

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EXPRESSÃO *IN VITRO* DA CICLOXIGENASE-2 (COX2) NO
OSTEOSSARCOMA EXPOSTO A INIBIDOR SELETIVO DA COX2**

PAULO RICARDO DE OLIVEIRA BERSANO

Botucatu
SÃO PAULO - BRASIL
Outubro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EXPRESSÃO *IN VITRO* DA CICLOXIGENASE-2 (COX2) NO
OSTEOSSARCOMA EXPOSTO A INIBIDOR SELETIVO DA COX2**

PAULO RICARDO DE OLIVEIRA BERSANO

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Doutor.

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

Co-orientadora: *Prof^a Dr^a Maria Teresa de Seixas Alves*

Botucatu
SÃO PAULO - BRASIL
Outubro de 2011

Nome do Autor: Paulo Ricardo de Oliveira Bersano.

Título: EXPRESSÃO *IN VITRO* DA CICLOXIGENASE-2 (COX2) NO
OSTEOSSARCOMA EXPOSTO A INIBIDOR SELETIVO DA COX2.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Noeme Sousa Rocha

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica – Serviço de Patologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Rodrigues Moutinho Gärtner

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

ICBAS / IPATIMUP – Universidade do Porto, Portugal

Prof.Dr. Alaor Aparecido de Almeida

Membro

Instituto de Biociências de Botucatu – CEATOX

IBB – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Sheila Canevese Rahal

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira

Membro

Departamento de Clínica – Serviço de Patologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 01 de agosto de 2011

*A **Deus**, pela Sua misericórdia divina, pela alegria do dom da vida e
pela Sua presença sempre constante em todos os momentos.*

*Aos meus pais **José Guilherme** e **Josepha Maria** (in memorian),*

*À **Zilda**, aos meus queridos **irmãos** e toda a **família**,
pelos exemplos, apoio, dedicação, carinho e amor.*

dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista (FMVZ Unesp-Botucatu) à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela oportunidade de realizar o Programa de Pós-Graduação (Doutorado) em Patologia Veterinária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio Regular a Pesquisa (2009/5349-3-9) e pela Bolsa de Estudos (2009/53777-7), que permitiram a realização e o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

À professora Noeme Sousa Rocha, pela confiança por acreditar neste novo desafio, pela oportunidade de estudo, paciência, conselhos, competência, sugestões precisas, pela orientação neste doutoramento e sobretudo pelo exemplo de humildade, pela amizade e respeito mútuo.

À professora Maria Teresa de Seixas Alves (EPM-Unifesp-GRAACC), pela disponibilização do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, pela amizade, auxílio no delineamento experimental e nas avaliações histopatológicas e citológicas, pela correção da tese, pelos incentivos nos momentos de dificuldades, pela competência e experiência compartilhada em patologia óssea, pela confiança, e claro, pela co-orientação, cujos ensinamentos e correções serão sempre dados como referência.

À professora Maria de Fátima Rodrigues Moutinho Gärtner (IPATIMUP e ICBAS), pela disponibilização do Laboratório de Imunoistoquímica do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e do Laboratório de Cultivo Celular do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, Portugal, cujo período de convivência nos Laboratórios foram de muito trabalho e aprendizado, agradeço toda gentileza em sempre nos receber bem e as sugestões na realização do experimento.

Ao professor Matti Kiupel (Michigan States University, EUA), pela visão da importância dos trabalhos com cultivo primário de OSA canino, cujas sugestões foram amplamente absorvidas, aceitas e compreendidas em função da evidente experiência em pesquisas, agradecendo pelas conversas, aconselhamentos e ponderações precisas.

Ao professor Antônio Sérgio Petrilli (GRAACC/IOP/Unifesp) e sua equipe, pelas conversas acadêmicas e trocas de experiências e informações preciosas sobre o osteossarcoma e a indicação do nome do Dr. Chand Khanna.

À professora Fernanda da Cruz Landim (FMVZ Unesp-Botucatu), pela disponibilização do Laboratório LANÇA em que todo trabalho *in vitro* foi desenvolvido, pelo suporte acadêmico, pelas sugestões na realização do experimento, dedicação, pela amizade e admiração.

À professora Sheila Canavese Rahal (FMVZ Unesp-Botucatu), pela disponibilização da sala de cirurgia do SEMPAS para coleta dos fragmentos tumorais e a facilitação na obtenção dos materiais necessários junto ao Centro Cirúrgicos para processamento das amostras, pela amizade, confiança e competência.

Ao professor Alaor Aparecido de Almeida, pela admiração, respeito mútuo construído e iniciado em discussões sobre pesquisas após algumas aulas que renderam pelo menos uma excelente iniciação científica e que ainda certamente renderão outros trabalhos. Agradeço a amizade, o auxílio farmacológico deste trabalho, os conselhos, as inúmeras consultas, conversas intermináveis, a toda gentileza e prestatividade.

Ao pesquisador Chand Khanna (National Cancer Institute – Center for Cancer Research, EUA), pelos preciosos conselhos, pela motivação, competência, sugestões incríveis para uso do material obtido, pelo exemplo de humildade e preocupação por bons trabalhos sobre osteossarcoma e tudo que o envolve, pela amizade, pela parceria que se forma e se fortalece. Minha admiração profissional e pessoal.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilorio e professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, pela amizade, admiração e presenças sempre constantes por meio de seus ensinamentos obtidos na Graduação e na Pós-Graduação na Universidade Federal de Viçosa, cujo resultado de uma idéia criada foi em grande parte realizada neste estudo.

Ao professor Júlio Lopes Sequeira (FMVZ Unesp-Botucatu), pela prestatividade, preocupação e empenho em sempre querer ajudar, pelo respeito, conselhos, sugestões e amizade.

À professora Renée Laufer Amorim (FMVZ Unesp-Botucatu), pela disponibilização de material quando necessário, contatos profissionais e amizade.

À professora Sílvia Minharro Barbosa (UFT), pela amizade, pelo apoio, admiração e ajuda para superar grande parte dos constantes desafios que surgiram durante este tempo de estresse e agitações.

Aos funcionários José Roberto, Maria, Patrícia, Marlene, Cristina, Maury Raul, Claudinei e Valéria que por inúmeras vezes com paciência, competência e gentileza atenderam os meus incansáveis pedidos e solicitações nas fases de necessidades e decisões importantes de meu doutoramento, e aos residentes da Unesp Botucatu de 2008, 2009, 2010 e 2011 que me ajudaram na obtenção dos casos de OSA canino.

Às amigas Marjorie Golin, Léia e Viviane do Hemocentro da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu pela amizade construída neste anos de trabalho, pela grande ajuda no processamento do material e análise dos resultados quase que infinitos encontrados na citometria de fluxo.

Às funcionárias Leonor Cristina Manoja Roman, Fernanda, Kátia e Maria José do Laboratório de Imunoistoquímica da Patologia da EPM-Unifesp, e Maria de Fátima Faria, Alexandra Rêma e Célia Cristina do Laboratório de Imunoistoquímica do Laboratório de Patologia do ICBAS – Universidade do Porto, Porto pela paciência, amizade construída e auxílio na confecção das lâminas de HE, IHQ e ICQ.

Aos colegas e amigos de Viçosa: Anna Paula B. R. Ferreira, Fabrício Valente, Michelle Bressan, Ferdinan de Almeida Melo, Abelardo da Silva Júnior, Juliana Munique, Pablo Herthel. Como sempre dissemos: “No final dá tudo certo...” Agora a frase é outra: “O mais importante é o principal”.

Aos colegas e amigos de Pós-Graduação Tatiana, Thaila, Camila, Daniela, Mydien, Vinícius, Fernanda, Breno, Lidiane, Fabrício, Isabelle, Mácia, Mariana, Jair Camargo, Luis Magalhães, Celi, Vitor Rosetto e muitos outros que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização e desenvolvimento deste trabalho, agradeço simplesmente a amizade e força.

Aos amigos Gustavo Araújo e Carla Moya pela amizade, torcida e força.

Ao amigo João Ferreira de Lima Neto, que com sabedoria, habilidade, competência e conhecimento pudemos enfim padronizar a técnica de isolamento das culturas de células neoplásicas e demais técnicas de cultivo celular, sua ajuda foi de fundamental importância para os bons resultados deste trabalho. Não me esquecendo do também amigo de Laboratório Mateus Sudano que muito auxiliou nos trabalhos paralelos e nesta Tese com seus imprescindíveis conhecimentos em estatística.

Ao Grupo de Pesquisa OSA, com Rodolfo Françon, passando por Tarini Cristina e Gabriela Venturini, em seguida pelas presenças de Isis Galanti Khiel e Naiara da Costa Cinegaglia, meu muito obrigado!

Ao meu presente de Graduação que se estendeu pelo mestrado, doutorado e certamente me acompanhará por mais uns dez anos ainda, que é o meu grande companheiro, amigo sincero e que traz alegria ao meu dia-a-dia... Este é o Wilbherth, meu “filho preto” que eu nunca canso de dizer e amar, agora entrando na vida senil, porém, sempre carinhoso, obediente, e sem igual.

Aos amigos de república Luis Vergara, Jair Vergara, Rafael e Érico, pelas risadas, companheirismo, convivência, ajuda sempre que necessária, torcida e sobretudo pela grande amizade compartilhada.

Aos proprietários dos animais que permitiram o uso do material dos seus cães envolvidos no estudo e a todos que direta ou indiretamente proporcionaram a realização desta investigação, o meu sincero agradecimento.

À todas as vítimas de câncer e principalmente às de minha família como: minha mãe Josepha e minha irmã Ana Lúcia (vítimas de carcinoma mamário), meu avô Guilherme (vítima de carcinoma prostático), meu querido tio Vitório (vítima de carcinoma de colon), minha querida tia Anna de Lourdes (vítima de carcinoma pancreático) e ao meu pai (vítima e curado de carcinoma de colon). A persistência se faz presente por uma causa, e por esta causa há motivos que instintivamente me conduzem e incentivam para esta pequena parcela de contribuição.

À minha mãe, que é e sempre será motivo de orgulho para mim e a toda Família pelo seu exemplo de vida, perseverança, coragem, luta e por sua linda história. Sinto sua presença desde o momento que acordo, estende-se quando vou me deitar e sei que me acompanha em meus sonhos a noite e em todos os outros sonhos de minha vida, compartilhando as conquistas e desilusões, mas também sei que quem persevera sempre alcança. Obrigado pelo nome que me acompanhará por toda eternidade, pela sua presença e amor incondicional de mãe que nunca se ausentou.

Ao meu pai, que é minha base, espelho, minha fortaleza, motivo de orgulho, perseverança, dedicação que tanto fez e faz por mim e a todos meus irmãos, com sua insistência em proporcionar sempre ensino e educação a todos os seus filhos, mostra-nos o quão nobre é o dom do saber. Sempre dando apoio, incentivo, confiança, carinho mesmo distante fisicamente, mas sempre presente com sua torcida, compartilhando passo a passo todos os momentos de minha vida. Não me esquecendo da Zilda que sempre com seu amor também pude sentir sua torcida, incentivo e carinho.

Aos meus queridos e amados irmãos Ana Lúcia, Duda, James, Carminha, Tuca, Janaina, Benê e Álvaro, que tanto fazem e fizeram por mim. Sempre vibrantes e presentes com conselhos, incentivos, acolhimento, carinho e sobretudo exemplo de vida e amor. Meu eterno obrigado por fazerem parte desta conquista que compartilho com todos vocês.

A Virgem Santíssima repito meu "*Totus Tuus*" com confiança em sua proteção maternal. Minha eterna gratidão pela sempre silenciosa presença, e doce amor misericordioso e piedoso, que pude senti-lo em cada pulsar de meu peito em Fátima, cuja visita foi realizada de acordo com a Sua vontade. Obrigado por Sua incansável interseção por mim e por todos nós. Nossa Senhora Mãe de Deus, rogai por nós!

Ao amor eterno de Deus Pai que nos criou, Deus Filho que nos remiu e o Espírito Santo que nos santifica, sem o qual, nada disso seria possível, pois tudo se resolveu com tranquilidade conforme os Seus desígnios. Com esta confiança que pude sentir Sua mão sempre estendida e pronta para iluminar e santificar a minha vida. Jesus, eu confio em Vós!

***Eu vos louvo e vos dou graças, ó Senhor,
porque de modo admirável me formastes!***

Salmo 138

BIOGRAFIA

PAULO RICARDO DE OLIVEIRA BERSANO, filho de José Guilherme Bersano e Josepha Maria de Oliveira Bersano (*in memorian*), nasceu em Ibitinga, SP, aos 04 de maio de 1974.

Concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (MG) em janeiro de 2004. Em agosto do mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação, nível mestrado, em Medicina Veterinária na área de Patologia Veterinária, desta mesma Instituição de ensino, finalizando este estudo em dezembro de 2006.

Em março de 2008 ingressou no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp Campus de Botucatu), cujos trabalhos de doutoramento em Patologia Veterinária foram conduzidos.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E ANÁLISE DO PERFIL DE BIOMARCADORES ALVO DA CARCINOGENESE

Tabela 1	Especificações dos anticorpos utilizados nas imunomarcações do experimento.....	16
Tabela 2	Parâmetros clínicos dos animais e suas respectivas expressões de Cox2, cujos fragmentos tumorais foram utilizados para isolamento e caracterização dos cultivos primários de OSA canino.....	28
Tabela 3	Representação dos valores (%) para determinação da diferenciação histológica do cultivo primário de OSA canino.....	31
Tabela 4	Representação dos valores (%) para determinação da diferenciação histológica do cultivo primário de OSA canino...	31

CAPÍTULO 2: EXPOSIÇÃO A INIBIDOR SELETIVO DA COX2 EM CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSSARCOMA CANINO

Tabela 5	Identificação dos valores das células vivas, apoptóticas, apoptóticas / necrose e em necrose, segundo as expressões da Cox2.....	46
Tabela 6	Identificação dos valores das células vivas, em apoptose, apoptose / necrose e em necrose, segundo os períodos de 24h, 48h e 72h.....	48
Tabela 7	Identificação dos valores das células vivas, apoptóticas, apoptóticas / necrose e em necrose, segundo as concentrações crescentes de Celecoxibe.....	50

CAPÍTULO 3: VALIDAÇÃO DE DIFERENTES MARCAÇÕES EM CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSSARCOMA CANINO

Tabela 8	Especificações dos anticorpos primários utilizados nas imunomarcações.....	54
Tabela 9	Representação do perfil imunoistoquímico dos marcadores alvo do padrão histológico tumoral referentes aos respectivos spOS.....	57
Tabela 10	Representação do perfil imunocitoquímico da caracterização do cultivo primário de osteossarcoma canino para citospin....	58
Tabela 11	Representação fenotípica do perfil imunoistoquímico dos marcadores alvo da carcinogênese para os fragmentos dos tumores em estudo.....	61
Tabela 12	Representação imunocitoquímica dos valores encontrados na caracterização dos cultivos primários de osteossarcoma canino para citospin.....	63

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSARCOMA CANINO E ANÁLISE DO PERFIL DE BIOMARCADORES ALVO DA CARCINOGENESE

- Figura 1 Cadela Rottweiler, 6 anos, colheita da amostra na região distal tíbio-fibular (A) Células mesenquimais malignas com características morfológicas de osteoblastos neoplásicos (): matriz óssea pela célula adjacente, (): células multinucleadas, (): ranhuras na cromatina, (): micronúcleo. – Giemsa. 400X. (B) Osteossarcoma osteoblástico em cão: alta celularidade de osteoblastos malignos ativos, deposição de trabéculas e matriz óssea. – HE. 400X..... 14
- Figura 2 (A) Cão SRD, macho, 7 anos, no centro cirúrgico com aumento de volume na região proximal do úmero do membro torácico esquerdo. (B) Amputação do membro torácico esquerdo em cão com osteossarcoma na região proximal do úmero. (C) Coleta do tumor de forma asséptica após a amputação do membro do paciente. (D) Indicação do local da coleta do tumor pela ponta do bisturi. (E) Material coletado em tubos de 15mL contendo solução PBS pH 7,4. (F) Fragmentos tumorais lavados e sendo preparados para tripsinização (G). Material já processado, acondicionado em frasco de cultivo e mantido em estufa. (H) Cultivo apresentando heterogeneidade e intensa celularidade. 200X..... 17
- Figura 3 (A) Gráfico identificando amostragem do padrão celular desejado na análise. (B) Histograma do controle autofluorescente. (C): Histograma do controle do anticorpo secundário. (D) Histograma para o marcador vimentina com 97,91% positividade dentro da região denominada “M1”. (E): Histograma para o marcador citoqueratina com 0,16% de positividade dentro da região “M1”. Avaliação de 10.000 células por análise..... 25
- Figura 4 (A) Osteossarcoma osteoblástico. Alta celularidade de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Há grande proliferação de osteoblastos neoplásicos e produção de matriz óssea não mineralizada – HE. 400X. (B) Osteossarcoma combinado ou misto. Nota-se células condróides malignas (a), células pleomórficas malignas (b) e células malignas fusiformes. (c). – HE. 400X..... 27

Figura 5	(A) Imunoistoquímica positiva para anticorpo anti-Cox2 em fragmentos de tecido de osteossarcoma canino. IHQ - Novolink®. 400X. (B): Imunoistoquímica negativa para anticorpo anti-Cox2 em fragmentos de tecido de osteossarcoma canino. IHQ - Novolink®. 400X.....	27
Figura 6	Cultivos primários de osteossarcoma canino apresentando grande quantidade células pleomórficas com células fusiformes pentagonais a poliédricas, mono, bi ou multinucleares, anisocitose evidente com núcleos vesiculosos e nucléolos evidentes. (A): spOS-1. – 200X. (B): spOS-2. – 400X. (C): spOS-3. – 200X. (D): spOS-4. – 400X (E): spOS-6. – 200X. (F): Cultivo de ctm-D. – 200X. (G): spOS marcada com Alizarin-Red, núcleos laranja-avermelhados. – 200X. (H): Cultivo de ctm-D marcada com Alizarin-Red, núcleos laranja-avermelhados. – 200X.....	32

CAPÍTULO 2: EXPOSIÇÃO A INIBIDOR SELETIVO DA COX2 EM CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSSARCOMA CANINO

Figura 7	A esquerda, fórmula estrutural (Goodman & Gilman's – The pharmacological basis of therapeutics, 2010) e a direita, modelo molecular (sciencephotolibrary – F003/4947, Royalty Free) do anti-inflamatório seletivo para a Cox2 (Celecoxibe)..	43
Figura 8	(A) Gate R1 identifica amostragem de células a serem analisadas no dot-plot, (B) Controle Autofluorescente identificando células em LL sem marcações. (C) Identificação a partir dos quatro quadrantes (UL, UR, LL, LR) a resposta ao referido tratamento.....	44
Figura 9	Porcentagens de células vivas, apoptose, apoptose / necrose e necrose observado nos grupos Cox2 positivos e negativos. *($P \leq 0,05$).....	47
Figura 10	Porcentagens de células vivas, apoptose, apoptose / necrose e necrose observado nos grupos 24h, 48h e 72h de exposição a Celecoxibe. *72h difere ($P \leq 0,05$) dos grupos 24h e 48h.....	48
Figura 11	Porcentagens de células vivas, apoptose, apoptose / necrose e necrose observado nos grupos.....	51

CAPÍTULO 3: VALIDAÇÃO DE DIFERENTES MARCAÇÕES EM CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSSARCOMA CANINO

- Figura 12 Osteossarcoma canino. Expressão dos imunomarcadores a partir do painel de identificação histológica dos fragmentos neoplásicos dos tumores ósseos em estudo, identificando em (A): osteossarcoma osteoblástico. HE. 400X. (B): vimentina positiva. (C): citoqueratina negativa. (D): osteocalcina positiva. (E): osterix positivo. (F): osteopontina positiva. IHQ - Novolink[®]. 400X..... 57
- Figura 13 Expressão dos imunomarcadores a partir do painel de caracterização da diferenciação histológica das células das cinco culturas spOS, identificando em (A): spOS-3 vimentina positiva. (B): spOS-2 citoqueratina negativa em quatro das cinco culturas. (C): spOS-1 citoqueratina positiva em spOS-1. (D): spOS-3 osteocalcina positiva. (E): spOS-2 osterix positivo. (F): spOS-1 osteopontina positiva. IHQ. 400X. Identificação de diferenças morfológicas e principalmente na quantidade de citoplasma nas diferentes culturas spOS. ICQ - Novolink[®]. 400X..... 58
- Figura 14 Osteossarcoma canino. Expressão dos imunomarcadores a partir do painel fenotípico de caracterização das proteínas alvo encontradas nas fases da carcinogênese para os fragmentos dos tumores estudados. (A): Cox2. (B): VEGF. (C): MMP-2. (D): MMP-9. (E): caspase-3 (F): Bax. (G): Bcl-2 (H): p53. (I): Ki-67 (MIB-1). IHQ positiva - Novolink[®]. 400X..... 61
- Figura 15 Expressão dos imunomarcadores a partir do painel fenotípico de caracterização das proteínas alvo identificadas nas fases da carcinogênese para os cultivos spOS. (A): Cox2. (B): VEGF. (C): MMP-2. (D): MMP-9. (E): caspase-3 (F): Bax. (G): Bcl-2 (H): p53. (I): Ki-67 (MIB-1). ICQ positiva - Novolink[®]. 400X..... 63
- Figura 16 Osteossarcoma canino. Citospin com coloração histoquímica (A) Células apresentando critérios de malignidade (): megalocitose com ondulações citoplasmáticas, (): micronúcleo, (): célula multinucleada, (): ondulações citoplasmáticas / pseudópodes, (*): secreção de matriz óssea. – Giemsa. 1.000X. (B) Células apresentando pleomorfismo celular e nuclear. Coloração verde demonstrando alta atividade celular dos osteoblastos neoplásicos. (*): célula multinucleada maligna. Papanicolaou. 1.000X..... 66

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Etiopatogenia do osteossarcoma canino.....	4
2.1.1. Moléculas alvo para caracterização do painel de biomarcadores do osteossarcoma canino.....	5
2.1.2. Cultivo celular.....	9
2.1.3. Morte celular por apoptose.....	10
3. OBJETIVOS.....	12
4. HIPÓTESES.....	12
5. CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E ANÁLISE DO PERFIL DE BIOMARCADORES ALVO DA CARCINOGENESE.....	13
5.1. Objetivo do capítulo 1.....	13
5.2. Material e métodos.....	13
5.2.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo.....	13
5.2.2. Processamento do material.....	14
5.2.3. Imunoistoquímica.....	15
5.2.4. Obtenção das amostras das culturas celulares primárias do osteossarcoma canino.....	15
5.2.5. Digitalização das imagens.....	18
5.2.6. Nomenclatura dos cultivos primários de OSA canino.....	18
5.2.7. Manutenção dos cultivos primários.....	19
5.2.7.1. Troca dos meios de cultivo.....	19
5.2.7.2. Caracterização dos cultivos primários.....	19
5.2.7.3. Contagem celular.....	20
5.2.7.4. Criopreservação dos cultivos primários.....	20
5.2.8. Caracterização dos cultivos primários.....	21

5.2.9.	Coleta das células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	22
5.2.10.	Isolamento, cultivo <i>in vitro</i> de células-tronco mesenquimais e diferenciação em osteoblastos.....	23
5.2.11.	Análise para confirmação da diferenciação em células de origem óssea pela citoquímica em cultivo.....	24
5.3.	Análise estatística.....	26
5.4.	Resultados e discussão.....	26
5.4.1.	Casos obtidos e suas respectivas nomenclaturas.....	26
5.4.2.	Parâmetros clínicos dos animais em estudo.....	28
5.4.3.	A importância do uso de biomarcadores em oncologia veterinária e para o OSA canino.....	29
5.4.4.	Expressão dos biomarcadores em função das células em cultivo primário.....	30
5.4.5.	Expressão dos biomarcadores Cox2 e Ki-67.....	33
5.4.6.	Expressão dos biomarcadores VEGF, MMP-2 e MMP-9.	36
5.4.7.	Expressão dos biomarcadores caspase-3, Bcl-2, Bax e p53.....	37
5.5.	Conclusão do Capítulo 1.....	39
6.	CAPÍTULO 2: EXPOSIÇÃO A INIBIDOR SELETIVO DA COX2 EM CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSARCOMA CANINO.....	40
6.1.	Objetivo do capítulo 2.....	40
6.2.	Material e métodos.....	40
6.2.1.	Aspectos éticos e origem do material em estudo.....	40
6.2.2.	Processamento do material.....	41
6.2.2.1.	Uso dos cultivos primários spOS.....	41
6.2.3.	Cultivo celular e tratamentos.....	41
6.2.3.1.	Farmacodinâmica do Celecoxibe.....	42
6.2.4.	Citometria de fluxo.....	43
6.2.5.	Análise estatística.....	45
6.3.	Resultados e discussão.....	46
6.3.1.	Análise dos tratamentos com inibidor seletivo da Cox2 nos cultivos spOS positivos e negativos.....	46
6.3.2.	Tratamentos com inibidor seletivo da Cox2 em função dos tempos 24h, 48h e 72h.....	47

6.3.3.	Análise das diferentes concentrações nos tratamentos com inibidor seletivo da Cox2.....	50
6.4.	Conclusão do Capítulo 2.....	51
7.	CAPÍTULO 3: VALIDAÇÃO DE DIFERENTES MARCAÇÕES EM CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSARCOMA CANINO.....	52
7.1.	Objetivo do capítulo 3.....	52
7.2.	Material e métodos.....	52
7.2.1.	Aspectos éticos e origem do material em estudo.....	52
7.2.2.	Processamento do material.....	53
7.2.2.1.	Uso dos cultivos primários spOS.....	53
7.2.2.2.	Imunoistoquímica.....	53
7.2.2.3.	Imunocitoquímica.....	53
7.2.2.4.	Coloração Giemsa e Papanicolaou.....	54
7.2.3.	Análise da intensidade de marcação.....	55
7.2.4.	Digitalização das imagens.....	55
7.3.	Resultados e Discussão.....	56
7.3.1.	Expressão dos biomarcadores em função do padrão histológico das células em cultivo primário e dos respectivos fragmentos tumorais.....	56
7.3.2.	Expressão dos biomarcadores da carcinogênese.....	60
7.3.3.	Marcação histoquímica: Giemsa e Papanicolaou.....	66
7.3.4.	Avaliação do uso das técnicas utilizadas no estudo.....	67
7.4.	Conclusão do Capítulo 3.....	68
8.	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXOS.....	81

RESUMO

BERSANO, Paulo Ricardo de Oliveira. DR., Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, julho de 2011. **Expressão *in vitro* da cicloxigenase-2 (Cox2) no osteossarcoma exposto a inibidor seletivo da Cox2.** Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha. Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa de Seixas Alves.

O comportamento biológico altamente metastático e localmente agressivo é marca dos tumores ósseos malignos do cão, sua importância deve-se à dificuldades na conduta terapêutica. Para testar a hipótese, o trabalho se propôs a investigar a Cox2, proteína alvo para tratamento, com identificação e quantificação dos marcadores da proliferação: Ki-67; apoptose: caspase-3, p53, Bcl-2 e Bax; invasão: MMP-2 e MMP-9; e formação de vasos: VEGF. Cinco cães com suspeitas clínicas e radiológicas, e posterior diagnóstico citopatológico e histopatológico de osteossarcoma de ocorrência espontânea, que foram submetidos à cirurgia. Obteve-se de cada animal o isolamento e caracterização dos cultivos primários. Os diferentes cultivos foram expostos a inibidor seletivo da Cox2, o celecoxibe, no qual houve diferença ($p \leq 0,05$) para os cultivos Cox2 positivos em relação aos negativos, com maior indução à necrose. Em 72h observou-se maior porcentagem de células vivas, menor de células em apoptose e maior de células em necrose em relação aos grupos de 24h e 48h. Houve tendência ($p=0,08$) na redução da porcentagem de células em necrose para os grupos de $100\mu\text{M.L}^{-1}$ quando comparados aos grupos de $10\mu\text{M.L}^{-1}$. Independente do método, os fatores que induzem crescimento vascular, proliferação, morte e invasão, inerentes as etapas da carcinogênese, são complexos Não foi possível determinar o papel individual de cada um destes fatores. A metodologia empregada se mostrou eficaz para determinar o padrão histológico das amostras. Logo, o cultivo primário se comportou como modelo ideal para estudo do OSA, visto que suas características de agressividade tumoral não se perderam quando comparados aos métodos citados.

Palavras chaves: Osteossarcoma, carcinogênese, tratamentos, cicloxigenase-2.

ABSTRACT

BERSANO, Paulo Ricardo de Oliveira. DR., Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, July, 2011. ***In vitro* expression of cyclooxygenase-2 (Cox2) for osteosarcoma exposed to a Cox2 selective inhibitor.** Adviser: Dra. Noeme Sousa Rocha, MDV. Co-advisers: Dra. Maria Teresa de Seixas Alves, MD.

A high metastatic behavior and site aggressiveness are common features of bone malignant tumors in the dog and they are important owing to their therapeutic difficulties. The objective of this study was to validate such hypothesis by investigating the Cox2 (therapy's target protein) via the identification and quantification of markers for proliferation (Ki-67), apoptosis (caspase-3, p53, Bcl-2 and Bax), invasion (MMP-2 and MMP-9) and vessel formation (VEGF). Five dogs diagnosed as having spontaneous osteosarcoma (clinical, radiological, cytopathological and histopathological diagnosis) underwent tumor removal surgery and it was isolated and characterized the primary culture of each animal. All cultures were exposed to a Cox2 selective inhibitor named celecoxibe. There was difference ($p \leq 0,05$) between Cox2 positive cultures and Cox2 negative ones. The positive ones presented higher necrosis induction. The 72h group presented higher percentage of live cells and cells undergoing necrosis when compared to the 24h and 48h groups. Nevertheless, the 72h group presented lower percentage of cells in apoptosis. Cells undergoing necrosis tended be in a lower percentage ($p=0,08$) for the $100\mu\text{M.L}^{-1}$ groups when compared to the $10\mu\text{M.L}^{-1}$. Regardless of methodology, the factors that induce vascular growth, proliferation, death, and invasion in different phases of the carcinogenesis are complex. It was no yet possible to determine the individual role from each of these factors. The methodology applied in this experiment was efficient in determining the histological standard of these samples. Hence, the primary culture may be used as an ideal model for the OSA study as the tumor aggressive characteristics were not lost when compared to the previously mentioned methods.

Key words: Osteosarcoma, carcinogenesis, treatments, cyclo-oxygenase-2.

1. Introdução

Recentes pesquisas têm avançado na busca por marcadores do osteossarcoma (OSA), em humanos e no cão, como os de proliferação celular, indiferenciação, receptores de moléculas adesivas, metástase entre outros. Investigações baseadas apenas nas vertentes clínicas do osteossarcoma não são acuradas o suficiente para identificar o perfil heterogêneo deste tumor (DERNELL et al, 2007). Em pequenos animais, o câncer é a principal causa de morte (MODIANO e BREEN, 2007).

As células inflamatórias e seus diversos fatores solúveis envolvidos na inflamação estão presentes em todos os tumores. Os fenômenos clássicos da resposta inflamatória, que incluem remodelação tecidual, angiogênese e cicatrização, são características comumente utilizadas como sinais ou indícios morfológicos de um câncer invasivo (DEMARIA et al., 2011). Estudos têm mostrado que estes processos inflamatórios estromais, relacionados principalmente a presença da Cox2, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e progressão de tumores em várias espécies, cujo papel nas neoplasias inclui a proliferação e transformação celular, crescimento tumoral, invasão e metástases (GASPARINI et al., 2003; FINAK et al., 2008). Desta forma, a identificação da presença da Cox2 e outras proteínas envolvidas na carcinogênese nos permitem caracterizar o perfil destas neoplasias, prever suas agressividades e principalmente seus respectivos comportamentos clínicos (DEMARIA et al., 2011).

A Cox2 está sendo avaliada com objetivo de tratamento e prevenção do câncer. O uso de inibidores seletivos da Cox2 (coxibes) bloqueia o crescimento de muitos tumores por diversos mecanismos, principalmente pela antiangiogênese e pelos efeitos pró-apoptóticos. Achados pré-clínicos mostraram que a alta expressão da Cox2, observada em tumores humanos em estágios avançados, é a base para uma nova estratégia de terapêutica anticâncer, baseada na combinação de inibidores

seletivos da Cox2 e outras modalidades de tratamentos (GASPARINI et al., 2003).

Segundo Wolfesberger et al, (2006) a administração adjuvante de um inibidor da Cox2 *in vitro* para o osteossarcoma canino, apresenta resultados semelhantes aos encontrados em outros cânceres como os de esôfago, cólon, estômago e reto, cujos tratamentos adjuvantes com estas drogas vêm apresentando resultados animadores. Portanto, para os casos em que ela é expressa existem boas perspectivas de sobrevida, justificando assim, novas buscas terapêuticas para o tratamento do osteossarcoma.

