



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

COMPARAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* ENTRE OS TRATAMENTOS COM  
RESVERATROL, *VISCUM ALBUM* E/OU DOXORRUBICINA EM CULTURA  
DE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO

FELIPE CÉSAR DA SILVA BRASILEIRO

Botucatu – SP

2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

COMPARAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* ENTRE OS TRATAMENTOS COM  
RESVERATROL, *VISCUM ALBUM* E/OU DOXORRUBICINA EM CULTURA  
DE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO

FELIPE CÉSAR DA SILVA BRASILEIRO

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária para obtenção do título de  
Mestre.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renée Laufer  
Amorim

Coorientadores: Prof. Dr. Carlos Eduardo  
Fonseca Alves e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Karina  
Delella

Botucatu – SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Brasileiro, Felipe César da Silva.

Comparação da resposta *in vitro* entre os tratamentos com resveratrol, *Viscum album* e/ou doxorubicina em cultura de células de osteossarcoma canino / Felipe César da Silva Brasileiro. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Renée Laufer Amorim  
Coorientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves  
Coorientador: Flávia Karina Delella  
Capes: 50503006

1. Cão - Doenças. 2. Osteossarcoma. 3. Oncologia.  
4. Técnicas *in vitro*. 5. Doxorubicina. 6. Resveratrol.

Palavras-chave: Cão; Compostos naturais bioativos; Oncologia comparada e translacional; Rato.

**Nome do Autor:** Felipe César da Silva Brasileiro

**Título:** COMPARAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* ENTRE OS TRATAMENTOS COM RESVERATROL, *VISCUM ALBUM* E/OU DOXORRUBICINA EM CULTURA DE CÉLULAS DE OSTEOSARCOMA CANINO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renée Laufer Amorim

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Membro

Departamento de Ciências Biológicas

FOB – USP – Bauru

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes

Membro

Departamento de Patologia

FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 1 de julho de 2022.

## **DEDICATÓRIA**

Esta dissertação é dedicada à minha família; razão pela qual vivo, prossigo e busco sempre me aperfeiçoar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que me foi oportunizado e, sempre, concluído com sucesso. Por toda fortaleza, vitalidade e jocosidade no enfrentamento de todas as situações, mesmo as que, por vezes, deixavam-me momentaneamente cabisbaixo e aflito. Tudo é passageiro e, por isso, não deve nos tirar a paz, aprendamos!

À melhor família que eu sempre pude ter e que, mesmo distantes, sempre se fizeram presentes, cada um da sua melhor maneira. Aos meus pais, Maria Helena e Júlio, minhas irmã Tâmisa e Nájlla, que sempre se mantiveram como meu esteio moral e ético e, de bom grado, também me oportunizaram o amor e a segurança psicológica/financeira que sempre necessitei para que pudesse me dedicar integralmente à minha formação.

À minha orientadora professora Renée Laufer-Amorim, por toda atenção e as inúmeras orientações, conversas e conselhos. Sempre extremamente presente. Com toda certeza, oportunizou experiências, guiou meus passos dentro e fora da pesquisa e facilitou minha vida. És uma pesquisadora excepcional, mas muito mais que isso; uma mulher e mãe inspiradora, competente, atenta, prestativa e sensível. Obrigado por me aceitar, acreditar em mim e auxiliar no meu processo de melhoria!

Aos meus coorientadores, professores Carlos Eduardo Fonseca-Alves e Flávia Karina Delella, por toda candura, prestatividade e apoio técnico, bem como todas as conversas, orientações e auxílios. Vocês foram um porto seguro ao qual pude atracar sempre que preciso. À professora Noeme Sousa Rocha, amiga e parceira de pesquisa que me deu valiosos conselhos de vida, além de oportunizar um excelente estágio de docência com liberdade criativa e possibilidades de aperfeiçoamento pedagógico e didático.

Aos meus amigos do trabalho que sempre me deram o apoio técnico e amparo emocional. Patrícia e Mirian, obrigado por todo meu treinamento inicial em cultura celular, vocês sempre serão um norte na minha conduta laboratorial. Zara, Gui, Alê, Thay, e Fer, sou grato por todos os nossos momentos dentro e fora da universidade, vocês foram vitais. Gi, você é uma amiga excepcional que

me apoiou e que dividiu a vida e a bancada comigo, nos tornamos partes vivas da pesquisa e vida um do outro, um especial obrigado.

