de todos os marcadores, salvo a citoqueratina, conforme descrito na tabela 2. Sendo que estatisticamente foi observado um limite aceitável de $P \leq 0,05$ que transpõe uma significância que nos permitiu validar as culturas como sendo de osteossarcoma.

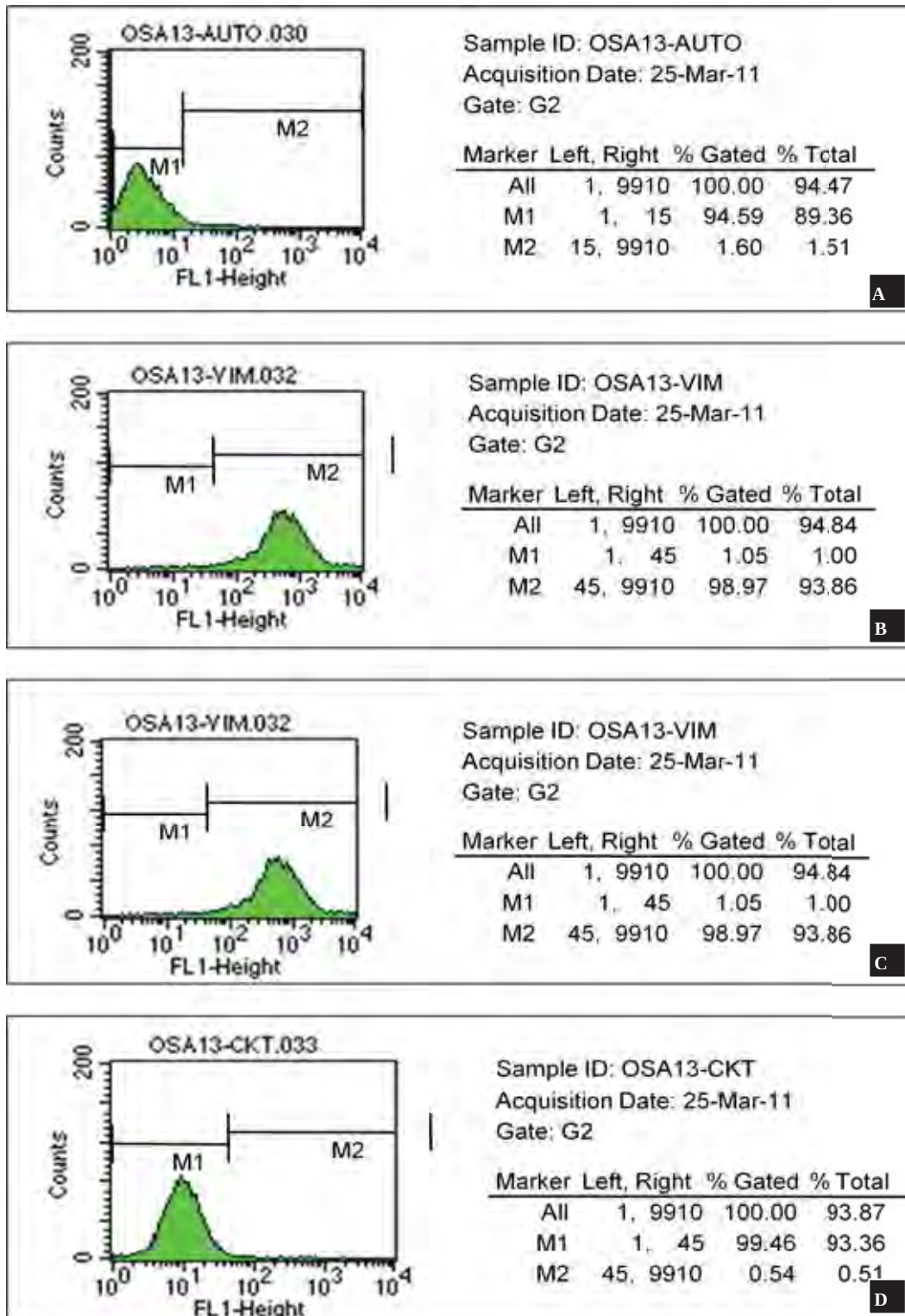


Figura 6 - Citometria de fluxo das células provenientes da cultura OSA 13. (A) Controle com células sem nenhuma marcação, (B) Controle com células associadas ao anticorpo secundário, (C) Células marcadas com vimentina e (D) Células marcadas com citoqueratina.

Tabela 2 – Imunomarcção das culturas de Osteossarcoma Canino. Citometria de fluxo.

Proteína	Cultivo celular (N=10.000)				
	OSA 03	OSA 07	OSA 08	OSA 10	OSA 13
Vimentina	99,46 ^a	97,91 ^b	98,39 ^c	94,25 ^d	98,97 ^e
Citoqueratina	1,00 ^a	0,16 ^b	0,34 ^c	0,65 ^d	0,54 ^e
Osteocalcina	17,74 ^a	43,82 ^b	23,3 ^c	30,61 ^d	21,45 ^e
Osterix	56,25 ^a	32,57 ^b	31,82 ^c	53,87 ^d	35,21 ^e
Osteopontina	40,43 ^a	17,81 ^b	26,17 ^c	35,67 ^d	37,37 ^e

^{a, b, c, d, e} Letras sobrescritas diferentes de cada categoria de proteína na mesma linha diferem significativamente ($P \leq 0,05$).

5.4. Análise de Metilação

A quantidade de DNA extraído das amostras foi satisfatória, pois os valores variaram entre 24,37 e 199,7 nanogramas de DNA por microlitro (ng/μl) (Tabela 3), quando comparados com o padrão mínimo que é de 25 ng/μl.

Os resultados das análises da PCR-MSP revelaram bandas específicas (Figura 7) nas amostras positivas para metilação (N/4) e para não metilação (N/4), conforme expresso na Tabela 4.

Tabela 3 - Mensuração de DNA das amostras envolvidas no experimento. Espectrofotometria

Amostras	ng/μl	A260	260/230	260/280	Const.
OSA 3*	134,2	2,68	2,03	2,0	50
OSA 7*	24,37	0,49	1,74	1,9	50
OSA 8*	136,4	2,73	2,25	1,95	50
OSA 10*	199,7	4,0	2,24	2,02	50
OSA 13*	60,14	1,2	2,09	2,08	50
TC 45**	109,49	2,737	2,15	2,11	50
ON***	27,83	0,557	1,81	0,3	50

*Amostras de culturas de osteossarcoma canino.

**Controle positivo para gene metilado e não metilado.

***Amostra de osteoblastos não neoplásicos.

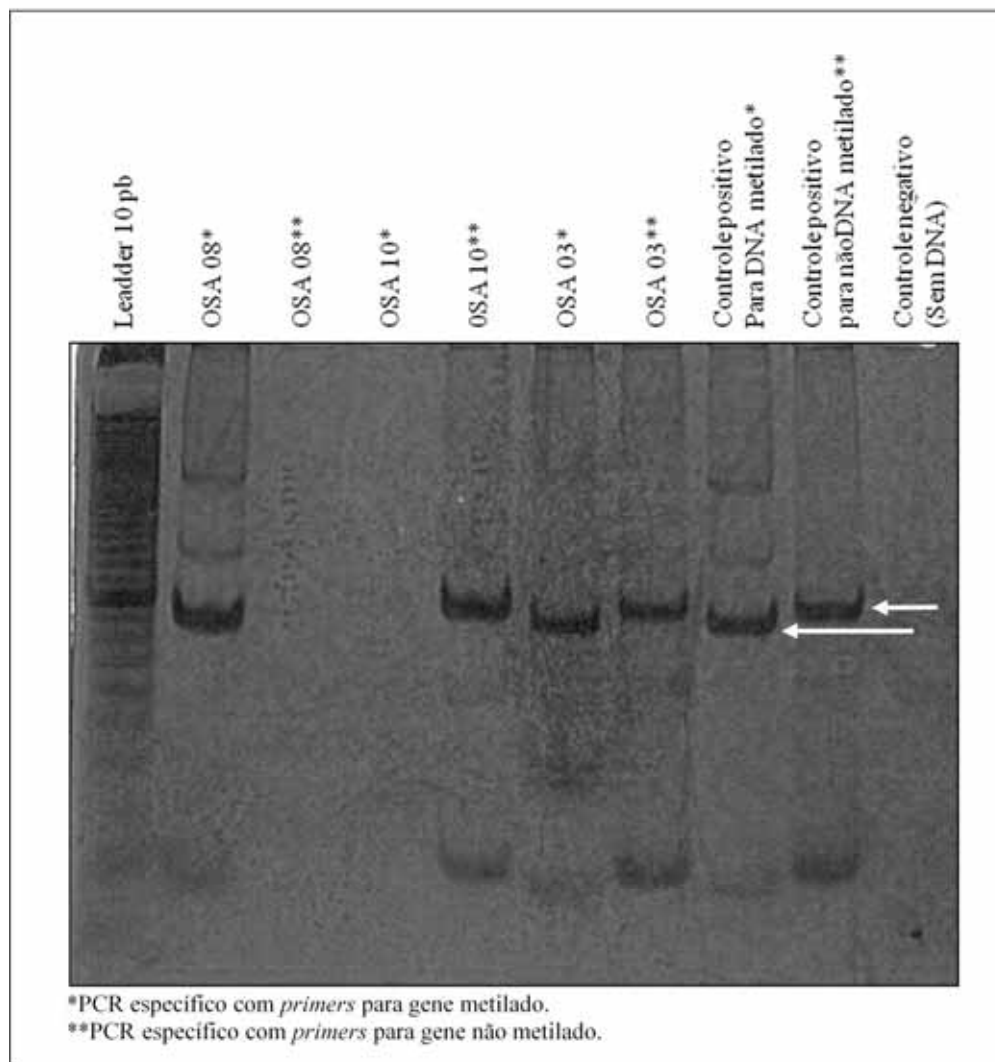


Figura 7 – Metilação do gene *FOXE1*. Observe a banda de 88pb do controle positivo para *FOXE1* metilado (Seta maior) e a banda com 94pb do controle positivo para *FOXE1* não metilado (Seta menor).

Tabela 4 - Análises de metilação das culturas de osteossarcoma canino obtidas por PCR-MSP.

	OSA3*	OSA7*	OSA8*	OSA10*	OSA13*	ON**
Metilado	+	+	+	-	+	-
Não Metilado	+	+	-	+	-	+

*Amostras de culturas de osteossarcoma canino.

** Amostra de osteoblastos não neoplásicos.

5.5. Análise de expressão gênica

A quantidade de RNA extraído das amostras foi satisfatória, pois os valores variaram entre 27,83 e 174,94 ng/μl (Tabela 5), quando comparados com o padrão mínimo que é de 20 ng/μl.

A qualidade deste produto foi satisfatória, uma vez que o RNA se apresentou livre de contaminação por DNA e íntegro com relação às subunidades 28S e 18S (Figura 8).

A síntese de cDNA apresentou resultados quantitativamente suficientes variando entre 1663,2 a 1894,6 ng/μl (Tabela 6), desta forma possibilitando que fossem encaminhados a análise de RT-PCR onde se exige o mínimo de 10000 ng/μl.

As análises de expressão gênica foram insatisfatórias, uma vez que não se observou a expressão do gene FOXE1 e β-Actina.

Tabela 5 - Mensuração de RNA das amostras envolvidas no experimento. Espectrofotometria

Amostras	ng/μl	A260	260/230	260/280	Const.
OSA 3*	174,94	4,37	1,27	2,08	40
OSA 7*	199	4,98	1,34	2,12	40
OSA 8*	252,89	6,32	1,15	2,09	40
OSA 10*	261,58	6,54	1,25	2,05	40
OSA 13*	246,6	6,17	0,95	2,1	40
TC 45**	109,49	2,74	2,15	2,11	40
ON*	27,83	0,56	1,81	0,3	40

*Amostras de culturas de osteossarcoma canino.

**Controle positivo para gene não metilado e não metilado.

***Amostra de osteoblastos não neoplásicos.

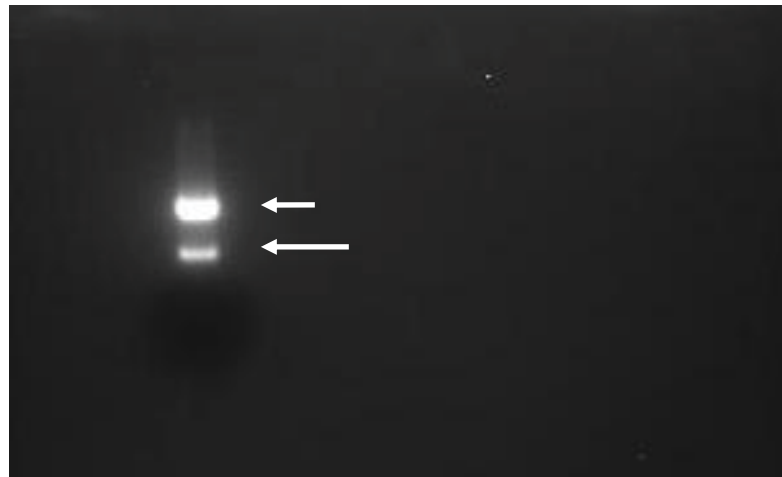


Figura 8 - Integridade das amostras de RNA. Observe as subunidades 28s (seta menor) e 18s (seta maior). Pelo UVP Sistema BioDoc-It.