As vias moleculares da inflamação relacionada ao câncer estão agora sendo investigadas e desvendadas, resultando na identificação de novas moléculas alvos que podem levar a melhor conhecimento do prognóstico e tratamento (MANTOVANI et al., 2008). No homem o prognóstico através de biomarcadores como: p53, Rb, MMP, VEGF, PCNA, Ki-67, FOS, SV40, BMP, MAPK, WNT/ β -catenina, HER-2, ErbB, MIC, Cox2 entre outros, é amplamente utilizado nos dias de hoje (GASPARINI et al., 2003; LOUKOPOULOS et al., 2004; GORLICK e KHANNA, 2010), e cada vez mais se tornam ferramenta de direcionamento em diversos tipos de tratamentos, sendo utilizados também para o monitoramento de pacientes, como indicadores para uso de novos quimioterápicos e adjuvantes terapêuticos, podendo assim também indicar o aparecimento de metástase ou recidivas. No OSA canino estes métodos são subutilizados, principalmente na realidade brasileira de diagnóstico, tratamento e prognóstico.

Pelos trabalhos nacionais que investigam a incidência do OSA em cães, pode-se observar a não representatividade casuística desta neoplasia como mostram Bersano (2006) e Daleck et al, (2009), e, principalmente em virtude da decisão do proprietário optar pela eutanásia do animal, ao invés do tratamento principalmente pelos custos onerosos, com isso, perde-se o registro da doença e as informações preciosas de toda manifestação clínico-patológica, *ante-mortem* e *pos-mortem* que a doença possa trazer. Portanto, novas buscas poderão melhorar o

diagnóstico, assim como tornar os novos tratamentos mais confiáveis, eficazes e com menor custo para esta neoplasia.

Assim sendo, esta investigação procurou a partir de estudo *in vitro*, fazer uso de biomarcadores alvo da carcinogênese, isolar, caracterizar e expor células primárias do osteossarcoma canino a um inibidor seletivo da Cox2 em diferentes tempos e concentrações.

2. Revisão de Literatura

2.1. Etiopatogenia do osteossarcoma canino

O osteossarcoma é a neoplasia óssea primária mais frequentemente diagnosticada em cães, responsável por mais de 80% dos casos (STRAW et al., 1990; HAMMER et al., 1995; WOLFESBERGER et al., 2006), representando excelente modelo *in vivo* para o OSA humano (KIRPENSTEIJN et al., 2002; MULLINS et al., 2004), já que sua biologia em cães é semelhante. (KHANNA et al., 2001). Compreende aproximadamente de 2% a 5% de todos os cânceres em cães (DERNELL et al., 2007) e menos de 1% em humanos (GORLICK e KHANNA, 2010). Quando comparado a tumores de outros órgãos, as neoplasias ósseas primárias são pouco frequentes, porém, sua importância deve-se à dificuldades na conduta, já que apresentam um extenso espectro de lesões (BRASILEIRO FILHO, 2006).

É uma doença que se caracteriza por comportamento altamente metastático e localmente agressivo. Independente das espécies a localização do tumor é preferencialmente em ossos longos, na região epifisária. São muitas as hipóteses etiológicas para o OSA, que vão desde as anormalidades genéticas inerentes ao paciente, até mesmo as exposições aos diversos riscos ambientais, como a exposição a radiação ionizante demonstrada em modelos animais, como também observada em humanos (JANEWAY et al., 2009; GORLICK e KHANNA, 2010).

Todavia, a causa do OSA canino de origem espontânea ainda é controversa, acreditando-se estar mais relacionada com o porte do animal do que a raça. Pesquisas demonstram que cães com peso acima de 36,5kg possuem 61 a 185 vezes mais risco de desenvolver OSA quando comparados à cães de peso menor que 9kg. A idade média de ocorrência é de 7,7 anos, e o risco aumenta até os 10 anos. Os animais não castrados apresentam maior incidência ao OSA comparados com os castrados (DALECK et al., 2002; DERNELL et al., 2007).

O diagnóstico do osteossarcoma se inicia na história clínica e no exame semiológico do animal, posteriormente, laboratorial tais como: bioquímico, citológico, histológico, por imagem e diagnósticos diferenciais (LING et al., 1974; DALECK et al., 2002; DERNELL et al., 2007). Em humanos, estudos nacionais demonstram que o tempo entre o início dos sintomas até o diagnóstico não se correlacionam com a presença de metástases, tamanho do tumor, ou a sobrevivência do paciente. Estes dados sugerem que o estágio da apresentação da doença depende mais das propriedades biológicas do tumor do que do diagnóstico tardio da neoplasia (PETRILLI, et al., 2006).

O prognóstico em cães é extremamente reservado (HAMMER et al., 1995; DERNELL et al., 2007), sendo a amputação a principal forma de tratamento. O procedimento proporciona a ressecção completa do tumor primário para cães com OSA apendicular, porém, apesar do alívio do desconforto local, raramente resulta em cura (DALECK et al., 2009). A cirurgia deve ser considerada tratamento paliativo, quando realizada isoladamente (WATERS, 1998).

A resposta individual de cães à quimioterapia é imprevisível, podendo resultar em insucesso em responder à droga citotóxica. Para o OSA canino, a doxorrubicina vem sendo utilizada juntamente com a cisplatina que possui menor custo, ou mais comumente com a carboplatina, que é derivado platinado de segunda geração, utilizado em função de apresentar menores efeitos colaterais (LARONE e DELPRAT, 2004; DERNELL et al., 2007).

2.1.1. Moléculas alvo para caracterização do painel de biomarcadores do osteossarcoma canino

As células mesenquimais possuem muitos biomarcadores em comum e muitos deles se mantêm muito expressos nas células mais diferenciadas. Desta forma, torna-se necessária a utilização de marcadores específicos para identificação do padrão e comportamento do tipo celular desejado (NEUPANE et al., 2008).

Para o OSA canino os principais biomarcadores constituintes do painel de identificação do tumor são as moléculas e proteínas que apresentam marcação positiva: cálcio; pelos métodos de mensuração da atividade da fosfatase alcalina (FA) a partir dos níveis de Ca^{2+} e proteínas do líquido sobrenadante das amostras previamente padronizadas (LOUKOPOULOS et al., 2004), assim como a identificação do mesmo cation em células de culturas previamente fixadas em álcool absoluto e marcadas pelo alizarin red (LIU et al., 1999). Como imunomarcadores a vimentina identifica células de origem mesenquimal, a osteopontina, osteocalcina, osteonectina, RANK-L são sinalizadores expressos por osteoblastos que regulam a mineralização da matriz óssea (ERIKSEN, 2010).

Como proteínas expressas em células de origem óssea, a osteopontina se apresenta como bom parâmetro para marcação do OSA (LOUKOPOULOS et al., 2004); a osteocalcina apresenta ótima imunoexpressão para identificação de células ósseas diferenciadas em cultivos celulares (NEUPANE et al., 2008; JUHÁSOVÁ et al., 2011); e osterix, que é importante marcador relacionado a diferenciação de osteoblastos (ERIKSEN, 2010). Segundo Cao et al, (2005) o osterix também possui importante envolvimento na patogênese do osteossarcoma. Além do auxílio dos biomarcadores, é de fundamental importância identificar o fenótipo celular e seu comportamento em culturas *in vitro* para sua melhor identificação e caracterização (FRESHNEY, 2010).

Como objeto de estudo na identificação do perfil dos cultivos primários do OSA canino e construção do painel imuno-histogênico destas células neoplásicas *in vitro*, diversas moléculas alvo foram selecionadas. A cicloxigenase-2 (Cox2) que é a proteína alvo deste estudo, foi inicialmente identificada no início dos anos de 1.990 como enzima distinta, que apresentava em torno de 60% de homologia com a Cox1.

A Cox2 é uma proteína mediada no estroma por células inflamatórias, por diversas citocinas e outros mediadores (WASKEWICH et al., 2002). As Cox são enzimas que catalisam a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Das três isoformas descritas (WOLFESBERGER et al., 2006), a cicloxigenase-1 (Cox1), é

constitutiva e expressada em muitos tecidos, a segunda isoforma é a Cox2, que é induzida e expressada por células que participam do processo inflamatório, por tecidos neoplásicos e por outras condições patológicas; e a terceira prostaglandina tem sido descrita recentemente e postulada como sendo a Cox3, proteína variante da Cox1 expressa principalmente em células do coração e córtex cerebral (GASPARINI et al., 2003).

A alta expressão da Cox2 conduz a uma elevada concentração de prostaglandinas, especialmente a prostaglandina E2 (PGE2) (MOHAMMED et al., 2004). Pai et al. (2002) mostraram uma estreita ligação entre PGE2 e receptores de EGF. A PGE2 induz a ativação de metaloproteinases MMP2 e MMP9, que são moléculas importantes nos processos de invasão dos tecidos adjacentes e nas metástases (LOUKOPOULOS et al., 2004), e aumentando a expressão de TGF- α , combinando com receptores de EGF, o que promove ou desencadeia sinalizadores mitogênicos (GASPARINI et al., 2003).

A Cox2 pode ser induzida por estímulos mitóticos, mediados por fatores de crescimento, tais como: EGF, VEGF, FGF, TNF- α , Interleucinas 1 α e 1 β (VADLAMUDI et al., 1999; ARAKI et al., 2003).

Ela é expressa constitutivamente em tecidos neoplásicos como em muitos carcinomas, incluindo colon, esôfago, próstata, mama, dentre outros (WASKEWICH et al., 2002). Há evidências de que a Cox2 esteja envolvida na patogênese de alguns carcinomas como em ratos transplantados com células epiteliais em que houve alta estabilidade destas células, cuja expressão de Cox2 foi elevada e houve resistência a apoptose e expressão aumentada de Bcl-2.

Estas células mostraram aumento em sua adesão a matrix extracelular e reduzidos níveis dos receptores de TGF- β (TSUJII e DuBOIS, 1995). Foi observado mudanças no fenótipo de células que expressaram altos níveis de Cox2 e aumento na agressividade tumoral. Já a alta expressão da Cox2 isoladamente não é suficiente para induzir neoplasia, mas sua expressão é suficiente para relacioná-la a carcinogênese em certos tipos de tecidos (WANG e DuBOIS, 2004).

Alguns estudos preliminares sugerem que a Cox2 pode ter papel importante na gênese do osteossarcoma canino. A porcentagem da enzima expressa neste tumor e sua distribuição celular paralelamente encontrada no osteossarcoma humano, sugere que o OSA canino serve como um modelo animal para o OSA humano espontâneo. Soma-se a isto a forte marcação de Cox2 encontrada nas formas mais agressivas da doença (MULLINS et al., 2004; BERSANO, 2006).

As mutações somáticas no gene p53 são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tumores humanos. (JORD et al., 2000). O p53 é capaz de iniciar a apoptose através da indução da expressão do membro pró-apoptótico Bax, da família Bcl-2 (SILVA, 2004; KUMAR et al., 2005), que induz a liberação de citocromo-c pelas mitocôndrias.

Posteriormente, atuam as enzimas caspases, responsáveis finais pela destruição celular (ALBERTS et al., 2002). Os testes para ocorrência de apoptose podem evidenciar os caminhos estruturais e funcionais utilizados pelas células, bem como metabólitos resultantes da expressão destes genes, como a caspase (GRIFFIN e HARDWICK, 1997; HOORNAERT et al., 1997).

Muitos fatores que afetam o prognósticos dos pacientes com OSA são, a idade, sexo, localização da lesão, tamanho do tumor, padrão histológico e estágio de desenvolvimento tumoral (MARINHO et al., 2005; DALECK et al., 2009).

As características proliferativas do tumor podem ser analisadas por diversos métodos, incluindo contagem de figuras de mitoses e pela avaliação da fase do ciclo celular pela análise do DNA, que é a incorporação da timidina ou o método conhecido como o bromodeoxiuridina (BrdU). A imunoexpressão do Ki-67 se dá em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2, e M), mas não é encontrado em células quiescentes (G0), com isso, esta molécula avalia a proliferação celular de tumores (MARINHO et al., 2005; OSATHANON et al., 2011).

2.1.2. Cultivo celular

Em virtude do grande número de eventos celulares que determinam crescimento, diferenciação, proliferação, invasão e metástases, novas pesquisas têm buscado compreender as múltiplas expressões fenotípicas das células de OSA em cultivo *in vitro* (KHANNA et al, 2001).

O cultivo celular é a manutenção de forma artificial de células em recipientes e acondicionamentos adequados e especiais, que a partir de um conjunto de técnicas apropriadas passa ser possível isolar e manter determinadas culturas de células, seja de procariontes e eucariontes. Pode-se também isolar e manter em cultivo, culturas de vírus e protozoários e outros microorganismos.

Quando fazemos o isolamento em placas de cultivo ou frascos apropriados, a chamamos de cultivo primário. O primeiro contato do material biológico *ex vivo* para as condições *in vitro*, é denominado de cultura primária. A medida que vamos fazendo subculturas desta cultura primária e expandindo por meio de sementeiras este material para outros recipientes apropriados, ele passa a se chamar cultivo primário de primeira, de segunda, de terceira passagem e assim por diante.

As linhagens celulares são subculturas de um cultivo primário que foi submetido a diversas sementeiras subsequentes até o momento em que o cultivo em estudo passa ser uma população celular clonal homogênea, com características fenotípicas e comportamentais bem estabelecidas, diferentemente dos cultivos primários que apresentam material heterogêneo de populações de células (FRESHNEY, 2010).

Para se isolar linhagens de OSA canino, Loukopoulos et al (2004) estabeleceram 120 subculturas ou passagens subsequentes de um mesmo cultivo primário. O número de passagens para isolamento de linhagens celulares é variável para diferentes tipos de tumores e até mesmo para uma mesma neoplasia, em função das características comportamentais próprias e independentes que as células neoplásicas isoladas apresentam (LOUKOPOULOS et al., 2004; FRESHNEY, 2010).

Desta forma, tem-se observado nos estudos que envolvem modelos *in vitro* em oncologia com terapêutica, preferência pelo uso de cultivos primários a linhagens monoclonais de células neoplásicas pré-estabelecidas, pois o cultivo primário expressa realidade mais próxima ao que efetivamente ocorre no paciente afetado pela doença, pelo fato de apresentar diversos clones neoplásicos. Por esta razão, o cultivo primário se torna excelente modelo para pesquisas em oncologia. (FRESHNEY, 2010).

2.1.3. Morte celular por apoptose

Um evento presente na apoptose é a perda da simetria da membrana plasmática. É conhecido que a apoptose é um processo de morte no qual a integridade da membrana se mantém, o que significa que a característica de ser semipermeável está presente. No entanto, esta membrana passa a apresentar mudanças em sua simetria. Segundo Benjamim et al., (1998), este é o caso da distribuição da fosfatidil serina, a qual é uma molécula que normalmente se encontra orientada para a face citoplasmática da membrana celular externa.

A anexina V é uma proteína de 37KD com capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípides de carga negativa na superfície celular na presença de íons cálcio (LANDI et al., 2003). Quando a célula entra em processo de morte celular por apoptose, um dos eventos é a exposição da fosfatidil serina para o exterior da membrana celular. Devido esta mudança na simetria da célula, têm se desenvolvido métodos que permitem detectar a presença de fosfatidil serina no exterior da membrana (BENJAMIM et al., 1998).

Como a anexina V é uma molécula que não é capaz de difundir através da membrana e que tem uma alta afinidade pela fosfatidil serina, somente células com exposição da fosfatidil serina na face da membrana voltada para o meio extracelular, e portanto, em apoptose, serão marcadas com anexina V (WALS et al., 1998).

A coloração com anexina V pode ser acompanhada de marcação com iodeto de propídio, a qual nos permite saber se a integridade da

membrana foi perdida. Esta marcação dupla permite a identificação de células que se encontram em etapa inicial ou tardia da morte celular. O grupo com morte celular tardia deve ser individualizado, pois envolve tanto células em estágios avançados de apoptose, como células em necrose (MORENO, 2000). A anexina V conjugada se liga a fosfatidil serina em superfície de células apoptóticas na presença de Ca^{2+} , mas pode passar diretamente a membrana compromissada de células mortas se ligando a fosfatidil serina no interior de células com lise de membrana plasmática como no caso da necrose (ENGELAND et al., 1998).

3. Objetivos

A meta de curto a médio prazo deste projeto foi consolidar e ampliar o estudo experimental e aplicado, com ênfase na carcinogênese do osteossarcoma por meio do isolamento de cultivos primários. Caracterizando as culturas pelos marcadores vimentina, citoqueratina, osteocalcina, osteopontina, osterix e identificando o perfil fenotípico da carcinogênese por meio dos biomarcadores Cox2, VEGF, MMP-2, MMP-9, caspase-3, Bax, Bcl-2, p53 e Ki-67 de cada um destes cultivos *in vitro* do tumor.

4. Hipóteses

4.1. Os cultivos primários apresentarem semelhanças nos padrões fenotípicos já que estão nas mesmas condições de manutenção *in vitro*.

4.2. Nos tratamentos submetidos a exposição crescente de concentração e de tempo pelo inibidor seletivo da Cox2, os cultivos Cox2 positivo é que obterão os maiores níveis de sensibilidade.

4.3. As diferentes técnicas de imunomarcacão apresentarem valores semelhantes para as mesmas culturas em análises.

5. CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSSARCOMA CANINO E ANÁLISE DO PERFIL DE BIOMARCADORES ALVO DA CARCINOGENESE

5.1. Objetivo do capítulo 1

5.1.1. Isolar e caracterizar cultivos primários de OSA canino e implantar modelo experimental *in vitro* de estudo deste tumor em cães sem predisposição de idade, sexo e raça, apresentando perfil fenotípico destes cultivos a partir da expressão de moléculas alvo da carcinogênese.

5.1.2. Pesquisar por citometria de fluxo a expressão de biomarcadores alvo da carcinogênese nos cultivos celulares.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo

Para a condução do experimento foram selecionados osteossarcomas caninos diagnosticados no Hospital Veterinário e Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP Campus de Botucatu, de março de 2008 a janeiro de 2011. O diagnóstico destes animais passou pelo atendimento clínico, radiológico, cirúrgico e patológico, sendo o diagnóstico presumível dado pelos achados citológicos (Figura 1A) e confirmado pelo histopatológico (Figura 1B) segundo a Organização Mundial de Saúde.

Procedeu-se investigação dos fragmentos obtidos a céu aberto das peças cirúrgicas pós-amputação dos respectivos membros dos cães acometidos pelo OSA, sendo que quatro deles apresentaram tumor na porção distal rádio-ulnar e um na distal tíbio-fibular, cujos materiais obtidos foram utilizados parte para isolamento dos cultivos primários e parte para inclusão em parafina.

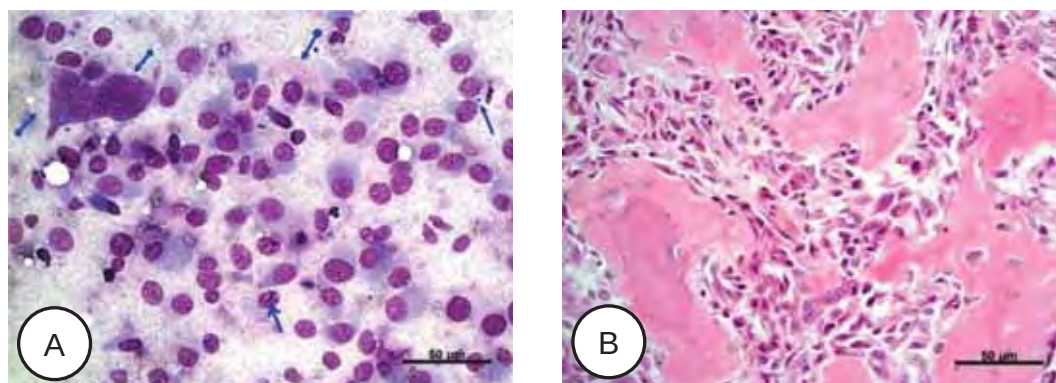
Todos os proprietários foram esclarecidos quanto aos procedimentos do estudo, assinando Termo de Consentimento Livre e

Informado (anexo 1). O estudo teve parecer favorável da Câmara de Ética da FMVZ – UNESP Campus de Botucatu, protocolo 98/2008 (anexo 3).

5.2.2. Processamento do material

Os fragmentos do tumor foram fixados em formalina tamponada a 10%, descalcificados em ácido nítrico 10% e processados pelas técnicas histológicas usuais de desidratação, diafanização e inclusão em parafina, cortados com espessura máxima de 4 micrômetros, e corados pela Hematoxilina-Eosina para estudo em microscopia de luz. A classificação do tumor se baseou com o proposto pela Organização Mundial de Saúde - Classificação Histológica de Tumores Ósseos e das Articulações dos Animais Domésticos (SLAYLER et al., 1994).

O osteossarcoma possui ampla variedade de características microscópicas, desta forma, o seu diagnóstico definitivo foi dado apenas com a presença da produção de osteóide ou ainda de osso neoformado pelas células mesenquimais malignas (PALMER, 1992; THOMPSON e POOL, 2002).



Figuras 1: Cadela Rottweiler, 6 anos, colheita da amostra na região distal tíbio-fibular (A) Células mesenquimais malignas com características morfológicas de osteoblastos neoplásicos (●→): matriz óssea pela célula adjacente, (◆→): células multinucleadas, (→): ranhuras na cromatina, (→): micronúcleo. – Giemsa. 400X. (B) Osteossarcoma osteoblástico em cão: alta celularidade de osteoblastos malignos ativos, deposição de trabéculas e matriz óssea. – HE. 400X.

5.2.3. Imunoistoquímica

Os cinco casos de OSA que surgirem durante o período descrito foram imunomarcados no tecido de biópsia para identificação da expressão da Cox2 do tumor. Desta forma foi possível identificar o osteossarcoma como “Cox2 positivo”, para aquele que expressaram a enzima e “Cox2 negativo” para os que não expressam a enzima Cox2. Estes resultados foram posteriormente comparados com a expressão desta mesma enzima nas células em cultivo primário *in vitro* por meio da citometria de fluxo.

Para a realização da técnica de imunoistoquímica, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com espessura de 3µm e distendidos em lâminas histológicas devidamente preparadas com 3-aminopropyltrimethoxy silane (Sigma A3648) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes nas lâminas de vidro, evitando assim a perda de material durante o processamento imunoistoquímico. A técnica utilizada seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto tendo como anticorpo primário o clone CX-294 anti-Cox2 (Dako-M3617-1).

5.2.4. Obtenção das amostras das culturas celulares primárias do osteossarcoma canino

Os cultivos celulares primários de osteossarcoma canino foram obtidos a partir do tumor de animais acometidos pela doença que foram diagnosticadas pelo exame citológico (Fig 1.A) e confirmados pelo histopatológico (Fig 1B). Estes casos são provenientes da rotina do atendimento clínico e cirúrgico (Fig 2A e 2B) do Hospital Veterinário da FMVZ – Unesp Campus de Botucatu.

A coleta foi efetuada com total assepsia da amostra (Fig 2.C). Inicialmente foram coletados fragmentos ósseos das regiões de transição entre osso normal e osso neoformado (Fig 2.D), e acondicionados em solução salina de PBS pH 7,4 (Fig 2.E e 2F). Posteriormente, no Laboratório de Fertilização *in vitro* e Cultivo Celular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP Campus

de Botucatu, os fragmentos tumorais foram mantidos em solução tripsina (TrypLE Select – Invitrogen 12563-029) a 37,5°C por 60 minutos com homogenizador magnético.

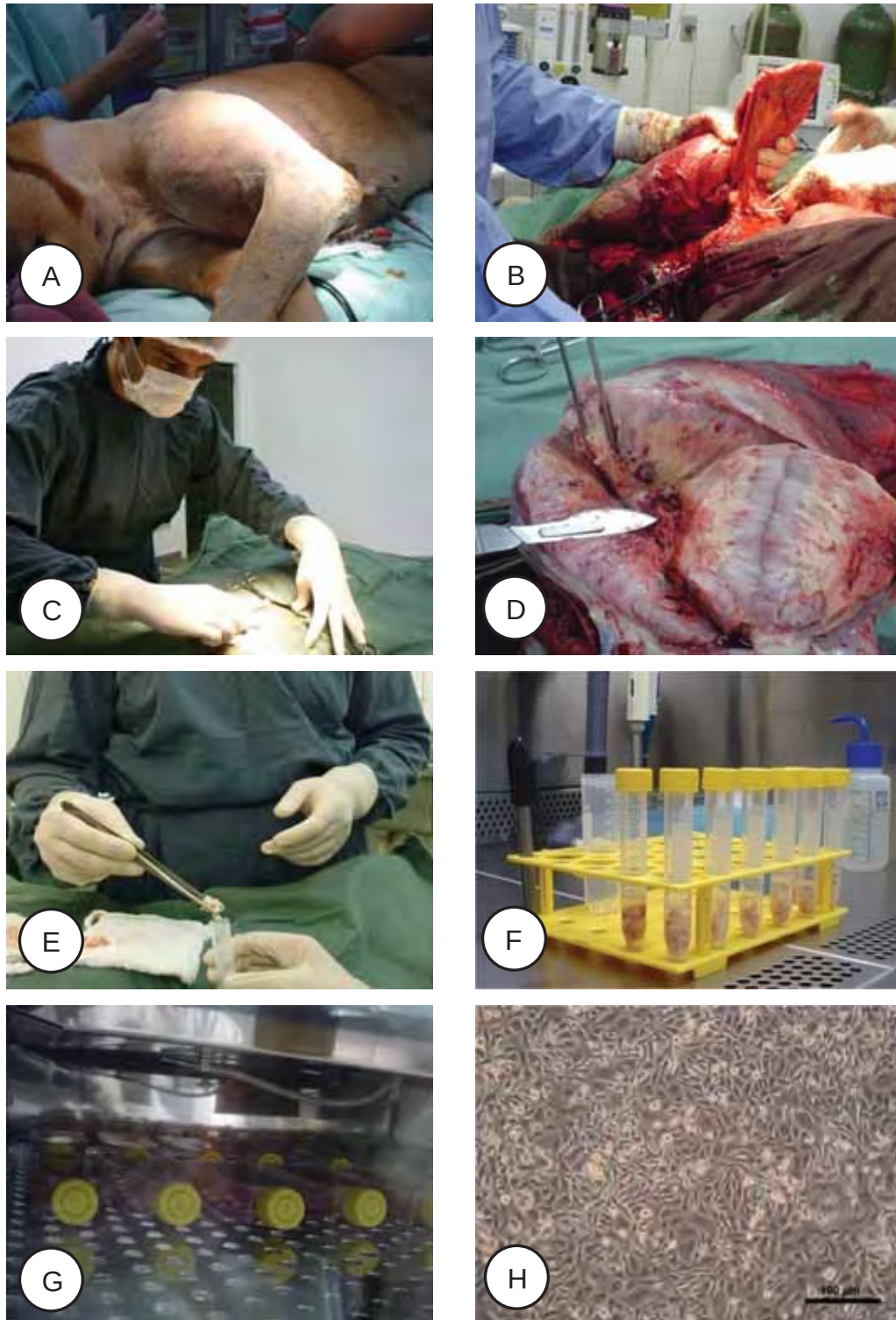
Feito isso, a solução foi centrifugada descartando-se o sobrenadante, ressuspensando o péllet e acondicionando esta solução em frascos 25 cm² (Sarstedt – 83.1810.300) com 5 mL de meio de cultivo DMEM alta glicose (Dulbecco's modifield essential medium - Gibco 11995-065), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco 12657-029), e com a combinação de 100U/mL de penicilina com 100mg/mL estreptomicina (Gibco 15140) e 3µg/mL de Anfotericina B (Gibco 15290).

Tabela 1: Especificações dos anticorpos utilizados nas imunomarcações do experimento.

Proteínas	Especificações dos Anticorpos			Diluições
	Código	Clone	Companhias	FACS*
Vimentina	U7034	Vim 3B4	Dako	1:200
Citoqueratina	U7022	MNF116	Dako	1:100
Osteocalcina	AB13418	OC4-30	Abcam	1:50
Osterix	AB22552	Sp7	Abcam	1:100
Osteopontina	SC73631	LFMb-14	Santa Cruz	1:100
Cox2	M3617-1	CX-294	Dako	1:100
VEGF	M7273-129	VG1	Dako	1:100
MMP-2	MOB312	VC2	DBS	1:100
MMP-9	A0150-129	A015029	Dako	1:100
Caspase-3	MOB309	3CS P03	DBS	1:100
Bax	A3533-1	RxH	Dako	1:50
Bcl-2	M0887-1	124	Dako	1:100
p53	M7001-1	DO-7	Dako	1:100
Ki-67	AR14911	MIB-1	Dako	1:200

*FACS: Citometria de fluxo.

As amostras foram incubadas em estufa de CO₂ a 5%, umidade 95% e temperatura de 37,5°C para o cultivo e manutenção da cultura (Fig 2.G). Após três a quatro passagens, observando a morfologia celular e comportamento destas células em cultivo (Fig 2.H), um painel imunomarcador foi utilizado para confirmar a cultura celular como sendo de osteossarcoma canino, usando-se para isto o de Fluxo FACS Calibur BD[®]



Figuras 2: (A) Cão SRD, macho, 7 anos, no centro cirúrgico com aumento de volume na região proximal do úmero do membro torácico esquerdo. (B) Amputação do membro torácico esquerdo em cão com osteossarcoma na região proximal do úmero. (C) Coleta do tumor de forma asséptica após a amputação do membro do paciente. (D) Indicação do local da coleta do tumor pela ponta do bisturi. (E) Material coletado em tubos de 15mL contendo solução PBS pH 7,4. (F) Fragmentos tumorais lavados e sendo preparados para tripsinização (G). Material já processado, acondicionado em frasco de cultivo e mantido em estufa. (H) Cultivo apresentando heterogeneidade e intensa celularidade. 200X.

- Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu e um painel de marcadores de proteínas para identificação fenotípica de células de origem mesenquimal, com características osteogênicas e outras proteínas relacionadas à carcinogênese destas células cultivadas (Tabela 1).

5.2.5. Digitalização das imagens

As imagens dos fragmentos tumorais foram digitalizados com o auxílio do equipamento de análise de imagens capturadas pela câmera digital científica colorida, modelo AxioCamERc 5.8 “marca Carl Zeiss®”, acoplada ao microscópio Trinocular “Axio Lab.A1”, com iluminação transmitida 35 watts para o campo claro, com auxílio das objetivas de 20X e 40X “marca Carl Zeiss®”, Alemanha, utilizando-se para isto o programa de análise morfométrica “AxioVision LE”, Release 4.8.2, marca Carl Zeiss®, Alemanha.

Para o cultivo celular as imagens foram obtidas com auxílio da câmera digital Sony Super Steady Shot DSC-T70 (Cyber-Shot 8 megapixels), lente Carl Zeiss® 3,5-4,3/6,33-19, zoom óptico de 3X, acoplada ao microscópio Leica® DM IRB, utilizando-se posteriormente o programa computacional de análise morfométrica “AxioVision LE”, Release 4.8.2, marca Carl Zeiss®, Alemanha.

5.2.6. Nomenclatura dos cultivos primários de OSA canino

A nomenclatura das culturas celulares de osteossarcoma canino recebeu os seguintes critérios de acordo com expressão da cicloxigenase-2 nos tecidos tumorais dos fragmentos colhidos e também a partir da expressão desta enzima encontrada na citometria de fluxo, ou seja, todas as culturas caracterizadas tiveram a denominação spOS (São Paulo – Osteossarcoma), sendo aquelas em que as marcações foram negativas (IHQ) ou de baixa intensidade (citometria de fluxo), cujos valores estão abaixo de um (<1%) para a expressão Cox2, foram identificadas com números ímpares e aquelas que obtiveram expressões iguais ou maiores a um ($\geq 1\%$), foram identificadas com números pares, ou seja, por estes

critérios spOS-1 (OSA com baixa expressão de Cox2), spOS-2 (OSA Cox2 positivo) e assim por diante. Com isso, torna-se mais simplificada a identificação da referida cultura quando se está trabalhando em laboratório ou até mesmo quando se discute os resultados referentes a uma determinada amostra de células tumorais de OSA *in vitro*.

5.2.7. Manutenção dos cultivos primários

5.2.7.1. Troca dos meios de cultivo

Para manutenção das amostras celulares, foram efetuadas de duas a três trocas dos meios de cultivo por semana, contendo DMEM alta glicose, suplementado com 10 % de SFB, adicionados pela combinação de penicilina (100U/mL) com estreptomicina (100mg/mL) e Anfotericina-B (3µg/mL).

5.2.7.2. Expansão dos cultivos primários

Para expansão dos cultivos celulares, foram semeadas 2×10^6 células por novo frasco (25 cm²) em subculturas, este procedimento também é conhecido como passagem de células de um frasco mãe para outros frascos filhos, tendo como objetivo, manter o cultivo celular com viabilidade esperada ou obter maior número de células ou simplesmente selecionar um tipo celular desejado.

Para tal, inicialmente foi feita a tripsinização das células contidas nestes frascos. Para isso, foi retirado todo meio de cultivo destes frascos, posteriormente elas foram lavadas com solução de PBS pH 7,2 e em seguida adicionados 1mL de tripsina TrypLE Select (Invitrogen 12563-029) a 37,5°C. Os frascos foram mantidas em estufa a 37,5°C por no máximo 5 minutos até que houvesse a ação da enzima e todas as células se soltassem do fundo do frasco. Após isto, realizou-se então a neutralização com meio DMEM alta glicose acrescido de 20% de SFB, Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina-B.

5.2.7.3. Contagem celular

Para se saber o número de células obtida após a tripsinização e bloqueio com SFB da solução, uma amostra de 50 µL da solução foi retirada e adicionada a 50 µL do corante Tripan Blue 0,4% (Sigma T8154), com esta solução homogenizada, preencheu-se a Câmara de NeuBauer usando 20 µL desta solução.