Sou grato à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia por ter ofertado a estrutura necessária para a realização deste projeto de pesquisa, bem como aos seus valiosos servidores/residentes/pós-graduandos/professores que nunca mediram esforços para me auxiliar no que fosse preciso.

Agradeço, enormemente, à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo por ter outorgado o processo 2020/01639-9, o qual possibilitou a manutenção do bolsista e contribuiu com a execução desta pesquisa durante todo o período. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Viver é um rasgar-se e remendar-se”

**(Guimarães Rosa)**

“Sou do tamanho do que vejo e não do tamanho da  
minha altura”

**(Fernando Pessoa)**

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante  
das experiências. O homem que não tem olhos abertos para o  
mistério passará pela vida sem ver nada”

**(Albert Einstein)**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Epidemiologia.....	5
2.1.2 Patogenia .....	6
2.2 Abordagem terapêutica convencional.....	8
2.2.1 Modalidade terapêuticas – vantagens e limitações atuais, eficácia geral e sobrevida .....	8
2.3 Medicina integrativa – Compostos naturais bioativos .....	9
2.3.1 Fitoquímicos – histórico e desafios.....	9
2.3.2 Compostos naturais bioativos aplicados ao osteossarcoma .....	10
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 Objetivo geral.....	14
3.2 Objetivos específicos .....	14
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>15</b>
<b>4 TRABALHO CIENTÍFICO .....</b>	<b>16</b>
4.1 Resumo.....	16
4.2 Abstract.....	17
4.3 Introdução .....	18
4.4 Métodos .....	19
4.4.1 Cultivo celular e grupos experimentais.....	19
4.4.2 Análise de viabilidade celular .....	19
4.4.3 Análise de migração celular .....	20
4.4.4 Análise de apoptose .....	21
4.4.5 Análise estatística.....	22
4.5 Resultados .....	22
4.5.1 Viabilidade celular .....	22
4.5.2 Migração celular .....	27
4.5.3 Ensaio de apoptose.....	28
4.6 Discussão .....	31
4.7 Referências.....	36
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>42</b>

<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>50</b>

BRASILEIRO, F. C. S. **Comparação da resposta *in vitro* entre os tratamentos com resveratrol, *Viscum album* e/ou doxorrubicina em cultura de células de osteossarcoma canino.** Botucatu, 2022. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O osteossarcoma (OS) é uma neoplasia localmente agressiva e metastática cujas opções terapêuticas atuais mantêm-se pouco efetivas em neoplasias de alto grau/metastáticas, tanto em humanos, quanto nos animais. O *Viscum album* e o resveratrol, com atividade antitumoral, apresentaram citotoxicidade dose-dependente e reduziram a proliferação e motilidade de células de OS humano (*in vitro*); mas ainda não foram testados em células de OS canino e murino. O objetivo deste estudo foi descrever a ação antineoplásica do *V. album* homeopático e do resveratrol, comparados à doxorrubicina. Para isso, as linhagens de osteossarcoma canino (D17, OSA 8-4) e murino (UMR 106) foram cultivadas *in vitro*, subdivididas nos grupos tratados e controle, seguido de avaliação metabólica pela técnica de viabilidade celular (MTT – 24 a 72h), e de motilidade pelo teste de migração (transwell - 24h). Todos os fármacos exibiram inibição seletiva (dose-dependente) da viabilidade celular nas três linhagens celulares testadas. Para as células D17, OSA 8-4 e UMR 106, o *V. album* homeopático obteve IC50 de 22,38µL/mL, 25,19µL/mL e 28,82µL/mL; o resveratrol 18,52µM, 50,29µM e 24,83µM e a doxorrubicina 398,8nM, 777,3nM e 918,1nM, respectivamente. As doses encontradas nas IC50 dos compostos naturais bioativos foram todas capazes de inibir a migração celular e induzir a apoptose das linhagens testadas, com destaque para o resveratrol. Nossos resultados demonstram uma ação de diminuição de viabilidade celular, além de menor migração celular, fator importante considerando-se o grande potencial metastático dos OS. Esses resultados corroboram para a necessidade da realização de testes conjuntos destas substâncias para verificar efeitos de sinergismo, antagonismo e adição.