Tabela 6 - Mensuração de cDNA das amostras envolvidas no experimento. Espectrofotometria

Amostras	ng/ μ l	A260	260/280	260/230	Const.
OSA 3*	1710	34,19	1,86	2,21	50
OSA 7*	1738,2	34,76	1,85	2,18	50
OSA 8*	1894,6	37,89	1,87	2,13	50
OSA 10*	1828	36,57	1,87	2,16	50
OSA 13*	1788	25,75	1,87	2,05	50
TC 45**	1663,2	33, 26	1,85	2,1	50
ON*	1702	34,04	2,29	1,85	50

*Amostras de culturas de osteossarcoma canino.

**Controle positivo para gene metilado e não metilado.

***Amostra de osteoblastos não neoplásicos.

6. DISCUSSÃO

Nos termos do objetivo deste trabalho, que foi aplicar um modelo de estudo experimental *in vitro* do osteossarcoma canino, para servir de suporte ao estudo do gene *FOXE1*, visto que ele é um gene supressor tumoral pouco investigado, entretanto de extrema importância na pesquisa do câncer pelo fato dele estar envolvido com a via de sinalização HH/GLI2, que regula positivamente o crescimento celular. Eles foram alcançados, visto que:

As culturas celulares de osteossarcoma *in vitro* são de suma importância para estudar seu comportamento biológico e processo de carcinogênese (MINAMITANI, 2000; LOUKOPOULOS et al., 2004). Desta forma, Loukopoulos et al. (2004), Hasegawa et al, (2008) e Jänh et al (2010) ressaltam que estudos experimentais baseados em células primárias condizem situações próximas à realidade *in vivo*, o que não é observado em linhagens celulares imortalizadas representadas por células uniformes com suas características bem definidas. Neste ponto, o presente trabalho estudou o gene *FOXE1* de células baseadas em cultivos primários e não em linhagens, com o intuito de prever situações mais próximas à realidade, uma vez que Owel et al. (1990) observou a inibição e expressão de determinados genes associados a maturação e diferenciação em culturas imortalizadas.

Ao se estabelecer um cultivo primário neoplásico, é de suma importância a realização de sua avaliação histopatológica que servirá como subsídio à validação da cultura, e compreensão de sua biologia celular, visto o comportamento distinto dos diferentes subtipos de osteossarcoma (HASEGAWA et al, 2008; JÄNH et al, 2010). Daleck (1996) e Kirpensteijn et al. (2002) relataram a alta prevalência de osteossarcoma osteoblástico, o que também foi observado no presente estudo ao diagnosticarmos quatro osteossarcomas osteoblásticos e um misto. Vale ressaltar que a o critério adotado

para classificação do osteossarcoma esteve de acordo com modelo proposto pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (AFIP), onde observamos no osteossarcoma osteoblástico a associação de matriz osteóide a células mesenquimais com um padrão pleomórfico intenso, nucléolos conspícuos ora ovalados ora arredondados que variaram de um a dois exibindo severa anisonucleose, alto índice de figuras de mitose atípicas, cromatina frouxa e multinucleações; o osteossarcoma misto apresentou as mesmas características descritas anteriormente, contudo com associação de condroblastos.

Os achados morfológicos dos osteoblastos cultivados foram representados por células variando de redondas a poligonais. O que também foi observado por Cao et al. (2006) e Hasegawa et al. (2008) em modelos experimentais de culturas primárias de osteoblastos de coelhos, e igualmente descrito por Jähn et al (2010) em modelos de culturas primárias de osteoblastos humanos. Minamitani (2000) ao trabalhar com linhagens de osteossarcoma humano esteve em concordância com as características descritas anteriormente, salvo aos critérios de malignidade correspondentes a multinucleações e nucléolos conspícuos revelando severa anisonucleose; o que está em comum acordo neste experimento.

Segundo Davies (2003) os osteoblastos são as únicas células capazes de sintetizar e secretar matriz osteóide (colágeno tipo I, proteoglicanos, glicoproteínas sulfato de condroitina, osteocalcina, osteopontina e osteonectina), que servirá como base para mineralização, através da deposição de íons de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita, que ao permear os osteoblastos caracterizam os osteócitos (GOUGH et al, 2003; VENUGOPAL et al, 2011). Sudo et al. (1983) e Liu et al. (2004) observaram a mesma situação, contudo em culturas de osteoblastos *in vitro*. Sendo assim o presente estudo obteve culturas positivas para coloração imunocitoquímica de *Alizarin Red*, que

caracteriza uma cultura como sendo de osteossarcoma canino (GOUGH et al, 2003; CAO et al, 2006; HASEGAWA et al, 2008; JÄHN et al, 2010; VENUGOPAL, 2011).

A citometria de fluxo mostrou-se uma técnica adequada à análise imunocitoquímica de culturas celulares. Esta observação já fora feita por Rattner et al. (1997) e Faldyna et al (2001), que consideram a técnica um método prático que revela resultados objetivos, ao identificar e quantificar as células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência.

Moore et al (1989) estabeleceu o uso do anticorpo monoclonal anti-vimentina para detecção destes grupos de filamentos intermediários em tecidos caninos, onde sua marcação positiva permitiu a classificação do tecido como de origem mesenquimal (WILLIAMSON & MIDDLETON, 1998), como é situado em tecidos humanos (LEADER et al., 1987). Desta forma, Loukopoulos et al. (2004) destaca a importância da análise da vimentina em consórcio com a citoqueratina, para estabelecer a origem mesenquimal das culturas celulares de osteossarcoma canino contribuindo para sua validação; o que esta em comum acordo com o presente estudo que revelou resultados positivos para o anticorpo anti-vimentina e negativos para o anticorpo anti-citoqueratina, nas culturas avaliadas de osteossarcoma.

Jähn et al. (2010) e Matsubara et al. (2008) descreveram a importância da proteína osterix na diferenciação de osteoblastos. Rattner et al. (1997) e Davies (2003) afirmam que a osteocalcina é uma proteína não colagenosa expressa somente por osteoblastos, com isso sendo de extrema importância na caracterização de culturas de osteossarcoma. Rattner et al. (1997), Loukopoulos et al. (2004) e Hasegawa et al, (2008), ressaltam a importância da marcação da osteopontina, que apesar de não específica, está sempre presente na formação de matriz osteóide. Neste contexto, todas as proteínas descritas foram expressas no presente estudo.

Com isso e seguindo os modelos de caracterização descritos por Rattner et al. (1997), Minamitani (2000), Gought et al. (2003) Loukopoulos et al. (2004), Hasegawa et al. (2008) e Jähn et al. (2010), as células cultivadas nesta pesquisa foram osteoblastos que possuíam grande potencial osteogênico levando em consideração a morfologia celular, produção de matriz mineralizada e marcação imunocitoquímica.

Como este é o primeiro estudo abrangente que pretende verificar os padrões de metilação e expressão do gene *FOXE1* em culturas primárias de osteossarcoma; se desconhecem dados na literatura especializada no assunto que possam ser confrontados, entretanto e de acordo com Pardini (2011) ao estudar o padrão de metilação em carcinoma de células escamosas de cães, foi possível concluir que a técnica para avaliar o padrão de metilação do gene *FOXE1* em seres humanos pode ser utilizada para a mesma avaliação em cães, uma vez que ela foi aplicável ao presente estudo.

Foi neste cenário, que se evidenciaram os resultados elevados dos índices de metilação das culturas de osteossarcoma canino em relação a osteoblastos normais que não se apresentaram metilados, desta forma surgindo um novo enfoque ao gene *FOXE1* que anteriormente não apresentava sua importância descrita na biologia celular de osteoblastos neoplásicos.

Desta forma, ao confrontarmos os resultados das análises de metilação das culturas de osteossarcoma, notamos que uma (OSA 10) se encontrou não metilada, duas (OSA 08 e OSA 13) se mostraram metiladas, duas (OSA 03, OSA 07) revelaram as duas situações e a amostra de osteoblastos normais se apresentou não metilada, o que sugere que a metilação possa estar envolvida com o processo de carcinogênese do osteossarcoma canino. Apesar dos autores Paik et al. (2007), Brunet et al. (2007) e Kops et al. (2002) não terem utilizado o mesmo sistema, também verificaram a metilação em hemangiomas e linfoma tímicos. O

que leva a acreditar que este modelo pode ser utilizado para compreensão da carcinogênese do osteossarcoma canino.

Outra situação apresentada foi que um cultivo de osteossarcoma canino não estava metilado, o que diante da contextualização pode ser relacionado a uma mutação em seu DNA e não uma condição de silenciamento gênico conforme descrito por Ushima & Asada (2009).

Todavia frente à ausência de dados sobre a atuação do gene *FOXE1* em osteoblastos e os resultados obtidos no presente estudo, evidenciou-se uma situação até o momento não descrita na literatura. Como propósito de complementar os resultados de metilação optamos pela análise de expressão gênica com PCR em Tempo Real, tendo como finalidade um resultado mais palpável sobre a expressão do gene *FOXE1*. Sobre esta base e pioneiros na aplicação desta técnica com relação ao gene *FOXE1* em cães, foram utilizados primers para *FOXE1* e β -Actina desenhados para humanos, entretanto os resultados insatisfatórios não os validaram para cães, desta forma existindo a necessidade de se fazer um *primer* específico para cães.

É difícil estabelecer uma associação do gene *FOXE1* e sua aplicabilidade com o osteossarcoma canino, contudo comunicações atuais inferem possíveis vias de que possam ser aplicadas ao processo de carcinogênese do osteossarcoma. Diante deste referencial, Eichberger et al. (2004) e Grosjean & Couvé-Privat (2004) ao estudarem carcinomas basocelulares, concluíram o papel importante do gene *FOXE1* ao regular negativamente a via de sinalização Sonic Hedgehog (HH)/GLI2, cuja função é sinalizar positivamente a proliferação celular. Esse posicionamento vem compactuar com os dados de Venza et al. (2010) que inferiu o gene *FOXE1* como um possível candidato a gene supressor tumoral, uma vez que foi encontrado altamente metilado em carcinomas de células escamosas.

Nesta conjuntura e tendo em vista que o gene *FOXE1* não só foi identificado como foi encontrado metilado no presente estudo, pode existir associação do gene *FOXE1* e o osteossarcoma na mesma condição descrita anteriormente, uma vez que a via sinalização HH/GLI2 tem um papel fundamental na proliferação de osteoblastos tanto na vida embrionária, como na vida pós-natal ao regular o crescimento e reparação de fraturas óssea (VORTKAMP et al, 1997; LONG et al., 2004; DAY & YANG, 2008; TORO & MÁRQUEZ, 2008; JOENG et al., 2009; KIM et al, 2010)

Diante deste posicionamento epigenético que abordamos a metilação, e em comum concordata com Zöchbauer-Müller et al. (2002), estes resultados preliminares podem ser contributivos à aplicações clínicas, desta forma possibilitando a abordagem precoce do paciente ou mesmo despertando o interesse de indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de drogas desmetilantes.

Apesar do número reduzido de amostras examinadas no presente estudo, os resultados aqui apresentados não podem ser generalizados, mas sim servir de subsídio para colocar em evidência e inferir uma condição epigenética de metilação do gene *FOXE1* e sua possível associação com o processo de carcinogênese do osteossarcoma canino, bem como sua atuação em condições fisiológicas do desenvolvimento ósseo, que até o momento não se tem conhecimento de relatos semelhantes na literatura especializada no assunto.

7. CONCLUSÃO

Sob as condições do modelo experimental *in vitro* do osteossarcoma canino propostas deste trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

- Foi possível determinar o padrão de metilação da região promotora de *FOXE1* pela técnica de PCR específica para detecção de metilação (PCR-MSP).
- A extrapolação do *primer FOXE1* humano para quantificar a expressão gênica do cão não é possível.