Com auxílio do microscópio Leica® DM IRB as contagens foram efetuadas considerando as células azuis, que permitem a passagem do corante através da membrana celular, como células mortas e as células translúcidas, vivas. Com isso, foram contadas apenas as células translúcidas dos quatro quadrantes mais externos. O valor encontrado foi colocado na equação abaixo para obter o resultado do número de células por mL da solução:

$$N^{\circ} = \frac{N^{\circ} \text{ células contadas} \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times 10^4}{4 \text{ (quadrantes lidos)}}$$

O resultado obtido é a concentração inicial (Ci) da solução. Este valor foi inserido na equação seguinte para identificar o quanto do volume inicial (Vi) da solução foi adicionado para cada novo frasco de cultivo celular, ou seja, qual foi a quantidade necessária da solução que continha 2×10^6 células:

$$Ci \times Vi = Cf \times Vf.$$

Cf (concentração final desejada, 2×10^6)

Vf (volume final de meio no frasco).

5.2.7.4. Criopreservação dos cultivos primários

Para criopreservação destes cultivos primários, foi efetuado o procedimento de tripsinização das células em cultivo, efetuada a contagem e posteriormente ajustado o número de 2×10^6 células por mL. Em seguida

utilizando solução com 10% de dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma C6164), 20% SFB e 70% de DMEM alta glicose com Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina-B. O material obtido foi distribuído homogeneamente e acondicionado em criotubos (Sarstedt 72.694.006), deixados por 24h em Freezer -80°C e em seguida colocados e mantidos em botijão criogênico em nitrogênio líquido (-196°C).

5.2.8. Caracterização dos cultivos primários

De acordo com o delineamento descrito (Anexo 2), para caracterização fenotípica das culturas isoladas a partir dos marcadores encontrados na Tabela 1, as células do frasco A (Anexo 2) com 5 mL de meio, foram expandidas para o frasco B (Anexo 2) com 20 mL de meio de cultivo, por período de 10 dias. Neste tempo, elas já obtiveram a confluência acima de 90% para em seguida serem semeadas para o frasco C (Anexo 2).

Para as respectivas caracterizações, os cultivos em C (Anexo 2) encontravam-se no máximo na oitava passagem. Durante todo este período experimental descrito nos intervalos A, B e C (Anexo 2), as trocas de meios ocorreram a cada dois dias. Passados novamente mais 10 dias e alcançando a confluência desejada acima de 90%, as células foram tripsinizadas (TrypLE Select Invitrogen 12563-029), contadas com auxílio da Câmara de Neubauer, fixadas com paraformaldeído 4% (BD Cytofix – 554.655), permeabilizadas (Fix & Perm - Caltag® GAS002S-100), ressuspensas em PBS pH 7,2 e enfim, acondicionadas em tubos plásticos específicos para citometria de fluxo.

Nestes tubos foram colocados 100 µL de solução com 10^5 células e em seguida instilados os respectivos anticorpos primários para as referidas imunomarcações. Estas soluções de PBS, células e anticorpos foram mantidas “overnight” em temperatura de 4°C.

No dia seguinte, foram instilados 1 µL dos respectivos anticorpos secundários conjugados com o cromógeno fluorescente (DKYxMS – FITC – Ap192F – Chemicon, DKYxRB – FITC- Ap182F- Chemicon) nos tubos contendo as soluções imunomarcadas com os anticorpos primários.

Para cada caracterização, deixou-se agir por 45 minutos o anticorpo secundário, em seguida adicionou-se 900 µL de PBS pH 7,2 nos tubos e se fez duas lavagens de 5 minutos em centrífuga com 2.000 RPM (rotações por minuto) para se retirar o excesso dos anticorpos que não reagiram. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500 µL de PBS pH 7,2. Em seguida a solução foi homogenizada e se fez a leitura de 10^4 células por tubo com auxílio do Citômetro de Fluxo FACS Calibur BD® - Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Em toda caracterização dos cultivos primários, fez-se uso do controle autofluorescente, contendo apenas PBS pH 7,2 com as células tumorais, e o controle do anticorpo secundário, que além das células e do PBS, tinha-se também a presença do anticorpo secundário. Os resultados desta leitura do citômetro de fluxo são feitos numa amostragem de 10.000 células e os resultados são dados em porcentagens.

5.2.9. Coleta das células-tronco mesenquimais da medula óssea

Para a coleta das células-tronco mesenquimais (CTM) destinadas para diferenciação em células osteogênicas (osteoblastos) e usadas como controle e/ou parâmetros aos cultivos das spOS, foi utilizado um cão sem raça definida de 2 anos, sadio, pesando 20 kg, proveniente do Canil da FMVZ Unesp Campus de Botucatu.

O animal foi preparado para a punção da medula óssea a partir da região da articulação escápulo-umeral. Para isso, foi inicialmente tranquilizado com acepromazina na dose de 0,05 mg/kg pela via intramuscular. Decorridos 15 minutos, foi posicionado em decúbito lateral direito e introduzida, na veia cefálica esquerda, solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, na dose de 20 mL/kg/hora.

Em seguida, a anestesia geral fora induzida com propofol, na dose de 6-8 mg/kg pela via intravenosa. Para a manutenção anestésica utilizou-se o mesmo agente. Após tricotomia e anti-sepsia do local, uma agulha de biópsia de medula óssea foi introduzida no tubérculo maior do úmero até atingir o canal medular. A agulha, acoplou-se numa seringa descartável de 20 mL contendo cerca de 1 mL de heparina sódica

(Bergamo, 600478) 5.000UI/mL, na qual, por meio de gradiente de pressão negativo, foram coletados uma média de 5 mL de sangue da medula óssea.

5.2.10. Isolamento, cultivo *in vitro* de células-tronco mesenquimais e diferenciação em osteoblastos

Após a coleta da medula óssea, o sangue foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos para retirada do soro e gordura. O material obtido foi ressuspensão na proporção 1/1 em meio DMEM alta glicose com L-glutamina (Gibco, 1995-065) sem soro fetal bovino (SFB). Dessa solução, foi transferido um volume de 4 mL para um outro tubo de 15 mL (TPP, 000292) previamente preparado, contendo 4 mL de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL - Amersham Biosciences) (diluição Ficoll:meio de 1:1), e então centrifugado a 1.500 rpm durante 40 minutos à temperatura ambiente. Houve a formação do anel células na interface Ficoll-células.

Coletado o anel de células mononucleares, o material foi ressuspensionado em meio DMEM alta glicose com L-glutamina sem soro e centrifugado novamente a 1.500 rpm durante 10 minutos. Este passo foi repetido duas vezes para retirada total do produto Ficoll-Paque (tóxico às células). Após lavagem, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM alta glicose com L-glutamina com a adição de 20% de soro fetal bovino inativado em carvão ativado.

As células foram plaqueadas em frascos de 25 cm², com 5 mL de meio DMEM alta glicose com L-glutamina, 20% SFB contendo 100 UI/mL Penicilina / 100 µg/mL Estreptomicina e 3,0 µg/mL Anfotericina B, durante um período de 14 dias, tempo necessário para que o cultivo atinja 80% de subconfluência. O meio de cultura foi trocado a cada 5 dias.

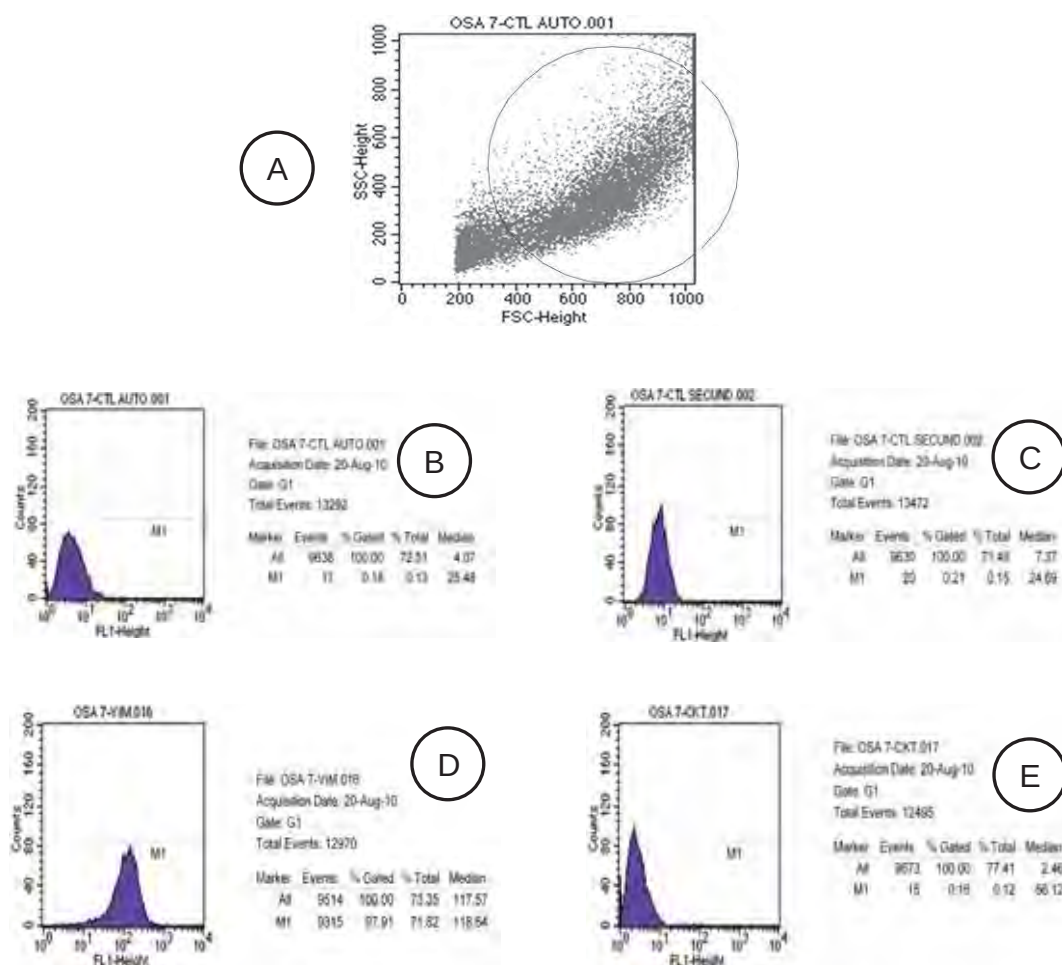
Uma vez atingidos 80% de subconfluência em cultivo, as células foram tripsinizadas, contadas com o auxílio da Câmara de Neubauer e transferidas $2,0 \times 10^6$ para dois frascos de 75cm², respectivamente com troca dos meios de dois em dois dias por 21 dias. Após isso, aplicou-se o mesmo procedimento de caracterização das spOS.

5.2.11. Análise para confirmação da diferenciação em células de origem óssea pela citoquímica em cultivo

Como osteócitos formam depósitos de cálcio, a confirmação dos cultivos spOS se tratar de células neoplásicas de origem óssea e para também confirmar a diferenciação das células-tronco mesenquimais (ctm-D) em tecido ósseo, a marcação citoquímica de Alizarin-red S (A5533-25G) constituiu nas células fixadas a identificação da deposição do mineral no meio extracelular como preconizado por Freshney. (2010).

Para a realização da marcação da diferenciação, foi aspirado o álcool 70% das células fixadas as quais foram lavadas duas vezes com água destilada, adicionando-se, em seguida, 500µL de Alizarin red. As células foram então incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período removeu-se o corante e as células foram lavadas por 4 vezes com água. Em seguida adicionou-se 1ml de PBS 7,2 por poço para evitar que as células secassem, e os resultados foram analisados, observando-se 5 campos diferentes com o auxílio do microscópio Leica® DM IRB invertido em aumento de 400X.

Desta forma, a confirmação da diferenciação em osteoblastos malignos e normais (spOS e ctm-D) foi efetuada por meio da interpretação do Painel imunomarcador e com uso do Alizarin-Red.



Figuras 3: (A) Gráfico identificando amostragem do padrão celular desejado na análise. (B) Histograma do controle autofluorescente. (C): Histograma do controle do anticorpo secundário. (D) Histograma para o marcador vimentina com 97,91% positividade dentro da região denominada “M1”. (E): Histograma para o marcador citoqueratina com 0,16% de positividade dentro da região “M1”. Avaliação de 10.000 células por análise.

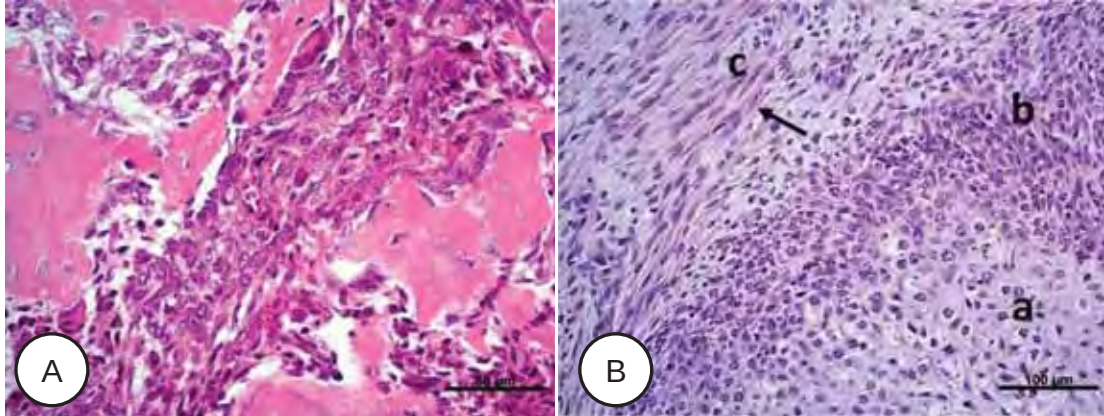
5.3. Análise estatística

Para análise estatística, a variável dependente binomial (porcentagem de expressão das proteínas na citometria fluxo) dos diferentes cultivos primários foi avaliada através do teste de regressão logística utilizando o PROC LOGISTIC do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA), quando o efeito de tratamento foi significativo utilizou-se o comando LSMEANS do PROC GLM do SAS para realizar os contrastes entre os diferentes cultivos primários. Os resultados estão apresentados como porcentagem. Foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

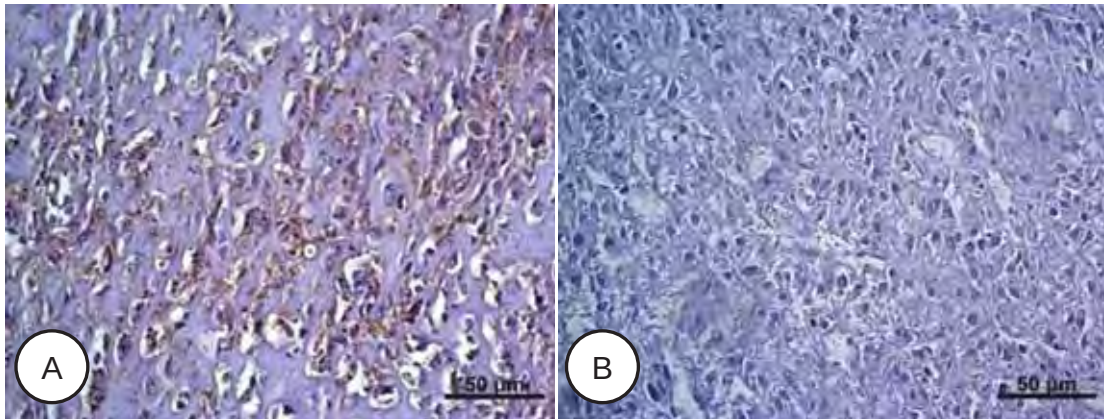
5.4. Resultados e discussão

5.4.1. Casos obtidos e suas respectivas nomenclaturas

Cinco animais acometidos por OSA canino foram obtidos e selecionados para o desenvolvimento deste estudo. A partir da expressão IHQ dos fragmentos tumorais e análise pela citometria de fluxo para a enzima Cox2, os cultivos primários receberam as nomenclaturas de spOS-1, spOS-2, spOS-3, spOS-4 e spOS-6, sendo aquelas com numeração ímpar denominados OSAs de baixa intensidade e as com numerações pares são OSAs Cox2 positivos, como demonstram as Tabelas 2 e 3.



Figuras 4: (A) Osteossarcoma osteoblástico. Alta celularidade de osteoblastos malignos e trabéculas ósseas pré-existentes. Há grande proliferação de osteoblastos neoplásicos e produção de matriz óssea não mineralizada – HE. 400X. (B) Osteossarcoma combinado ou misto. Nota-se células condróides malignas (a), células pleomórficas malignas (b) e células malignas fusiformes. (c). – HE. 400X.



Figuras 5: (A) Imunoistoquímica positiva para anticorpo anti-Cox2 em fragmentos de tecido de osteossarcoma canino. IHQ - Novolink[®]. 400X. (B): Imunoistoquímica negativa para anticorpo anti-Cox2 em fragmentos de tecido de osteossarcoma canino. IHQ - Novolink[®]. 400X.

Tabela 2: Parâmetros clínicos dos animais e suas respectivas expressões de Cox2, cujos fragmentos tumorais foram utilizados para isolamento e caracterização dos cultivos primários de OSA canino.

Dados dos animais	Identificação dos animais				
	spOS*-1	spOS*-2	spOS*-3	spOS*-4	spOS*-6
Expressão IHQ Cox2	negativa	positiva	negativa	positiva	positiva
Raça	Dog Alemão	SRD*	Rottweiler	Rottweiler	Setter Irlandês
Peso – kg	45	40	54	52,4	32
Sexo	macho	macho	fêmea	fêmea	macho
Idade - anos	7	10	11	6	7
Localização anatômica	Distal rádio/ulna	Distal rádio/ulna	Distal rádio/ulna	Distal tíbia/fíbula	Distal rádio/ulna
Padrão histológico OSA	Misto	Osteoblástico	Osteoblástico	Osteoblástico	Osteoblástico

*São Paulo – Osteossarcoma / **SRD: Sem raça definida.

5.4.2. Parâmetros clínicos dos animais em estudo

Dentre os animais supracitados na Tabela 2, dois foram Cox2 negativos na avaliação IHQ e três Cox2 positivos. A maior incidência de animais Cox2 positivos (60%) estão de acordo com Mullins et al (2004) e Bersano (2006). Em relação ao porte dos animais acometidos, todos eram de raças de porte médio e grande, sendo um Dog Alemão (45 kg), um SRD (40 kg), dois Rottweilers (54 e 52,4 kg) e um Setter Irlandês (32 kg), sendo duas fêmeas e três machos. Suas idades variaram de 6 a 11 anos de idade, e de acordo com a localização anatômica do tumor primário foram todos caracterizados como OSA em esqueleto apendicular, sendo quatro na porção distal rádio/ulna e um na porção distal de tíbia/fíbula.

Segundo o padrão histológico descrito por Slayter et al (1994), foram encontrados quatro casos de OSA osteoblástico (Figura 5A) e um caso de OSA combinado ou misto (Figura 5B). Todos estes achados referentes ao porte dos animais, peso, idade, locais de acometimento, sexo e padrão histológico estão todos de acordo com os descritos por Slayter et al. (1994), Thompson e Pool (2002), Dernell et al (2007) e Palmer (2007), ou seja, para os OSAs osteoblásticos houve identificação de uma

quantidade variável de osteóide neoplásico e osso. As células tumorais se assemelham a osteoblastos, com grau variável de pleomorfismo celular, podendo ainda ser encontradas células gigantes multinucleadas de forma difusa por todo o tumor.

Presenciou-se também em alguns campos osteoblastos anaplásicos, cujas células apresentaram bordas angulares com núcleo hipercromático posicionado excentricamente no citoplasma ligeiramente basofílico. Para o OSA combinado ou misto, observou-se que não houve predomínio de um padrão histológico, ou seja, dois ou mais subtipos se organizavam para dar origem a um único tumor, com células mesenquimais malignas produzindo ora matriz condróide, ora com células fusiformes com abundante estroma conjuntivo, quantidade variável de osteóide neoplásico e osso neoformado.

As expressões da Cox2 encontradas na IHQ e na citometria de fluxo foram similares como mostram as Tabelas 2 e 3, com três casos Cox2 positivos (Figura 6A) e dois casos Cox2 negativos (Figura 6B), sendo que em função da sensibilidade e a quantidade de células envolvidas na análise pela citometria de fluxo foi encontrado uma baixa expressão da enzima neste tipo de avaliação em duas culturas neoplásicas, spOS-1 e spOS-3, que na IHQ foram consideradas negativas.

5.4.3. A importância do uso de biomarcadores em oncologia veterinária e para o OSA canino

O principal objetivo para a utilização de biomarcadores alvo da carcinogênese em oncologia veterinária, especificamente para o OSA canino se faz pela necessidade de personalizar tratamento dos pacientes, pois desta forma, identificarmos a partir de um painel imunomarcador quais são os potenciais genes que estão ativos no tumor, podendo melhor conduzir a terapêutica em função da expressão dos biomarcadores, e com isso proporcionar melhor qualidade e expectativa de vida ao animal (SELVARAJAH e KIRPENSTEIJN, 2010).

O uso de cultivos primários associados a painéis fenotípicos de OSA tem sua importância pelo fato do OSA canino ser excelente modelo

para o OSA humano, pois apresentam características comuns como apresentação histopatológica, localização, locais de metástases, prognósticos (PAOLONI et al., 2009) e comportamento biológico (KHANNA et al., 2001), com isso, novos estudos e novos desafios poderão ser melhor investigados em aplicações *in vitro*, através da biologia molecular e até mesmo em ensaio por meio de transplantação tumoral em modelos experimentais a partir de células cultivadas (SELVARAJAH e KIRPENSTEIJN, 2010). Desta forma, o potencial uso destes marcadores alvo da carcinogênese em cultivos tumorais estão abrindo novas possibilidades de pesquisa na oncologia veterinária, como será, a seguir, discutido nesta investigação.

5.4.4. Expressão dos biomarcadores em função das células em cultivo primário

Os cultivos primários spOS e ctm-D foram positivos para a coloração citoquímica para Alizarin-red, como demonstram as figuras 7G e 7H, e de acordo com a Tabela 3 os cinco cultivos primários expressaram o biomarcador vimentina acima de 90%, que está relacionado a origem mesenquimal das células cultivadas (PIROZZI et al., 2011), e também todas expressaram visivelmente as marcações positivas para proteínas de características osteogênicas, como osteocalcina, osterix e osteopontina (LOUKOPOULOS et al., 2004; NEUPANE et al., 2008; ERIKSEN, 2010; JUHÁSOVÁ et al., 2011), indicando a origem e a seguinte diferenciação das células tumorais cultivadas. O osterix é um ótimo indicador de expressão identificando células ósseas, pois se apresenta como um osteoprogenitor diferenciado encontrado dentro de osteoblastos, e possui importante fator de transcrição de osteoblastos que regula a expressão dos genes de proteínas da matriz óssea, incluindo a osteocalcina e osteopontina (Nakamura et al., 2010).

Houve diferença ($P \leq 0,05$) nas expressões das três proteínas osteogênicas (osteocalcina, osterix e osteopontina) nos cinco cultivos primários em estudo, indicando que além delas estarem expressas, elas também apresentaram diferentes concentrações nestes cultivos (Tabela 3).

Tabela 3: Representação dos valores (%) para determinação da diferenciação histológica do cultivo primário de OSA canino.

Proteína	Cultivo primário (FACS* n°: 10.000)					
	ctm-D**	spOS***-1	spOS-2	spOS-3	spOS-4	spOS-6
Vimentina	96,79	97,91 ^a	94,25 ^b	98,97 ^c	98,39 ^a	99,46 ^c
Citoqueratina	0,24	0,16 ^a	0,65 ^b	0,54 ^b	0,34 ^{a,b}	1,00 ^c
Osteocalcina	82,62	43,82 ^a	30,61 ^b	21,45 ^c	23,3 ^d	17,74 ^e
Osterix	51,96	32,57 ^a	53,87 ^b	35,21 ^c	31,82 ^a	56,25 ^d
Osteopontina	89,11	17,81 ^a	35,67 ^b	37,37 ^b	26,17 ^c	40,43 ^d

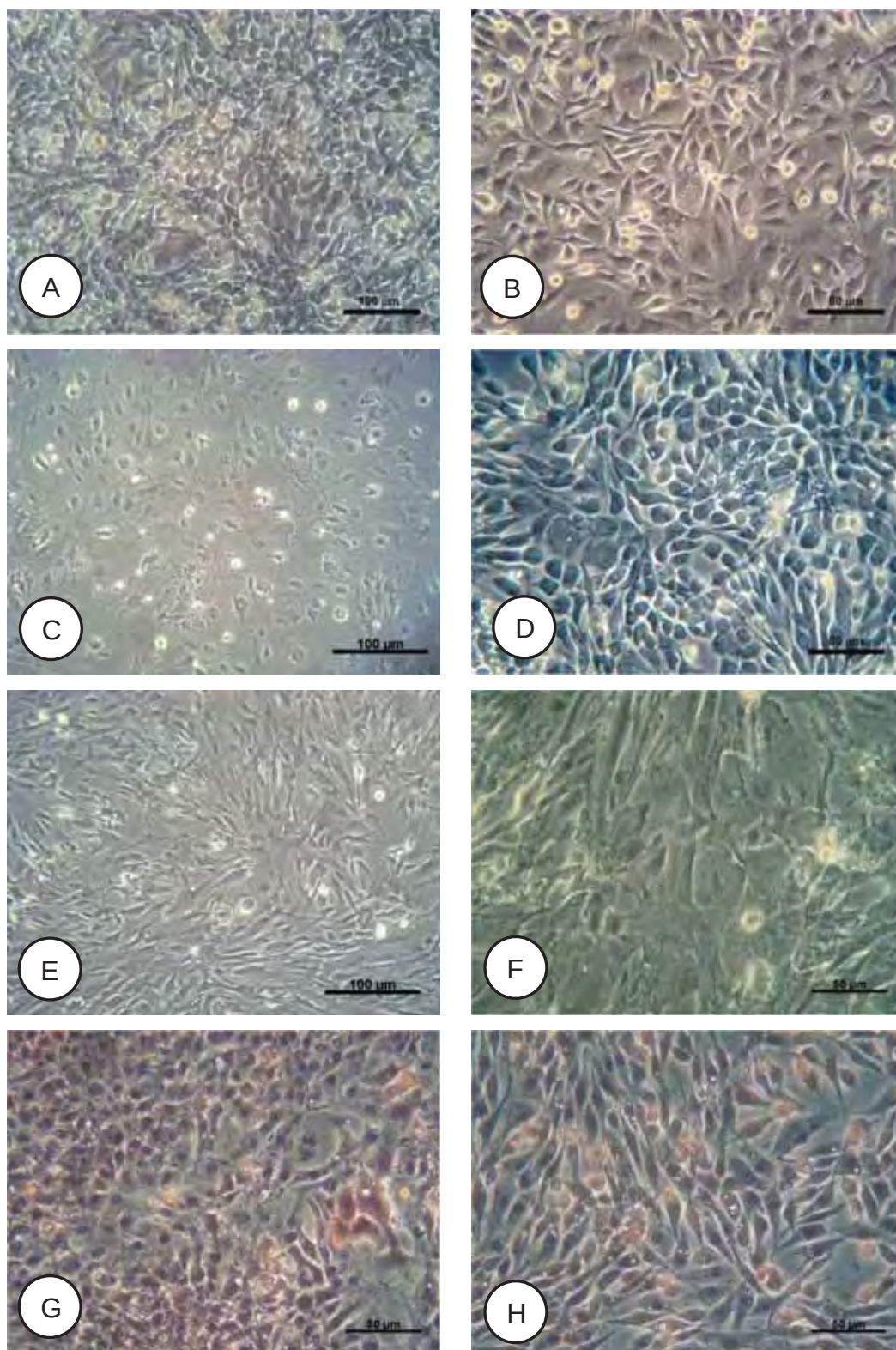
a, b, c, d, e Letras sobrescritas distintas na mesma linha diferem ($P \leq 0,05$). * FACS: citometria de fluxo, **ctm-D: Células-tronco mesenquimais com diferenciação osteogênica, **spOS: São Paulo – Osteossarcoma.

Tabela 4: Representação dos valores (%) do perfil fenotípico na caracterização do cultivo primário de OSA canino.

Proteína	Cultivo primário (FACS* n°: 10.000)					
	ctm-D**	spOS***-1	spOS-2	spOS-3	spOS-4	spOS-6
Cox2	71,03	0,22 ^a	5,30 ^b	0,29 ^a	6,90 ^c	15,84 ^d
VEGF	1,85	1,31 ^a	3,08 ^b	27,72 ^c	15,61 ^d	1,35 ^a
MMP-2	5,50	1,98 ^a	18,42 ^b	9,56 ^c	13,49 ^d	2,50 ^a
MMP-9	12,52	62,4 ^a	68,58 ^b	42,38 ^c	67,23 ^b	10,85 ^d
Caspase-3	0,26	0,14 ^a	4,50 ^b	15,73 ^c	6,67 ^d	0,93 ^a
Bax	0,06	2,71 ^a	2,20 ^a	16,07 ^b	4,25 ^c	8,71 ^d
Bcl-2	0,31	9,04 ^a	4,75 ^b	26,01 ^c	37,31 ^d	4,80 ^b
p53	0,11	0,02 ^a	0,95 ^b	21,71 ^c	12,99 ^d	1,11 ^b
Ki-67 (MIB-1)	2,74	0,46 ^a	65,08 ^b	51,15 ^c	46,67 ^d	1,64 ^a

a, b, c, d, e Letras sobrescritas distintas na mesma linha diferem ($P \leq 0,05$). * FACS: citometria de fluxo, **ctm-D: Células-tronco mesenquimais com diferenciação osteogênica, **spOS: São Paulo – Osteossarcoma.

Estas marcações são de grande importância para termos a confirmação da presença do osteoblasto no cultivo, diminuindo as chances de estarmos trabalhando com outro tipo celular (LOUKOPOULOS et al., 2004; ERIKSEN, 2010; NEUPANE et al., 2008). De acordo com Freshiney (2010) além do auxílio dos biomarcadores, é de fundamental importância identificar o fenótipo celular e seu comportamento em culturas *in vitro* para sua melhor identificação e caracterização. Com isso, foi observado que três das cinco culturas (spOS-2, spOS-3 e spOS4) apresentavam muitas características de malignidade indicadas por Loukopoulos et al, (2004),



Figuras 6: Cultivos primários de osteossarcoma canino apresentando grande quantidade células pleomórficas com células fusiformes pentagonais a poliédricas, mono, bi ou multinucleares, anisocitose evidente com núcleos vesiculosos e nucléolos evidentes. (A): spOS-1. – 200X. (B): spOS-2. – 400X. (C): spOS-3. – 200X. (D): spOS-4. – 400X (E): spOS-6. – 200X. (F): Cultivo de ctm-D. – 200X. (G): spOS marcada com Alizarin-Red, núcleos laranja-avermelhados. – 200X. (H): Cultivo de ctm-D marcada com Alizarin-Red, núcleos laranja-avermelhados. – 200X.

como crescimento rápido, núcleos vesiculosos com nucléolos evidentes, intenso pleomorfismo celular, com células poliédricas a alongadas com presenças variáveis de vesículas intracitoplasmáticas (Fig 2. B, C e D). As outras duas culturas, spOS-1 e spOS-6, (Fig 2. A e E) possuíam crescimento mais lento, e apresentavam, de certa forma, morfologia pouco semelhante com as demais culturas, porém, um fator que chamou atenção destes dois cultivos foi que apesar de suas marcações, houve certo predomínio de células com morfologia epitelióide (OKADA et al., 2003), ou seja, citoplasma abundante e dimensões maiores, fato que proporcionavam a ocupação de maiores espaços nos frascos, sendo assim, observou-se nestas culturas número reduzido de células por mL em relação as demais culturas quando estas eram tripsinizadas e contadas.

Em relação ao crescimento *in vitro* e proliferação celular verificado em cada cultura separadamente, encontramos as expressões da seguinte forma: spOS-2 = spOS-4 > spOS-3 > spOS-1 > spOS-6, ou seja, spOS-2 e spOS-4 apresentaram comportamento e até mesmo morfologia celular muito semelhantes, spOS-3 teve crescimento menor que spOS-2 e spOS-4, todavia, maior que spOS-1, e também apresentam morfologia semelhantes entre elas sendo ligeiramente diferentes de spOS-2 e spOS-4. Já spOS-6, é a que possui menor desenvolvimento *in vitro* das cinco culturas analisadas, cujas células são também pleomórficas e com morfologias discretamente diferentes das outras quatro cultivos primários.

5.4.5. Expressão dos biomarcadores Cox2 e Ki-67

A correlação entre inflamação e câncer existe desde 1863, quando Rudolf Virchow citado por Balkwill e Montovani (2001), observou leucócitos em tecidos neoplásicos. Muitos tumores produzem fatores estimuladores de colônias que prolongam a sobrevivência dos macrófagos associados a tumores (BALKWILL e MONTOVANI, 2001; BELO et al., 2004). As células inflamatórias e seus diversos fatores solúveis envolvidos na inflamação estão presentes em todas as neoplasias. Os fenômenos clássicos da resposta inflamatória, que incluem remodelação tecidual, angiogênese e cicatrização, são características comumente utilizadas

como sinais ou indícios morfológicos de neoplasias invasivas (DEMARIA et al., 2011). É também estabelecido que o câncer é uma doença progressiva que ocorre a partir de uma série de passos bem definidos, tipicamente surgindo como consequência de ativação de mutações gênicas em oncogenes (COUSSENS e WERB, 2002). Esta ligação entre inflamação e câncer, surgiu a partir de diversos estudos que correlacionavam o uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) com a diminuição da incidência do carcinoma de cólon. Porém, em meados dos anos noventa ainda não havia base científica que explicasse estas observações (OSHIMA et al., 1996; BAKHLE, 2001).