**Palavras-chave:** compostos naturais bioativos; oncologia comparada e translacional; cão; rato.

BRASILEIRO, F. C. S. **Comparison of *in vitro* response between treatments with resveratrol, *Viscum album* and or doxorubicin in canine osteosarcoma cell culture.** Botucatu, 2022. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

### ABSTRACT

Osteosarcoma (OS) is a locally aggressive and metastatic neoplasm whose current therapeutic options remain ineffective in high-grade/metastatic neoplasms, both in humans and animals. *Viscum album* and resveratrol, natural antitumor agents, showed dose-dependent cytotoxicity and reduced the proliferation and motility of human OS cells (*in vitro*); but they have not been yet tested in canine and murine OS cells. This study aimed to describe the antineoplastic action of homeopathic *V. album* and resveratrol compared to doxorubicin. For this, canine (D17, OSA 8-4) and murine (UMR 106) osteosarcoma cell lines were cultured *in vitro*, subdivided into treated and control groups, followed by metabolic assessment by the cell viability technique (MTT – 24 to 72h), and of motility by the migration test (transwell - 24h). All drugs exhibited selective (dose-dependent) inhibition of cell viability in the three cell lines tested. For D17, OSA 8-4, and UMR 106 cells, the homeopathic *V. album* obtained IC<sub>50</sub> of 22.38µL/mL, 25.19µL/mL, and 28.82µL/mL; resveratrol 18.52µM, 50.29µM and 24.83µM and doxorubicin 398.8nM, 777.3nM and 918.1nM, respectively. The doses found in the IC<sub>50</sub> of the bioactive natural compounds were inhibitory cell migration and inducing apoptosis in the tested cell lines, especially resveratrol. Our results demonstrate a capacity to decrease cell viability, besides lower cell migration, a significant factor considering the great metastatic potential of OS. These results corroborate the need to work on co-test of these substances to verify the effects of synergism, antagonism, and addiction.

**Keywords:** bioactive natural compounds; comparative and translational oncology; dog; mouse.

# **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

O osteossarcoma é uma neoplasia óssea agressiva e metastática que, de forma geral, similarmente acomete humanos e cães, exceto pelas faixas etárias. Em ambas as espécies, os tratamentos atuais somente retardam a evolução da doença, mas seguem por décadas sem afastar o prognóstico ruim e garantir longa sobrevida livre de doença, em casos de alto grau. Ao diagnóstico, boa parte dos pacientes apresentam micrometástases pulmonares, as quais evoluem para macrometástases e tornam-se as principais causas de morte.

Os desafios no tratamento efetivo do câncer vêm mobilizando esforços de pesquisas na busca infinda de novos medicamentos com bons resultados terapêuticos e com significativa segurança para o paciente. Ao contrário disso, parte dos quimioterápicos atuais possuem relevantes efeitos colaterais e, quando usadas em doses inferiores, apresentam maior inabilidade em controlar a progressão tumoral e garantir qualidade de vida, bem como uma maior sobrevida livre de doença.

A busca por alternativas medicamentosas é fundamentada na tentativa de melhor prognóstico em uma resposta terapêutica eficaz, bem como a garantia de qualidade de vida ao paciente. Sempre é necessário vislumbrar os efeitos direcionados às células cancerígenas, com boa margem de segurança, e com ausência ou mínimos efeitos colaterais. Outro fato a ser considerado é a seguridade durante sua manipulação. Nesse contexto, a adequada exploração dos recursos disponíveis na fauna e flora pode fornecer uma gama de novos compostos naturais bioativos a serem estudados em neoplasias como o osteossarcoma.

Os compostos naturais há décadas demonstram-se com fonte de medicamentos anticancerígenos – ou não – que podem ser utilizados em sua forma natural ou redesenhados de maneira em que o sintético possibilite melhor eficácia ou menores efeitos colaterais. Tecnologias de biodisponibilização, tal qual a nanotecnologia empregada à farmacologia, também podem ser utilizadas para aprimorar o desempenho destes e otimizar a resposta do paciente aos cuidados ofertados. A integração das terapias tradicionais com os novos

métodos alude a possibilidades futuras de garantir remissão tumoral e maior tempo livre sem doença e a qualidade de vida aos pacientes.

## **1 REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1.1 Epidemiologia**

Os tumores ósseos provocam intenso desconforto e afetam a mobilidade e, muitas vezes, ocasionam fraturas patológicas e perda da qualidade de vida. Afora isso, ainda possuem ampla capacidade de agressão local, metástase regional e/ou distante, e a possibilidade de síndromes paraneoplásicas (BELAYNEH et al., 2021; MAKIELSKI et al., 2019; PAOLONI; KHANNA, 2008).