8. PERSPECTIVAS

Uma vez o gene *FOXE1* identificado o passo seguinte é:

- Investigar o papel do gene *FOXE1* e seus fatores de transcrição na carcinogênese do osteossarcoma.
- Validar a Técnica de PCR em Tempo Real com *primers* específicos para cães, com o intuito de correlacionar o padrão de metilação com a expressão gênica.
- Investigar a possível associação do gene *FOXE1* com a via de sinalização HH/GLI2 do osteossarcoma canino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL, L. L.. Establishment of experimental model of cultured rat's osteoblast in vitro. *Journal of Tianjin Medical University* , p.139–42, 2004.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. Como as células são estudadas. In: B. B. ALBERTS, *Biologia molecular da célula* (3 ed. ed., p. 156-162). Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- ATHANASOU, N. Cell and organ culture in the understanding of bone and its neoplasms. *Pathology of bone and joint neoplasms* (W.B. SAUDENRS), p. 34-58, 1999.
- BARDET, J. Extraskelatal osteossarcomas: literature review and case presentation. *Journal of the american animal hospital association* , v.19, p. 601-604, 1983.
- BASS, A.; WATANABE, H.; MERMEL, C. SOX2 is an amplified lineage survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature genetics* , v.41, p. 1238-1244, 2009.
- BRUNET, A. B.; ZIGMOND, M.; LIN, M.; JUO, P.; HU, L. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* , v.196, p. 857-868, 1999.
- CAO, X.; YIN, X.; Z. L.; LI, S. Establishment of a new model for culturing rabbit osteoblasts in vitro. *Biomed. Mater* , p. 17-19, 2006.
- CHUN, R. & LORIMIER, L. Update on the biology and management of canine osteossarcoma. *The veterinary clinics of north america: small animal practice* , p. 492-516, 2003.
- CHUN, R.; KURZMAN, I.; COUTO, C.; KLAUSNER, J.; HENRY, C.; MacEWEN, E. Cisplatin and doxorubicin combination chemotherapy for the treatment of canine

- osteossarcoma: pilot study. *Journal veterinary international medicine* , v.14, p. 495-498, 2000.
- CLIFTON-BLIGH, R. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associate with thyroid agenesis, cleft palate an choanal atresia. *Nature Genetcs* , v.19, p. 330-401, 1998.
- DALECK, C. R. Osteossarcoma canino. *Clínica Veterinária* , v.01 (n.15), p. 26-27, 1996.
- DAVIES, J. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education* , 67, p. 932-949, 2003.
- DAY, T. & YANG, Y. Wnt and hedgehog sinaling pathways in bone development. *Journal of bone and joint surgery* , v.90, p. 19-24, 2008.
- DERNELL, W. S.; STRAW, R. C.; WITHROW, S. Tumors of the skeletal system. *Small animal clinical oncology* (3 ed.), p. 378-417, 2001.
- DICKERSON, M. Restripective analisys of axial skeleton osteossarcoma in 22 large-breed dogs. *Journal of veterinary internal medicine* , v.15 (n.2), p. 120-124, 2001.
- EICHBERGER, T.; REGL, G.; IKRAM, M.; NEILL, G.; PHILPOTT, M.; ABERGER, F. FOXE1, a new trascriptional target of GLI2, is expressed in human epiderms and basal cell carcinoma. *The society for investigative dermatology* , v.122, p. 1180-1187, 2004)
- FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOTA, P. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - a fow cytometric study. . *Veterinary immunology and ummunophatologY* , 82, p. 23-27, 2002.
- FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells*. New York: Wiley-Liss, 2000.
- GORDON, J.; TYE, C.; SAMPAIO, A.; UNDERHILL, T.; HUNTER, G.; HARVEY, A.G. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone* , p. 462-473, 2007.

- HAMMER, A.; WEEREN, F.; WEISBRODE, S.; PADGETT, S. Journal of the american animal association. *Prognostic factors in dogs with osteosarcoma of the flat or irregular bones* , v.31 (n.04), p. 321-326, 1995.
- HASEGAWA, Y.; SHIMADA, K.; SUZUKI, N.; TAKAYAMA, T.; KATO, T.; IEZUKA, T.; SATO, S.; ITO, K. The in vitro osteogenic characteristic of primary osteoblastic cells from a rabbit calvarium. *Journal of oral science.* , 50, p. 427-434, 2008.
- HERMAN, J. G. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, v.93, p. 9821-9826. 1996. , v.93, p. 9821, 1996.
- HEYMANN, S. J. Canine axial skeletal osteosarcoma: A retrospective study of 116 cases (1986-1989). *Veterinary surgery* , v.21 (n.03), p. 304-310, 1992.
- IRIE, K.; ZALZAL, S.; OZAWA, H.; MCKEE, M.; NANJI, A. Immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures. *The anatomical record* , v.252, p. 554-567, 1998.
- JÄHN, K.; RICHARDS, R.; ARCHER, C.; STODDART, M.. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *European Cells and Materials* , v.20, p. 149-161, 2010
- JOHNSON, K.; WATSON, A.; PAGE, R. Afecções esqueléticas. In: xxx, *Tratado de medicina interna veterinária* (p. 2867-2900). Philadelphia: W. B. Saunders, 1997.
- KALIN, T.; WANG, C.; ACKERSON, T.; MAJOR, M.; DETRISAC, C.; KALINICHENKO, V. Increased levels of the FoxM1 transcription factor accelerate development and progression of prostate carcinomas in both TRAMP and LADY transgenic mice. *Cancer research* , v.66, p. 1712-1720, 2006.
- KALINICHENKO, V.; ZHOU, Y.; SHIN, B.; STOLZ, D.; WATKINS, S.; WHITSETT, J. Wild-type levels of the mouse Forkhead Box f1 gene are essential for lung repair.

- American journal physiology lung cellular and molecular physiology* , v.282, p. 1353-1265, 2002.
- KANG, M.; KIM, H.; JUNG, Y.; KIM, Y.; HONG, S.; KIM, M. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *Journal of cellular biochemistry* , v.102, p. 224-239, 2007.
- KARSENTY, G. & WAGNER, E. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell* , v.02, p. 389-406, 2002.
- KIM, W.; MELITON, V.; BOURQUARD, N.; HAHN, T.; PARHAMI, F. Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow stromal cells are inhibited by oxidative stress. *Journal of cellular biochemistry*, 2010.
- KIMURA, H.; NG, J.; CURRANT, T. Transient inhibition of the hedgehog pathway in young mice cause permanent defects in bone structure. *Cancer cell* , v.13, p. 249-260, 2008.
- KIRPENSTEIJN, H.; KIK, M.; RUTTEMAN, G.; TESKE, E. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Veterinary pathology* , v.39, p. 240-246, 2002.
- KOPS, G.; MODEMA, R.; GLASSFORD, J.; ESSERS, M.; DIJKERS, S.; COFFER, P. Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulate forkhead transcription factors. *Molecular and cellular biology* , v.22, p. 2025- 2036, 2002.
- KORNAK, U. & MUNDLOS, S. Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *The american journal of human genetics* , v.73, p. 447-474, 2003.
- LACOUR, J. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *British journal of dermatology* , v.146, p. 17-19, 2002.

- LAMB, R. C. Preoperative measurement of canine primary bone tumors using radiography and bone scintigraphy. *Journal of the american medical association* , v.196, p. 1032-1037, 1990.
- LINDENBAUM, S. & ALEXANDER, H. Infections simulating bone tumors: a review of sub acute osteomyelitis. *Clinical orthopaedics* , v.184, 1984.
- LOUKOPOULOS, P.; THORNTON, J.; ROBINSON, W. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. *Veterinary pathology* , v.40, p. 237-248, 2003.
- MANI, S.; YANG, J.; BROOKS, B.; SCHWANINGER, G.; ZHOU, P.; MIURA, M. Mesenchyme Forkhead (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proceedings of the national academy of sciences* , v.104, p. 10069-10074, 2007.
- MARINA, N.; GEBHARDT, M.; TEOT, L.; GORLICK, R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist* , p. 422-441, 2004.
- MATSUBAYASHI, H.; CANTO, M.; SATO, N.; KLEIN, A.; ABE, T.; YAMASHITA, K. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer researchs* , v.66, p. 1208-1217, 2006.
- McENTEE, M. C. Palliative radiotherapy for canine apendicular osteosarcoma. *Veterinary radiology & ultrasound* , v.34 (n.05), p. 367-370, 1997.
- McMAHON, A.; INGHAM, P.; TABIN, C. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Current topics in developmental biology* , v.53, 2003.
- MINAMITANI, K. Establishment of an osteoblastic osteosarcoma cell line and effects of cell culture conditions on secretion of matrix metalloproteinases from the cultured osteosarcoma Cells. *Kurume Medical Journal*, 47,115-124, 2000 , 47, p. 115-124, 2000.

- MISDORP, W. General considerations. In: J. E. MOULTON, *Tumors in domestic animals* (3 ed., p. 122). London: University of California press, 1990.
- MISDORP, W. Skeletal osteosarcoma. *American journal of pathology* , p. 285-288, 1980.
- MISDORP, W. & HART, A. Some prognostic and epidemiological factors in canine osteosarcoma. *Journal of the national cancer institute* , p. 537-545, 1979.
- ONO, M.; YAGUCHI, H.; OHKURA, N.; KITABAYASHI, I.; NAGMURA, Y.; NOMURA, T. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* , v.446, p. 685-689, 2007.
- PAIK, J.; KOLLIPARA, R.; CHU, G.; JI, H.; XIAO, Y.; DING, Z. Foxos are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* , v.128, p. 309-323, 2007.
- PARK, S. & CHATTERJE, V. Genetics of congenital hypothyroidism. *Journal of medical genetics* , v.42, p. 379-389, 2005.
- PATNAIK, A. Canine extraskeletal osteosarcoma and chondrosarcoma: a clinicopathological study of 14 cases. *Veterinary pathology* , p. 46-55, 1990.
- PERRIEN, D.; BROWN, E.; ARONSON, J.; SKINNER, R.; MONTAGUE, D.; BADGER, T. Immunohistochemical study of osteopontin expression during distraction osteogenesis in the rat. *The journal of histochemistry* , v.50, p. 567-574, 2002.
- POOL, R. R. Tumors of bone and cartilage. In: J. E. MOULTON, *Tumors of domestic animals* (p. 157-230). Berkeley: University of California press. 1990.
- PRITCHARD, D.; FINKEL, M.; REILLY, C. The etiology of osteosarcoma a review of current considerations. *Clinical orthopedics* , v.14 , n.03, 1975.
- RADHAKRISHNAN, S.; BHAT, U.; HUGHES, D.; WANG, I.; COSTA, R.; GARTEL, A. Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box m1. *Cancer research* , v.66, p. 9731-9735, 2006.

- RATTNER, A.; SABIDO, O.; MASSOUBRE, C.; RASCLE, F.; FREY, J. Characterization of human osteoblastic cells: influence of the culture conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, p. 757-762, 1997.
- RINGENBERG, M.; NEITZEL, L.; ZACHARY, J. Meningeal osteosarcoma in a dog. *Veterinary pathology*, p. 653-655, 2000.
- RU, G.; TERRACINI, B.; GLICKMAN, L. Host related risk factors for canine osteosarcoma. *Veterinary journal*, v.156, p. 31-39, 2000.
- SANGUINETTI, C. J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, v.17, p. 914-921, 1994.
- SEO, S.; FUJITA, H.; NAKANO, A.; KANG, M.; DUARTE, A.; KUME, T. The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Developmental biology*, v.294, p. 458-470, 2006.
- SPODNICK, G.; BERG, J.; RAND, W.; SCHELIG, S.; COUTO, G.; HARVEY, H. Prognosis for dogs with appendicular osteosarcoma treated by amputation alone: 162 cases (1978-1988). *Journal of american veterinarian medical association*, v.200, p. 995-999, 1992.
- STEPHEN, S. & ERIC, W. The emerging roles of forkhead box (fox) proteins in cancer. *Nature*, v.07, p. 847-859, 2007.
- STINSON, E.; COOK, W.; SMITH, M.; SAUNDERS, G. Extraskelatal osteosarcoma in the duodenum of a cat. *Journal of the american animal hospital association*, v.21, p. 859-873, 2000.
- STRAW, R.C. Tumors of the skeletal system. In: E. & WITHROW, *Small animal clinical oncology* (p. 378-417). Philadelphia: W. B. Saunders, 1996

- THE, M.; WONG, S.; NEILL, G.; GHALI, L.; PHILPOTT, M.; QUINN, A. FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer research* , v.62, p. 4773-4780, 2002.
- THOMSEN, B. & MYERS, R.K. Extraesqueletal osteossarcoma of the mandibular salivary gland in a dog. *Veterinary pathology* , v.36, p. 71-73, 1999.
- TROPEL, P. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental cell research* , v.295, p. 395-406, 2004.
- VAN DOORN, R.; ZOUTMAN, W.; DIJKMAN, R.; DE MENEZES, R.X.; COMMANDEUR, S.; MULDER, A.A.; VAN DER VELDEN, P.A.; VERMEER, M.H.; WILLEMZE, R.; YAN, P.S.; HUANG, T.H.; TENSEN, C.P. Epigenetic profiling of cutaneous T-cell lymphoma hypermethylation of multiple tumor supressor genes including BCL7a, PTPRG, and p73. *Journal of clinical oncology* , v.23, p. 3886-3896, 2005.
- VENUGOPAL, J.; DEVI, V.; SENTHILRAN, T.; SATHIKUMAR, D.; GUPTA, D.; RAMAKRISHNA, S. Osteoblast mineralization with composite nanofibrous substrate for bone tissue regeneration. *Cell Biology International* , 35, p. 73-80, 2011.
- VENZA, I.; VISALLI, M.; TRIPODO, B.; DE GRAZIA, G.; LODDO, S.; TETI, D. FOXE1 is target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *British journal of dermatology* , v.162, p. 1093-1097, 2010.
- WITHROW, S.; POWERS, B.; STRAW, R.; WILKINS, R. Comparative aspects of osteossarcoma: dog vs man. *Clinical orthopaedics and related research* , p. 159-167, 1991.
- WU, H. & SUN, E, Y, . Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatric research* , v.59, p. 21-25, 2006.