Neste estudo houve concordância entre os valores encontrados na Tabela 2 nos fragmentos tumorais com os expressos na Tabela 4, sendo que apenas aqueles cujos valores foram negativos na IHQ tiveram discreta marcação na citometria de fluxo (<1). Este fato pode ter sido ocasionado pela amostra estudada, já que na citometria de fluxo se avaliam 10 mil células numa amostragem de 100 mil a 500 mil células, quantidade que dificilmente se encontrará num fragmento de tecido. Assim sendo, nesta avaliação a Cox2 foi identificada em valores abaixo de 1% nas culturas spOS-1 e spOS-3, e se mostrou negativa nos fragmentos de biópsia nas amostras de tecidos dos cães destes mesmos dois casos de osteossarcoma.

Estudos têm mostrado que processos inflamatórios relacionados a presença da Cox2, desempenham papel fundamental no desenvolvimento e progressão de tumores em várias espécies, incluindo a proliferação, transformação celular, crescimento, invasão e metástases (GASPARINI et al., 2003; FINAK et al., 2008).

A Cox-2 tem papel importante na sinalização para divisão celular e progressão de neoplasias, induzindo estímulos mitóticos, mediados por fatores de crescimento, tais como: fator de crescimento endodermal (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), dentre outros (VADLAMUDI et al., 1999; ARAKI et al., 2003). Ela é também enzima que está envolvida em fenômenos como a apoptose, imunovigilância, angiogênese e tem sido implicada na produção de prostaglandinas para

diversos tipos de tumores, incluindo o OSA (MOHAMMED et al., 2004). De acordo com Mullins et al (2004) e Bersano (2006), ela é fortemente expressa no OSA canino do esqueleto apendicular.

Desta forma, pelo fato da Cox2 ter estreita ligação com a progressão tumoral (VADLAMUDI et al., 1999; ARAKI et al., 2003), acredita-se que haja relação positiva entre expressão da Cox2 com a proliferação de células neoplásicas. Todavia, foi identificado a partir da expressão do marcador Ki-67, sinalizador de proliferação celular, que o cultivo spOS-1 está de acordo com este padrão, ou seja, houve valor muito baixo da Cox2 (0,22%), resultando numa baixa expressão do Ki-67 (0,46%) o que foi também observado no comportamento celular *in vitro*, cuja cultura apresentava menor taxa de proliferação em relação as demais culturas, sendo maior apenas que a spOS-6.

Já em spOS-3, cujo valor para Cox-2 também é bem reduzido o ki-67 é indicado como o segundo maior valor dentre os cinco casos analisados, porém, observou-se *in vitro*, apenas discreto aumento no crescimento celular em relação à spOS-1, estando muito aquém das demais culturas.

Em relação aos cultivos primários Cox2 positivos spOS-2, spOS-4 e spOS-6, identificamos respectivamente marcações de 5,3%; 6,9% e 15,84% para esta enzima, com isso, pudemos observar que de fato em spOS-2 e spOS-4 houve relação positiva, cujos valores expressos pelo Ki-67 foram de 65,08% e 46,67%, estando de acordo com Mao et al, (2006) e Tsubochi et al (2006), porém, spOS-6 não está de acordo ao descrito por estes autores, pois expressou o maior valor para a Cox2 e em contrapartida foi o cultivo primário que identificamos o menor valor de Ki-67.

Desta forma, spOS-3 e spOS-6 também não estão de acordo com o descrito por Mao et al (2006) e Tsubochi et al (2006) e em função da relação expressão da Cox2 e proliferação celular (Ki-67), podendo haver outras variáveis que porventura estejam influenciando estes valores encontrados em culturas *in vitro* ou que são fenômenos independentes como descreve Rubio et al, (2005) e Gumurdulu et al, (2007).

Neste caso, o ideal seria termos número maior de culturas neoplásicas ou ampliar os estudos com os biomarcadores alvo da carcinogênese para podermos avaliar melhor estes fenômenos.

Tanto a Cox2 como o Ki-67 têm grande importância na avaliação prognóstica dos pacientes quando avaliadas individualmente, como demonstram Gasparini et al, (2003), Rubio et al, (2005), Marinho et al, (2005), porque a partir da interpretação destes resultados é possível inferir no prognóstico e conduta terapêutica do paciente.

5.4.6. Expressão dos biomarcadores VEGF, MMP-2 e MMP-9

De acordo com Wergin e Kaser-Hotz, (2004) a expressão do VEGF está associada com a maior agressividade em OSAs, estando suas concentrações plasmáticas significativamente correlacionadas com o intervalo livre de doença, ou seja, quanto maior sua expressão, menor é o tempo livre da doença o que significa maiores as chances de recidivas num paciente que esteja sendo submetido a quimioterapia pós-operatório (BERG et al., 1997; THAMM et al., 2008).

Nos cinco cultivos primários os valores apresentaram-se relativamente baixos, sendo apenas os spOS-3 e spOS-4 tiveram maiores valores com 27,72% e 15,61% (Tabela 4), os outros três obtiveram valores bem reduzidos em relação aos outros dois citados. Logo, pressupõe-se prognóstico menos favorável em relação ao valor encontrado para VEGF são as culturas spOS-3 e spOS-4 respectivamente. Com isso, de acordo com Bajpai et al, (2009), estas duas culturas possuem um fator de prognóstico negativo importante.

As metaloproteinase (MMP) são enzimas dependentes do zinco e expressas normalmente em neoplasias e doenças inflamatórias. Neste contexto, elas têm sido implicadas como biomarcadores importantes para prever a sobrevida de paciente que seguirão quimioterapia adjuvante (FOUKAS et al., 2002).

Elas foram identificadas nas cinco culturas spOS, sendo mais expressas as MMP-9 como demonstra a Tabela 4, cuja cultura spOS-6 obteve o menor valor para MMP-9 (10,85%) e o segundo menor para MMP-

2 (2,5%). Já a spOS-2, obteve os maiores valores para as duas MMP em análise com 68,58% para MMP-9 e 18,42% para MMP-2, com isso, como mostrado por Loukopoulos et al (2004) estas enzimas também estão correlacionadas com a invasão e metástases no OSA humano e OSA canino, mostrando entretanto, o grande potencial destas cinco culturas isoladas em promover invasão e metástase.

5.4.7. Expressão dos biomarcadores caspase-3, Bcl-2, Bax e p53

A apoptose é fator importante para a carcinogênese. Todavia, o seu grande estimulador é a mitocôndria, que libera o mais potente catalisador de morte celular, o citocromo-c. A caspase-3 é enzima chave para execução da apoptose, sendo responsável totalmente ou parcialmente pela clivagem proteolítica de muitas proteínas, inclusive muitas enzimas nucleares (ALBERTS et al., 2004). Nesta investigação foi avaliada a apoptose espontânea, detectada nas células dos cultivos primários por meio do anticorpo anti-caspase-3 (Tabela 4). Ela foi expressa de forma variável nas cinco culturas em estudo, havendo diferenças nestas expressões que variaram de 0,14% a 15,73%.

A família Bcl-2 contém elementos pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bid, Bim) e anti apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W), os quais, de maneira geral, regulam a liberação de citocromo-c pelas mitocôndrias (KUMAR et al., 2009). Embora tenha papel preciso no processo de carcinogênese, o p53 ainda permanece em grande parte, com suas funções não muito bem conhecidas (SAGARTZ, 1996; ALBERTS et al., 2004). O p53 é capaz de iniciar a apoptose através da indução da expressão do membro pró-apoptótico Bax, da família Bcl-2 (KUMAR et al., 2009; SILVA, 2004). Por sua vez, o Bax induz a liberação de citocromo-c pelas mitocôndrias que sinalizam para que as enzimas caspases atuem, sendo elas as responsáveis finais pela destruição celular (KUMAR et al., 2009).

Neste complexo sistema de biomarcadores relacionados a apoptose celular como a caspase-3, Bcl-2, Bax e p53, encontramos alguns resultados interessantes, pois como observado na Tabela 4 houve

variações nas expressões da caspase-3 nas cinco culturas, o que também foi observado nos outros genes que regulam a apoptose.

Cada cultura quando analisada individualmente observamos, por exemplo, que em spOS-1 as células apresentam valores para o anti-apoptótico Bcl-2 (9,04%) três vezes maior que o sinalizador positivo para apoptose Bax (2,71%), tendo como consequência o menor valor para clivagem por meio da caspase-3 (0,14%), como já discutido sobre este cultivo primário, os valores da Cox2 (0,22%) e do Ki-67 (0,46%) são os menores e consequentemente houve menor número de divisão celular e menor expressão de Ki-67.

Pelos resultados descritos para Cox2, a expressão de Bcl-2 deveria ser baixa, pois, segundo Singhd et al, (2008) se Cox2 está expressa, Bcl-2 deveria estar expressa e vice-versa, porém, ele não informa se esta é uma relação direta, proporcional e que se mantém constante, nem informa qual a concentração mínima de Cox2 necessária pra sinalização de Bcl-2 em diferentes tumores e métodos de avaliação.

Alberts et al, (2004), descreve que a proteína p53 é uma das responsáveis pelo controle do ciclo celular, replicação do DNA, proliferação, manutenção da estabilidade genética e a apoptose. A expressão do p53 em spOS-1 foi a menor (0,02%), sendo possível presumir, com isso, o comportamento destas células neoplásicas *in vitro* sem necessidade de saber que de fato esta foi uma das culturas com menor potencial replicativo, ou seja, a interpretação do painel imunomarcador correspondeu com o comportamento destas células observado em laboratório.

Em outro exemplo, spOS-3 foram verificados os maiores valores para p53 (21,71%), o segundo maior para anti-apoptótico Bcl-2 (26,01%), os maiores para o pró-apoptótico Bax (16,07%) e para a enzima de clivagem caspase-3 (15,73%), ou seja, de acordo com estes resultados, há nítido desequilíbrio mostrado pelo p53 nestas células em spOS-3, com isso, houve maior sinalização à apoptose em relação as outras cinco culturas mostradas pelo Bax e caspase-3, porém, existe uma tentativa de frear ou minimizar esta sinalização em função da ação mais alta da Bcl-2,

que é importante anti-apoptótico. Estes são muito expressos em função da segunda maior expressão do Ki-67 em relação aos demais cultivos.

No entanto, para os valores do p53, Loukopoulos et al, (2004) nos chama atenção para que novos trabalhos envolvendo cultivo celular de osteossarcoma canino, relacionado-os com progressão tumoral, devem ser melhor elucidados com novos estudos e investigações, pois estes mecanismos e comportamentos *in vitro* para este marcador ainda não estão muito bem estabelecidos.

5.5. Conclusão do Capítulo 1

Os OSA caninos deste estudo são todos de cães de porte médio-grande, acometidos em ossos do esqueleto apendicular, com idades variando de 6-11 anos, com predomínio do padrão osteoblástico, sendo três Cox2 positivos e dois Cox2 negativos.

Foi possível isolar, caracterizar e implantar o modelo de estudo a partir do uso de painel imunomarcador.

A partir do painel de caracterização foi possível avaliar as diferentes expressões destes biomarcadores, inferir o comportamento variado das células do OSA canino em cultivo primário e suas manifestações individuais em condições *in vitro*.

A caracterização e manutenção destes cultivos primários de OSA canino se mostraram como excelente modelo que necessitam de novos estudos e novas investigações para maior entendimento da carcinogênese do osteossarcoma, que poderão ser avaliados em associações com fármacos mais recentes que diminuam as expressões de determinadas proteínas como a Cox2, o VEGF, as MMPs ou que minimizem o índice proliferativo destas neoplasias.

Logo, estas investigações e desenvolvimentos de novos fármacos poderão ser conduzidos em parcerias com indústria farmacêutica, contribuindo para melhor qualidade de vida do paciente oncológico e lhe proporcionar num futuro não tão distante uma terapêutica personalizada a partir da interpretação destes biomarcadores alvo da carcinogênese.

6. CAPÍTULO 2: EXPOSIÇÃO A INIBIDOR SELETIVO DA COX2 EM CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSARCOMA CANINO

6.1. Objetivo do capítulo 2

Por meio da identificação do perfil de cada cultivo primário, avaliar nestas cultivos, sendo três Cox2 positivos e dois Cox2 negativos, a sensibilidade *in vitro* que elas terão quando expostas a inibidor seletivo da Cox2 em diferentes concentrações e tempo de exposição.

6.2. Material e métodos

6.2.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo

Para a condução do experimento foram selecionados osteossarcomas caninos diagnosticados no Hospital Veterinário e Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP Campus de Botucatu, de março de 2008 a janeiro de 2011. O diagnóstico destes animais passou pelo atendimento clínico, radiológico, cirúrgico e patológico, sendo o diagnóstico presumível dado pelos achados citológicos e confirmado pelo histopatológico segundo a Organização Mundial de Saúde.

Procedeu-se investigação dos fragmentos obtidos a céu aberto das peças cirúrgicas pós-amputação dos respectivos membros dos cães acometidos pelo OSA, sendo que quatro deles apresentaram tumor na porção distal rádio-ulnar e um na distal tíbio-fibular, cujos materiais obtidos foram utilizados parte para isolamento dos cultivos primários e parte para inclusão em parafina.

Todos os proprietários foram esclarecidos quanto aos procedimentos do estudo, assinando Termo de Consentimento Livre e Informado (anexo 1). O estudo teve parecer favorável da Câmara de Ética da FMVZ – UNESP Campus de Botucatu, protocolo 98/2008 (anexo 3).

6.2.2. Processamento do material

6.2.2.1. Uso dos cultivos primários spOS

Para este estudo foram utilizadas os cultivos primários spOS caracterizados no Capítulo 1, em que foram separadas em culturas Cox2 negativas (IHQ) ou de baixa expressão (<1 – citometria de fluxo) e Cox2 positivas (IHQ) ou de maior expressão (>1 – citometria de fluxo).

6.2.3. Cultivo celular e tratamentos

Seguindo o delineamento descrito no Anexo 2, foi criado a partir dos cultivos primários spOS um arranjo fatorial 2 (positivo, negativo) X 7 (controle, 10, 50, 100, 200, 300 e $600\mu\text{M.L}^{-1}$ de Celecoxibe) X 3 (24, 48 e 72h) com relação a porcentagem de células vivas, apoptose, apoptose-necrose e necrose. Desta forma, cada cultura (B – Anexo 2) separadamente foi tripsinizada (TrypLE Select Invitrogen 12563-029), contada com auxílio da Câmara de Neubauer e semeada (D, E e F – Anexo 2) em três frascos de 75 cm^2 com 5×10^6 células por frasco, para os tempos de tratamento de 24h, 48h e 72h. Para os respectivos tratamentos, os cultivos em D, E e F (Anexo 2) encontravam-se no máximo em oitava passagem.

Após 10 dias da semeadura dos frascos D, E e F (Anexo 2), a confluência de mais de 90% foi alcançada e cada frasco individualmente foi novamente tripsinizada, contadas com auxílio da Câmara de Neubauer e semeada em sete frascos de 25cm^2 com 10^6 células por frasco com 5 ml de meio cada, contendo DMEM alta glicose, suplementado com 10 % de SFB, adicionados pela combinação de penicilina (100U/mL) com estreptomicina (100mg/mL) e Anfotericina-B ($3\mu\text{g/mL}$), que foram usadas no dia seguinte para o início do tratamento com as concentrações crescentes (controle, 10, 50, 100, 200, 300 e $600\mu\text{M.L}^{-1}$) de um inibidor seletivo da Cox2 (Celecoxibe). Os frascos foram identificados e

acondicionados em estufa de CO₂ a 5%, umidade 95% e temperatura de 37,5°C por 24h.

No dia seguinte, observando a aderência celular no fundo do frasco e antes de colocar as células cultivadas em contato com o inibidor seletivo da Cox2, todo meio usado para a semeadura foi desprezado e os frascos lavados por duas vezes com PBS 7,2 para se retirar a maior parte dos debris celulares contidos neste meio de cultivo em função da semeadura do dia anterior. Feito isso, os tratamentos foram colocados nos respectivos frascos com seus referentes tempos de exposição de acordo com o delineamento do Anexo 2.

6.2.3.1. Farmacodinâmica do Celecoxibe

Como nomenclatura dada segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o Celecoxibe é também conhecido como: 4-[5-(4-metifenil)-3-(trifluorometil) pirazol-1-il] benzenesulfonamida, com fórmula molecular: C₁₇H₁₄N₃F₃O₂S, e massa molar: 381,373g/mol.

Grupo farmacoterapêutico: Inibidor seletivo da ciclooxigenase-2
Celecoxibe é uma nova classe de agente que age por meio de mecanismo singular como inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (ISC). A ciclooxigenase-2 (Cox2) é induzida em resposta a estímulos inflamatórios. Isto leva à síntese e ao acúmulo de prostanóides inflamatórios, em particular a prostaglandina E₂, causando inflamação, edema e dor. Celecoxibe age como agente anti-inflamatório, analgésico e antipirético por bloquear a produção de prostanóides inflamatórios, via inibição da Cox2.

Celecoxibe inibe especificamente a forma induzida da Cox2 através da formação tempo-dependente de um complexo enzima-inibidor fortemente ligado. Essa ligação não é covalente, mas se dissocia muito lentamente. Estudos *in vivo* e *ex vivo* mostram que Celecoxibe tem afinidade muito baixa pela enzima ciclooxigenase 1 (Cox1) de expressão constitutiva. Consequentemente, em doses terapêuticas, Celecoxibe não tem efeito sobre prostanóides sintetizados pela ativação da Cox1, não interferindo, portanto, nos processos fisiológicos normais relacionados à

Cox1 nos tecidos, particularmente no estômago, intestino, plaquetas e rins (BULÁRIO PFISER, 1999)

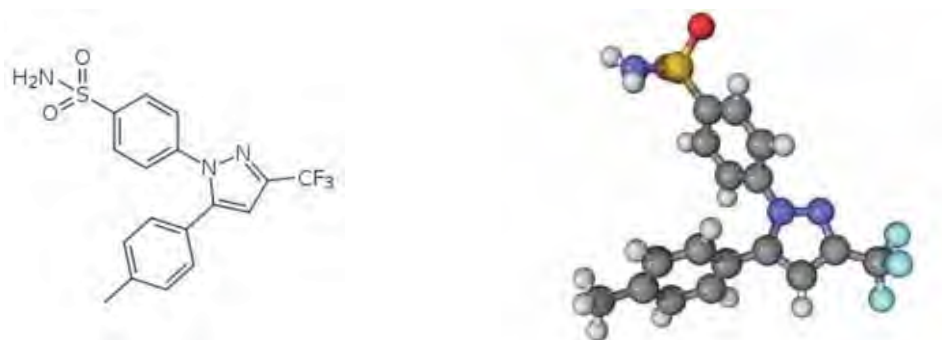


Figura 7: A esquerda, fórmula estrutural (Goodman & Gilman's – The pharmacological basis of therapeutics, 2010) e a direita, modelo molecular (sciencephotolibrary – F003/4947, Royalty Free) do anti-inflamatório seletivo para a Cox2 (Celecoxibe).

6.2.4. Citometria de fluxo

Para a leitura das células tratadas com Celecoxibe por meio do citômetro de fluxo, inicialmente todo meio de cultivo foi desprezado em tubos de 15mL previamente identificados, depois os frascos foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 e em seguida as células foram tripsinizadas, e o conteúdo do frasco (células em suspensão com tripsina) foi adicionado nos mesmos tubos de 15mL inicialmente identificados e com os meios de cultivo contendo os respectivos tratamentos. Desta forma, foi possível analisar todo conteúdo presente no frasco.

Posteriormente os tubos foram centrifugados por 10 minutos em 2.000 RPM. Desprezou-se o sobrenadante, foi ressuspendido o pélet com 200µL de PBS pH 7,4 adicionado com Ca^{2+} e Cl^- e em seguida foi dividido este conteúdo em dois tubos plásticos para citometria (BD[®]) contendo em cada tubo 100µL da solução PBS pH 7,4 adicionado com Ca^{2+} e Cl^- e células tratadas, sendo que um dos tubos dos respectivos tratamentos foram utilizados como controle negativo, ou seja, não foi adicionado nenhuma substância neles após a divisão. No outro tubo referente ao seu respectivo tratamento foi instilado 5µL de Anexina V (A13201 – conjugada com Alexa Fluor 488 – Invitrogen) e aguardado 30 min. Logo após, foi instilado 1µL de Iodeto de Propídio. Passados 10 min todos os tubos foram

encaminhados para a leitura no citômetro de fluxo FACS Calibur da BD[®], do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, SP, Brasil.

Foram identificadas pelo sistema dot plot (quatro quadrantes) as células vivas (Fig.8 LL: não sensibilizadas no tratamento), as marcadas em apoptose (Fig.8 LR: Anexina V), as células em necrose (Fig.8 UL: Iodeto de Propídio) e as com dupla marcação (Fig.8 UR: apoptose e necrose). Os resultados desta leitura do citômetro de fluxo são feitos numa amostragem de 10.000 células e são dados em porcentagens.

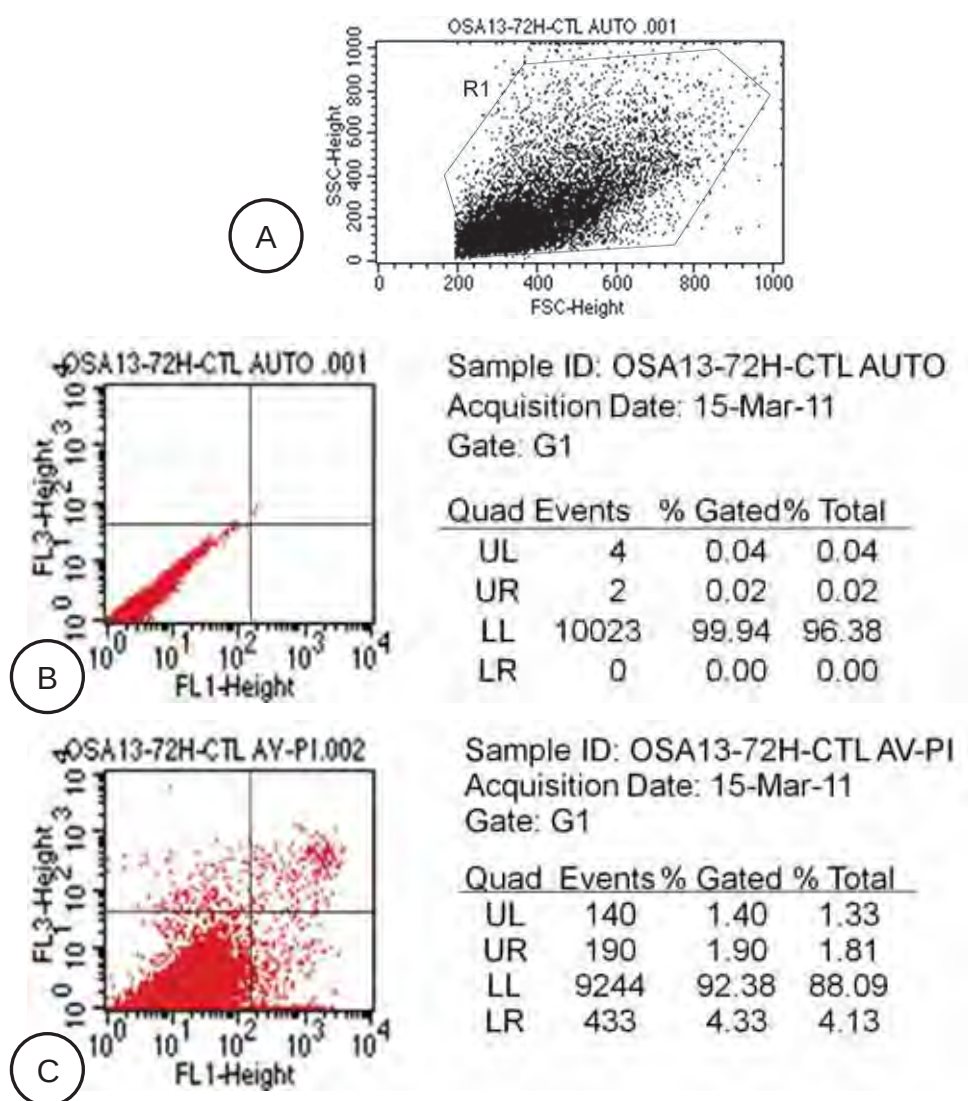


Figura 8: (A) Gate R1 identifica amostragem de células a serem analisadas no dot-plot, (B) Controle Autofluorescente identificando células em LL sem marcações. (C) Identificação a partir dos quatro quadrantes (UL, UR, LL, LR) a resposta ao referido tratamento.

6.2.5. Análise estatística

Para análise estatística, as variáveis dependentes binomiais (porcentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose/necrose, e em necrose) foram avaliadas utilizando a ANOVA seguido do teste de Tukey através do PROC GLM do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Fontes de variação no modelo incluindo positividade da Cox2 (mais, ou menos expressa) tratamento (Controle, 10, 50, 100, 200, 300 e 600 μ M da droga Celecoxibe), tempo de exposição à substância Celecoxibe (24, 48 e 72h) e interações de primeira ordem; todos os efeitos foram considerados como efeito fixo.

Os dados expressos em porcentagem e que não passaram no teste de normalidade (Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, e Cramer-von Mises) foram submetidos à transformação de arcosseno. Os efeitos principais estão apresentados na ausência de interação significativa. Os resultados estão apresentados como médias dos quadrados mínimos e erro padrão. Para todas as análises, foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Análise dos tratamentos com inibidor seletivo da Cox2 nos cultivos spOS positivos e negativos

De acordo com a Tabela 5 e Figura 9 pode-se observar os valores expressos nas culturas positivas (spOS-2, spOS-4 e spOS-6) para o encontrado com células vivas ($78,7\% \pm 3,0$), em apoptose ($11,7\% \pm 2,5$), em apoptose / necrose ($4,3\% \pm 0,5$) e necrose ($3,6\% \pm 0,5$), e valores para as culturas negativas (spOS-1 e spOS-3) para o encontrado com células vivas ($74,7\% \pm 3,7$), em apoptose ($18,1\% \pm 3,0$), em apoptose / necrose ($4,5\% \pm 0,6$) e necrose ($3,1\% \pm 0,6$).

Tabela 5: Identificação dos valores das células vivas, apoptóticas, apoptóticas / necrose e em necrose, segundo as expressões da Cox2.

Cox2	Viva	Apoptose	Apoptose necrose	Necrose
Positivo	$78,7 \pm 3,0$	$11,7 \pm 2,5$	$4,3 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,5^a$
Negativo	$74,4 \pm 3,7$	$18,1 \pm 3,0$	$4,5 \pm 0,6$	$3,1 \pm 0,6^b$

^{a, b} Letras sobrescritas distintas na mesma coluna diferem ($P \leq 0,05$). Positivos e Negativos, de acordo com expressão da Cox2 pela imunoistoquímica.

Segundo a Tabela 5 e a figura 9, pode-se também observar que nos cultivos negativos, apesar de não ter ocorrido diferenças, é verificado que houve maior sensibilidade destas células aos tratamentos, como visto nas células vivas (positivos $78,7\% >$ negativos $74,4\%$), sinalizadas para apoptose (positivos $11,7\% <$ negativos $18,1\%$) e para aquelas em apoptose / necrose (positivos $4,3\% <$ negativos $4,5\%$), porém, para os cultivos positivos foi observado maior ($P \leq 0,05$) número de células em necrose (positivos $3,6\% >$ negativos $3,1\%$) comparados com os cultivos negativos.

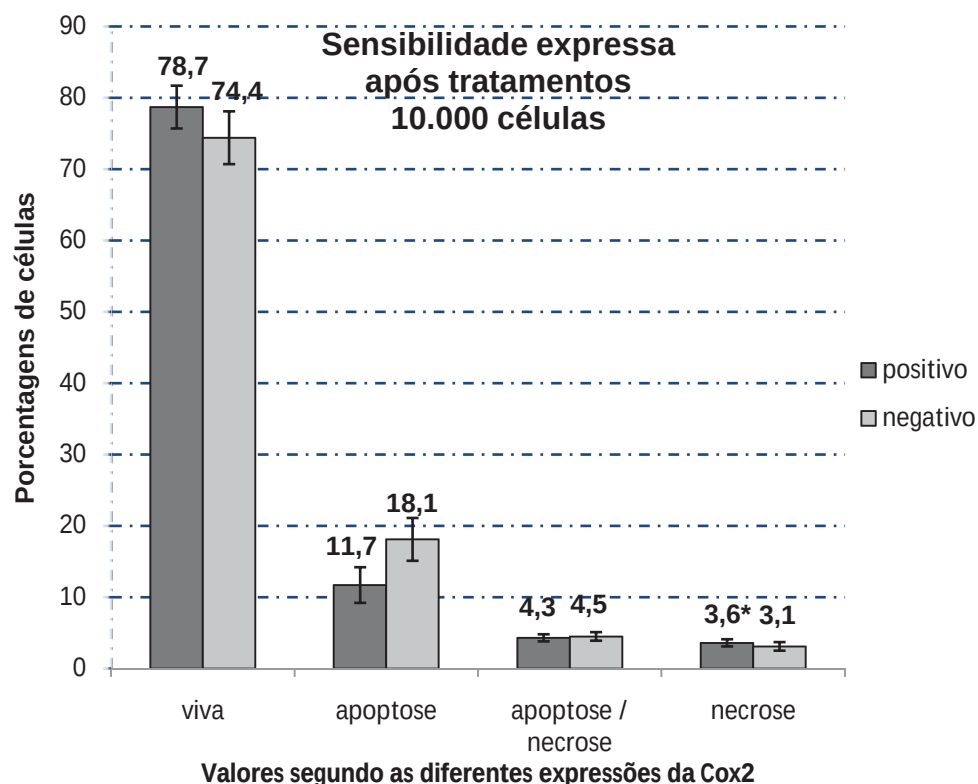


Figura 9: Porcentagens de células vivas, apoptose, apoptose / necrose e necrose observado nos grupos Cox2 positivos e negativos. *($P \leq 0,05$).

6.3.2. Tratamentos com inibidor seletivo da Cox2 em função dos tempos 24h, 48h e 72h

Em função do tempo de exposição com doses de Celecoxibe constatamos que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os três tempos analisados para as situações de células vivas, em apoptose e apoptose / necrose, como demonstram a Tabela 6 e Figura 10, porém se verificam semelhanças nos valores para os tempos de 24h e 48h, com discreta diminuição de células vivas, aumentando da mesma forma as em apoptose e apoptose / necrose. Todavia, foi observada significância para os valores de necrose como exposto nas colunas com letras distintas com ($P \leq 0,05$). Desta forma, para o fenômeno de necrose em 24h e 48h os valores foram 2,8% e 1,7%, sem significância ($P > 0,05$), porém, no tempo de 72h com

valor de 5,7%, foi observada diferença entre os outros dois valores anteriores ($P \leq 0,05$).

Tabela 6: Identificação dos valores das células vivas, em apoptose, apoptose / necrose e em necrose, segundo os períodos de 24h, 48h e 72h.

Período - horas	Viva	Apoptose	Apoptose necrose	Necrose
24	71,8 $\pm$ 4,1 ^a	20,0 $\pm$ 3,4 ^a	4,5 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,7 ^a
48	70,4 $\pm$ 4,1 ^a	21,4 $\pm$ 3,4 ^a	4,6 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,7 ^a
72	87,3 $\pm$ 4,1 ^b	3,23 $\pm$ 3,4 ^b	4,0 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 0,7 ^b

^{a, b} Letras sobrescritas distintas na mesma coluna diferem ($P \leq 0,05$).

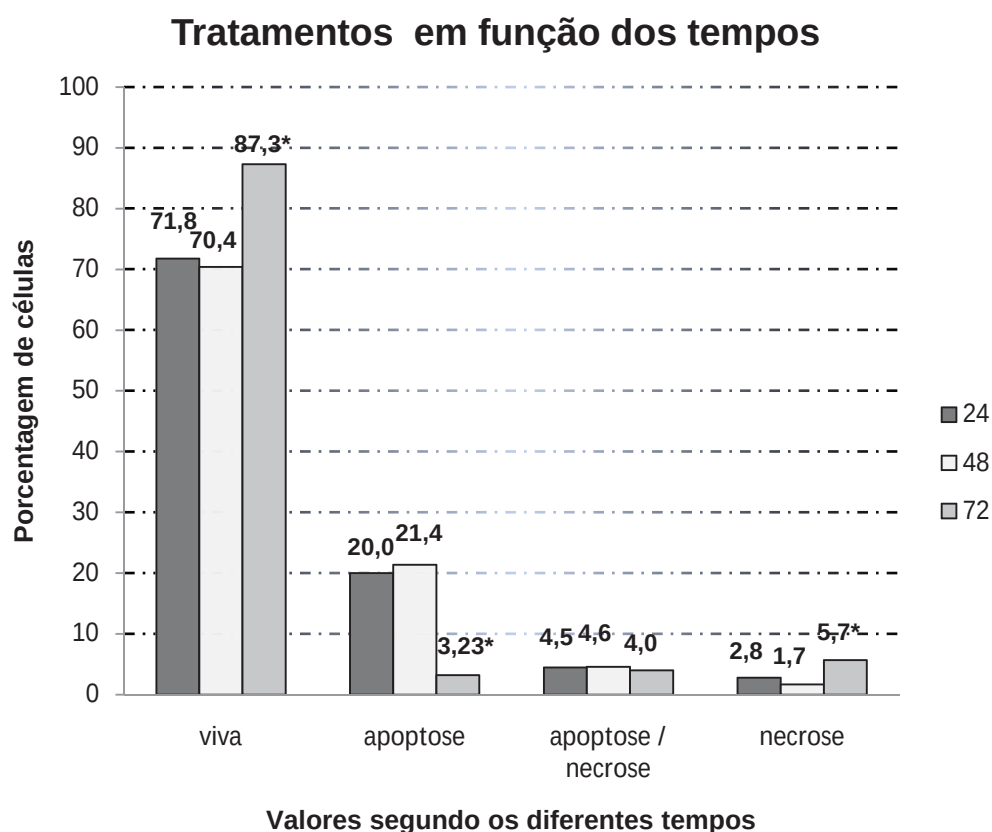


Figura 10: Porcentagens de células vivas, apoptose, apoptose / necrose e necrose observado nos grupos 24h, 48h e 72h de exposição a Celecoxibe. *72h difere ($P \leq 0,05$) dos grupos 24h e 48h.