As lesões ósseas são frequentes na clínica veterinária, figurando entre as mais observadas. Em cães, as alterações tumorais estão entre as principais causas de mortalidade, compreendendo 18%, bem como as traumáticas (17%) e as que afetam o sistema locomotor (13%) (BONNETT et al., 2005). Ainda, as neoplasias ósseas acometem humanos e animais, em especial os cães, muitas vezes com prognóstico desfavorável, culminando em óbito (MAKIELSKI et al., 2019).

Os osteossarcomas (OS) representam cerca de 80% dos tumores ósseos malignos em cães, ficando à frente do condrossarcoma e fibrossarcoma, e compõem cerca de 5 a 7% dos tumores malignos diagnosticados na espécie canina (TEDARDI et al., 2016). A idade média de surgimento da neoplasia é de aproximadamente sete anos e meio, porém com apresentações esporádicas em cães jovens. Algumas das principais raças acometidas compreendem São Bernardo, Pastor Alemão, Golden Retriever, Rottweiler e Fila Brasileiro, com predomínio em machos adultos (WHITERS et al., 2019; THOMPSON e DITTMER, 2017; DALECK et al., 2016; SZEWCZYK; LECHOWSKI; ZABIELSKA, 2015; MACEWEN et al., 2004).

Eles são subdivididos em medulares (centrais) e periosteais (periféricos), axiais e apendiculares; sendo os apendiculares mais comuns e o canal medular dos ossos longos o principal local de origem, em especial na região metafisária. Desse, os de origem central (medular) revelam fenótipo mais

agressivo e, por conseguinte, pior prognóstico (OLSON e CARLSON, 2017; THOMPSON e DITTMER, 2017; DALECK et al., 2016).

Nas neoplasias descritas em humanos, a ocorrência tumores primários ósseos é rara, e correspondem a 0,2% do total. Acometem mais as crianças e adultos jovens, bem como idosos com mais de 65 anos (BELAYNEH et al., 2021; CHOI; RO, 2021). Anualmente, em menores de 15 anos, relatam-se 5,6 novos casos a cada um milhão de indivíduos, e o principal sítio anatômico é a metáfise dos ossos longos, especialmente os distais (BELAYNEH et al., 2021) e com menos de 1000 casos novos em toda a população (MAKIELSKI et al., 2019). Apesar de não precisa, a incidência de novos casos em cães é entre 10-50 vezes maior que em humanos (MAKIELSKI et al., 2019).

### 1.1.2 Patogenia

O OS é um tumor ósseo maligno que tem origem na proliferação clonal de células osteoblásticas, com graus distintos de diferenciação, por vezes com características primitivas. Uma matriz extracelular (osteoide) imatura acompanha as células em quantidades variáveis, e essa pode apresentar transformações de cunho metaplásico e reativo (PENG; JIANG, 2018; OLSON e CARLSON, 2017; DALECK et al., 2016).

A despeito da etiopatogenia, mesmo não se sabendo com clareza, sugere-se que os microtraumas ósseos, inflamações crônicas, alimentação e o porte grande do cão, bem como fatores hormonais, genéticos e epigenéticos, estejam ligados na gênese desta neoplasia. O crescimento rápido e a curta expectativa de vida das raças grandes podem estar correlacionados. Os membros torácicos são os mais afetados, haja vista o eixo gravitacional com consequente suporte de cerca de 60% do peso corporal, o que pode predispor a microlesões repetidas e estas darem origem ao processo neoplásico (MAKIELSKI et al., 2019; OLSON e CARLSON, 2017; DALECK et al., 2016).

As células-tronco tumorais (CSC – *Cancer Stem Cells*) também são indicadas como possíveis responsáveis da iniciação tumoral. São hábeis em realizar autorrenovação, promovem a diferenciação e desdiferenciação celular, bem como auxiliam na manutenção das subpopulações neoplásicas. Estas possuem capacidade totipotente ou pluripotente, com ampla promoção de

invasão adjacente e metástases. Além disso, é referido que estas células apresentam resistências às terapias convencionais (COSTA et al., 2019; GATTI et al., 2018; PANG et al., 2014; PENG; JIANG, 2018; SANTALIZ-RUIZ et al., 2014; VESELSKA et al., 2008; WILSON et al., 2008)

Em virtude de novas opções terapêuticas, caracterizar esse grupo de células é necessário. Estudos realizados com osteossarcoma humano apontam a co-expressão dos marcadores de células tronco tumorais como uma forma eficaz de identificação. As principais proteínas investigadas são CD133, CD117, STRO1, STAT3, NANOG, OCT3/4 (PENG; JIANG, 2018; SANTALIZ-RUIZ et al., 2014; VESELSKA et al., 2008).