YANG, J. Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis. *International journal of oncology* , v.29, p. 643-648, 2006.

10. ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

10.1. Artigo

Trabalho a ser enviado para a Revista Acta Veterinária Escandinavica:

Expressão do gene *FOXE1* em culturas de osteossarcoma canino

Rodolfo Françon Araujo Ventura¹, Adriana Camargo Ferrasi², Noeme Sousa Rocha^{1*}

1 Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

2 Hemocentro de Botucatu, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (FM), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

* Correspondência: rochanoeme@fmvz.unesp.br

Serviço de Patologia Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Junior, s/n, CEP: 18400-970, Botucatu, SP, Brasil.

Rodolfo Françon Araujo Ventura: rodolfo@institutoventura.com

Adriana Camargo Ferrasi: adriana.ferrasi@uol.com.br

Noeme Sousa Rocha: rochanoeme@fmvz.unesp.br

RESUMO

O osteossarcoma (OSA) do cão ou sarcoma osteogênico é um tumor primário de comportamento biológico agressivo, prevalente em raças de médio e grande porte com idade entre sete a nove anos. O objetivo do trabalho foi aplicar um modelo experimental *in vitro* do osteossarcoma canino, para servir de suporte ao estudo do gene *FOXE1*, gene supressor tumoral pouco investigado, entretanto de extrema importância na pesquisa do câncer pelo fato de estar envolvido com a via de sinalização HH/GLI2, que regula positivamente o crescimento celular. Foram utilizadas cinco culturas de osteossarcoma, que serviram como subsídio para análise de metilação, imunoexpressão e expressão gênica. Os resultados permitiram validar a cultura celular do osteossarcoma canino, identificar dos padrões de metilação do gene *FOXE1*. Assim, observou-se a aplicabilidade da determinação do padrão de metilação da região promotora de *FOXE1* e a não extrapolação do *primer FOXE1* humano para quantificar a expressão gênica do cão.

Palavra- chave: *FOXE1*, epigenética, osteossarcoma *in vitro*.

INTRODUÇÃO

O avanço da ciência no que tange a compreensão genética e molecular em todos os aspectos e desenvolvimento do esqueleto, que abrangem a condrogênese e osteogênese, vem permitindo melhor compreensão das condições distintas e geneticamente heterogêneas das doenças ósseas [16]. Neste contexto, baseado em uma concordata de patologia molecular e embriologia, coloca-se em evidência à aplicabilidade em estudos que cingem a carcinogênese do osteossarcoma e demais doenças ósseas [12].

E um marco positivo para Medicina Veterinária foi à caracterização e publicação do genoma canino [17], que permitiu a investigação de bases genéticas do câncer e a

oncologia comparada. E enfocando no problema do câncer em pacientes humanos e veterinários, parcerias se estabeleceram abrangendo um grupo multidisciplinar com médicos veterinários, médicos oncologistas, patologistas, cirurgiões, geneticistas e biólogos moleculares, com o intuito de melhor compreender os processos de carcinogênese e progressão tumoral [1].

Nada obstante com o advento da Epigenética, foi colocado em foco que as condições que levariam a um câncer não seriam necessariamente provenientes de eventos mutacionais, mas também por mecanismos epigenéticos que compreendem interferências na expressão de genes supressores tumorais ou proto-oncogenes. Estes mecanismos que envolvem a metilação, fosforilação e acetilação de histonas, podem ser hereditários ou ocorrer esporadicamente em função de estímulos ambientais. Deste modo, em consórcio com comunicações atuais, tem-se despertado o interesse pelos genes da família FOX que estão sendo descritos como hipometilados ou hipermetilados em determinados tipos de neoplasias [19-27].

Na grande família dos genes *FOX*, atualmente tem-se levantado a importância ao gene da família *FOXE1* e suas variações epigenéticas, uma vez que atua como um gene supressor tumoral. Portanto quando silenciado pelo fenômeno da metilação, perde sua função e inicia o processo de carcinogênese e progressão tumoral de determinadas neoplasias [7-16-27].

Com base nestas considerações o presente trabalho teve por objetivo controverter o papel emergente do gene *FOXE1* e seus fatores de transcrição, uma vez que estudos atuais revelam fortes evidências quanto a sua atuação no processo de carcinogênese do osteossarcoma canino [6-7-27].

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O presente trabalho foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, *campus* Botucatu. A inclusão dos pacientes foi condicionada ao consentimento escrito dos proprietários, após o esclarecimento sobre o protocolo experimental, o qual incluiu o exame citopatológico, histopatológico, manutenção de culturas de células neoplásicas *in vitro* e a publicação dos dados em revistas especializadas no assunto.

No seu desenvolvimento foi utilizado para composição das culturas, material biológico de cinco peças cirúrgicas correspondentes a membros apendiculares de cinco cães sem restrição de sexo e idade, com o diagnóstico clínico e citológico de osteossarcoma, atendidos no Hospital Veterinário entre março de 2009 e janeiro de 2011. Também foi obtido um fragmento de uma fratura óssea de um cão de 7 anos de idade do atendimento do Serviço de Cirurgia da presente Instituição, que serviu de controle para avaliação de osteoblastos normais.

Análise citopatológica

Os cães com suspeita clínica de osteossarcoma foram encaminhados à coleta de material para análise citopatológica por citologia aspirativa por agulha fina (CAAF). Para tanto, foram utilizadas seringas descartáveis de 10 ml, agulhas descartáveis e citoaspirador de Valeri. As amostras foram secas ao ar, fixadas com metanol e coradas pelo método de Giemsa, para posterior análise em microscópio óptico Leica Digital Module R (DMR) - Leica. O diagnóstico de osteossarcoma corados por Giemsa seguiu o modelo proposto por Raskin (2003) e Withrow & Macewen's (2007).

Análise histopatológica.

Os fragmentos de tecido neoplásico foram fixados em formalina tamponada 10%, posteriormente descalcificadas em Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) e encaminhadas ao Laboratório de Histopatologia da FMVZ- UNESP, campus Botucatu; onde foram incluídas em parafina, cortadas com espessura de 4 micrômetros, e coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina, para posterior análise em microscópio óptico Leica Digital Module R (DMR) – Leica. A classificação dos tumores seguiu o modelo proposto pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (AFIP), que para o OSA são sete, entretanto só foi utilizada a do osteossarcoma osteoblástico e do osteossarcoma misto.

Cultivo celular

Obtenção e manutenção das amostras

Prontamente, ao recebimento da peça cirúrgica que correspondeu ao membro apendicular com o diagnóstico anátomo-clínico de osteossarcoma, procedeu-se sob condições assépticas a coleta de amostras de células neoplásicas. Primeiramente, foram coletados fragmentos ósseos das regiões de transição entre osso normal e osso neoformado, que foram acondicionados em solução de Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4.

Posteriormente, os fragmentos foram mantidos em solução tripsinizada a temperatura de 37°C por 60 minutos com homogenizador magnético. Por imediato, a solução foi centrifugada e descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* e esta solução foi acondicionada em *garrafas* apropriadas com meio de cultivo DMEM alta glicose (Dulbecco's Modified Essential Médium), suplementado com soro fetal bovino (10%), combinação de penicilina (100U/mL) com streptomomicina (100mg/mL) e

anfotericina-B (2,5µg/mL). As amostras foram incubadas em estufa de CO₂ a 5%, umidade 95% e temperatura de 37°C para o cultivo e manutenção.

Caracterização das culturas

Após quatro passagens foi realizada a caracterização morfológica das culturas que compreenderam células cubóides e, por conseguinte, realizada a técnica citoquímica de *Alizarin Red* que corou positivamente matriz osteóide.

Posteriormente, as culturas foram submetidas à caracterização imunocitoquímica com o auxílio da citometria de fluxo, onde se utilizou um painel imunomarcador para osteoblastos que compreendeu os anticorpos Anti-Vimentin/HRP (Clone Vim 3B4), Anti-Human Cytokeratin/HRP (Clone MNF116), AC monoclonal de cam anti Osteocalcina (clone OC4-30), Ac monoclonal de cam anti Osteopontina e Sp7 / Osterix antibody.

Para a caracterização imunocitoquímica, as células foram ressuspensas em 3 mL de solução de tripsina a 37°C por cinco minutos, em seguida a mesma foi bloqueada com a adição de meio de cultivo completo com 20% de soro fetal bovino. Depois foram centrifugadas por 10 minutos a 2.000 RPM, o *pellet* foi ressuspensado em 1mL de PBS pH 7,2. Feito isso, as células foram fixadas com paraformaldeído a 5% (BD®). Em seguida realizou-se uma nova centrifugação por 10 minutos a 2.000 RPM, ressuspensão, e o material foi lavado com PBS, permeabilizado por 15 minutos com Fix&Perm (Invitrogen®), lavadas por mais duas vezes com PBS pH 7,2.

Finalmente a solução resultante foi acondicionadas em 100µL desta solução em 7 tubos plásticos para FACS Calibur da BD®. Posteriormente, foram instilados os respectivos anticorpos primários nos tubos previamente identificados, sendo que dois deles compreenderam os controles, sendo um o autofluorescente (sem nenhuma marcação) e o

outro o controle com anticorpo secundário. Ficaram encubadas de 12 a 14h em temperatura de 4°C.

No dia seguinte foi instilado o anticorpo secundário fluorescente (FITC - Millipore) e após 1h realizou a leitura no Citômetro de fluxo Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Calibur da BD®, do Hemocentro da FM - UNESP, campus Botucatu.

Análise de Metilação

O DNA foi extraído a partir de 5×10^6 células das culturas de osteossarcoma caracterizadas via o Protocolo de extração de DNA - QIAamp® DNA Blood Mini Kit-50 (Quiagen®), em seguida o produto da extração foi quantificada com o auxílio de um espectrofotômetro, e posteriormente conservada em freezer -80°C; que permaneceu até o momento do tratamento com bissulfito de sódio, onde as citosinas não metiladas foram convertidas em uracila .

Este produto foi submetido a PCR específica para detecção de metilação (PCR-MSP), conforme a técnica descrita por Hermann et al. (1996) (Anexo 3). Contudo, para realização da PCR-MSP foram utilizadas duas apresentações diferentes de enzimas DNA polimerase, representadas pela GoTaq® Green Master Mix e GoTaq® DNA Polimerase. Além disso, também se utilizou *primers* para a situação de DNA não metilado, onde os iniciadores foram transcritos pela cadeia de oligonucleotídeos sense 5' TTT GTA GGG TTG GAG ATT TAT G 3' e anti-sense 5' AAA ACA CAA AAA CAA CAA ATT C 3' que ampliaram de modo específico um região de 94 pares de base. Em contrapartida, a situação de DNA metilado foi utilizado um *primer* sense 5' TCG TAG GGT TGG AGA TTT AC 3' e anti-sense 5' GAA ACG AAA ACA ACG AAA TCG 3' que correspondeu a uma região de 88 pares de bases.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese no aparelho The PowerPac™ HC-Bio-Rad® em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (SAMBROOK et al., 2001) (Anexo 4) e corados com nitrato de prata (25).

Como controles positivos foram utilizadas amostras de genes metilados e não metilados previamente sequenciados, e a sua autenticidade foi comparada com as sequências de bancos genômicos públicos.

Análise de expressão gênica

O Ácido Ribonucléico (RNA) foi extraído a partir de 5×10^6 células de culturas de osteossarcoma previamente caracterizadas, segundo o Protocolo de extração de RNA - RNeasy® Mini Kit-50 (Quiagen®), o resultado do processo foi quantificado com o auxílio de um espectrofotômetro. Posteriormente, estas amostras foram conservadas em freezer - 80°C até que fossem encaminhadas para análise da expressão. Concomitantemente foi realizada a análise da pureza deste RNA pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 6% (Anexo 5) no aparelho Electrophoresis Power Supply- EPS 200 (BioSurplus®), sendo documentado pelo UVP Sistema BioDoc-It.

A partir do RNA obtido foi sintetizada uma fita de DNA complementar (cDNA), segundo o protocolo do kit MultiScribe transcriptase reversa (Applied Biosystems®), que serviu como matéria prima para as análises de expressão gênica.

A partir de 5µl de cDNA e TaqMan® e do Universal PCR Master MIX, a técnica de RT-PCR foi realizada em duplicata, tanto com *primers FOXE1* - TaqMan® quanto para o controle endógeno com β -Actina Endogena Humana - TaqMan® (cod. Prod. 4326315E). O sistema Taqman® se baseou em sonda fluorescente que permitiu a detecção de um produto específico da PCR, conforme seu acúmulo durante os ciclos da reação.

A sonda foi constituída por um corante repórter fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda estava intacta, a proximidade do *quencher* reduziu bastante a fluorescência emitida pelo corante repórter por meio da transferência de energia por ressonância de fluorescência. Quando a sonda se anelou a sequência antes dos *primers* e clivou por meio da atividade da nuclease 5' da Taq-DNA polimerase, enquanto o *primer* era estendido. A clivagem da sonda separou o corante repórter do *quencher*, aumentando o sinal da fluorescência emitida pelo repórter. A fluorescência foi monitorada em tempo real com um aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®) e seu respectivo programa para quantificação da expressão gênica.