Para o tempo de 72h foi observado nos valores para células vivas (87,3%) aumento substancial ($P \leq 0,05$), em que tínhamos para os tempos anteriores de 24h (71, 8%) e 48h (70,4%), sendo também constatado grande diminuição de células sinalizadas para apoptose ($P \leq 0,05$), em que apresentamos para 24h (20,0%) e 48h (21,4%) uma diminuição para 72h (3,23%), fato também observado para necrose, cujo valor subiu significativamente ($P \leq 0,05$). Porém, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os três tempos para as porcentagens das células em apoptose / necrose.

Uma provável explicação para o aumento súbito de células vivas e diminuição de células em apoptose diz respeito a seleção artificial que o Celecoxibe proporcionou as células nos diferentes cultivos, com isso, as resistentes às diferentes concentrações da substância se dividiram normalmente fazendo com que aumentasse de forma evidente o número de células vivas e diminuísse as células em apoptose.

O número significativo ($P \leq 0,05$) de células em necrose (5,7%) em relação aos outros dois valores anteriores provavelmente se deve ao fato que o maior tempo de exposição (72h) e as maiores concentrações do inibidor seletivo da Cox2, proporcionaram menor estabilidade celular, maior sinalização para apoptose num primeiro momento, e posteriormente estas células já sinalizadas entraram em necrose, com isso elas estariam sendo computadas nas porcentagens totais dos tratamentos nas diferentes doses para o Celecoxibe, fato que está de acordo com Gupta et al (2004), Fantappie et al (2007) e Huang e Sinicrope, (2010).

Segundo Gupta et al (2004), Arico et al, (2002) e Huang e Sinicrope, (2010), o Celecoxibe possui grande capacidade para promover apoptose e como efeito secundário causa necrose das células tumorais. O mesmo ocorreu em nosso estudo, em que nas concentrações crescentes no tempo de 72h, proporcionaram maior número de células necróticas.

6.3.3. Análise das diferentes concentrações nos tratamentos com inibidor seletivo da Cox2

Constatou-se de acordo com os valores expressos na tabela 7 e Figura 11, que apesar de não se observar diferenças ($P \leq 0,05$) para células vivas, em apoptose e apoptose / necrose, observa-se discreta redução nos valores para células vivas e aumento em células apoptóticas. Com isso, foi avaliado que houve tendência de diminuição regressiva de células vivas e aumento de células em apoptose. Foi identificado também que a concentração de $100\mu\text{M.L}^{-1}$ foi a que produziu numericamente a maior sinalização para apoptose (20,8%) e a menor ($P = 0,08$) para necrose (1,7%), podendo este ponto ser identificado como valor de início de um fenômeno farmacodinâmico.

Todavia, a partir desta concentração houve queda nos valores encontrados para células vivas e aumento do número de células em necrose. Além disso, houve tendência ($P = 0,08$) na redução da porcentagem das células em necrose para o grupo de $100\mu\text{M.L}^{-1}$ quando comparado ao de $10\mu\text{M.L}^{-1}$.

Tabela 7: Identificação dos valores das células vivas, apoptóticas, apoptóticas / necrose e em necrose, segundo as concentrações crescentes de Celecoxibe.

Celecoxibe ($\mu\text{M.L}^{-1}$)	Viva	Apoptose	Apoptose necrose	Necrose
Controle	86,0 $\pm$ 6,3	6,0 $\pm$ 5,1	4,0 $\pm$ 1,0	4,4 $\pm$ 1,1
10	80,1 $\pm$ 6,3	10,2 $\pm$ 5,1	4,2 $\pm$ 1,0	5,8 $\pm$ 1,1
50	76,5 $\pm$ 6,3	17,6 $\pm$ 5,1	3,2 $\pm$ 1,0	3,4 $\pm$ 1,1
100	75,0 $\pm$ 6,3	20,8 $\pm$ 5,1	5,6 $\pm$ 1,0	1,7 $\pm$ 1,1
200	74,1 $\pm$ 6,3	18,9 $\pm$ 5,1	4,5 $\pm$ 1,0	2,7 $\pm$ 1,1
300	70,5 $\pm$ 6,3	12,9 $\pm$ 5,1	4,6 $\pm$ 1,0	2,9 $\pm$ 1,1
600	73,5 $\pm$ 6,3	17,8 $\pm$ 5,1	4,6 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 1,1

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

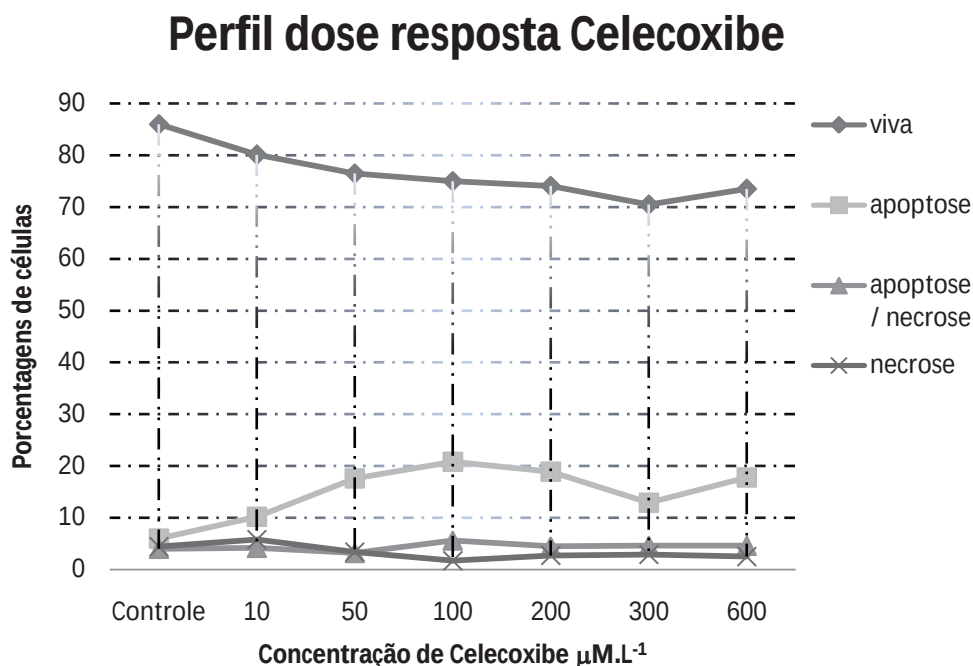


Figura 11: Porcentagens de células vivas, apoptose, apoptose / necrose e necrose observado nos grupos

6.4. Conclusão do Capítulo 2

Em comparação aos cultivos Cox2 positivos e Cox2 negativos, foi possível inferir que houve diferença para as células em necrose, em que os cultivos Cox2 positivos foram maiores que os negativos e que não houve diferença entre os grupos Cox2 positivos com os negativos em relação à porcentagem de células vivas, em apoptose e apoptose / necrose.

Para o tempo de 72h foi observada maior porcentagem de células vivas, menor porcentagem de células em apoptose e maior porcentagem de células em necrose em relação aos grupos de 24h e 48h. Foi também observado que não houve diferença entre os grupos apoptose / necrose para 24h, 48h e 72h.

Verificou-se que houve tendência na redução da porcentagem de células em necrose para os grupos de $100\mu\text{M.L}^{-1}$ quando comparados aos do grupo de $10\mu\text{M.L}^{-1}$, e que não houve diferença entre a porcentagem das concentrações de Celecoxibe com a porcentagem de células vivas, em apoptose e apoptose / necrose.

7. CAPÍTULO 3: VALIDAÇÃO DE DIFERENTES MARCAÇÕES EM CULTIVOS PRIMÁRIOS DE OSTEOSARCOMA CANINO

7.1. Objetivo do capítulo 3

Validar as imunomarcações expressas por meio da citometria de fluxo (FACS), Imunoisquímica (IHQ) e imunocitoquímica (ICQ) para os marcadores vimentina, citoqueratina, osteocalcina, osterix, osteopontina, Cox2, VEGF, MMP-2, MMP-9, caspase-3, Bax, Bcl-2 e Ki-67, e marcações histoquímicas Giemsa e Papanicolaou em cultivos primários de osteossarcoma canino.

7.2. Material e métodos

7.2.1. Aspectos éticos e origem do material em estudo

Para a condução do experimento foram selecionados osteossarcomas caninos diagnosticados no Hospital Veterinário e Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP Campus de Botucatu, de março de 2008 a janeiro de 2011. O diagnóstico destes animais passou pelo atendimento clínico, radiológico, cirúrgico e patológico, sendo o diagnóstico presumível dado pelos achados citológicos e confirmado pelo histopatológico segundo a Organização Mundial de Saúde.

Procedeu-se investigação dos fragmentos obtidos a céu aberto das peças cirúrgicas pós-amputação dos respectivos membros dos cães acometidos pelo OSA, sendo que quatro deles apresentaram tumor na porção distal rádio-ulnar e um na distal tíbio-fibular, cujos materiais obtidos foram utilizados parte para isolamento dos cultivos primários e parte para inclusão em parafina.

Todos os proprietários foram esclarecidos quanto aos procedimentos do estudo, assinando Termo de Consentimento Livre e

Informado (anexo 1). O estudo teve parecer favorável da Câmara de Ética da FMVZ – UNESP Campus de Botucatu, protocolo 98/2008 (anexo 3).

7.2.2. Processamento do material

7.2.2.1. Uso dos cultivos primárias spOS

Para este estudo foram utilizadas os resultados encontrados nas Tabelas 2 do Capítulo 1, assim como os cinco cultivos primários spOS caracterizados neste primeiro Capítulo.

7.2.2.2. Imunoistoquímica

Para a realização da técnica de imunoistoquímica, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com espessura de 3µm e distendidos em lâminas histológicas devidamente preparadas com 3-aminopropyltrimethoxy silane (Sigma A3648) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes nas lâminas de vidro, evitando assim a perda de material durante o processamento imunoistoquímico. A técnica utilizada seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo (Anexo 7), tendo como anticorpos primários os descritos na Tabela 1

7.2.2.3. Immunocitoquímica

De acordo com o delineamento (Anexo 2) no momento em que as células foram tripsinizadas para a caracterização (C) por meio da citometria de fluxo, uma parte deste material foi utilizado para uso na técnica de ICQ por meio da citocentrífuga ou técnica de Citospin.

As células foram contadas com auxílio da Câmara de Neubauer e ajustadas suas concentrações para que fossem feitas a impressão de 5×10^4 células por disco/por lâmina. Para este procedimento foi utilizada a citocentrífuga do Serviço de Patologia Veterinária da Unesp Campus de

Botucatu, com 2.000 RPM por 5 minutos. Feito isso, este material foi fixado com Álcool 50% por 10 minutos, secos em temperatura ambiente e posteriormente acondicionados em geladeira até o início da técnica de ICQ.

Estas lâminas com as células dos cultivos spOS previamente fixadas seguiram o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo (Anexo 8), tendo como anticorpos primários os descritos na Tabela 1

Tabela 8: Especificações dos anticorpos primários utilizados nas imunomarcações.

Proteínas	Especificações dos Anticorpos			Diluições		
	Código	Clone	Companhias	IHQ*	ICQ**	FACS***
Vimentina	U7034	Vim 3B4	Dako	1:250	1:250	1:200
Citoqueratina	U7022	MNF116	Dako	1:350	1:350	1:100
Osteocalcina	AB13418	OC4-30	Abcam	1:50	1:50	1:50
Osterix	AB22552	Sp7	Abcam	1:50	1:50	1:100
Osteopontina	SC73631	LFMb-14	Santa Cruz	1:50	1:50	1:100
Cox2	M3617-1	CX-294	Dako	1:100	1:100	1:100
VEGF	M7273-129	VG1	Dako	1:50	1:50	1:100
MMP-2	MOB312	VC2	DBS	1:50	1:50	1:100
MMP-9	A0150-129	A015029	Dako	1:100	1:100	1:100
Caspase-3	MOB309	3CS P03	DBS	1:100	1:100	1:100
Bax	A3533-1	RxH	Dako	1:100	1:100	1:50
Bcl-2	M0887-1	124	Dako	1:350	1:350	1:100
p53	M7001-1	DO-7	Dako	1:100	1:100	1:100
Ki-67	AR14911	MIB-1	Dako	1:250	1:250	1:200

*IHQ: Imunoistoquímica – **ICQ: Imunocitoquímica – ***FACS: Citimetria de fluxo.

7.2.2.4. Colorações Giemsa e Papanicolaou

As células foram contadas com auxílio da Câmara de Neubauer e ajustadas suas concentrações para que fossem feitas as impressões de 5×10^4 células por disco/por lâmina. Para este procedimento foi utilizada a citocentrífuga do Serviço de Patologia Veterinária da Unesp Campus de Botucatu, com 2.000 RPM por 5 minutos. Feito isso, as lâminas destinadas a coloração Giemsa foram fixadas em metanol a 100% e deixadas secar no

ambiente, já para as lâminas destinadas a coloração Papanicolaou, as células foram fixadas em álcool absoluto imediatamente após a impressão destas nas lâminas. Em seguida seguiram os respectivos protocolos de coloração para Giemsa e Papanicolaou do Serviço de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Unesp Campus de Botucatu.

7.2.3. Análise da intensidade de marcação

Os critérios utilizados para a classificação da expressão imunocitoquímica para os marcadores da Tabela 1 seguem os escores considerando (0): não houve coloração ou esta foi inferior a 10% das células neoplásicas; (+): coloração fraca em mais de 10% das células neoplásicas; (++) : coloração é fraca a moderada, completa em mais de 10% das células neoplásicas; (+++) : coloração forte e completa em mais de 10% das células neoplásicas. As células e núcleos positivos foram identificados pela coloração castanho. (Ellis et al, 2006).

7.2.4. Digitalização das imagens

As imagens dos cultivos celulares foram digitalizadas com o auxílio do equipamento de análise de imagens capturadas pela câmera digital científica colorida, modelo AxioCamERc 5.8 “marca Carl Zeiss®”, acoplada ao microscópio Trinocular “Axio Lab.A1”, com iluminação transmitida Hal 35 watts para o campo claro, com auxílio das objetivas de 20X e 40X “marca Carl Zeiss®”, Alemanha, utilizando-se para isto o programa computacional de análise morfométrica “AxioVision LE”, Release 4.8.2, marca Carl Zeiss®, Alemanha.

7.3. Resultados e Discussão

7.3.1. Expressão dos biomarcadores em função do padrão histológico das células em cultivo primário e dos respectivos fragmentos tumorais

Segundo os valores encontrados nas Tabelas 3, 9 e 10 referentes aos marcadores vimentina, citoqueratina, osteocalcina, osterix e osteopontina, foram identificados valores que demonstram a origem histológica das células dos cinco cultivos primários de osteossarcoma canino em análise e dos fragmentos dos tumores primários das respectivas culturas, sendo que todos obtiveram marcações fortes (+++) (>90%) para vimentina, demonstrando e caracterizando a origem mesenquimal das amostras em análise (Figuras 12B 13A) (PIROZZI et al., 2011).

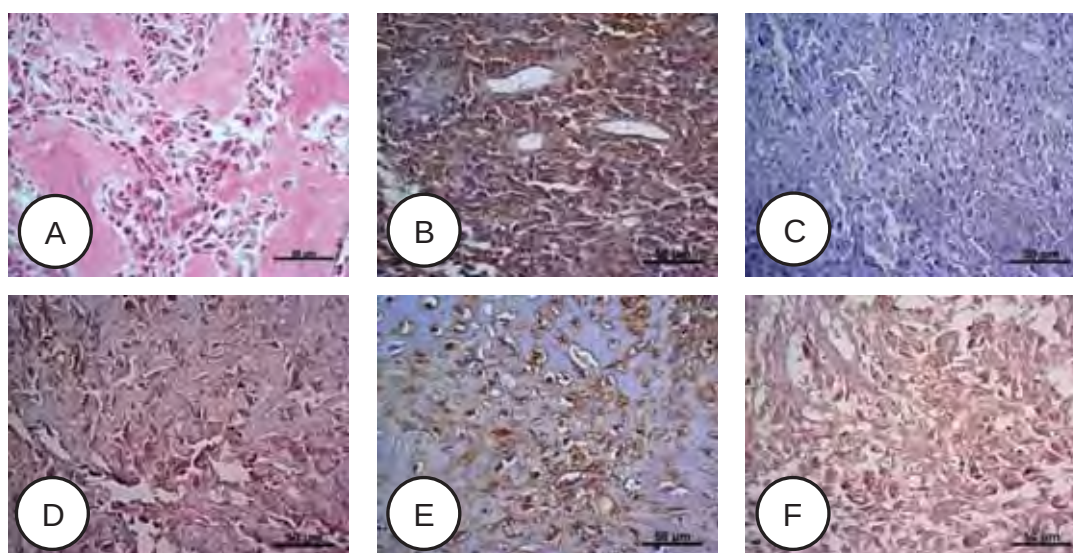
Todos os valores expressos na Tabela 3 para citoqueratina não ultrapassaram 1% de reatividade. Segundo a Tabela 9 todos os fragmentos tumorais analisados apresentaram marcação negativa para citoqueratina, e quatro das cinco culturas também apresentou marcação negativa para o mesmo biomarcador que identifica células de origem epitelial (Figuras 12C e 13B), porém, a cultura spOS-1 apresentou marcação fraca (+), para este biomarcador (Figura 13C), podendo este fato ocorrer como já descreveu Okada et al (2003), como sendo um critério de malignidade, todavia, com padrão mais citoplasmático e com características um pouco difusa pelo citoplasma.

Segundo os valores encontrados nas Tabelas 3, 9 e 10 referentes aos marcadores vimentina, citoqueratina, osteocalcina, osterix e osteopontina, foram identificados valores que demonstram a origem histológica das células dos cinco cultivos primários de osteossarcoma canino em análise e dos fragmentos dos tumores primários das respectivas culturas, sendo que todos obtiveram marcações fortes (+++) (>90%) para vimentina, demonstrando e caracterizando a origem mesenquimal das amostras em análise (Figuras 12B 13A) (PIROZZI et al., 2011). Todos os valores expressos na Tabela 3 para citoqueratina não ultrapassaram 1% de reatividade. Segundo a Tabela 9 todos os fragmentos tumorais analisados

Tabela 9: Representação do perfil imunoistoquímico dos marcadores alvo do padrão histológico tumoral referentes aos respectivos spOS.

Proteína	ON*	Imunoistoquímica dos fragmentos tumorais				
		spOS**-1	spOS-2	spOS-3	spOS-4	spOS-6
Vimentina	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
Citoqueratina	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
Osteocalcina	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)
Osterix	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)
Osteopontina	(++)	(+)	(+)	(+)	(0)	(++)

*ON: osso normal, spOS: **São Paulo – Osteossarcoma.



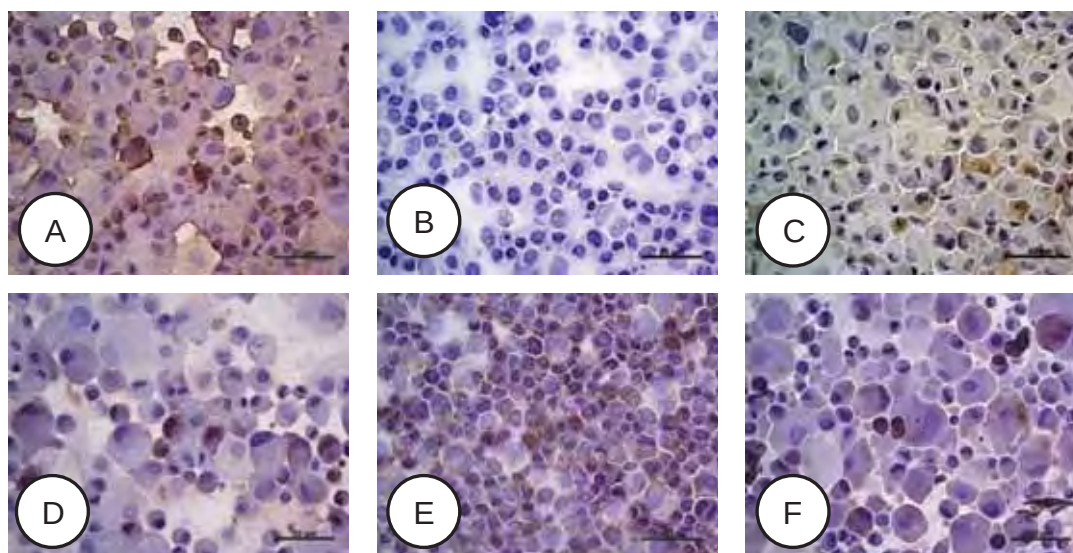
Figuras 12: Osteossarcoma canino. Expressão dos imunomarcadores a partir do painel de identificação histológica dos fragmentos neoplásicos dos tumores ósseos em estudo, identificando em (A): osteossarcoma osteoblástico. HE. 400X. (B): vimentina positiva. (C): citoqueratina negativa. (D): osteocalcina positiva. (E): osterix positivo. (F): osteopontina positiva. IHQ - Novolink®. 400X.

apresentaram marcação negativa para citoqueratina, e quatro das cinco culturas também apresentou marcação negativa para o mesmo biomarcador que identifica células de origem epitelial (Figuras 12C e 13B), porém, a cultura spOS-1 apresentou marcação fraca (+), para este biomarcador (Figura 13C), podendo este fato ocorrer como já descreveu Okada et al (2003), como sendo um critério de malignidade, todavia, com padrão mais citoplasmático e com características um pouco difusa pelo citoplasma.

Tabela 10: Representação do perfil imunocitoquímico da caracterização do cultivo primário de osteossarcoma canino para citospin.

Proteína	Cultivo primário				
	spOS*-1	spOS*-2	spOS*-3	spOS*-4	spOS*-6
Vimentina	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
Citoqueratina	(+)	(0)	(0)	(0)	(0)
Osteocalcina	(+++)	(++)	(+)	(++)	(+)
Osterix	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(+)
Osteopontina	(++)	(+)	(+)	(0)	(+)

*São Paulo – Osteossarcoma.



Figuras 13: Expressão dos imunomarcadores a partir do painel de caracterização da diferenciação histológica das células das cinco culturas spOS, identificando em (A): spOS-3 vimentina positiva. (B): spOS-2 citoqueratina negativa em quatro das cinco culturas. (C): spOS-1 citoqueratina positiva em spOS-1. (D): spOS-3 osteocalcina positiva. (E): spOS-2 osterix positivo. (F): spOS-1 osteopontina positiva. IHQ. 400X. Identificação de diferenças morfológicas e principalmente na quantidade de citoplasma nas diferentes culturas spOS. ICQ - Novolink®. 400X.

Para a proteína osteocalcina (Figuras 12D e 13D) foi identificado segundo a Tabela 3, marcações presentes e relativamente constantes para os cinco cultivos primários, sendo spOS-1 com maior valor e spOS-6 com menor valor expresso, estando todos com marcações abaixo do referencial estabelecido pelo ctm-D. Para Tabela 9, foi identificado coincidência nas marcações fortes expressas em spOS-1 com osso normal (ON), e

marcações moderadas nas outras quatro amostras de tumores analisados. Segundo Tabela 10, uma marcação forte (spOS-1), duas moderadas (spOS-2 e spOS-4) e duas marcações fracas (spOS-3 e spOS-6), foram encontradas nas respectivas análises.

A proteína osterix (Figuras 12E e 13E) mostra Tabela 3 certa uniformidade nas expressões desta proteína, cujo maior valor é 56,25% que está acima do encontrado em ctm-D e o menor de 31,82%. Na Tabela 9, identificamos coincidência nos valores moderados expressos no ON, spOS-1 e spOS-6 e com menor expressão para os outros três tumores analisados. Na Tabela 10, duas marcações forte (spOS-1 e spOS-3) duas moderadas (spOS-2 e spOS-4) duas consideradas fracas (spOS-6) para as referidas culturas.

Na marcação para osteopontina (Figuras 12F e 13F), notou-se maior oscilação nas expressões encontrados nas amostras, cujo maior valor observado foi de 40,43% para spOS-6, sendo considerado menos da metade do que foi encontrado para ctm-D (89,11%), e o menor valor com 17,81% para spOS-1. Segundo a representação da Tabela 9, a não uniformidade dos resultados também foi observada, em que tivemos a mesma marcação moderada para ON e nos fragmentos tumorais relativos a spOS-6, já o tecido tumoral relativo a spOS-4 teve marcação negativa e os demais tumores se observou marcação fraca. De acordo com a Tabela 10, não houve nenhuma marcação forte para esta proteína, porém, uma foi considerada moderada (spOS-1), três marcações fracas (spOS-2, spOS-3 e spOS-6) e uma cultura que não houve marcação (0) para esta proteína (spOS-4).

Em geral, todas expressões observadas para identificação do padrão histológico das células neoplásicas isoladas *in vitro*, mostraram valores que possuem a mesma interpretação que os encontrados na Tabela 3, 9 e 10 ou seja, estas células expressam proteínas de tecido ósseo, cujo marcador osterix foi o que se comportou de forma mais estável nas três avaliações segundo dados das respectivas tabelas. Desta forma, para a finalidade de identificação do padrão histológico das amostras analisadas, os três métodos são equivalentes.

Para mesma finalidade de uso em amostras celulares *in vitro*, a análise do padrão histológico é mais viável economicamente quando utilizamos a metodologia do citospin, pois como demonstrado nas Tabelas 3 e 10 os resultados são equivalentes.

Mesmo não sendo a coloração mais adequada, porém, a partir da análise microscópica e pela visualização das imagens encontradas nas Figuras 12 e 13, pode-se identificar vários critérios de malignidade presentes nas células imunomarcadas em função do alto grau de pleomorfismo celular, com presença de anisocitose, anisocariose, células multinucleadas, micronúcleos, citoplasma abundante dentre outros fatores que estão presentes e de acordo com descrito por Koss et al (1992) e Raskin e Meyer (2010).

7.3.2. Expressão dos biomarcadores da carcinogênese

Para estes biomarcadores, foram expressos valores divergentes para as mesmas proteínas alvo como demonstram as Tabelas 4, 11 e 12, diferentemente do que ocorreu na avaliação para definir o padrão histológico do material em análise. Segundo a Tabela 12, para a enzima Cox2 (Figura 14A) tivemos duas marcações fracas (+) (spOS-1 e spOS-2) e três culturas que não expressaram a proteína inflamatória (spOS-3, spOS-4 e spOS-6).

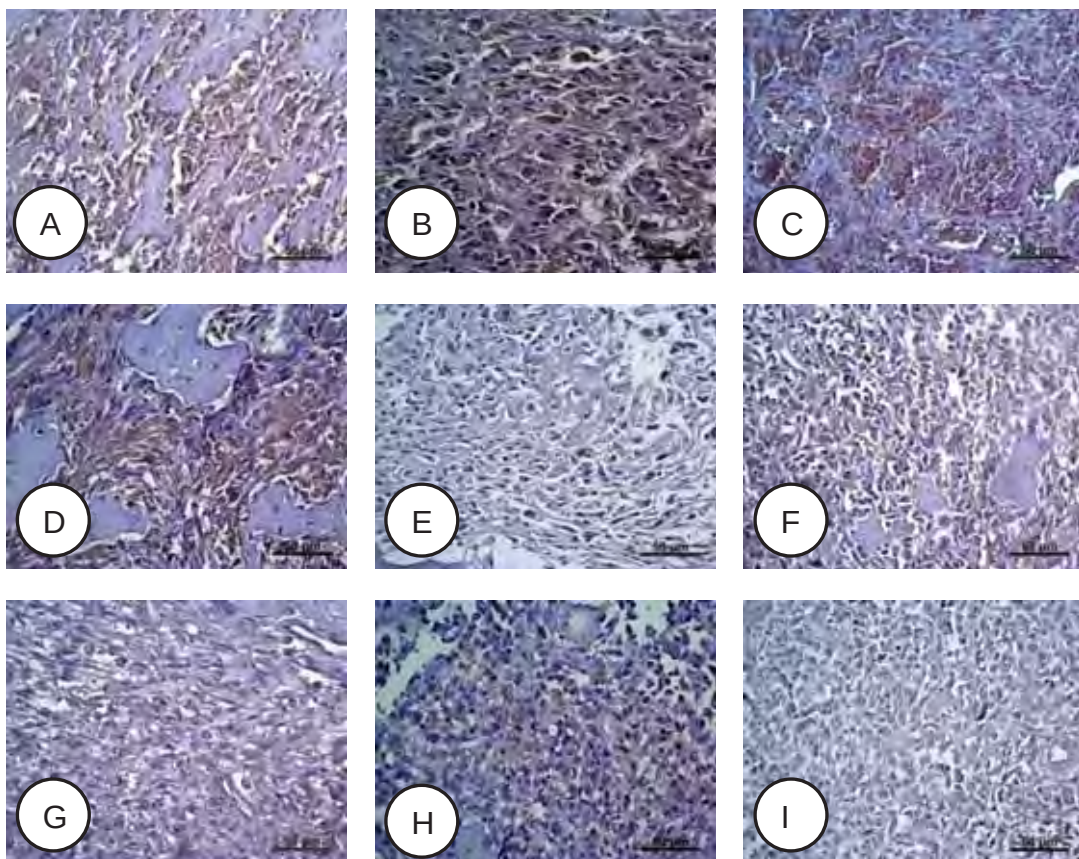
Para os valores expressos na Tabela 4, spOS-1 é considerada uma neoplasia de baixíssima expressão de Cox2 e na Tabela 11 ela é negativa para esta enzima, porém, segundo a Tabela 12, deve ter havido algum estímulo destas células em condições desconhecidas e distintas para que uma baixa expressão fosse identificada na análise expressa na Tabela 12, assim porém, poderíamos deduzir o fato da detecção desta expressão, já que segundo Kumar et al (2009) e Alberts et al (2004) ela é classificada como uma enzima induzível.

Com isso, o mesmo raciocínio se aplica para tentar descrever o fenômeno ocorrido nas cultura spOS-4 e spOS-6, pois verifica-se reação positiva na Tabela 4 e 11, porém, de acordo com o encontrado na Tabela 12, não houve expressão da Cox2 nestas duas culturas, podendo ter

Tabela 11: Representação fenotípica do perfil imunistoquímico dos marcadores alvo da carcinogênese para os fragmentos dos tumores em estudo.

Proteína	Imunoistoquímica dos fragmentos tumorais					
	ON*	spOS**-1	spOS-2	spOS-3	spOS-4	spOS-6
Cox2	(++)	(0)	(++)	(0)	(+)	(+)
VEGF	(+)	(+)	(+)	(++)	(0)	(++)
MMP-2	(0)	(++)	(+)	(+)	(0)	(+)
MMP-9	(+)	(++)	(++)	(+++)	(+)	(++)
Caspase-3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(0)
Bax	(+)	(++)	(0)	(+)	(0)	(+)
Bcl-2	(+)	(+)	(+)	(0)	(+)	(+)
p53	(0)	(+)	(+)	(0)	(+)	(+)
Ki-67 (MIB-1)	(+)	(++)	(+)	(+)	(0)	(+)

*ON: osso normal, spOS: **São Paulo – Osteossarcoma.



Figuras 14: Osteossarcoma canino. Expressão dos imunomarcadores a partir do painel fenotípico de caracterização das proteínas alvo encontradas nas fases da carcinogênese para os fragmentos dos tumores estudados. (A): Cox2. (B): VEGF. (C): MMP-2. (D): MMP-9. (E): caspase-3 (F): Bax. (G): Bcl-2 (H): p53. (I): Ki-67 (MIB-1). IHQ positiva - Novolink®. 400X. .

haverido algum bloqueio na sinalização para a síntese da enzima que aconteceu apenas nestas duas culturas ou algum fator inerente aos cultivos celulares neoplásicos que podem apresentar comportamento diversos e inesperados em função das condições pelas quais as células foram expostas, ou pelo comportamento individual de cada cultivo celular, fatos que ainda não foram explorados e investigados, já que os critérios morfológicos de malignidade se mantiveram presentes nestas células. Na cultura spOS-3 também não foi identificada a expressão da Cox2, como assim também pôde ser observado nas Tabelas 4, 11 e 12.