Já em células de osteossarcoma canino, as que tinham perfil pluripotente ou embriogênico também passaram a expressar NANOG, OCT3/4, STAT3, CD133, em regra (GATTI et al., 2018; PANG et al., 2014; WILSON et al., 2008). A exemplo da ocorrência em outras neoplasias caninas, Costa et al.,(2019) também evidenciaram e caracterizaram as células-tronco tumorais do carcinoma de próstata canino a partir da expressão de NANOG, Nestin, OCT3/4, CD44 (+) e CD24 (-).

Nestin é uma proteína estrutural (filamento intermediário VI), inicialmente descrita em células-tronco neurais, também correlacionada com o ciclo/estresse celular, e desenvolvimento tumoral mediado pelas CSC (COSTA et al., 2019; NERADIL; VESELSKA, 2015). OCT3/4 atua diretamente na regulação transcricional de genes indutores de pluripotência e desdiferenciação celular, e seu decréscimo já foi notado em CSC (COSTA et al., 2019; GATTI et al., 2016; PANG et al., 2014; WANG; CHIOU e WU, 2013). Já NANOG é um homeodomínio divergente, intimamente correlacionado com OCT3/4 e Sox2 como chaves de codificação de fatores transcricionais associados às características embrionárias de CSC (COSTA et al., 2019; PANG et al., 2014; WANG; CHIOU; WU, 2013; WILSON et al., 2008).

## 1.2 Abordagem terapêutica convencional

### 1.2.1 Modalidade terapêuticas – vantagens e limitações atuais, eficácia geral e sobrevida

A terapia convencional do osteossarcoma, em cães e humanos, compreende a abordagem cirúrgica, a quimioterapia e a radioterapia. Em caso de excisão tumoral, escolha primária, esta pode ser feita por meio de amputação radical do membro ou preservação com retirada do tumor primário e uso de aloenxertos corticais. A extensão e a localização da lesão, além da recusa da amputação, por parte dos tutores, são fatores determinantes na escolha entre a amputação ou tratamento cirúrgico conservativo. Confere alívio imediato, melhora o prognóstico e adia a eventual eutanásia (DALECK et al., 2016; SZEWCZYK; LECHOWSKI; ZABIELSKA, 2015).

A quimioterapia, na medicina veterinária, tem o intuito de ser paliativa e não curativa, agregando mais qualidade de vida, com intensidade e duração inferiores aos praticados na medicina humana (OLSON e CARLSON, 2017; THOMPSON e DITTMER, 2017; DALECK et al., 2016). Os principais fármacos utilizados na quimioterapia adjuvante para o OS são a doxorubicina, a carboplatina e a cisplatina, capazes de retardar os processos metastáticos nas doses preconizadas (DALECK et al., 2016; SZEWCZYK; LECHOWSKI; ZABIELSKA, 2015).

Como um exemplo, a doxorubicina é um antibiótico (antraciclina) descoberto em 1970 e com origem em uma bactéria anaeróbia (*Streptomyces peucetius*). A doxorubicina é oxidada em uma semiquinona instável que é reconvertida à doxorubicina e nesse processo gera múltiplas espécies reativas de oxigênio (ROS); seus principais mecanismos – prováveis – compreendem as lesões às membranas celulares por peroxidação lipídica pelas ROS, além das intercalações e lesões no DNA mediadas por danos à topoisomerase II, enzima participante do processo de reparo ao DNA, estes processos deflagram a apoptose celular. Apesar de controversos, os principais mecanismos da cardiotoxicidade provocada pela doxorubicina incluem radicais livres férricos e formação de doxorubicinol, e disrupção mitocondrial. Os efeitos colaterais cardíacos e o desenvolvimento de resistência ao fármaco são os principais entraves na utilização da doxorubicina (THORN et al., 2011).