RESULTADOS

Análise citopatológica

O resultado das análises citopatológicas das amostras dos animais estudados, foram positivas para neoplasia de células mesenquimais (osteoblastos) com produção de matriz osteóide (Figura 1).

Análise histopatológica

O resultado das análises histopatológicas dos fragmentos que foram destinados às culturas: OSA 03, OSA 08, OSA 10 e OSA 13, corresponderam a osteossarcomas osteoblástico, salvo o OSA 07 que foi osteossarcoma misto (Figuras 2 e 3 respectivamente).

Cultivo e caracterização das culturas

Obtiveram-se cinco culturas de osteossarcoma que corresponderam à caracterização morfológica e citoquímica, chamando atenção aos altos critérios de malignidade (Figura 4).

Pela caracterização por citometria de fluxo (Figura 5) foi observada alta expressão de todos os marcadores, salvo a citoqueratina, conforme descrito na tabela 1. Sendo que estatisticamente foi observado um limite aceitável de $P \leq 0,05$ que transpõe uma significância que nos permitiu validar as culturas como sendo de osteossarcoma.

Análise de Metilação

A quantidade de DNA extraído das amostras foi satisfatória, pois os valores variaram entre 24,37 e 199,7 nanogramas de DNA por microlitro (ng/ μ l) (Tabela 2), quando comparados com o padrão mínimo que é de 25 ng/ μ l.

Os resultados das análises da PCR-MSP revelaram bandas específicas (Figura 6) nas amostras positivas para metilação (N/4) e para não metilação (N/4), conforme expresso na Tabela 3.

Análise de expressão gênica

A quantidade de RNA extraído das amostras foi satisfatória, pois os valores variaram entre 27,83 e 174,94 ng/ μ l (Tabela 4), quando comparados com o padrão mínimo que é de 20 ng/ μ l.

A qualidade deste produto foi satisfatória, uma vez que o RNA se apresentou livre de contaminação por DNA e íntegro com relação às subunidades 28S e 18S (Figura 7).

A síntese de cDNA apresentou resultados quantitativamente suficientes variando entre 1663,2 a 1894,6 ng/μl (Tabela 5), desta forma possibilitando que fossem encaminhados a análise de RT-PCR onde se exige o mínimo de 10000 ng/μl.

As análises de expressão gênica foram insatisfatórias, uma vez que não se observou a expressão do gene *FOXE1* e β -Actina.

DISCUSSÃO

Nos termos do objetivo deste trabalho, que foi aplicar um modelo de estudo experimental *in vitro* do osteossarcoma canino, para servir de suporte ao estudo do gene *FOXE1*, visto que ele é um gene supressor tumoral pouco investigado, entretanto de extrema importância na pesquisa do câncer pelo fato dele estar envolvido com a via de sinalização HH/GLI2, que regula positivamente o crescimento celular. Eles foram alcançados, visto que:

As culturas celulares de osteossarcoma *in vitro* são de suma importância para estudar seu comportamento biológico e processo de carcinogênese [18-20]. Desta forma, Loukopoulos et al. (2004), Hasegawa et al, (2008) e Jänh et al (2010) ressaltam que estudos experimentais baseados em células primárias condizem situações próximas à realidade *in vivo*, o que não é observado em linhagens celulares imortalizadas representadas por células uniformes com suas características bem definidas. Neste ponto, o presente trabalho estudou o gene *FOXE1* de células baseadas em cultivos primários e não em linhagens, com o intuito de prever situações mais próximas à realidade, uma vez que Owel et al. (1990) observou a inibição e expressão de determinados genes associados a maturação e diferenciação em culturas imortalizadas.

Ao se estabelecer um cultivo primário neoplásico, é de suma importância a realização de sua avaliação histopatológica que servirá como subsídio à validação da

cultura, e compreensão de sua biologia celular, visto o comportamento distinto dos diferentes subtipos de osteossarcoma [9-11]. Daleck (1996) e Kirpensteijn et al. (2002) relataram a alta prevalência de osteossarcoma osteoblástico, o que também foi observado no presente estudo ao diagnosticarmos quatro osteossarcomas osteoblásticos e um misto. Vale ressaltar que o critério adotado para classificação do osteossarcoma esteve de acordo com modelo proposto pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (AFIP), onde observamos no osteossarcoma osteoblástico a associação de matriz osteóide a células mesenquimais com um padrão pleomórfico intenso, nucléolos conspícuos ora ovalados ora arredondados que variaram de um a dois exibindo severa anisonucleose, alto índice de figuras de mitose atípicas, cromatina frouxa e multinucleações; o osteossarcoma misto apresentou as mesmas características descritas anteriormente, contudo com associação de condroblastos.

Os achados morfológicos dos osteoblastos cultivados foram representados por células variando de redondas a poligonais. O que também foi observado por Cao et al. (2006) e Hasegawa et al. (2008) em modelos experimentais de culturas primárias de osteoblastos de coelhos, e igualmente descrito por Jähn et al (2010) em modelos de culturas primárias de osteoblastos humanos. Minamitani (2000) ao trabalhar com linhagens de osteossarcoma humano esteve em concordância com as características descritas anteriormente, salvo aos critérios de malignidade correspondentes a multinucleações e nucléolos conspícuos revelando severa anisonucleose; o que está em comum acordo neste experimento.

Segundo Davies (2003) os osteoblastos são as únicas células capazes de sintetizar e secretar matriz osteóide (colágeno tipo I, proteoglicanos, glicoproteínas sulfato de condroitina, osteocalcina, osteopontina e osteonectina), que servirá como base para mineralização, através da deposição de íons de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita,

que ao permear os osteoblastos caracterizam os osteócitos [26]. Sudo et al. (1983) e Liu et al. (2004) observaram a mesma situação, contudo em culturas de osteoblastos *in vitro*. Sendo assim o presente estudo obteve culturas positivas para coloração imunocitoquímica de *Alizarin Red*, que caracteriza uma cultura como sendo de osteossarcoma canino [3- 9- 11-26].

A citometria de fluxo mostrou-se uma técnica adequada à análise imunocitoquímica de culturas celulares. Esta observação já fora feita por Rattner et al. (1997) e Faldyna et al (2001), que consideram a técnica um método prático que revela resultados objetivos, ao identificar e quantificar as células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência.

Moore et al (1989) estabeleceu o uso do anticorpo monoclonal anti-vimentina para detecção destes grupos de filamentos intermediários em tecidos caninos, onde sua marcação positiva permitiu a classificação do tecido como de origem mesenquimal [29], como é situado em tecidos humanos.[28]. Desta forma, Loukopoulos et al. (2004) destaca a importância da análise da vimentina em consórcio com a citoqueratina, para estabelecer a origem mesenquimal das culturas celulares de osteossarcoma canino contribuindo para sua validação; o que esta em comum acordo com o presente estudo que revelou resultados positivos para o anticorpo anti-vimentina e negativos para o anticorpo anti-citoqueratina, nas culturas avaliadas de osteossarcoma.

Jähn et al. (2010) e Matsubara et al. (2008) descreveram a importância da proteína osterix na diferenciação de osteoblastos. Rattner et al. (1997) e Davies (2003) afirmam que a osteocalcina é uma proteína não colagenosa expressa somente por osteoblastos, com isso sendo de extrema importância na caracterização de culturas de osteossarcoma. Rattner et al. (1997), Loukopoulos et al. (2004) e Hasegawa et al, (2008), ressaltam a importância da marcação da osteopontina, que apesar de não específica, está

sempre presente na formação de matriz osteóide. Neste contexto, todas as proteínas descritas foram expressas no presente estudo.

Com isso e seguindo os modelos de caracterização descritos por Rattner et al. (1997), Minamitani (2000), Gought et al. (2003) Loukopoulos et al. (2004), Hasegawa et al. (2008) e Jähn et al. (2010), as células cultivadas nesta pesquisa foram osteoblastos que possuíam grande potencial osteogênico levando em consideração a morfologia celular, produção de matriz mineralizada e marcação imunocitoquímica.

Como este é o primeiro estudo abrangente que pretende verificar os padrões de metilação e expressão do gene *FOXE1* em culturas primárias de osteossarcoma; se desconhecem dados na literatura especializada no assunto que possam ser confrontados, entretanto e de acordo com Pardini (2011) ao estudar o padrão de metilação em carcinoma de células escamosas de cães, foi possível concluir que a técnica para avaliar o padrão de metilação do gene *FOXE1* em seres humanos pode ser utilizada para a mesma avaliação em cães, uma vez que ela foi aplicável ao presente estudo.

Foi neste cenário, que se evidenciaram os resultados elevados dos índices de metilação das culturas de osteossarcoma canino em relação a osteoblastos normais que não se apresentaram metilados, desta forma surgindo um novo enfoque ao gene *FOXE1* que anteriormente não apresentava sua importância descrita na biologia celular de osteoblastos neoplásicos.

Desta forma, ao confrontarmos os resultados das análises de metilação das culturas de osteossarcoma, notamos que uma (OSA 10) se encontrou não metilada, duas (OSA 08 e OSA 13) se mostraram metiladas, duas (OSA 03, OSA 07) revelaram as duas situações e a amostra de osteoblastos normais se apresentou não metilada, o que sugere que a metilação possa estar envolvida com o processo de carcinogênese do osteossarcoma canino. Apesar dos autores Paik et al. (2007), -2- e Kops et al. (2002) não terem utilizado

o mesmo sistema, também verificaram a metilação em hemangiomas e linfoma tímicos. O que leva a acreditar que este modelo pode ser utilizado para compreensão da carcinogênese do osteossarcoma canino.

Outra situação apresentada foi que um cultivo de osteossarcoma canino não estava metilado, o que diante da contextualização pode ser relacionado a uma mutação em seu DNA e não uma condição de silenciamento gênico conforme descrito por Ushima & Asada (2009).

Todavia frente à ausência de dados sobre a atuação do gene *FOXE1* em osteoblastos e os resultados obtidos no presente estudo, evidenciou-se uma situação até o momento não descrita na literatura. Como propósito de complementar os resultados de metilação optamos pela análise de expressão gênica com PCR em Tempo Real, tendo como finalidade um resultado mais palpável sobre a expressão do gene *FOXE1*. Sobre esta base e pioneiros na aplicação desta técnica com relação ao gene *FOXE1* em cães, foram utilizados primers para *FOXE1* e β -Actina desenhados para humanos, entretanto os resultados insatisfatórios não os validaram para cães, desta forma existindo a necessidade de se fazer um *primer* específico para cães.

É difícil estabelecer uma associação do gene *FOXE1* e sua aplicabilidade com o osteossarcoma canino, contudo comunicações atuais inferem possíveis vias de que possam ser aplicadas ao processo de carcinogênese do osteossarcoma. Diante deste referencial, Eichberger et al. (2004) e Grosjean & Couvé-Privat (2004) ao estudarem carcinomas basocelulares, concluíram o papel importante do gene *FOXE1* ao regular negativamente a via de sinalização Sonic Hedgehog (HH)/GLI2, cuja função é sinalizar positivamente a proliferação celular. Esse posicionamento vem compactuar com os dados de Venza et al. (2010) que inferiu o gene *FOXE1* como um possível candidato a gene supressor tumoral, uma vez que foi encontrado altamente metilado em carcinomas de células escamosas.

Nesta conjuntura e tendo em vista que o gene *FOXE1* não só foi identificado como foi encontrado metilado no presente estudo, pode existir associação do gene *FOXE1* e o osteossarcoma na mesma condição descrita anteriormente, uma vez que a via sinalização HH/GLI2 tem um papel fundamental na proliferação de osteoblastos tanto na vida embrionária, como na vida pós-natal ao regular o crescimento e reparação de fraturas óssea [6-13].

Diante deste posicionamento epigenético que abordamos a metilação, e em comum concordata com Zöchbauer-Müller et al. (2002), estes resultados preliminares podem ser contributivos à aplicações clínicas, desta forma possibilitando a abordagem precoce do paciente ou mesmo despertando o interesse de indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de drogas desmetilantes.

Apesar do número reduzido de amostras examinadas no presente estudo, os resultados aqui apresentados não podem ser generalizados, mas sim servir de subsídio para colocar em evidência e inferir uma condição epigenética de metilação do gene *FOXE1* e sua possível associação com o processo de carcinogênese do osteossarcoma canino, bem como sua atuação em condições fisiológicas do desenvolvimento ósseo, que até o momento não se tem conhecimento de relatos semelhantes na literatura especializada no assunto.