Para VEGF (Figuras 14B e 15B), verificou-se de acordo com a Tabela 4 que as expressões para esta proteína foi bastante heterogênea, cujo valor mais alto foi de 27,72% (spOS-3) e o menor de 1,31%, bem próximo ao constatado em ctm-D (1,85%). Na Tabela 11, duas marcações moderadas para os fragmentos representativos de spOS-3 e spOS-6, que estão acima da marcação fraca de ON, obtiveram marcações fracas as amostras referentes a spOS-1 e spOS-2, já spOS-4 não houve marcação. Analisando a Tabela 12, constata-se duas marcações moderadas (spOS-1 e spOS-3) e outras três como nulas.

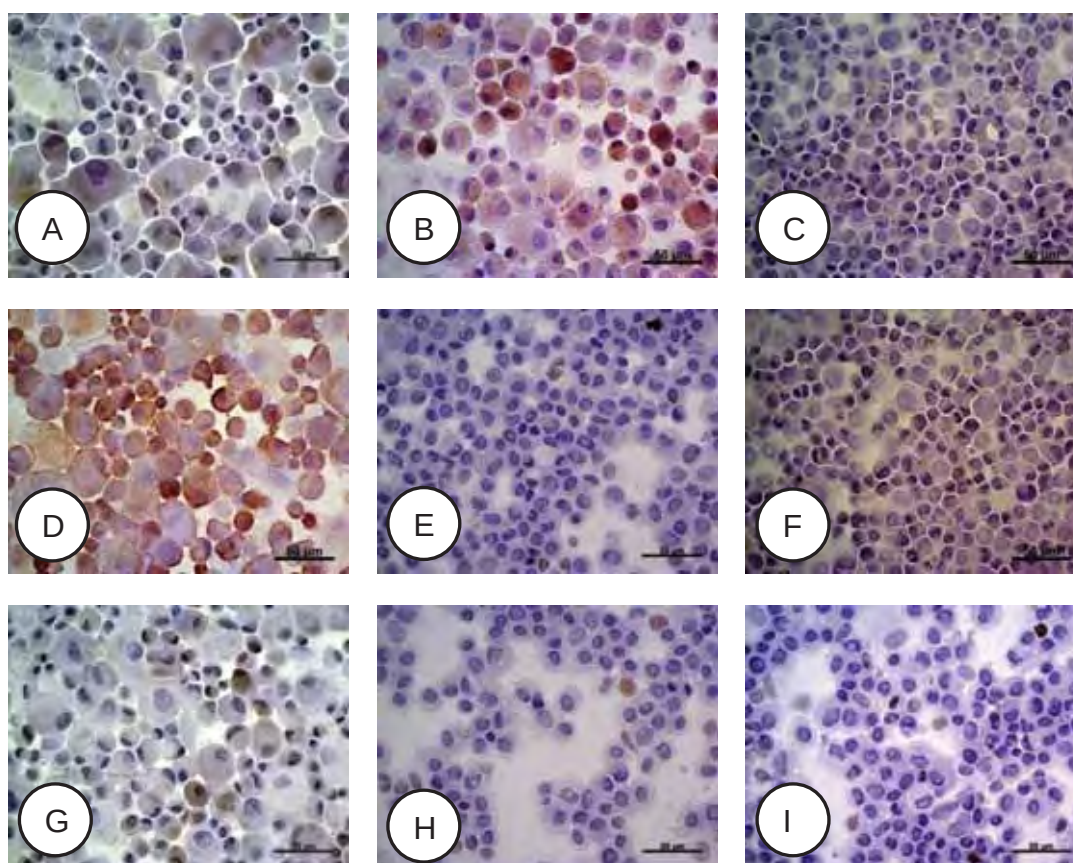
A imunexpressão para MMP-2 (Figuras 14C e 15C), notou-se instabilidade nas expressões encontrados nas amostras, cujo maior valor observado foi de 18,42% para spOS-2, sendo considerado quase 3 vezes maior ao que foi encontrado para ctm-D (5,5%), e o menor valor com 1,98% para spOS-1 (Tabela 4). Segundo a representação da Tabela 11, a não uniformidade dos resultados também foi observado, em que tivemos uma expressão moderada para spOS-1, três fracas (spOS-2, spOS-3 e spOS-6) e uma outra negativa (spOS-4), sendo mesmo valor observado para ON. De acordo com a Tabela 12, observamos uma cultura considerada de moderada imunomarkação (spOS-1), duas com marcações fracas e outras duas sem marcação.

Na marcação para MMP-9 (Figuras 14D e 15D), de acordo com a Tabela 4, foi observado quatro marcações relativamente altas, sendo a sua maior expressão encontrada na cultura spOS-2 (68,58%), estando este valor bem acima ao identificado em ctm-D (12,52%), e como menor

Tabela 12: Representação imunocitoquímica dos valores encontrados na caracterização dos cultivos primários de osteossarcoma canino para citospin.

Proteína	Cultivo primário				
	spOS*-1	spOS*-2	spOS*-3	spOS*-4	spOS*-6
Cox2	(+)	(+)	(0)	(0)	(0)
VEGF	(++)	(0)	(++)	(0)	(0)
MMP-2	(++)	(+)	(+)	(0)	(0)
MMP-9	(+++)	(+)	(+++)	(+)	(+)
Caspase-3	(0)	(0)	(+)	(0)	(0)
Bax	(+++)	(+)	(+)	(0)	(+)
Bcl-2	(++)	(0)	(+)	(0)	(0)
p53	(+)	(0)	(0)	(0)	(+)
Ki-67 (MIB-1)	(0)	(0)	(0)	(+)	(+)

*São Paulo – Osteossarcoma.



Figuras 15: Expressão dos imunomarcadores a partir do painel fenotípico de caracterização das proteínas alvo identificadas nas fases da carcinogênese para os cultivos spOS. (A): Cox2. (B): VEGF. (C): MMP-2. (D): MMP-9. (E): caspase-3 (F): Bax. (G): Bcl-2 (H): p53. (I): Ki-67 (MIB-1). ICQ positiva - Novolink®. 400X.

expressão, destaca-se spOS-6 (10,85%). Para a interpretação dos dados da Tabela 11, encontramos spOS-3 com marcação alta, e outras três culturas com marcação moderada (spOS-1, spOS-2 e spOS-6) e uma marcação fraca em spOS-4, mesmo valor encontrado em ON. Para Tabela 12, notam-se 2 valores altos (spOS-1, spOS-3) e os demais com marcação fraca.

De acordo com expresso para caspase-3 (Figuras14E e 15E), temos, segundo Tabela 4, valores relativamente baixos, sendo o de maior expressão para spOS-4 (15,73%) e o de menor expressão identificado em spOS-1, cujo valor está muito próximo ao de ctm-D (0,26%). Para o que fora identificado na Tabela 11, notou-se discreta semelhança em todos os valores com expressão fraca, com exceção a expressão de spOS-6, que foi nula, ON também observamos expressão fraca. Segundo a Tabela 12, houve também discreta semelhança nos valores, cuja marcação foi nula em quatro culturas e apenas spOS-3 verificou-se marcação fraca.

A proteína Bax foi identificada no estudo (Figuras14F e 15F), e suas imunoexpressões descritas na Tabela 4, cujos valores foram discretamente baixos, porém oscilantes, com maior valor encontrado em spOS-3 (16,07%) e menor em spOS-2 (2,20%), contudo ctm-D, obteve valores quase nulo (0,06%). Na Tabela 11, nota-se moderada reação em spOS-1, e fraca em spOS-3 e spOS-6, mesmo valor identificado em ON, sendo as outras duas amostras tumorais consideradas sem marcação. De acordo com Tabela 12, verificamos forte marcação em spOS-1, fraca em spOS-2, spOS-3 e spOS-6, e nula para spOS-4.

Na marcação para Bcl-2 (Figuras14G e 15G), de acordo com a Tabela 4, notou-se presente desuniformidade nas expressões para esta proteína anti-apoptótica nas amostras analisadas, cujo maior valor observado foi de 37,31% para spOS-4, e o menor com 4,80% para spOS-6, valor ainda bem acima ao de ctm-D (0,31%). Segundo a representação da Tabela 11, houve marcação fraca pra quatro culturas, sendo expressão nula observada apenas em spOS-3, em ON houve identificação de marcação fraca também. De acordo com Tabela 12, foi identificada uma cultura com marcação moderada (spOS-1), outra com marcação fraca

(spOS-3) e outras três sem expressão desta proteína anti-apoptótica (spOS-2, spOS-4 e spOS-6).

Na Tabela 4, notou-se para p53 (Figuras14H e 15H), marcação também bastante heterogenia, cujo maior valor identificado encontra-se em spOS-3 (21,71%), menor valor está expresso em spOS-1 (0,02%), valor muito próximo ao identificado em ctm-D (0,11%). para Tabela 11, foi observado quatro marcações fracas, sendo nulo apenas ao encontrado em spOS-3, cujo mesmo valor foi expresso em ON. Segundo a Tabela 12,) tivemos duas marcações fracas (spOS-1 e spOS-6) e mais três sem expressão nuclear desta proteína (spOS-2, spOS-3 e spOS-4).

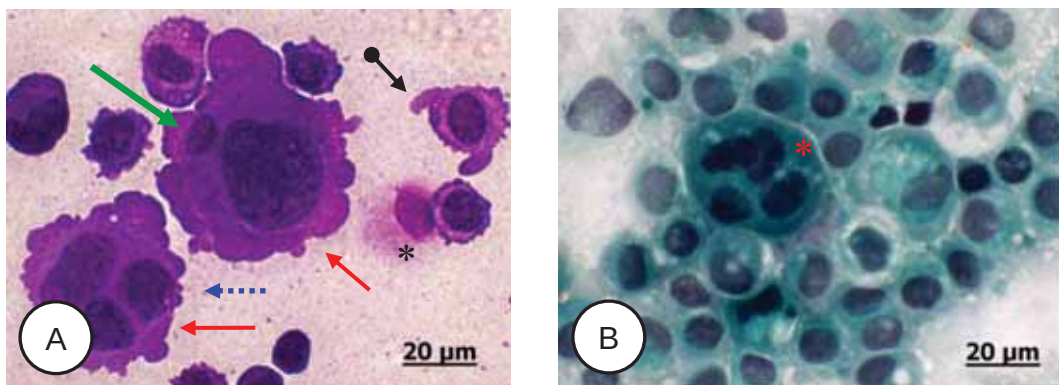
De acordo com Tabela 4, para ki-67 (Figuras14I e 15I), notou-se a maior oscilação nas expressões encontrados nas amostras, cujo maior valor observado foi de 65,08% para spOS-2, e o menor valor com 0,46% para spOS-1, sendo 2,74% o expresso em ctm-D. Segundo a representação da Tabela 11, a não uniformidade dos resultados também foi observado, em que tivemos marcação moderada em spOS-1, fracas em spOS-2, spOS-3 e spOS-6, assim como no ON e nula em spOS-4. Para Tabela 12, verificamos tivemos duas marcações fracas (spOS-4 e spOS-6) e novamente, outras três (spOS-1, spOS-2 e spOS-3) sem expressão da proteína analisada.

Como observado, os valores expressos destas proteínas são bastante divergentes de acordo com a análise efetuada e demonstradas nas Tabelas 4, 11 e 12, sendo alguns ligeiramente similares, como para MMP-9 em spOS-3, caspase-3 em spOS-3, spOS-4 e spOS-6. Todavia o que nos chama atenção é o fato de que em pelo menos uma das nove proteínas analisadas nas cinco culturas spOS, houve manifestação de positividade fraca e num dos casos ela foi moderada, mostrando que os anticorpos estavam funcionando, que as culturas celulares estavam de modo diferente identificando os antígenos alvo, ou seja, todas as células tiveram pelo menos uma marcação positiva e conseqüentemente, os anticorpos utilizados foram capazes de identificar os epítomos desejados, validando os componentes que identificaram a positividade da reação, mas contradizendo o que fora avaliado de forma mais sensível como descritos nos valores da Tabela 4.

7.3.3. Marcação histoquímica: Giemsa e Papanicolaou

Segundo Raskin e Meyer (2010) as marcações histoquímicas como Giemsa, são utilizadas na rotina laboratorial como marcação que proporciona boa visualização de estruturas citoplasmáticas e a partir disso, foram identificados nas cinco culturas deste estudo os mesmos critério de malignidade já descrito anteriormente, como um novo exemplo, foi possível identificar pelo Giemsa secreção de matriz óssea (Figura 16).

Já para a coloração de Papanicolaou que tem como característica observar detalhe e critérios nucleares, sendo importante também para identificar a presença de células com maior ou menor atividade, sendo que quando se encontram na coloração esverdeada elas estão mais ativas.



Figuras 16: Osteossarcoma canino. Citospin com coloração histoquímica (A) Células apresentando critérios de malignidade (→): megalocitose com ondulações citoplasmáticas, (→): micronúcleo, (⋯→): célula multinucleada, (●→): ondulações citoplasmáticas / pseudópodes, (*): secreção de matriz óssea. – Giemsa. 1.000X. (B) Células apresentando pleomorfismo celular e nuclear. Coloração verde demonstrando alta atividade celular dos osteoblastos neoplásicos. (*): célula multinucleada maligna. Papanicolaou. 1.000X.

Desta forma, as células neoplásicas apresentaram coloração indicativa de predomínio de alta atividade osteoblástica em função da coloração verde claro e em poucas delas se vê inclusive algumas gradações intracitoplasmáticas de cor laranja, que segundo Schmitt (1999), corresponde a menor atividade destas células coradas, porém, nesta

situação, esta baixa atividade se dá de forma parcial, porque não está presente em todo citoplasma, mas em partes dele.

Por estes achados e critérios de análise, é possível inferir que estas células possuem características de malignidade evidentes, tratando-se de neoplasia bastante agressivas e indiferenciadas como descreve Raskin e Meyer (2010).

7.3.4. Avaliação do uso das técnicas utilizadas no estudo

Como desvantagem, a técnica de citospin fez com que as células dos cultivos perdessem suas características morfológicas fibroblastóides apresentadas em condições *in vitro*, e também como demonstra esta investigação, houve desuniformidade e divergência nas expressões de diferentes imunomarcadores representados nas Tabelas 9 e 10, em relação a outras técnicas mais sensíveis e acuradas (Tabelas 3), porém, apesar destas divergências, foi possível estabelecer com certa segurança o tipo de célula analisada e suas diferenciações histológicas, porque as marcações para vimentina, osteocalcina e osterix, tiveram expressões bastante relevantes em todas as imunoexpressões. Esta metodologia se mostrou útil, de execução simplificada, equipamentos de fácil acesso e de custos reduzidos em relação aos utilizados para se obter os resultados da Tabela 3.

Ela se mostrou adequada para se observar critérios de malignidade descritos por Akerman e Walaas (1993) e Raskin e Meyer (2010), assim como o pleomorfismo celular, presença de micronúcleos, mitoses atípicas, células multinucleadas, anisocariose, ranhuras na cromatina (Fig.2 e Fig.3), baixa atividade e alta atividade das células em análise, em função da quantidade protéica encontrada no citoplasma dos osteoblastos neoplásicos e suas respectivas basofilias aos corantes utilizados, mostrando maior ou menor agressividade destas células em cultivo.

Para se obter os valores acurados que estão expressos na Tabela 2, há necessidade de meios e métodos mais exigentes e cuidadosos, além de equipamentos e materiais de uso com custos bem mais elevados em relação ao que já foi descrito. Apesar da alta

sensibilidade e confiabilidade da metodologia, neste tipo de análise nós não temos as informações morfológicas das células apresentando todos os critérios de malignidade expressos de modo claro e em muitos casos passando informações visíveis de forma direta ao observador, ou seja, para cada necessidade de análise se pode optar por outra análise a depender do tipo de informação ou do tipo de exigência que se necessita para obter o resultado desejado.

7.4. Conclusão do Capítulo 3

Para os diferentes métodos de avaliação dos resultados deste estudo, conseguimos inferir que houve concordância nas análises referentes as diferenciações histológicas das células analisadas e algumas discordâncias quanto à expressão de proteínas relacionadas a carcinogênese, dentre elas podemos inferir se tratar da promoção e progressão.

Houve identificação da proteína citoqueratina com marcação fraca numa cultura tumoral, sendo este achado considerado como critério de malignidade. Ainda nesta mesma cultura foi identificada a expressão para Cox2 de forma fraca, cujos valores em outras duas avaliações metodológicas foi tida como negativa e de baixíssima expressão. Assim como outras duas culturas consideradas positivas para Cox2, não expressaram marcação na ICQ.

É possível avaliar a partir da imunomarcação e histoquímica a morfologia de células neoplásicas de cultivo *in vitro* que estão expressas em lâmina citológica e aplicar nelas os critérios de malignidade conhecidos, assim como tirar conclusões importantes quanto a atividade e inatividade das culturas celulares.

Contudo, é identificado e obtido com técnicas mais simples, menos onerosas e menos complexas alguns dos mesmos resultados encontrados com técnicas mais complexas, que despendem maiores gastos e investimentos, lembrando que isto é dependente de tipo acurácia e sensibilidade metodológica que o estudo exige, dando ao pesquisador a

liberdade de escolhê-las a partir do conhecimento prévio da aplicabilidade e limitação destes métodos, cujos resultados poderão proporcionar grandes avanços ou simplesmente limitar suas investigações.

Referências

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th. Elsevier, p.397-418, 2009.

AKERMAN, M.; WALAAS, L. In: YOUNG, J.A. **Fine needle aspiration cytopathology**. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p.267-281, 1993.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **The Cell**. Garland Science, New York, London, 2002, 1616p.

ARAKI, Y.; OKAMURA, S.; HUSSAIN, S.P.; NAGASHIMA, M.; HE, P.; SHISEKI, M.; MIURA, K.; HARRIS, C.C. Regulation of cicloxygenase-2 expression by the Wnt and Ras pathways. **Cancer Research**, v.63, p.728-734, 2003

ARICO, S.; PATTINGRE, S.; BAUVY, C.; GANE, P.; BARBAT, A.; CODOGNO, P.; OGIER-DENIS, E. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. **The Journal of Biological Chemistry**. v.31, p.27613-27621, 2002.

BAKHLE, Y.S. COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. **British Journal of Pharmacology**, v.134, p.1137–1150, 2001.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**; v.357, p.539-545, 2001.

BELO, A.V.; BARCELOS, L.S.; FERREIRA, M.A.N.D.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, S.P. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. **Life Sciences**, v.74, n.23, p.2827-2837, 2004.

BENJAMIN, C.W.; HIEBSCH, R.R.; JONES, D.A. Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment. **Molecular Pharmacology**, v.53, p.446-50, 1998.

BERSANO, P.R.O. **Expressão imunoistoquímica da cicloxigenase-2 (Cox2) e quantificação das regiões organizadoras de nucléolos (NORs) nos diferentes padrões histológicos do osteossarcoma canino**. Viçosa, 2006. 98p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa.

BRASILEIRO FILHO, G.; Sistema ósteo-articular. In: **Bogliolo Patologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. p.979-1035.

BULÁRIO PFIZER. Celebra – Celecoxibe. **Laboratórios Pfizer Ltda**. p.1-30, 1999. www.pfizer.com.br

CAO, Y.; ZHOU, Z.; CROMBRUGGHE, B.; NAKASHIMA, K.; GUAN, H.; DUAN, X.; JIA, S.F.; KLEINERMAN E.S. Osterix, a Transcription Factor for Osteoblast Differentiation, Mediates Antitumor Activity in Murine Osteosarcoma. **Cancer Research**, v.65, n.4, p.1124-28, 2005.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature** v.420, p.860–867. 2002.

DALECK, C. R.; NARDI, A. B. De; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009, 1ª ed, p.632.

DALECK, C.R.; FONSECA, C.S.; CANOLA, J.C. Osteossarcoma canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v.5, n.3, p.233-242, 2002.

DEMARIA, S.; PIKARSKY, E.; KARIN, M.; COUSSENS, L.M.; CHEN, Y.C.; EL-OMAR, E. M.; TRINCHIERI, , G.; DUBINETT, S.M.; MAO, J.T.; SZABO, E.; KRIEG, A.; WEINER, G.J.; FOX, B.A.; COUKOS, G.; WANG, E.; ABRAHAM, R.T.; CARBONE, M.; LOTZE. M.T.; Cancer and inflammation: promise for biological therapy. **Journal Immunotherapy**. v.33, p.335-351. 2010.

DERNELL, W.S.; EHRHART, N.P.; STRAW, R.C.; VAIL, D.M. Tumor of the Skeletal System. In: Withrow, S.J.; Vail, D.M. **Small Animal Clinical Oncology**. 4.ed.,. 2007. p.540-582.

ELLIS, M.J.; TAO, Y.; YOUNG, O.; WHITE, S.; PROIA, A.D.; MURRAY, J. Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER2-positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole. **Journal of Clinical Oncology**. v.24, n.19, p.3019-3025, 2006.

ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTLE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v.31, p.1-9, 1998.

ERIKSEN, E.F. Cellular mechanisms of bone remodeling **Reviews in endocrine & metabolic disorders**. v.11, n.4, p.219–227, 2010.

FINAK,, G.; BERTOS, N.; PEPIN, F.; SADEKOVA, S.; SOULEIMANOVA, M.; ZHAO, H.; CHEN, H.; OMEROGLU, G.; METERISSIAN, S.; OMEROGLU, A.; HALLETT, M.; PARK, M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. **Nature Medicine**, v.14, p.518–27, 2008.

FOUKAS, A.F.; DESHMUKH, N.S.; GRIMER, R.J.; MANGHAM, D.C.; MANGOS, E.G.; TAYLOR, S. Stage-IIIB osteosarcomas around the knee. A study of MMP-9 in surviving tumour cells. **Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**. v.84, n.5, p.706-711, 2002.

FRESHNEY, R.I. Culture of animals cells. 6th ed. New Jersey: **John Wiley & Sons, Inc**, 2010. 732p.

FANTAPPIÈ, O.; SOLAZZO, M.; LASAGNA, N.; PLATINI, F.; TESSITORE, L.; MAZZANTI, R. P-glycoprotein mediates celecoxib-induced apoptosis in multiple drug-resistant cell lines. **Cancer Research**. v.67, n.10, p.4915-423, 2007.

GUPTA, S.; ADHAMI, V.M.; SUBBARAYAN, M.; MACLENNAN, G.T.; LEWIN, J.S.; HAFELI, U.O.; FU, P.; MUKHTAR, H. Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. **Cancer Research**. v.64, n.9, p.3334-3343, 2004.

GASPARINI, G.; LONGO, R.; SARMIENTO, R.; MORABITO, A. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? **The Lancet Oncology**, v.4, p.605-615, 2003.

GORLICK. R.; KHANNA, C. Osteosarcoma. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.25, n.4, p.683–691, 2010.

GRIFFI, D.E.; HARDWICK, J.M. Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection. **Annual Reveiw Microbiology**. v.51, v.565-592, 1997.

GUMURDULU, D.; ERDOGAN, S.; KAYASELCUK, F.; SEYDAOGLU, G.; PARSAK, C.K.; DEMIRCAN, O.; TUNCE. I. Expression of COX-2, PCNA, Ki-67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors and its relationship with histopathological parameter. **World Journal Gastroenterology**. v.13, p.426-443, 2007.

HAMMER, A.S.; WEEREN, F.R.; PADGETT, S.L. Prognostic Factors in Dogs with Osteosarcomas of the Flat or Irregular Bones. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.31, n.4, p.321-326, 1995.

HUANG, S.; SINICROPE, F.A. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells. **Autophagy**. v. 6, n.2, p.256-269, 2010

JANEWAY, K.; GORLICK, R.; BERNSTEIN, M. Osteosarcoma. In: ORKIN, S.; FISHER, D.; LOOK, A.; LUX, S, GINSBURG, D.; NATHAN, D. **Oncology of Infancy and Childhood**. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009, p.871–910.

JORD, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J.; WHITE, R.L. **Genética Médica**. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.197-212.

JUHÁSOVÁ, J.; JUHÁS, S.; KLÍMA, J.; STRNÁDEL, J.; HOLUBOVÁ, M.; MOTLÍK JR, J. Osteogenic differentiation of miniature pig mesenchymal stem cells in 2D and 3D environment. **Physiological Reserach**. p.1-30, 2011.

KHANNA, C.; KHAN, J.; NGUYEN, P.; PREHN, J.; CAYLOR, J.; YEUNG, C.; TREPEL,J.; MELTZER, P.; HELMAN, L. Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteossarcoma. **Cancer Research**. v.61, p.3750–3759, 2001.

KIRPENSTEIJN, J.; TIMMERMANS-SPRANG, E.P.M.; GARDEREN, E.V.; RUTTEMAN, G.R.; LEEUWEN, I.S.L-V.; MOL, J.A. Growth hormone gene expression in canine normal growth plates and spontaneous osteosarcoma. **Molecular and Celular Endocrinology**, v. 197, p. 179-185, 2002.

KOSS, L.G.; WOYKE, S.; OLSQEWski, W. **Aspiration biopsy: Cytologic interpretation and histologic bases**. Igaku-Shoin Medical Pub; 1992, 2nd Sub edition, p.631-657.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. **Pathologic Basis of Disease**. W. B. Saunders Company. 2009, 8Th, p.1464.

LANDI, E.P. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, p.39-46, 2003.

LARONE, D.; DELPRAT, C. Quimioterapia Anticancerígena. 1ª ed, **Editora Roca**, 2004. p.79-123.

LING, G. V.; MOORGAN, J. P.; POOL, R. R. Primary bone tumors in the dog: A combine clinical, radiographic, and histologic approach to early diagnosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.165, n.1, p.55-67, 1974.

LIU, S. Tumores ósseos e cartilaginosos. In: Bojrab, W.J. **Mecanismos das moléstias na cirurgia de pequenos animais**. São Paulo. Manole. 4.ed, 1996. p.1037-1092.

LOUKOPOULOS, P.; O'BRIEN, T.; GHODDUSI, M.; MUNGALL, B.A.; ROBINSON, W.F. Characterisation of novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. **Research in Veterinary Science**, v.77, p.131- 141. 2004.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**. v.44, p.454:436, 2008.

MAO, J.T.; FISHBEIN, M.C.; ADAMS, B.; ROTH, M.D. GOODGLICK, L.; HONG, L.; BURDICK, M.; STRIETER, E.R.M.; HOLMES, C.; TASHKIN, D. P.; DUBINETT, S.M. Celecoxib Decreases Ki-67 Proliferative Index in Active Smokers. **Clinical Cancer Research**. v.12, p.314-320, 2006.

MARINHO, L.C.;PATRÍCIO, F.R.S.; JESUS-GARCIA, R.F.; PETRILLI, A.S.; ODASHIRO, L.N. MACEDO, C.; ALVES, M.T.S. Clinicopathologic study and Ki-67 proliferative marker evaluation in human osteosarcomas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.41, n.6 • p.419-424, 2005.

MODIANO, J.F.; BREEN, M. The etiology of cancer. In: Withrow, S.J.; Mac Ewen, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 2007. p.3-30.

MOHAMMED, S.I.; KHAN, K.N.M.; SELLERS, R.S.; HAYEK, M.G.; DeNICOLA, D.B.; WU, L.; BONNEY, P.L.; KNAPP, D.W. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 naturally-occurring canine cancer. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.70, p.479-483, 2004.

MORENO, E.A.; CUÉLLAR, C.G.; GONZÁLEZ, A.D. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. **Cancerología**. v.46, p.275-280, 2000.

MULLINS, M.N.; LANA, S.E.; DERNELL, W.S.; OGILVIE, G.K.; WITHROW, S.J.; EHRHANT, E.J. Cyclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcomas, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.18, p.859-865, 2004.

NEUPANE, M.; CHANG, C.C.; KIUPEL, M.; YUZBASIAN-GUKAN. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue engineering**, v.14, n.6, p.1007-15, 2008.

OKADA, K.; HASEGAWA, T.; YOKOYAMA, R.; BEPPU, Y.; ITOI, E. Osteosarcoma with cytokeratin expression: a clinicopathological study of six cases with an emphasis on differential diagnosis from metastatic cancer. **Journal of Clinical Pathology**. v.56, n.10, p.742–746, 2003

OLIVEIRA, A.P.A. **Potencial metastático e reconhecimento da E-selectina em culturas e em tecidos colonizados pelo tumor ascítico de Ehrlich**. Viçosa, 2005. 65p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa.

OSATHANON, T.; BESPINYOWONG, K.; ARKSORNNUKIT, M.; TAKAHASHI, H.; PAVASANT, P. Human osteoblast-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness. **Journal of Oral Science**. v.53, n.1, p.23-30, 2010.

OSHIMA, M.; DINCHUK, J.E.; KARGMAN, S.L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TRZASKOS, J.M.; EVANS, J.F.; TAKETO, M.M. Suppression of intestinal polyposis in Apc knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (Cox-2). **Cell Press**, v.87, p.803-809, 1996.

PAI, R.; SOREGHAN, B.; SZABO, I. Prostaglandin E2 transactivates EGF-recepto: a novel mechanism for promoting colon câncer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nature Medicine**, v.8, p. 289-293, 2002.

PALMER, N. Diases of bones. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. Pathology of Domestic Animals. 4th ed. New York: **Academic Press Inc.** 1992. v. 1, p. 1-137.

PAOLONI M, KHANNA C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Review Cancer**. v.8, p.147–156, 2008.

PETRILLI, A.S.; CAMARGO, B.; ODONE-FILHO, V.; BRUNIERA, P.; BRUNETTO, A.L.; JESUS-GARCIA, R.; CAMARGO, O.P.; PENA, W.; PÉRICLES, P.; DAVI, A.; PROSPERO, J.D.; ALVES, M.T.S.; OLIVEIRA, C.R. ; MACEDO, C.R.D.; MENDES, W.L.; ALMEIDA, M.T. A.; BORSATO, M.L.; SANTOS, T.M.; ORTEGA, J.; CONSENTINO, E. Results of the brazilian osteosarcoma treatment group studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, n.7, p.1161-1168, 2006.

PIROZZI, G.;TIRINO, V.; CAMERLINGO, R.; FRANCO, R.;LA ROCCA, A.; LIGUORI, E.; MARTUCCI, N.,; PAINO, F.; NORMANNO, N.; ROCCO, G. Epithelial to Mesenchymal Transition by TGF β -1 Induction Increases Stemness Characteristics in Primary Non Small Cell Lung Cancer Cell Line. **PLoS One**,v.6, n.6, 215-248, 2011.

RASKIN, E.R.; MEYER, D.J. Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide. **Saunders Elsevier**, 2010, 2nd ed, 472p.

RUBIO. J.; RAMOS. D.; LOPEZ-GUERRERO, J.A.; IBORRA. I.; COLLADO. A.; SOLSONA. E.; ALMENAR. S.; LLOMBART-BOSCH. A.; Immunohistochemical expression of ki-67 antigen, Cox-2 and bax/bcl-2 in prostate cancer; prognostic value in biopsies and radical prostatectomy specimens. **European Urology**. v.48. p.745–775, 2005.

SELVARAJAH, G.T.; KIRPENSTEIJN, J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. **The Veterinary Journal**. v.185, p.28–35, 2010.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogenese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.625-633, 2004.

SLAYTER, M.V.; BOOSINGER, T.R.; DNMMRICH, K.; MISDORP, W.; LARSEN, S. Histological classification of bone and joint tumors of domestical animals. **World Health Organization**. 2nd series, v.1. Armed Forces Institute of Pathology American. Registry of Pathology Washington D.C.

SCHMITT, C. F. Autópsias, biopsias, citopatologia e outros métodos de investigação em patologia: o que são e como são utilizados. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos gerais**. 4^a ed. Atheneu, 1999. p. 279-292.

STRAW, R.C.; WITHROW, S.J. & POWERS, B.E. Management of canine appendicular osteosarcoma. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.20, n.4, p.1141-1161, 1990.

THAMM, D.H.;O'BRIEN, M.G.;VAIL, D.M. Serum vascular endothelial growth factor concentrations and postsurgical outcome in dogs with osteosarcoma. **Veterinary Comparative Oncology**. v.6, n.2, p.126-132, 2008.

THOMPSON, K.G.; POOL, R.R. Tumors of bones. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4th ed. EUA: Iowa State Press, 2002. p. 245-317.

TSUBOCHI. H.; SATO, N.; HIYAMA, M.; KAIMORI, M.; ENDO, S.; SOHARA, Y.; IMAI, T. Combined Analysis of Cyclooxygenase-2 Expression With p53 and Ki-67 in Nonsmall Cell Lung Cancer. **The Annals of Thoracic Surgery**. v.82, p.1198-1204, 2006

TSUJII, M.; & DUBOIS, R.N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v. 83, p.493-501, 1995.

WALS, G.M.; DEWSON, G.; WARDLAW, A.J.; LEVI-SCHAFFER, F.; MOQBELR. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. **Journal of Immunological Methods**. v.217, p.153-63, 1998.

WANG, D.; DUBOIS, R.N.; Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.2, p.415-416, 2004.

WASKEWICH, C.; BLUMENTHAL, RD.; LI, H.; STEIN, R.; GOLDENBERG, D.M.; BURTON, J. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. **Cancer Research**. v.62, n.7, p.2029-2033, 2002.

WATERS, D.J. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. In **Slatter: Sistema Músculo Esquelético**. Editora Manole Ltda. 1a ed. v.2, 1998, p.2607-2627.