Esses fármacos apresentam diferentes efeitos colaterais, sendo os principais a cardio e nefrotoxicidade. Outro fato importante é que, por vezes, os tutores dos animais resistem à quimioterapia, devido aos efeitos adversos. Já a radioterapia é utilizada quando as técnicas cirúrgicas não são possíveis, possibilitando antalgia eficiente e redução tumoral (DALECK et al., 2016). Porém, não há equipamentos disponíveis em todas as cidades de nosso país.

Pacientes humanos que apresentam variantes de baixo grau do osteossarcoma, no geral, 90% atingem sobrevida de 5 anos livre de doença. Já os pacientes que apresentam metástases no momento do diagnóstico primário, apresentam 10 e 40%. A taxa de recorrência compreende a faixa de 30 a 40% e a mortalidade é alta; 70% dos casos (BELAYNEH et al., 2021). Cerca de 80% dos cães diagnosticados com osteossarcoma apresentam doença progressiva e morrem em função de metástases pulmonares (SZEWCZYK; LECHOWSKI; ZABIELSKA, 2015).

### **1.3 Medicina integrativa – Compostos naturais bioativos**

#### **1.3.1 Fitoquímicos – histórico e desafios**

Há mais de meio século as pesquisas com compostos naturais vêm contribuindo para o desenvolvimento de fármacos naturais, semissintéticos e sintéticos aplicáveis à rotina; inclusive com estes compreendendo, aproximadamente, 25% das drogas antineoplásicas aprovadas nas últimas quatro décadas. Quando se trabalha com compostos naturais, estes podem necessitar de cuidadosa seleção para uma acurácia clínica e evasão de efeitos colaterais significativos, por vezes tóxicos. A medicina tradicional/popular utiliza da farmacopeia natural desde os primórdios, fato que nos dá certos direcionamentos às novas pesquisas que visem elucidar os mecanismos de ação e conferir maior segurança na utilização de tais compostos na oncologia humana e veterinária, ou mesmo descartar o uso (VIEIRA et al., 2022; HUANG; LU; DING, 2021).

Há desafios que são relativos a verificar a capacidade citotóxica do fármaco e, também muito importante, visibilizar quaisquer características de estímulo à proliferação celular (VIEIRA et al., 2022; HUANG; LU; DING, 2021). A manutenção de concentrações séricas adequadas para o efeito proposto, bem

como a disponibilização nos alvos tissulares é outro fato que requer atenção; isso demonstra que, às vezes, as fontes naturais destes compostos não suprimem a necessidade do paciente, carecendo de suplementação, bem como de tecnologias que confirmam amparo à adequada biodisponibilidade (HUANG; LU; DING, 2021; WITHERS et al., 2018)

### **1.3.2 Compostos naturais bioativos aplicados ao osteossarcoma**

Visto que os protocolos terapêuticos atuais somente retardam o avanço da doença e não afastam o prognóstico desfavorável, novas terapias devem ser pesquisadas, especialmente aquelas que possam apresentar menores efeitos colaterais. Nesse contexto, uma série de compostos naturais vêm sendo utilizados na medicina humana a fim de criar alternativas terapêuticas. Os mais pesquisados incluem os extratos de *Viscum album*, resveratrol, curcumina, apigenina, entre outros (PENG; JIANG, 2018; ANGULO et al., 2017; BONAMIN; CARVALHO; WAISSE, 2017; KLEINSIMON et al., 2017).

O resveratrol (trans-3, 4', 5 trihydroxystilbene, Resveratrol) é um polifenol e fitoalexina derivado do estilbeno, com sua primeira extração dada a partir do Heléboro Branco, e disponível em mais de 70 espécies. Apesar disso, ele está disponível em variadas plantas, em diferentes concentrações, sendo as principais as uvas e outras frutas vermelhas/roxas, além de amendoim, entre outros. Em múltiplos tumores exibiu efeitos pró-apoptóticos, de estase do ciclo celular e inibição da proliferação de células tumorais. Contudo, os mecanismos exatos ainda são pouco esclarecidos (ANGULO et al., 2017; BHASKARA et al., 2020; PENG; JIANG, 2018). Outros estilbenoides também exercem efeitos similares.

Segundo Peng e Jiang (2018), em estudo com cultura de células de osteossarcoma humano, utilizando concentrações entre 20 e 40  $\mu\text{M}$ , observou-se inibição do crescimento celular, redução das células-tronco tumorais, indução apoptótica e inibição da via JAK2/STAT3. O resveratrol ganhou notório reconhecimento em pesquisa mundo afora após estas visibilizarem as suas propriedades biofarmacológicas como um potente antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, anti-idade, imunomodulador e antitumoral natural; mesmo que

os seus mecanismos ainda permaneçam incertos (CHHABRA et al., 2021). Recentes estudos ainda buscam por elucidar suas funções também em doenças degenerativas, como é o caso do Alzheimer onde ele exerce neuroproteção (GU et al., 2021).