CONCLUSÃO

Sob as condições do modelo experimental *in vitro* do osteossarcoma canino propostas deste trabalho, foi possível determinar o padrão de metilação da região promotora de *FOXE1* pela técnica de PCR específica para detecção de metilação (PCR-MSP), e a não extrapolação do *primer FOXE1* humano para quantificar a expressão gênica do cão

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesses

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP, CAPES e CNPQ pelo suporte financeiro

Referências

1. ALBERTS, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. Como as células são estudadas. In: B. B. ALBERTS, *Biologia molecular da célula* (3 ed. ed., p. 156-162). Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
2. BRUNET, A. B.; ZIGMOND, M.; LIN, M.; JUO, P.; HU, L. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* , v.196, p. 857-868, 1999.
3. CAO, X.; YIN, X.; Z. L.; LI, S. Establishment of a new model for culturing rabbit osteoblasts in vitro. *Biomed. Mater* , p. 17-19, 2006.
4. DALECK, C. R. Osteossarcoma canino. *Clínica Veterinária* , v.01 (n.15), p. 26-27, 1996.
5. DAVIES, J. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education* , 67, p. 932-949, 2003.
6. DAY, T. & YANG, Y. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *Journal of bone and joint surgery* , v.90, p. 19-24, 2008.
7. EICHBERGER, T.; REGL, G.; IKRAM, M.; NEILL, G.; PHILPOTT, M.; ABERGER, F. FOXE1, a new transcriptional target of GLI2, is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *The society for investigative dermatology* , v.122, p. 1180-1187, 2004)

8. FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOTA, P. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - a flow cytometric study. . *Veterinary immunology and ummunophatologY* , 82, p. 23-27, 2002.
9. HASEGAWA, Y.; SHIMADA, K.; SUZUKI, N.; TAKAYAMA, T.; KATO, T.; IEZUKA, T.; SATO, S.; ITO, K. The in vitro osteogenic characteristic of primary osteoblastic cells from a rabbit calvarium. *Journal of oral science.* , 50, p. 427-434, 2008.
10. HERMAN, J. G. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, v.93, p. 9821-9826. 1996. , v.93, p. 9821, 1996.
11. JÄHN, K.; RICHARDS, R.; ARCHER, C.; STODDART, M.. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *European Cells and Materials* , v.20, p. 149-161, 2010
12. KARSENTY, G. & WAGNER, E. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell* , v.02, p. 389-406, 2002.
13. KIM, W.; MELITON, V.; BOURQUARD, N.; HAHN, T.; PARHAMI, F. Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow stromal cells are inhibited by oxidative stress. *Journal of cellular biochemistry*, 2010.
14. KIRPENSTEIJN, H.; KIK, M.; RUTTEMAN, G.; TESKE, E. Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteossarcoma. *Veterinary pathology* , v.39, p. 240-246, 2002.
15. KOPS, G.; MODEMA, R.; GLASSFORD, J.; ESSERS, M.; DIJKERS, S.; COFFER, P. Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulate forkhead transcription factors. *Molecular an cellular biology* , v.22, p. 2025- 2036, 2002.
16. KORNAK, U. & MUNDLOS, S. Genetic disorders of the skeleton: a developmental aproach. *The american journal of human genetics* , v.73, p. 447-474, 2003.

17. LINDBLAD-TOH, K; WADE, C.M.; MIKKELSEN, T.S. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, v.438, p.803-819, 2005.
18. LOUKOPOULOS, P.; THORNTON, J.; ROBINSON, W. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. *Veterinary pathology* , v.40, p. 237-248, 2003.
19. MATSUBAYASHI, H.; CANTO, M.; SATO, N.; KLEIN, A.; ABE, T.; YAMASHITA, K. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer researchs* , v.66, p. 1208-1217, 2006.
20. MINAMITANI, K. Establishment of an osteoblastic osteosarcoma cell line and effects of cell culture conditions on secretion of matrix metalloproteinases from the cultured osteosarcoma Cells. *Kurume Medical Journal*, 47,115-124, 2000 , 47, p. 115-124, 2000.
21. OWEN, T.A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V.; BARONE, L.M.; WILMING, L.; TASSINARI, M.S.; KENNEDY, M.B.; POCKWINSE, S.; LIAN, J.B.; STEIN, G.S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal Cell Physiology*. v.143, p.420-430, 1990.
22. PAIK, J.; KOLLIPARA, R.; CHU, G.; JI, H.; XIAO, Y.; DING, Z. Foxos are lineage-restricted redundant tumor supressors and regulate endothel cell homeostasis. *Cell* , v.128, p. 309-323, 2007.
23. RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. *Atlas de Citologia de Cães e Gatos*. São Paulo: Roca, 2003

-
24. RATTNER, A.; SABIDO, O.; MASSOUBRE, C.; RASCLE, F.; FREY, J. Characterization of human osteoblastic cells: influence of the culture conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, p. 757-762, 1997.
25. SANGUINETTI, C. J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* , v.17 , p. 914-921, 1994.
26. VENUGOPAL, J.; DEVI, V.; SENTHILRAN, T.; SATHIKUMAR, D.; GUPTA, D.; RAMAKRISHNA, S. Osteoblast mineralization with composite nanofibrous substrate for bone tissue regeneration. *Cell Biology International* , 35, p. 73-80, 2011.
27. VENZA, I.; VISALLI, M.; TRIPODO, B.; DE GRAZIA, G.; LODDO, S.; TETI, D. FOXE1 is target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *British journal of dermatology* , v.162, p. 1093-1097, 2010.
28. LEADER, M.; MRCPATH, M.D.; PATEL, J. et al. Sinovial sarcomas true carcinosarcomas? *Cancer*, v.59, p.2096-2098, 1987.
29. WILLIAMSON, M.M.; MIDDLETON, D.L. Cutaneous soft tissue tumors in dogs: classification, differentiation, and histogenesis. *Veterinary dermatology*. v.09.p.43-48, 1998.

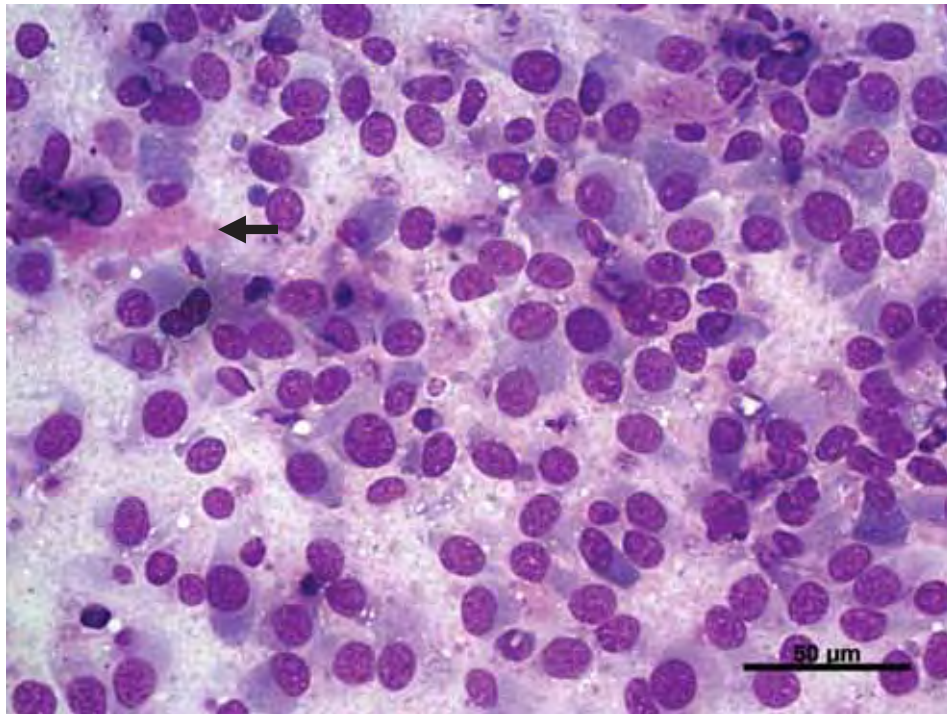


Figura 1 – Osteossarcoma. Aspirado de tecido. Células mesenquimais fusiformes pleomorfas com severa anisocitose e anisocariose. Os núcleos revelam cromatina granular e nucléolos conspícuos com moderada anisonucleose. Também há densos agregados de matriz mesenquimal imatura (seta). – Giemsa. 400X.

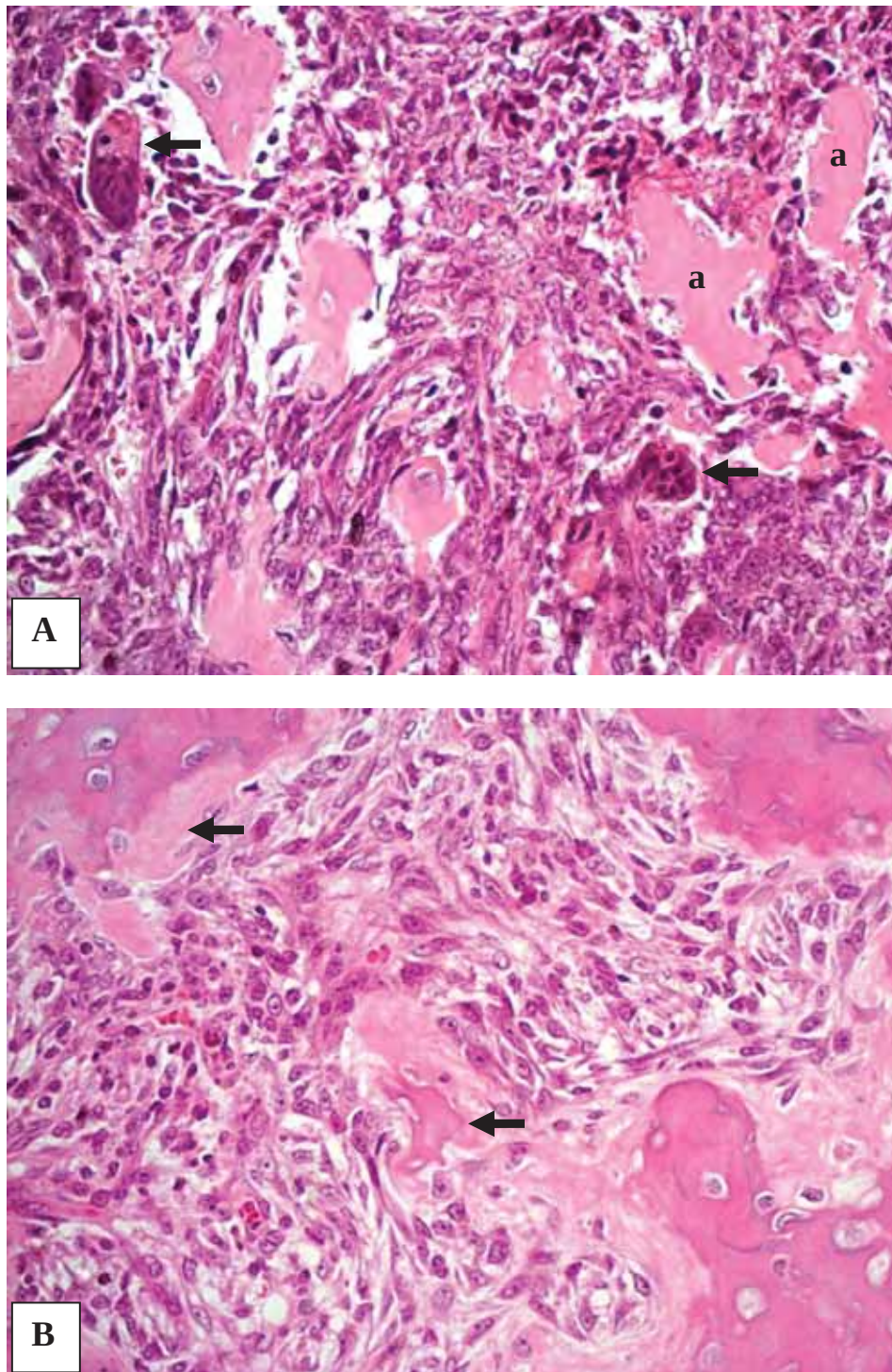


Figura 2 – OSA 03: osteossarcoma osteoblástico. Grande número de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Em A, notam-se nas áreas próximas das trabéculas (a) células e gigantes multinucleadas (setas). Em B, proliferação de osteoblastos neoplásicos e produção de matriz óssea não mineralizada (osteóide) (setas) – HE. 400X.