WERGIN, M.C.; KASER-HOTZ, B. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) measured in seventy dogs with spontaneously occurring tumours. **In Vivo**. v.18, n.1, p.15-19. 2004.

VADLAMUDI, R.; MANDAL, M.; ADAM, L.; STEINBACH, G.; MENDELSON, J.; KUMAR, R. Regulation of the cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. **Oncogene**, v.18, p.305-314, 1999.

WOLFESBERGER, B.; WALTER, I.; HOELZL, C.; THALHAMAMMER, J.G.; EGERBACHER, M. Antioplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 3, p.308-316, 2006

A nexos

Anexo1:



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

SERVIÇO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA

CEP 18.618-970 – Cx Postal 585 – Botucatu - SP - Rubião Jr. – FONE/ FAX (14) 38116293

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 (a): _____.

RG: _____

CPF: _____

Assinatura: _____

Botucatu, ____ de _____ de 20____.

Anexo2: Delineamento Experimental de cada cultura tumoral

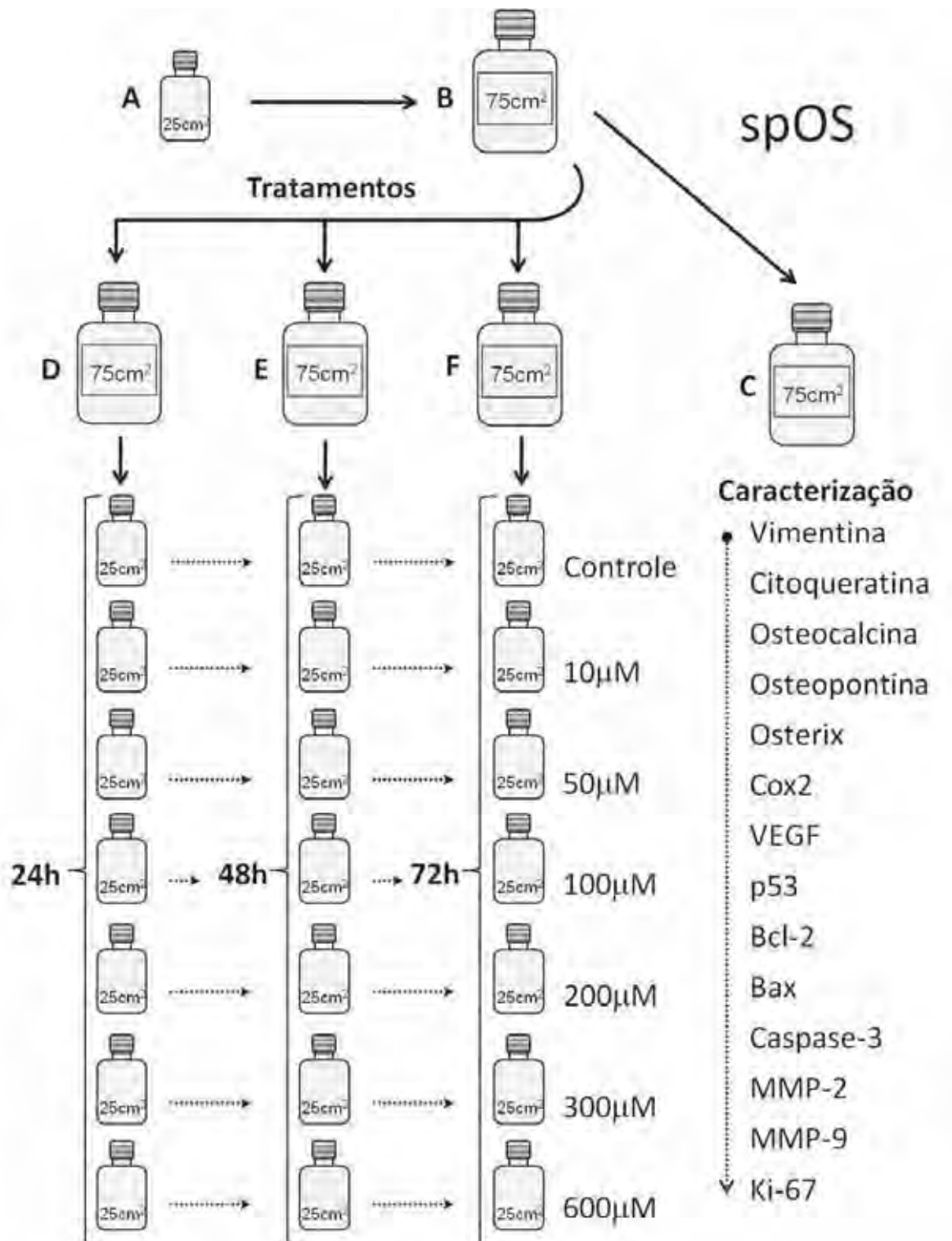


Figura anexo 2: Delineamento experimental em que (A) frasco de 25cm² contendo uma cultura tumoral de osteossarcoma canino (spOS), expandida para outro maior. (B) frasco de 75cm², usada para semear outros quatro frascos de mesmo volume. (C) Frasco de 75cm², usado para Caracterização do cultivo primário. (D) Frasco de 75cm² usado para os tratamentos de 24h. (E) Frasco de 75cm² usada para os tratamentos de 48h. (F) Frasco de 75cm² usada para os tratamentos de 72h.

Anexo 3: CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais / FMVZ Unesp Botucatu.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto "**Expressão *in vitro* da Ciclooxigenase-2 (COX2) no osteossarcoma exposto a inibidor seletivo da COX2**", Protocolo nº 98/2008-CEUA, de **Paulo Ricardo de Oliveira Bersano**, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível Doutorado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 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 25 de agosto de 2009.

Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18818-000
☎/fax: 14-3811-8105 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

Anexo 4: Parcerias e colaborações nacionais e internacionais.



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

LARCO PROT, Abel Salazar, L. 4099-003 Porto
TELEFONE +351 22 204 22 00
FAX +351 22 204 22 19

Departamento de Patologia e Imunologia Molecular

DECLARAÇÃO

Como Professora Catedrática de Patologia Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), da Universidade do Porto e Investigadora Sénior do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), venho comunicar a minha aceitação como colaboradora do projecto de doutoramento, do **Mestre Paulo Ricardo de Oliveira Bersano**, sobre o tema "*Expressão *in vitro* da ciclooxigenase-2 (Cox2) no osteossarcoma exposto a inibidor seletivo da Cox2*" (*In vitro expression of cyclooxygenase-2 (Cox2) for osteosarcoma exposed to a Cox2 selective inhibitor*).

A Professora Noeme Sousa Rocha é a orientadora do projecto de doutoramento do **Mestre Paulo Ricardo Bersano**, e pela colaboração de há longos anos com a UNESP - Câmpus de Botucatu, na pessoa da professora Noeme Rocha e grupo de Patologia Veterinária, tenho todo o prazer em colaborar para o desenvolvimento deste projecto, recebendo o **Mestre Paulo Ricardo Bersano**, no meu grupo tanto no IPATIMUP como no ICBAS-UP, num período a definir durante o ano de 2010.

O **Mestre Paulo Ricardo Bersano** durante o período que despende nestes laboratórios terá uma ligação activa com o diagnóstico histopatológico, interagindo com os residentes e patologistas/docentes do departamento. No âmbito científico e de investigação participará nos seminários e "*Journal club*" semanais de ambas as instituições quando da sua permanência em cada uma delas.

No ICBAS terá oportunidade de interagir com os alunos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, podendo também colaborar em alguns dos seminários e aulas do pré-graduado, nomeadamente na área de Oncobiologia.

Quando estipulado o período de permanência nestes institutos será disponibilizado alojamento numa das residências universitárias, sendo o custo da mesma da responsabilidade do estudante, assim como um seguro de saúde obrigatório por parte da Universidade do Porto.

Porto, 20 de Julho de 2009

Maria de Fátima Gärtner, DVM, PhD(Med), ECVP(Dipl.)
Professora Catedrática do ICBAS
Investigadora Sénior do IPATIMUP

MICHIGAN STATE
UNIVERSITY

Noeme Sousa Rocha
Professor of Veterinary Pathology
Departamento de Clínica
Veterinária - Patologia Veterinária - FMVZ - UNESP Campus de Botucatu
Distrito de Rubião Júnior, S/N, SP, CEP 18618-000.

Dr. med. vet. Matti Kiupel, BS, MS, PhD, DACVP
Fachtierarzt für Veterinär Pathologie
Associate Professor, Section Chief Anatomical Pathology
Michigan State University
Department of Pathobiology and Diagnostic Investigations
Diagnostic Center for Population and Animal Health
1125 Beaumont Road, Room 152A
Lansing, MI 48910, USA

July 17, 2009

Tel.: ** 517 432 2670

Fax.: ** 517 432 6557

E-mail: kiupel@dcpah.msu.edu

Dear Prof. Rocha,

It is my pleasure to extend this invitation to your student, Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano, to join the Department of Pathobiology and Diagnostic Investigation and the Diagnostic Center for Population and Animal Health at the college of Veterinary Medicine, Michigan State University, as a visiting post-doctoral scholar during the period of one year, with the precise date to be determined but estimated to begin in January 2010.



COLLEGE OF
**VETERINARY
MEDICINE**
Department of
Pathobiology and
Diagnostic Investigation
Michigan State University
1125 East Fes Hall
East Lansing, MI
48824-1115
517-432-4680
FAX: 517-432-7580

Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano will work under my direction. I am an associate professor for veterinary pathology in the department of Pathobiology and Diagnostic Investigation and the section chief of the Anatomical pathology section in the Diagnostic Center for Population and Animal Health. In the later function I also oversee the histology, immunohistochemistry and molecular pathology laboratory. I will mentor Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano in his research, which will primarily be carried out in this laboratory. Thereby I will be able to provide Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano with access to numerous current cutting edge molecular pathology techniques, including laser capture microdissection, automated immunohistochemistry and in-situ hybridization and others. I will collaborate with Drs. Noeme Sousa Rocha and Paulo Ricardo de Oliveira Bersano on their research project titled: "In vitro expression of cyclooxygenase-2 (Cox2) for osteosarcoma exposed to a Cox2 selective inhibitor. (Expressão *in vitro* da ciclooxigenase-2 (Cox2) no osteossarcoma exposto a inibidor seletivo da Cox2)".

Furthermore Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano will be interacting with our residents, graduate students and other faculty and participate in the daily routine biopsy and necropsy service. There will also be opportunities to attend seminars, lecture series, clinical rounds, and to interact with clinicians and residents in the veterinary teaching Hospital, in particular the Oncology Center.

Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano will not receive a stipend from Michigan State University for the period of his visit, and Michigan State University will not provide him with health insurance. We will assist in finding appropriate housing for Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano.

If you have any further questions, please don't hesitate to contact me.

Sincerely

Dr. Matti Kiupel

MSU is an affirmative action
equal opportunity institution.



IOP Instituto de
Oncologia Pediátrica

DECLARAÇÃO DE COMPROMISSO

A/C:

Noeme Sousa Rocha, MV, MSc, DSc
Livre Docente em Patologia Veterinária
Departamento de Clínica – Serviço de Patologia Veterinária
FMVZ – Unesp Campus de Botucatu
Distrito de Rubião Júnior, S/N, SP, CEP 18618-000

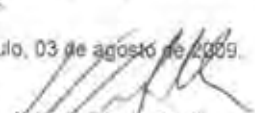
Prezada Profª Noeme,

É com grande satisfação que aceito colaborar nos trabalhos do doutorando e mestre **Paulo Ricardo de Oliveira Bersano**, intitulado **"Expressão *in vitro* da ciclooxigenase-2 (Cox2) no osteossarcoma exposto a inibidor seletivo da Cox2 (*In vitro expression of cyclooxygenase-2 (Cox2) for osteosarcoma exposed to a Cox2 selective inhibitor*)"** que estão sob sua orientação e co-orientação da Dra Maria Teresa de Seixas Alves. Dra. Maria Teresa é nossa parceira há anos nos trabalhos e estudos com tumores ósseos malignos em adolescentes no Instituto de Oncologia Pediátrica – IOP-GRAACC/UNIFESP.

Quero parabenizar pelo trabalho, pois, vejo este estudo com osteossarcoma canino como pioneiro no Brasil e, com isso, disponibilizo ao doutorando uma integração ativa no nosso Grupo de Estudo em Oncologia que é composto por médicos residentes, biólogos, clínicos, patologistas, pesquisadores e docentes de diversas áreas médicas, que de certo acrescentarão conhecimento, aprendizado e informações relevantes na sua formação acadêmica.

O doutorando Paulo Ricardo de Oliveira Bersano poderá participar de reuniões, conferências, palestras e expor suas experiências e aprendizados ao longo do período que estiver desenvolvendo seus estudos.

São Paulo, 03 de agosto de 2009.


Prof. Dr. Antônio Sérgio Petrilli
Chefe do Setor de Oncologia Pediátrica,
Depto de Pediatria – UNIFESP-EPM
Diretor Geral do IOP-GRAACC/UNIFESP



Rua Boaventura, 149
MCS-OC - 13ª Comissão
Laboratório de Oncologia
T: (+55 11) 5093-8400
F: (+55 11) 5093-8400
mailto:info@unifesp.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

DECLARAÇÃO DE COMPROMISSO

A/C:

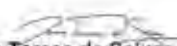
Noeme Sousa Rocha, MV, MSc, DSc
Livre Docente em Patologia Veterinária
Departamento de Clínica – Serviço de Patologia Veterinária
FMVZ – Unesp Campus de Botucatu
Distrito de Rubião Júnior, S/N, SP, CEP: 18618-000

Ilma Sra: Prof^a Noeme

Com prazer que aceito colaborar nos trabalhos do doutorando e mestre Paulo Ricardo de Oliveira Bersano intitulado *"Expressão in vitro da ciclooxigenase-2 (Cox2) no osteossarcoma exposto a inibidor seletivo da Cox2 (In vitro expression of cyclooxygenase-2 (Cox2) for osteosarcoma exposed to a Cox2 selective inhibitor)"* que estão sob sua orientação.

Como coorientadora deste Projeto, venho comunicar que disponibilizo ao doutorando uma integração ativa no nosso Grupo de Estudo em Oncologia que é composto por médicos residentes, biólogos, clínicos, patologistas, pesquisadores e docentes de diversas áreas médicas, que de certo acrescentarão conhecimento, aprendizado e informações relevantes na sua formação acadêmica e fico feliz pela ampliação e manutenção da parceria já existente de anos com o Dr. Antônio Sérgio Petrilli nos trabalhos e estudos com tumores ósseos malignos em adolescentes no Instituto de Oncologia Pediátrica – IOP/Unifesp, juntamente com o Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer – GRAACC.

Congratulo com os demais colaboradores pelo desenvolvimento e aplicabilidade do trabalho, pois, observo pioneirismo neste estudo com osteossarcoma canino no Brasil. Com isso, para seu êxito completo o doutorando Paulo Ricardo de Oliveira Bersano poderá participar de reuniões, conferências, palestras e expor suas experiências e aprendizados ao longo do período que estiver desenvolvendo seus estudos juntamente com nosso Grupo de Estudos em Oncologia.


Maria Teresa de Seixas Alves
Livre Docente
Departamento de Patologia
Escola Paulista de Medicina
Universidade Federal de São Paulo

Rua Botucatu, 740 – Edifício Lemos Torres / 1º andar
CEP 04023-062 – Vila Clementino
São Paulo - SP

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
18618-000 - Botucatu - SP - Rubião Júnior - Fone/Fax: (14) 3811-6249

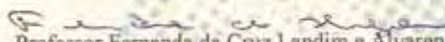
DECLARAÇÃO DE COMPRISSE

A/C: Noeme Sousa Rocha, MV, MSc, PhD
Livre Docente em Patologia Veterinária
Departamento de Clínica Veterinária – Serviço de Patologia
FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu
Distrito de Rubião Jr., s/n, SP, 18618.000

Como Professora Livre docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – BOTUCATU, venho comunicar meu aceite em colaborar no projeto de doutoramento de **Paulo Ricardo de Oliveira Bersano**, sobre o tema *Expressão in vitro da ciclooxigenase-2 (Cox-2) no osteossarcoma exposto a inibidor seletivo da Cox-2* (*In vitro expression of cyclooxygenase-2 (Cox-2) for osteosarcoma exposed to Cox-2 selective inhibitor*), e orientação da Prof. Dra. Noeme Sousa Rocha.

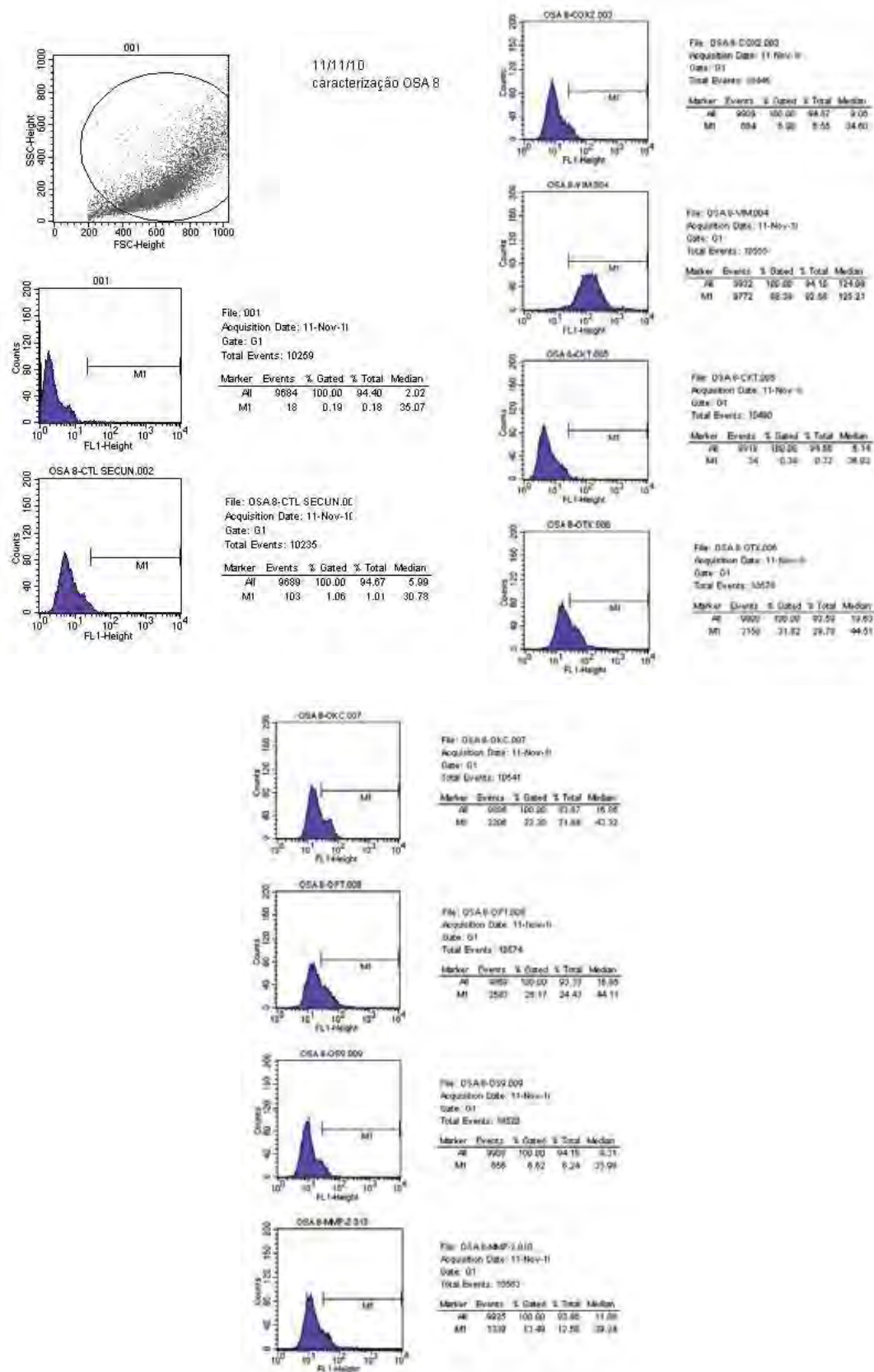
A colaboração entre o Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), sob minha responsabilidade, e a Professora Noeme se iniciou a cerca de dois anos, e a cada dia se intensifica. Desta forma, é com grande satisfação que recebo este convite. O projeto em questão versa sobre tema de grande importância não só para a medicina veterinária, mas também para medicina humana devido às similaridades no comportamento do osteossarcoma em humanos e em cães.

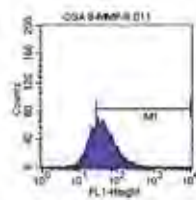
Durante a fase de execução do Projeto o Doutorando Paulo Ricardo de Oliveira Bersano terá livre acesso ao laboratório, interagindo com os demais pós-graduandos e participando ativamente das atividades envolvidas no cultivo celular. Além disso, o Doutorando será bem vindo para participar de reuniões, seminários e discussões científicas organizadas no âmbito do Laboratório e do Departamento.


Professor Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
DVM, PhD
Dep. Anima Reproduction and Veterinary Radiology
F.M.V.Z. - UNESP – Botucatu -SP- Brazil

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Diretoria
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18618-000
☎/fax: 14-3811-6002/6116 – ✉ diretor@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

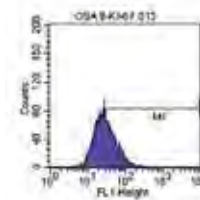
Anexo 5: Caracterização do spOS-1 – Dados analisados pela Citometria de Fluxo.





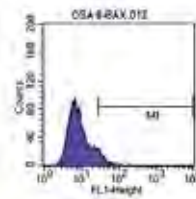
File: OSA-B-MP0.011
 Acquisition Date: 11-Nov-11
 Gate: G1
 Total Events: 10574

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
AP	9990	100.00	93.49	33.18
MT	6040	67.22	62.88	46.88



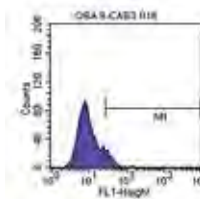
File: OSA-B-KM07.013
 Acquisition Date: 11-Nov-11
 Gate: G1
 Total Events: 10574

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
AP	9990	100.00	93.49	33.18
MT	4014	40.67	42.64	41.79



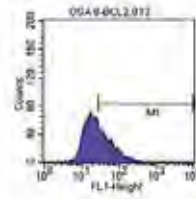
File: OSA-B-BAX.012
 Acquisition Date: 11-Nov-11
 Gate: G1
 Total Events: 10574

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
AP	9990	100.00	92.91	33.43
MT	419	4.25	3.94	32.78



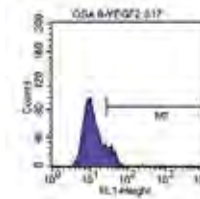
File: OSA-B-CAS0.016
 Acquisition Date: 11-Nov-11
 Gate: G1
 Total Events: 10589

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
AP	9990	100.00	93.83	33.74
MT	689	6.87	6.42	33.68



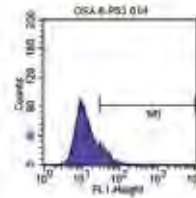
File: OSA-B-BCU.013
 Acquisition Date: 11-Nov-11
 Gate: G1
 Total Events: 10611

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
AP	9990	100.00	93.19	22.97
MT	2069	27.31	14.70	48.56



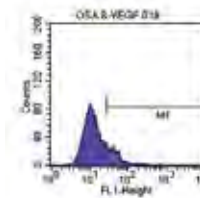
File: OSA-B-VPG02.017
 Acquisition Date: 11-Nov-11
 Gate: G1
 Total Events: 10594

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
AP	8990	100.00	83.82	19.65
MT	1004	12.15	9.50	38.52



File: OSA-B-P03.014
 Acquisition Date: 11-Nov-11
 Gate: G1
 Total Events: 10572

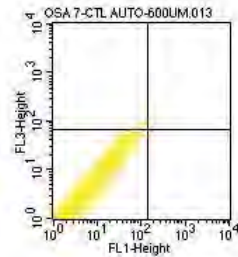
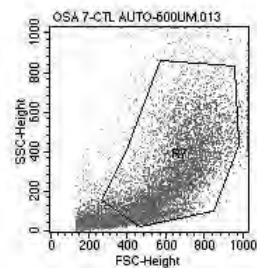
Marker	Events	% Gated	% Total	Median
AP	9651	100.00	90.68	11.14
MT	1280	12.99	11.77	29.24



File: OSA-B-VPG01.018
 Acquisition Date: 11-Nov-11
 Gate: G1
 Total Events: 10529

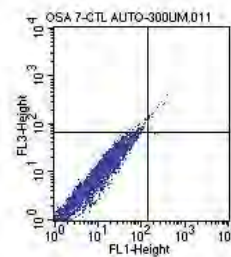
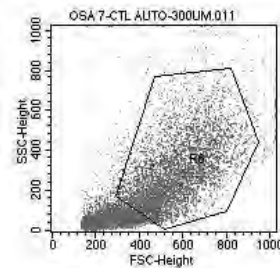
Marker	Events	% Gated	% Total	Median
AP	8854	100.00	82.95	11.97
MT	1541	15.81	14.50	46.22

Anexo 6: Tratamentos 24h / spOS-1 – Dados analisados pela Citometria de Fluxo



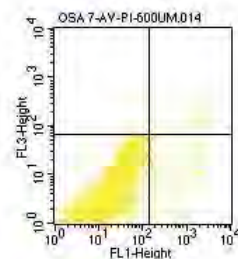
File: OSA 7-CTL AUTO-600UM.01
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G7
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	36	0.36	0.36
UR	12	0.19	0.12
LL	6118	99.22	61.18
LR	0	0.00	0.00



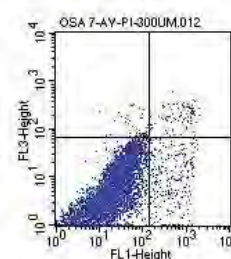
File: OSA 7-CTL AUTO-300UM.01
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G6
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	32	0.64	0.32
UR	12	0.24	0.12
LL	4938	99.10	49.38
LR	1	0.02	0.01



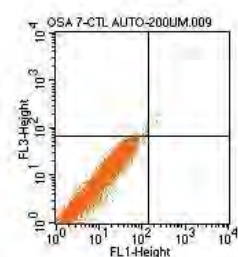
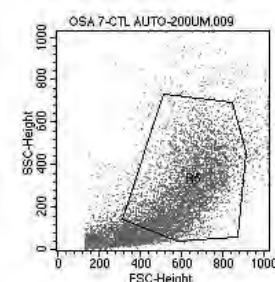
File: OSA 7-AV-PI-600UM.014
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G7
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	23	0.38	0.23
UR	99	1.64	0.99
LL	5580	92.18	55.60
LR	350	5.80	3.50



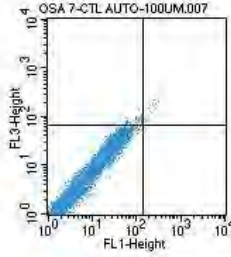
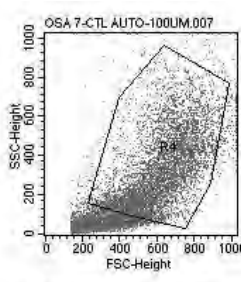
File: OSA 7-AV-PI-300UM.012
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G6
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	52	0.94	0.52
UR	93	1.68	0.93
LL	5104	92.46	51.04
LR	271	4.91	2.71



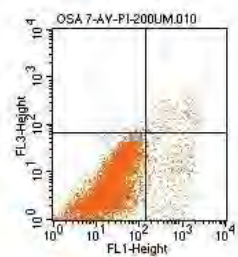
File: OSA 7-CTL AUTO-200UM.00
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G5
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	23	0.45	0.23
UR	7	0.14	0.07
LL	5113	99.42	51.13
LR	0	0.00	0.00



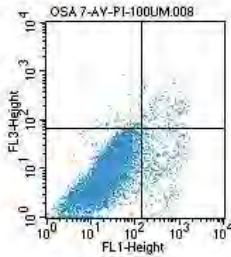
File: OSA 7-CTL AUTO-100UM.00
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G4
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	30	0.55	0.30
UR	16	0.29	0.16
LL	5403	99.16	54.03
LR	0	0.00	0.00



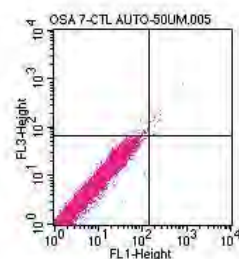
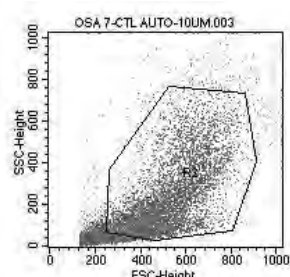
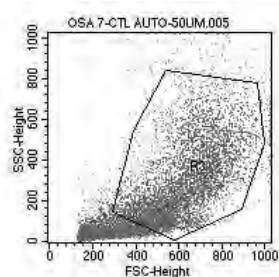
File: OSA 7-AV-PI-200UM.010
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G5
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	21	0.41	0.21
UR	105	2.06	1.05
LL	4704	92.40	47.04
LR	261	5.13	2.61



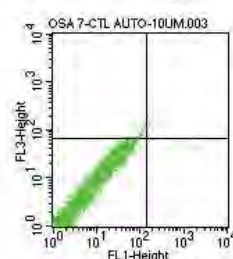
File: OSA 7-AV-PI-100UM.008
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G4
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	52	1.02	0.52
UR	112	2.21	1.12
LL	4651	91.59	46.51
LR	283	5.18	2.63



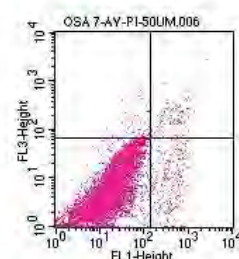
File: OSA 7-CTL AUTO-50UM.00
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G3
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	14	0.26	0.14
UR	12	0.22	0.12
LL	5495	99.53	54.95
LR	0	0.00	0.00



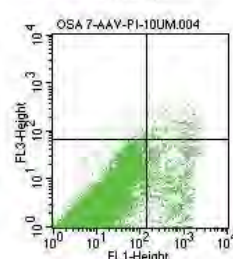
File: OSA 7-CTL AUTO-10UM.00
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G2
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	22	0.34	0.22
UR	8	0.12	0.08
LL	6483	99.49	64.83
LR	3	0.05	0.03



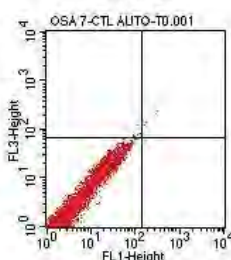
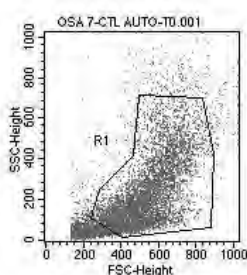
File: OSA 7-AV-PI-50UM.006
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G3
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	40	0.76	0.40
UR	77	1.46	0.77
LL	4989	94.31	49.89
LR	184	3.48	1.84



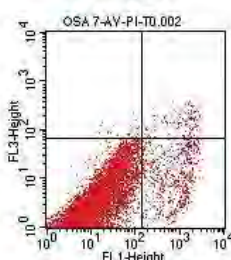
File: OSA 7-AV-PI-10UM.004
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G2
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	28	0.44	0.28
UR	115	1.82	1.15
LL	5536	87.76	55.36
LR	629	9.97	6.29



File: OSA 7-CTL AUTO-T0.00
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G1
Total Events: 9510

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	6	0.10	0.06
UR	5	0.08	0.05
LL	6024	99.82	63.34
LR	0	0.00	0.00



File: OSA 7-AV-PI-T0.002
Acquisition Date: 05-Oct-10
Gate: G1
Total Events: 10000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	23	0.37	0.23
UR	105	1.67	1.05
LL	5625	89.51	56.25
LR	531	8.46	5.31

Anexo 7: Protocolo de Imunoistoquímica

1. **Desparafinar e hidratar:** 2 X xilol, álcool absoluto, 95% e 70%, lavar em água corrente.
2. **Desmascaramento antigênico:** Em panela de pressão por três minutos em solução tampão citrato pH 6,00, após início da fervura.
3. **Bloqueio da peroxidase endógena:** Incubar em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ comercial 30%) a 10% em metanol.
4. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
5. *Usar o Kit Novolink[®]*
6. **Solução de bloqueio** (Blocking solution[®]): incubar por 30min em câmara úmida em temperatura ambiente.
7. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
8. **Anticorpo primário:** fazer as respectivas diluições e incubar em câmara úmida overnight a 4°C.
9. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
10. **Solução pós-primário** (Post-Primary solution[®]): incubar por 30min em câmara úmida em temperatura ambiente.
11. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
12. **Polímero** (Polymer solution[®]): incubar por 30min em câmara úmida em temperatura ambiente.
13. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
14. **Cromógeno:** revelar as marcações com DAB (diaminobenzidina em tampão TRIS 0,05M pH 7,6) por 2 a 7 min.
15. Lavagem em água corrente de 5 a 10 min.
16. **Contra-coloração:** contra-corar com Hematoxilina de Meyer por 1 min.
17. Lavagem em água corrente de 5 a 10 min.
18. **Desidratar, diafanizar e montar:** álcool 70%, 95% e 2 X absoluto, 2 X xilol, em seguida as lâminas foram montadas com lamínula e resina sintética (Permont).

Anexo 8: Protocolo de Imunocitoquímica

1. **Permeabilizar:** 10 min em solução de água destilada com acetona (1:1).
2. Deixar secar ao ar em temperatura ambiente.
3. **Hidratar:** álcool 70% e lavar em água corrente.
4. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
5. **Bloqueio da peroxidase endógena:** Incubar em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ comercial 30%) a 10% em metanol.
6. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
7. *Usar o Kit Novolink[®]*
8. **Solução de bloqueio** (Blocking solution[®]): incubar por 30min em câmara úmida em temperatura ambiente.
9. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
10. **Anticorpo primário:** fazer as respectivas diluições e incubar em câmara úmida overnight a 4°C.
11. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
12. **Solução pós-primário** (Post-Primary solution[®]): incubar por 30min em câmara úmida em temperatura ambiente.
13. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
14. **Polímero** (Polymer solution[®]): incubar por 30min em câmara úmida em temperatura ambiente.
15. Lavagem em solução TRIS 2 X 5min.
16. **Cromógeno:** revelar as marcações com DAB (diaminobenzidina em tampão TRIS 0,05M pH 7,6) por 2 a 7 min.
17. Lavagem em água corrente de 5 a 10 min.
18. **Contra-coloração:** contra-corar com Hematoxilina de Meyer por 1 min.
19. Lavagem em água corrente de 5 a 10 min.
20. **Desidratar, diafanizar e montar:** álcool 70%, 95% e 2 X absoluto, 2 X xilol, em seguida as lâminas foram montadas com lamínula e resina sintética (Permont).

- **SOLUÇÕES PARA AS REAÇÕES IMUNOREATIVAS**

SOLUÇÃO TAMPÃO TRIS

Trizma base SIGMA® – T-1503	6,0 g
Cloreto de sódio	8,5 g
Água destilada	100,00 mL

Ajustar solução para pH 7,4 com solução diluída de ácido clorídrico.

SOLUÇÃO TAMPÃO CITRATO pH 6,00

Ácido cítrico	2,1 g
Água destilada	1000,00 mL

Ajustar solução para pH 6,00 com solução diluída de hidróxido de sódio.

HEMATOXILINA DE MAYER

Hematoxilina	1,0 g
Iodato de sódio	0,2 g
Sulfato de amônio de alumínio 12 H ₂ O	50 g
Hidrate de cloral	50 g
Ácido cítrico	1 g
Água destilada	1000,00 mL

- **COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA (HE)**

HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina	5,00 g
Álcool etílico absoluto	50,00 mL
Sulfato de alumínio e potássio	100,00 g
Óxido de mercúrio	2,50 g
Água destilada	1000,00 mL

EOSINA

Eosina Y	5,00 g
Dicromato de potássio	2,50 g
Ácido pícrico aquoso saturado 1 a 1,5%	50,00 mL
Álcool etílico absoluto	50,00 mL
Água destilada	400,00 mL

Artigo submetido à Revista BMC Veterinary Research.

1921608033639991 Cyclo-oxygenase-2 inhibitor Celecoxib in canine
osteosarcoma cell culture

PARA: Você

Cc: Você + 5 Mais

Exibir detalhes

Corpo da mensagem

Article title: Cyclo-oxygenase-2 inhibitor Celecoxib in canine osteosarcoma cell culture

MS ID : 1921608033639991

Authors : Paulo Bersano, Maria Alves, Fátima Gartner, João Lima-Neto, Fernanda Landim and Noeme Rocha

Journal : BMC Veterinary Research

Dear Dr Bersano

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1921608033639991_article.pdf (1200K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1954519626639995_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to editorial@biomedcentral.com.

The submitting author can check on the status of the manuscript at any time by logging into 'My BioMed Central' (<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>

Role of selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor Celecoxib in canine osteosarcoma cell culture

Paulo RO Bersano^{1*}, Maria TS Alves², Maria FMR Gartner³,
João F Lima-Neto⁴, Fernanda C Landim⁴, Noeme S Rocha¹

¹Laboratory of Investigative and Comparative Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, Brazil.

²Department of Pathology, Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

³Institute of Molecular Pathology and Immunology of University of Porto, Porto, Portugal.

⁴Laboratory of Reproduction and Cellular Therapy, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, Brazil.

PROB	probersano@yahoo.com.br
MTSA	mtsaves@unifesp.br
MFMRG	fgartner@ipatimup.pt
JFLN	joaoferreiralima@yahoo.com.br
FCL	fernanda@fmvz.unesp.br
NSR	rochanoeme@fmvz.unesp.br

Abstract:

Background: Experimental studies have shown that cyclo-oxygenase-2 (Cox2) is related to the development and progression of tumors, since this enzyme is induced and expressed by cells such as macrophages, osteoblasts, "activated" endothelial cells, and tumor cells. Its activity in tumors includes proliferation, cell transformation, tumor growth, invasion and metastasis and may play an important role in carcinogenesis of the canine osteosarcoma, since it has high expression in tissue fragments. The combination of selective Cox2 inhibitors and other treatment modalities is the basis for a new anti-cancer therapy strategy. This *in vitro* study exposed primary cells of five different canine osteosarcoma cultures to selective Cox2 inhibitor at increasing concentrations and times.

Results: For Cox2 negative cultures, despite the absence of differences, greater sensitivity of cells to treatment was observed. For Cox2 positive cultures, a higher number of necrotic cells was observed ($P \leq 0.05$), when compared with negative cultures. For exposure times with Celecoxib doses, no difference ($P > 0.05$) was found between the three times analyzed for living, apoptotic and apoptotic / necrotic cells. There are similarities in the values of 24h and 48h, with slight reduction of living cells, increasing those undergoing apoptosis and apoptosis / necrosis. There was significance for necrosis ($P \leq 0.05$). In 72 hours, a significant difference was observed between the other two previous values ($P \leq 0.05$). It was found for $100\mu\text{M.L}^{-1}$, that there was a numerically greater signaling for apoptosis and lower ($P = 0.08$) for necrosis, and this point is the onset of the pharmacodynamic phenomenon, with drop in the values for living cells and increased number of necrotic cells, with a tendency ($P = 0.08$) for reducing the percentage of necrotic cells for the group of $100\mu\text{M.L}^{-1}$ when compared to that of $10\mu\text{M.L}^{-1}$.

Conclusions: For Cox2 positive and negative cultures, there was difference for necrotic cells and there was no difference between Cox2 positive and Cox2 negative groups in relation to the percentage of living cells and apoptotic and apoptotic / necrotic cells. At time of 72 hours, higher percentage of living cells, lower percentage of apoptotic cells and increased

percentage of necrotic cells in relation to groups of 24 and 48 hours was observed. A tendency for reducing the percentage of necrotic cells for group of 100 μ M.L-1 when compared to that of group of 10 μ M.L-1 was observed.

Background

Osteosarcoma (OS) is the primary bone tumor most frequently diagnosed in dogs, accounting for more than 80% of cases [1-2-3], representing excellent in vivo model for human OS [4-5], since its biology in dogs is similar [6]. This type of cancer accounts for approximately 2% to 5% of all cancers in dogs [7] and less than 1% in humans [8]. When compared to tumors in other organs, primary bone tumors are uncommon, but its importance is due to difficulties in treatment, since they cause a broad spectrum of lesions [9].

Cell culture is the maintenance of the artificial form of cells in appropriate containers and packaging. Cell strains are subcultures of a primary culture that has been submitted to several subsequent cultures until the moment it becomes a monoclonal homogeneous cell population with well-established phenotypic and behavioral characteristics, unlike primary cultures that show heterogeneous material of cell populations [10]. To isolate canine OS strains, Loukopoulos et al (2004) [11] have established 120 subcultures or subsequent passages of the same primary culture.

Therapy studies involving in vitro models in oncology have used primary cultures rather than monoclonal neoplastic cell strains because the primary culture expresses reality closer to what actually occurs in patients affected by the disease, by presenting different neoplastic clones. For this reason, the primary culture becomes an excellent model for research in oncology. [10].

Studies have shown that tumors exhibiting inflammatory processes related to the presence of Cox2 play an important role in the development and progression of tumors in several species, including proliferation, cell transformation, growth, invasion and metastasis [12].

Epidemiological surveys in man and dog with spontaneous tumors have shown that non-selective Cox2 inhibitors have chemopreventive effects and

antitumor activity on several types of cancers. Cox2 is being tested with the aim of treating and preventing cancer. The use of selective Cox2 inhibitors (coxibs) blocks the growth of many tumors through several mechanisms, mainly by anti-angiogenesis and pro-apoptotic effects. Preclinical findings have shown that the high Cox2 expression observed in human tumors in advanced stages is the basis for a new anticancer therapy strategy based on a combination of selective Cox2 inhibitors and other treatment modalities [13].

Thus, this *in vitro* study exposed primary cells of five different canine osteosarcoma cultures to selective Cox2 inhibitor at different concentrations and times.

Results and discussion

According to analysis of treatment with selective Cox2 inhibitor in positive and negative spOS cultures

Table 1 and Figure 1 show the values expressed in positive cultures (spOS-2, spOS-4 and spOS-6) for value found with living cells ($78.7 \pm 3.0\%$), apoptotic ($11.7 \pm 2.5\%$), apoptotic / necrotic ($4.3\% \pm 0.5$) and necrotic cells ($3.6\% \pm 0.5$), and values in negative cultures (spOS-1 and spOS-3) for value found with living cells ($74.7 \pm 3.7\%$), apoptotic ($18.1 \pm 3.0\%$), apoptotic / necrotic ($4.5\% \pm 0.6$) and necrotic cells ($3.1\% \pm 0.6$).

According to Table 1 and Figure 1, it could also be observed that in negative cultures, although no differences have occurred, these cells seemed to be more sensitive to treatment, as seen for living cells (78.7% positive > 74.4% negative), apoptotic (11.7% positive < 18.1% negative) and apoptotic / necrotic cells (4.3% positive < 4.5% negative); however, for positive cultures, a higher ($P \leq 0.05$) number of necrotic cells (3.6% positive > 3.1% negative) was observed when compared with negative cultures.

According to analysis of treatment with selective Cox2 inhibitor in function of times of 24h, 48h and 72h

No difference ($P > 0.05$) was found between the three times for living cells, apoptotic and apoptotic / necrotic cells in function of the exposure time with Celecoxib doses, as shown in Table 2 and Figure 2; however, there are

similarities in the values for times of 24h and 48h, with a slight reduction of living cells, increasing in the same way apoptotic and apoptotic / necrotic cells. However, significance was observed for the values of necrotic cells as shown in columns with different letters ($P \leq 0.05$). Thus, the phenomenon of necrosis at 24h and 48h, values were 2.8% and 1.7%, without statistical significance ($P > 0.05$); however, for time of 72 h with value of 5.7%, difference between the other two previous values was observed ($P \leq 0.05$). For the time of 72 hours, a significant increase ($P \leq 0.05$) was observed in the number of living cells (87.3%) in relation to previous times of 24 h (71.8%) and 48 h (70.4 %), being also found a large decrease of apoptotic cells ($P \leq 0.05$), shown for 24 h (20.0%) and 48 h (21.4%), a decrease for 72 h (3.23%), which was also observed for necrotic cells, whose value increased significantly ($P \leq 0.05$). However, there was no difference ($P > 0.05$) between the three times for the percentages of apoptotic / necrotic cells.

A likely explanation for the sudden increase of living cells and decreased number of apoptotic cells is the artificial selection that Celecoxib provided to cells in the different cultures; therefore, those resistant to different Celecoxib concentrations divided as usual, causing increased number of living cells and reduced number of apoptotic cells.

The significant number ($P \leq 0.05$) of necrotic cells (5.7%) compared to the other two previous values is due to the fact that the longest exposure time (72h) and highest concentrations of the selective Cox2 inhibitor provided lower cellular stability, higher signaling for apoptosis in the first moment, whose cells already underwent necrosis, thus they would be counted in the total percentages of treatments with different Celecoxib doses, which is consistent with Gupta et al (2004) [14], Fantappie et al (2007) [15] and Huang and Sinicrope, (2010) [16].

According to Gupta et al (2004) [14], Arico et al, (2002) [17] and Huang and Sinicrope, (2010) [16], Celecoxib has great ability to promote apoptosis and necrosis of tumor cells occurs as a side effect, a fact which corroborates our study, in which with increasing concentrations and time of 72h, a greater the number of necrotic cells was found.

According to analysis of different concentrations in treatments with selective Cox2 inhibitor

According to values shown in Table 3 and Figure 3, although there were no differences ($P \leq 0.05$) for living cells, apoptotic and apoptotic / necrotic cells, there is a slight reduction in the values of living cells and slight increase in the number of apoptotic cells. Thus, there was a trend for reducing the number of living cells and increasing the number of apoptotic cells. It was also identified that the concentration of $100\mu\text{M.L-1}$ numerically produced the largest signaling for apoptosis (20.8%) and the smallest ($P = 0.08$) for necrosis (1.7%), and this point can be identified as the onset of the pharmacodynamic phenomenon.

However, from this concentration on, there was a decrease in values of living cells and increase in the number of necrotic cells. In addition, there was a trend ($P = 0.08$) in reducing the percentage of necrotic cells for group of $100\mu\text{M.L-1}$ when compared to the group of $10\mu\text{M.L-1}$.

Conclusions

Comparing Cox2 positive and Cox2 negative cultures, it could be inferred that there was difference in cell necrosis, in which Cox2 positive cultures were greater than Cox2 negative cultures and that there was no difference between Cox2 positive and Cox2 negative cultures for the percentage of living cells and apoptotic and apoptotic / necrotic cells.

Groups of 72 h showed higher percentage of living cells, lower percentage of apoptotic cells and higher percentage of necrotic cells in relation to groups of 24 and 48 hours. It was also observed that there was no difference between apoptotic / necrotic groups for 24h, 48h and 72h.

There was a trend in reducing the percentage of necrotic cells for groups of $100\mu\text{M.L-1}$ when compared to groups of $10\mu\text{M.L-1}$, and there was no difference between the percentage of Celecoxib concentrations with the percentage of living cells and apoptotic and apoptotic / necrotic cells.

Methods

Ethical aspects and origin of the material under study

This study used primary cultures of canine osteosarcoma that were previously isolated and established by means of a panel of target biomarkers. Cell cultures were obtained in the routine of the Veterinary Hospital and FMVZ Veterinary Pathology Service - UNESP Campus of Botucatu, Brazil. All dog owners were informed about the study procedures, allowing the publication of data obtained in this study by signing the Free and Informed Consent Form. The study was approved by the FMVZ Ethics Committee – UNESP, Campus of Botucatu, protocol number 98/2008.

spOS primary cultures

This study used five spOS primary cultures isolated and characterized by means of biomarker panel such as the biochemical panel by alizarin red and by target proteins such as vimentin, cytokeratin, osteocalcin, osteopontin, osterix, cyclo-oxygenase-2. Values were determined by means of flow cytometry. In addition to flow cytometry, Cox2 was also evaluated by immunohistochemistry and separated into Cox2 positive and Cox2 negative cultures.

Cell culture and treatments

The following factorial arrangement was created from spOS primary cultures: 2 (positive, negative), x 7 (control, 10, 50, 100, 200, 300 and 600 μ M.L-1 Celecoxib) x 3 (24, 48 and 72h) with relative percentage of living cells and apoptotic, apoptotic – necrotic and necrotic cells. Thus, each cell culture was trypsinised in separate (TrypLE Select Invitrogen 12563-029), and counted with the aid of a Neubauer chamber and cultured in three 75 cm² flasks with 5x10⁶ cells per flask, which were used for treatment times of 24 h, 48 h and 72 h, respectively. For the beginning of treatments, cell cultures reached maximum at the 8th passage.

After 10 days of culture with confluence over 90%, each flask was individually trypsinized, and the cells were counted with the aid of a Neubauer chamber and cultured in seven 25 cm² flasks containing 106

cells per flask, with 5 ml of DMEM high glucose medium supplemented with 10% FCS, added of a combination of penicillin (100U/ml) with streptomycin (100mg/ml) and amphotericin-B (3µg/mL). After 24 hours, the treatments were initiated, and their culture media were replaced by others at the same concentrations of Fetal Calf Serum, Penicillin, Streptomycin and Amphotericin, but with the addition of increasing concentrations (control, 10, 50, 100, 200, 300 and 600 µM^L-1) of selective Cox2 inhibitor (celecoxib). The flasks were identified, packed and kept in incubator at 5% CO₂, 95% moisture and temperature of 37.5°C for 24h, 48h and 72h.

Flow cytometry

For the reading of Celecoxib-treated cells through flow cytometry, the entire culture medium was discarded in 15 mL tubes previously identified, being washed twice with PBS pH 7.2. Then, the cells were trypsinised, and the flask content (cell suspension with trypsin) was added in the respective 15 mL tubes initially identified with the culture media containing the treatments. Thus, it was possible to analyze all content present in the flask.

Subsequently, these tubes were centrifuged for 10 minutes at 2,000 RPM. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended with 200µL PBS pH 7.4 and added of Ca²⁺ and Cl⁻ and then this content was divided into two plastic tubes for cytometer (BD TM), each tube containing 100µL of PBS solution pH 7.4 added of Ca²⁺ and Cl⁻ and treated cells. One of the tubes was used as negative control, i.e., no substance was added after this procedure. The other tube was added of 5µL of Annexin V (A13201 – combined with Alexa Fluor 488 - Invitrogen) and left to rest for 30 min. Soon after, 1µL of Propidium Iodide was added and the sample was homogenized. After 10 min, all tubes were transferred to reading in the flow cytometer FACS Calibur BD TM, from the Blood Center of the Faculty of Medicine at Botucatu, UNESP, SP, Brazil.

In this reading, the dot plot system identified living cells, apoptotic cells and necrotic cells and those with double reading. The flow cytometry results were based on a sample of 10,000 cells and were expressed in percentages.

Statistical Analysis

The binomial dependent variables (percentage of living cells and apoptotic, apoptotic / necrotic, and necrotic cells) were evaluated using ANOVA followed by Tukey's test using PROC GLM of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Sources of variation in the model, including Cox2 positivity (more or less explicit) treatment (Control, 10, 50, 100, 200, 300 and 600 mM of Celecoxib), exposure time to Celecoxib (24, 48 and 72h) and first-order interactions; all effects were considered fixed effects. Data expressed in percentages not submitted to the normality test (Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov and Cramer-von Mises), were submitted to arcsine transformation. The main effects are presented in the absence of significant interaction. The results are presented as mean of least squares and standard error. For all tests, significance level of 5% was adopted ($P < 0.05$).

List of abbreviations

OS: Osteosarcoma

spOS: São Paulo – Osteosarcoma

Cox2: cyclo-oxygenase-2

Authors' Contributions

PROB: contributed substantially to the conception, design of the study and sampling, being involved in the elaboration of the manuscript, tables, charts and critical review of the intellectual content. MTSA: substantial importance in the experimental design, coordination, interpretation of results and critical review of the manuscript. MFMRG: played an important role in the design and review of the manuscript. JFLN: participated in the standardization and development of experimental studies. FCL: provided the laboratory for the development of in vitro studies and contribution to the standardization of techniques. NSR: conceived the study, participated in its design and coordination, and helped writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

PROB and NSR: Laboratory of Investigative and Comparative Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista – UNESP. Botucatu, Brazil.

MTSA: Department of Pathology, “Paulista” School of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

MFMRG: Institute of Molecular Pathology and Immunology of University of Porto, Porto, Portugal.

JFLN and FCL: Laboratory of Reproduction and Cellular Therapy, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Univ. Estadual Paulista – UNESP. Botucatu, Brazil.

Acknowledgments and funding

We acknowledge FAPESP (2009/53493-9) and (2009/53777-7) for the financial support and Mati Kiupel for substantial importance in the experimental design.

References

- [1] STRAW, R.C.; WITHROW, S.J. & POWERS, B.E. Management of canine appendicular osteosarcoma. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v.20, n.4, p.1141-1161, 1990.

- [2] HAMMER, A.S.; WEEREN, F.R.; PADGETT, S.L. Prognostic Factors in Dogs with Osteosarcomas of the Flat or Irregular Bones. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.31, n.4, p.321-326, 1995.

- [3] WOLFESBERGER, B.; WALTER, I.; HOELZL, C.; THALHAMAMMER, J.G.; EGERBACHER, M. Antioplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. *Research in Veterinary Science*, v. 80, n. 3, p.308-316, 2006

- [4] KIRPENSTEIJN, J.; TIMMERMAN-SPRANG, E.P.M.; GARDEREN, E.V.; RUTTEMAN, G.R.; LEEUWEN, I.S.L-V.; MOL, J.A. Growth hormone

gene expression in canine normal growth plates and spontaneous osteosarcoma. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 197, p. 179-185, 2002.

[5] MULLINS, M.N.; LANA, S.E.; DERNELL, W.S.; OGILVIE, G.K.; WITHROW, S.J; EHRHANT, E.J. Cyclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcomas, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.18, p.859-865, 2004.

[6] KHANNA, C.; KHAN, J.; NGUYEN, P.; PREHN, J.; CAYLOR, J.; YEUNG, C.; TREPEL, J.; MELTZER, P.; HELMAN, L. Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Research*. v.61, p.3750–3759, 2001.

[7] DERNELL, W.S.; EHRHART, N.P.; STRAW, R.C.; VAIL, D.M. Tumor of the Skeletal System. In: Withrow, S.J.; Vail, D.M. *Small Animal Clinical Oncology*. 4.ed.,. 2007. p.540-582.

[8] GORLICK. R.; KHANNA, C. Osteosarcoma. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.25, n.4, p.683–691, 2010.

[9] BRASILEIRO FILHO, G.; Sistema ósteo-articular. In: Bogliolo *Patologia*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. p.979-1035.

[10] FRESHNEY, R.I. *Culture of animals cells*. 6th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2010. 732p.

[11] LOUKOPOULOS, P.; O'BRIEN, T.; GHODDUSI, M.; MUNGALL, B.A.; ROBINSON, W.F. Characterisation of novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. *Research in Veterinary Science*, v.77, p.131- 141. 2004.

[12] FINAK,, G.; BERTOS, N.; PEPIN, F.; SADEKOVA, S.; SOULEIMANOVA, M.; ZHAO, H.; CHEN, H.; OMEROGLU, G.

METERISSIAN, S.; OMEROGLU, A.; HALLETT, M.; PARK, M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature Medicine*, v.14, p.518–27, 2008.

[(13] GASPARINI, G.; LONGO, R.; SARMIENTO, R.; MORABITO, A. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? *The Lancet Oncology*, v.4, p.605-615, 2003.

[14] GUPTA, S.; ADHAMI, V.M.; SUBBARAYAN, M.; MACLENNAN, G.T.; LEWIN, J.S.; HAFELI, U.O.; FU, P.; MUKHTAR, H. Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Cancer Research*. v.64, n.9, p.3334-3343, 2004.

[15] FANTAPPIÈ, O.; SOLAZZO, M.; LASAGNA, N.; PLATINI, F.; TESSITORE, L.; MAZZANTI, R. P-glycoprotein mediates celecoxib-induced apoptosis in multiple drug-resistant cell lines. *Cancer Research*. v.67, n.10, p.4915-423, 2007.

[16] HUANG, S.; SINICROPE, F.A. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells. *Autophagy*. v. 6, n.2, p.256-269, 2010.

[17] ARICO, S.; PATTINGRE, S.; BAUVY, C.; GANE, P.; BARBAT, A.; CODOGNO, P.; OGIER-DENIS, E. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *The Journal of Biological Chemistry*. v.31, p.27613-27621, 2002.

Table 1: Identification of living cells and apoptotic, apoptotic / necrotic and necrotic cells, according to the Cox2 expression

Cox2	Living	Apoptosis	Apoptosis necrosis	Necrosis
Positive	78.7 ±3.0	11.7 ±2.5	4.3 ±0.5	3.6 ±0.5a
Negative	74.4 ±3.7	18.1 ±3.0	4.5 ±0.6	3.1 ±0.6b

^{a, b} Different superscript letters in the same column differ ($P \leq 0.05$). Positive and Negative, according to the Cox2 expression through immunohistochemistry.

Table 2: Identification of living cells and apoptotic, apoptotic / necrotic and necrotic cells, according to the periods of 24h, 48h and 72h

Period - hours	Living	Apoptosis	Apoptosis necrosis	Necrosis
24	71.8 ±4.1a	20.0 ±3.4a	4.5 ±0.6	2.8 ±0.7a
48	70.4 ±4.1a	21.4 ±3.4a	4.6 ±0.6	1.7 ±0.7a
72	87.3 ±4.1b	3.23 ±3.4b	4.0 ±0.6	5.7 ±0.7b

^{a, b} Different superscript letters in the same column differ ($P \leq 0.05$).

Table 3: Identification of living cells and apoptotic, apoptotic / necrotic and necrotic cells according to increasing celecoxib concentrations

Celecoxib ($\mu\text{M.L-1}$)	Living	Apoptosis	Apoptosis necrosis	Necrosis
Control	86.0 ±6.3	6.0 ±5.1	4.0 ±1.0	4.4 ±1.1
10	80.1 ±6.3	10.2 ±5.1	4.2 ±1.0	5.8 ±1.1
50	76.5 ±6.3	17.6 ±5.1	3.2 ±1.0	3.4 ±1.1
100	75.0 ±6.3	20.8 ±5.1	5.6 ±1.0	1.7 ±1.1
200	74.1 ±6.3	18.9 ±5.1	4.5 ±1.0	2.7 ±1.1
300	70.5 ±6.3	12.9 ±5.1	4.6 ±1.0	2.9 ±1.1
600	73.5 ±6.3	17.8 ±5.1	4.6 ±1.0	2.5 ±1.1

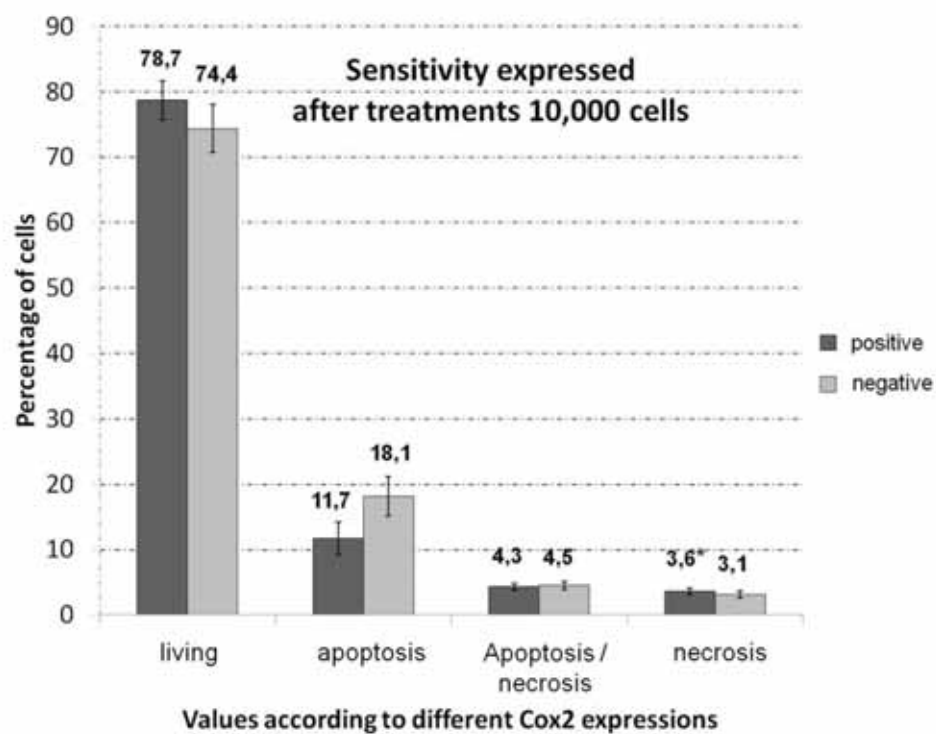
There was no significant difference ($P > 0.05$).

Figure legends:

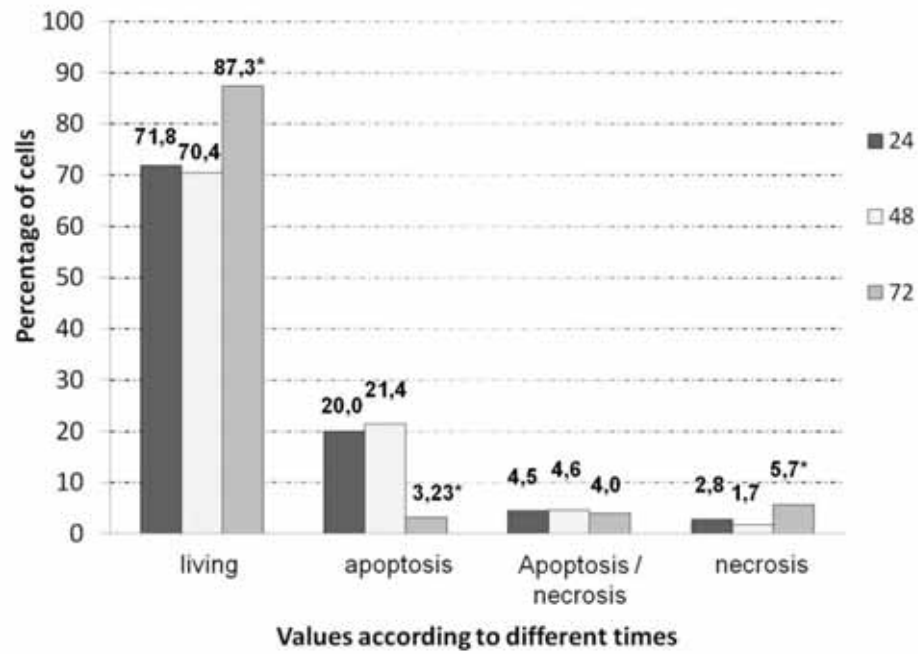
Figure 1: Percentages of living cells and apoptotic, apoptotic / necrotic and necrotic cells observed in the Cox2 positive and negative groups. * ($P \leq 0.05$).

Figure 2: Percentages of living cells and apoptotic, apoptotic / necrotic and necrotic cells observed in the groups of 24h, 48h and 72h of celecoxib exposure. * 72h differs ($P \leq 0.05$) from groups 24h and 48h.

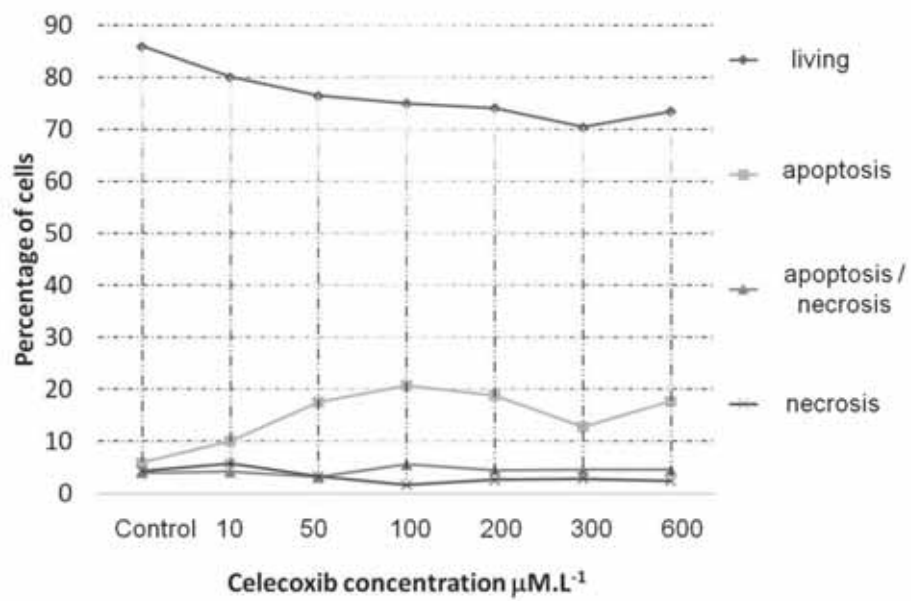
Figure 3: Percentages of living cells and apoptotic, apoptotic / necrotic and necrotic cells observed in the groups



Treatments in function of times



Celecoxib response dose profile



Belle prière à faire pendant la Messe

Seigneur, faites de moi un instrument de votre paix.

Là où il y a de la haine, que je mette l'amour.

Là où il y a l'offense, que je mette le pardon.

Là où il y a la discorde, que je mette l'union.

Là où il y a l'erreur, que je mette la vérité.

Là où il y a le doute, que je mette la foi.

Là où il y a le désespoir, que je mette l'espérance.

Là où il y a les ténèbres, que je mette votre lumière.

Là où il y a la tristesse, que je mette la joie.

Ô Maître, que je ne cherche pas tant à être consolé qu'à consoler, à être compris qu'à comprendre, à être aimé qu'à aimer, car c'est en donnant qu'on reçoit, c'est en s'oubliant qu'on trouve, c'est en pardonnant qu'on est pardonné, c'est en mourant qu'on ressuscite à l'éternelle vie.

La Clochette, n° 12, dec. 1912, p. 285.

*

Oração de São Francisco de Assis

Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor;

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;

Onde houver discórdia, que eu leve a união;

Onde houver dúvida, que eu leve a fé;

Onde houver erro, que eu leve a verdade;

Onde houver desespero, que eu leve a esperança;

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, Fazei que eu procure mais consolar, que ser consolado;

compreender, que ser compreendido; amar, que ser amado, pois, é dando que se recebe, é perdoando que se é perdoado, e é morrendo que se vive para a vida eterna.