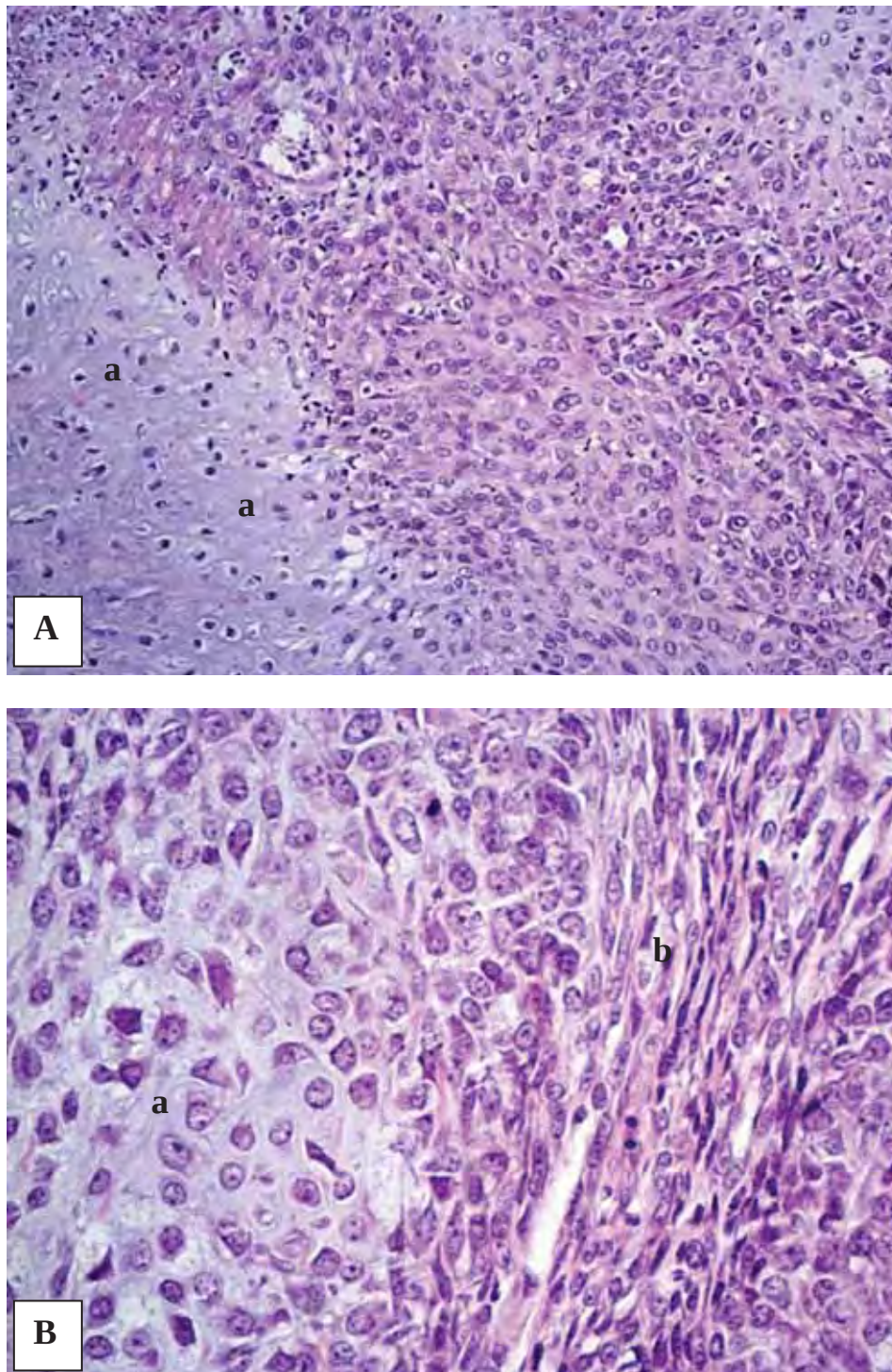


Figura 3 – OSA 07: osteossarcoma misto. Produção de matriz óssea maligna com ausência de predomínio celular. Em A, observa-se tecido cartilaginoso maligno (a) – HE. 200X. Em B, nota-se pleomorfismo celular, matriz condróide (a), tecido fibrossarcomatoso (b) – HE. 400X.

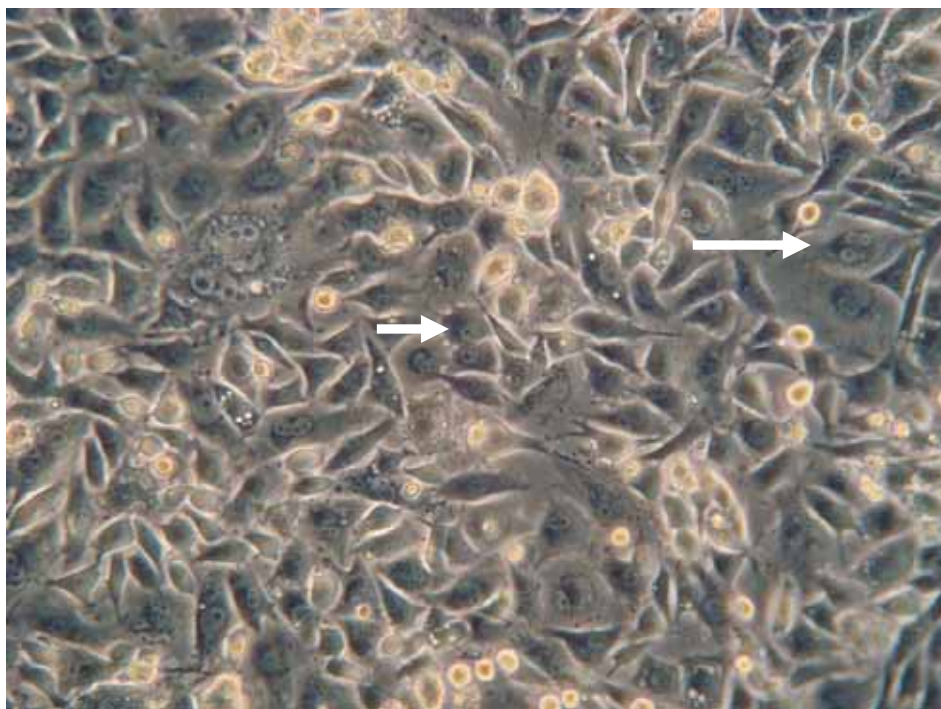


Figura 4 – Cultivo celular OSA 13. Observe uma população homogênea de células mesenquimais fusiformes que revelam critérios de malignidade, tais como multinucleações (seta maior) e nucléolos conspícuos (seta menor).

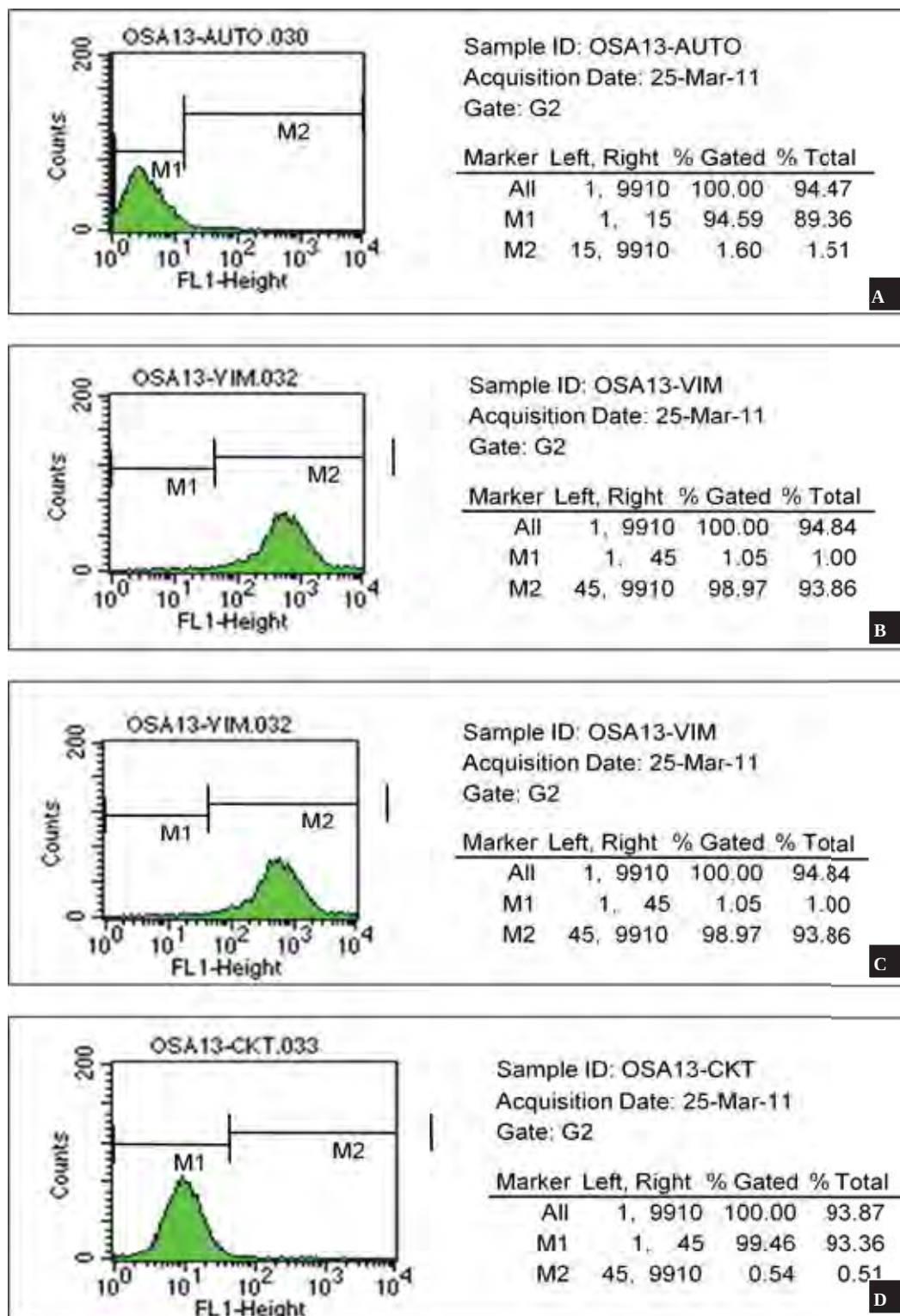


Figura 5 - Citometria de fluxo das células provenientes da cultura OSA 13. (A) Controle com células sem nenhuma marcação, (B) Controle com células associadas ao anticorpo secundário, (C) Células marcadas com vimentina e (D) Células marcadas com citoqueratina.

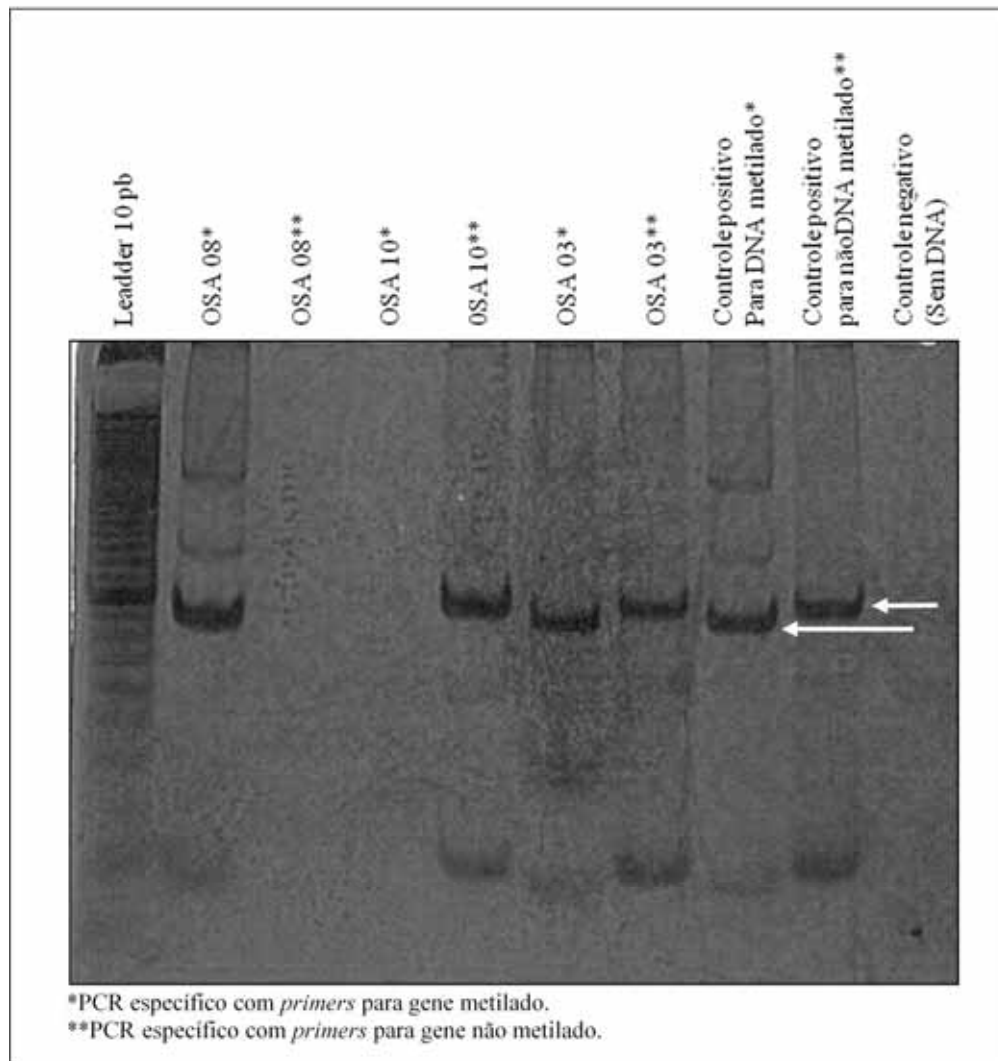


Figura 6 – Metilação do gene *FOXE1*. Observe a banda de 88pb do controle positivo para *FOXE1* metilado (Seta maior) e a banda com 94pb do controle positivo para *FOXE1* não metilado (Seta menor).



Figura 7 - Integridade das amostras de RNA. Observe as subunidades 28s (seta menor) e 18s (seta maior). Pelo UVP Sistema BioDoc-It.

Tabela 1 – Imunomarcagem das culturas de Osteossarcoma Canino. Citometria de fluxo.

Proteína	Cultivo celular (N=10.000)				
	OSA 03	OSA 07	OSA 08	OSA 10	OSA 13
Vimentina	99,46 ^a	97,91 ^b	98,39 ^c	94,25 ^d	98,97 ^e
Citoqueratina	1,00 ^a	0,16 ^b	0,34 ^c	0,65 ^d	0,54 ^e
Osteocalcina	17,74 ^a	43,82 ^b	23,3 ^c	30,61 ^d	21,45 ^e
Osterix	56,25 ^a	32,57 ^b	31,82 ^c	53,87 ^d	35,21 ^e
Osteopontina	40,43 ^a	17,81 ^b	26,17 ^c	35,67 ^d	37,37 ^e

^{a, b, c, d, e} Letras sobrescritas diferentes de cada categoria de proteína na mesma linha diferem significativamente ($P \leq 0,05$).

Tabela 2 - Mensuração de DNA das amostras envolvidas no experimento. Espectrofotometria

Amostras	ng/μl	A260	260/230	260/280	Const.
OSA 3*	134,2	2,68	2,03	2,0	50
OSA 7*	24,37	0,49	1,74	1,9	50
OSA 8*	136,4	2,73	2,25	1,95	50
OSA 10*	199,7	4,0	2,24	2,02	50
OSA 13*	60,14	1,2	2,09	2,08	50
TC 45**	109,49	2,737	2,15	2,11	50
ON***	27,83	0,557	1,81	0,3	50

*Amostras de culturas de osteossarcoma canino.

**Controle positivo para gene metilado e não metilado.

***Amostra de osteoblastos não neoplásicos.

Tabela 3 - Análises de metilação das culturas de osteossarcoma canino obtidas por PCR-MSP.

	OSA3*	OSA7*	OSA8*	OSA10*	OSA13*	ON**
Metilado	+	+	+	-	+	-
Não Metilado	+	+	-	+	-	+

*Amostras de culturas de osteossarcoma canino.

** Amostra de osteoblastos não neoplásicos.

Tabela 4 - Mensuração de RNA das amostras envolvidas no experimento. Espectrofotometria

Amostras	ng/ μ l	A260	260/230	260/280	Const.
OSA 3*	174,94	4,37	1,27	2,08	40
OSA 7*	199	4,98	1,34	2,12	40
OSA 8*	252,89	6,32	1,15	2,09	40
OSA 10*	261,,58	6,54	1,25	2,05	40
OSA 13*	246,6	6,17	0,95	2,1	40
TC 45**	109,49	2,74	2,15	2,11	40
ON*	27,83	0,56	1,81	0,3	40

*Amostras de culturas de osteossarcoma canino.

**Controle positivo para gene não metilado e não metilado.

***Amostra de osteoblastos não neoplásicos.

Tabela 5 - Mensuração de cDNA das amostras envolvidas no experimento. Espectrofotometria

Amostras	ng/ μ l	A260	260/280	260/230	Const.
OSA 3*	1710	34,19	1,86	2,21	50
OSA 7*	1738,2	34,76	1,85	2,18	50
OSA 8*	1894,6	37,89	1,87	2,13	50
OSA 10*	1828	36,57	1,87	2,16	50
OSA 13*	1788	25,75	1,87	2,05	50
TC 45**	1663,2	33, 26	1,85	2,1	50
ON*	1702	34,04	2,29	1,85	50

*Amostras de culturas de osteossarcoma canino.

**Controle positivo para gene metilado e não metilado.

***Amostra de osteoblastos não neoplásicos.

10.1. Normas de publicação

Instructions for authors

Research

See '[About this journal](#)' for descriptions of different article types and information about policies and the refereeing process.

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that **Acta Veterinaria Scandinavica** levies an article-processing charge on all accepted Research, Brief communication, Case report and Review articles; if the submitting author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge is covered by the membership (see the [About](#) page for detail). A [Membership Institution](#) is only recognized if the submitting author is from a BioMed Central institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, **Acta Veterinaria Scandinavica** accepts only [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the '[About Acta Veterinaria Scandinavica](#)' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor-in-Chief and/or Editorial Board members.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from BioMed Central customer support team.

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our Useful Tools page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft Word (version 2 and above)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)
- DeVice Independent format (DVI)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile. If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format. If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given below.

Overview of manuscript sections for Research

Manuscripts for Research articles submitted to **Acta Veterinaria Scandinavica** should be divided into the following sections (in this order):

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Background
- Methods
- Results and discussion
- Conclusions
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests

- Authors' contributions
- Authors' information
- Acknowledgements
- Endnotes
- References
- Illustrations and figures (if any)
- Tables and captions
- Preparing additional files

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

You can [download a template](#) (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article.

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article should be given.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Methods

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see '[About this journal](#)'.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in '[About this journal](#)'.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and

coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal

communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '**et al.**'.

Any **in press** articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- BibTeX
- EndNote style file
- Reference Manager
- Zotero

Examples of the **Acta Veterinaria Scandinavica** reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the Acta Veterinaria Scandinavica reference style

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs. Nat Genet** 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction. Proteins** 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide. Eur Respir J**, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal**

cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 1999, 42:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In **Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore.** Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In **Origins of Plastids. Volume 2.** 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In **Breast Cancer Res** 1998, 10:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): **Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore.** Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: **Origin of Eukaryotic Cells.** New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage.** In **Cultured Human Cells and Tissues.** Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): **Methods and Perspectives in Cell Biology**, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: **Annual Report.** London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs.** **PhD thesis.** Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Neylon C: Open Research Computation: an ordinary journal with extraordinary aims. [http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open_research_computation_an_ordinary]

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- EPS (preferred format for diagrams)
- PDF (also especially suitable for diagrams)
- TIFF
- PNG (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (version 5 and above; figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may be used; parts of

the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although **Acta Veterinaria Scandinavica** does not restrict the length and quantity of data included in an article, there may still be occasions where an author wishes to provide data sets, tables, movie files, or other information as additional files. Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, **Acta Veterinaria Scandinavica** requires that all supplementary data are included as additional files rather than as a link to your own website. These files can be uploaded using the 'Additional Material files' button in the manuscript submission tool.

The maximum file size for additional files is 10 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files will be linked to the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the article. They will be made available in exactly the same form as originally provided by the authors.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text, immediately following the tables (if any):

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the three-letter file extension (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - o PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
 - o SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - o MOV (QuickTime)
 - o MPG (MPEG)
- Tabular data
 - o XLS (Excel Spreadsheet)
 - o CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, **Acta Veterinaria Scandinavica** can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is also no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be numbered in the order in which they are referred to in the text. Authors should include all relevant supporting data with each article.

Acta Veterinaria Scandinavica will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the **Acta Veterinaria Scandinavica** reference format.
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**
- Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics, and authors are required to use approved gene symbols, names, and formatting. Protein products should be in plain type.

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

ANEXO 1 – Consentimento da Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, *campus* Botucatu.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Expressão do gene *FOXE1* em culturas de osteossarcoma canino**", Protocolo nº 179/2009-CEUA, de **Rodolfo Françon Araújo Ventura**, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Mestrado, desta Faculdade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 03 de junho de 2011.


Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO 2 – Modelo do Termo de consentimento e livre informado.

**fmvz-unesp**
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

SERVIÇO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA
CEP 13.081-870 - Ca Postal 585 - Botucatu - SP - Brasil Jr. - FONE-FAX (14) 3811.620

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO

Informo que estou consciente e perfeitamente esclarecido que será realizado coleta do tumor ósseo da cão /cadela, ____ anos, ____ kg, da raça _____, de pelagem _____ de RG/FMVZ- _____

Unesp Botucatu: _____ No Clínica Cirúrgica: _____

_____ para realização de exame citológico, histopatológico para confirmação da neoplasia e cultivo celular para fins de pesquisa no Setor da Pós-Graduação desta Instituição de Ensino e posterior divulgação dos resultados.

Proprietário (ã): _____

RG: _____

CPF: _____

Assinatura: _____

Botucatu, ____ de _____ de 20 ____

ANEXO 3 – Protocolo de tratamento do DNA por Bissulfito de Sódio.**01. Desnaturação do DNA:**

- a. Ajuste o termobloco (Banho maria seco) para 50°C
- b. Ajuste o termobloco (Banho maria seco) para 80°C
- c. Pipete o volume de DNA suficiente para 2,0µg
- d. Complete o volume com água estéril até 17µl
- e. Adicione 1,0µl de espermatozoides de salmão (Herring Sperm DNA)
- f. Adicione 2,0µl de NaOH a 3M
- g. Aqueça por 20 minutos a 50°C em banho maria seco

02. Tratamento com Bissulfito de Sódio:

- a. Prepare as soluções de Bissulfito de Sódio e Hidroquinona separadamente
(Suficiente para oito amostras)
 - Bissulfito: 1,9 gramas de Bissulfito de Sódio+ 2,5 ml de água estéril a 80°C
 - Hidroquinona: 0,11g de Hidroquinona + 1ml de água estéril a 80°C (OBS: Não se esquecer de cobrir o tubo com papel alumínio)
- b. Adicione a solução de Bissulfito de sódio: 0,7ml de NaOH 2M e a metade (0,5ml) da solução de hidroquinona
- c. Misture a nova solução e adicionar 500µl em todos os tubo de DNA já desnaturado
- d. Incube a mistura por 3 horas a 70°C (OBS: Não se esquecer de cobrir os tubos com papel alumínio)

03. Purificação (Kit Wizard SV Gel and PCR Clean System):

- a. Adicione 500µl do MBS (Membrane binding solution) ao produto do tratamento com Bissulfito de Sódio (Aproximadamente o mesmo volume)

- b. Coloque a microcoluna SV no tubo sem tampa (Fornecidos pelo KIT)
- c. Transfira a solução à microcoluna e incube por 1 minuto à temperatura ambiente
- d. Centrifugue a 14.000 RPM por 1 minuto
- e. Descarte o material do fundo do tubo, preservando a microcoluna
- f. Recoloque a coluna no tubo sem tampa
- g. Adicione 700µl MWS (Membrane washing solution)
- h. Centrifugue a 14.000 RPM por 1 minuto
- i. Descarte o material do fundo do tubo, preservando a microcoluna
- j. Recoloque a coluna no tubo sem tampa
- k. Adicione 500µl MWS (Membrane washing solution)
- l. Centrifugue a 14.000 RPM por 5 minutos
- m. Transfira a coluna para um tubo tipo Eppendorf 2 ,0ml
- n. Adicione 45µl de água estéril a 80°C
- o. Incube em temperatura ambiente por 1 minuto
- p. Centrifugue a 14.000 RPM por 3 minutos
- q. Descarte a microcoluna
- r. Adicione 5,0µl de NaOH 3M e deixe a temperatura ambiente por 10 minutos

04. Precipitação:

- a. Adicione 75µl de acetato de amônio 5M
- b. Espere 5 minutos para completa deaminação
- c. Adicione 350µl de etanol 100% gelado
- d. Adicione 1,0µl de glicogênio 20 mg/ml
- e. Incube a -20°C overnight ou 2 horas a -80°C

05. Ressuspensão:

- a. Centrifugue a 14.000 RPM por 15 minutos
- b. Descarte o sobrenadante com cuidado para não desprender o pellet de DNA
- c. Adicione 500µl de etanol 70% gelado (OBS: Diluir no momento de usar)
- d. Centrifugue a 14.000 RPM por 15 minutos à temperatura ambiente
- e. Seque o DNA a temperatura ambiente
- f. Adicione 50µl de água estéril ou Tris EDTA (TE)
- g. Aliquote em 25µl em 2 tubos de 0,5ml
- h. Armazene a -80°C

ANEXO 4 – Técnica de eletroforese em gel de Poacrilamida 6% para DNA.

01. Preparo do gel:

- a. 7 ml de bisacrilamina a 6%
- b. 70 µl de persulfato
- c. 70 µl de TEMED

02. Preparo do DNA para ser aplicado nos pocinhos:

- a. 7,0µl de DNA
- b. 2,0µl de Tampão de corrida.

03. Correr a 100 volts por 40 minutos em tampão TEB (Tris, EDTA e Ácido Bórico)

ANEXO 5 – Técnica de eletroforese em gel de Agarose 2% para RNA.

01. Preparo do gel:

- a. 0,8 gramas de agarose
- b. 40 ml de TAE
- c. 1,5 µl de brometo de etídeo

02. Preparo do RNA para ser aplicados nos pocinhos:

- a. 5,0µl de RNA
- b. 2,0µl de azul uréia

03. Correr a 100 volts por 40 minutos em tampão TAE (Tris-Acetato).