Lux et al., (2019) observaram uma eficácia antinociceptiva do resveratrol com uso agudo e crônico em um modelo de dor óssea provocada por metástases e, ainda, sugerem que a sinalização molecular exercida por SIRT1 (Silent Information Regulator 1) pode ser a chave para tal efeito. Já Zhu et al. (2017) verificaram – em modelo de dor óssea por metástases – que as alterações de pH que cursam com acidose tissular e induzem respostas por meio dos receptores TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid receptor type 1) e ASIC3 (Acid-sensing ion channels 3) são atenuadas pela administração do resveratrol. Em se tratando do osteossarcoma, um tumor ósseo agressivo e doloroso, tais benefícios antálgicos e citotóxicos são mais que desejados, e é provável que mecanismos similares possam exercer o controle da dor de uma neoplasia primária, conforme ocorre nas metástases.

O visco (*Viscum album*) é tido como uma planta hemiparasita, principalmente encontrada em pinheiros e amendoeiras, e o seu extrato é utilizado no tratamento de várias neoplasias há cerca de 80 anos em humanos. Este extrato aquoso contém uma série de princípios ativos (ex. lecitinas, viscotoxinas, alcaloides, flavanoides, triterpenos, aminoácidos e polissacarídeos), e as lecitinas e viscotoxinas possuem os efeitos antitumorais mais evidentes, como a citotoxicidade e indução da apoptose (BONAMIN; DE CARVALHO; WAISSE, 2017; KIENLE; KIENE, 2010; KLEINSIMON et al., 2017).

Há grande influência da quantidade e do momento em que é realizada a coleta do visco nas características do medicamento final. Podem ser realizadas quatro coletas do visco, duas no inverno e duas no verão. A exemplo, o Helixor® é composto pelo extrato de *Viscum album* ( $\frac{3}{4}$  inverno e  $\frac{1}{4}$  verão). A composição é predominantemente invernal devido à maior concentração de lecitinas nas amostras desse período. Dessa maneira, haja vista as funções supracitadas das lecitinas, esse fato garante um maior efeito citotóxico e antitumoral ao medicamento (SCHLODDER; GARDIN, 2011).

Segundo Kleinsimon et al. (2017), em estudo com cultura de células de osteossarcoma humano, notou-se os efeitos de inibição da proliferação tumoral e indução apoptótica através da despolarização mitocondrial, ativação de caspases por liberação do citocromo c. Além disso, observou-se também um efeito sinérgico do visco quando combinado com diferentes quimioterápicos, potencializando a apoptose.

A curcumina é derivada do extrato das raízes do açafrão da terra e apresentou-se eficiente na redução da viabilidade da linhagem de osteossarcoma canino D17. As concentrações entre 0 e 10 $\mu$ M não exerceram efeitos inibitórios significativos no período de 24h, entretanto a citotoxicidade aumentou significativamente quando o tempo de exposição à droga passou para 48 ou 72h. Adicionalmente, houve significativo decréscimo na IC 50, sendo elas de 61,51, 47.80 e 39.41  $\mu$ M, respectivamente; ela também conferiu perda na capacidade vital e proliferativa, mediada pela indução de caspases 3 e 7, bem como subexpressão de Bcl-2 e superexpressão de Bax (SEVRI et al., 2021).

Apesar disso, a curcumina demonstrou pouca biodisponibilidade sérica, isso devido às características de absorção e eliminação. Esta característica dificulta a manutenção de concentrações circulantes capazes de produzir o efeito antitumoral requerido. Dessa maneira, WITHERS et al. (2018) utilizaram a curcumina encapsulada por lipossomos visando uma maior biodisponibilidade dessa nos tecidos alvos por meio de uma entrega venosa eficaz. Os pulmões apresentaram concentrações tissulares significativamente maiores com o "Lipocurc", com inibição da proliferação celular e angiogênese, *in vitro*. *In vivo*, a administração de 10mg/kg em cães, em sessões semanais de oito horas, mostrou-se bem tolerada, apesar de carecer de maiores ensaios de segurança.

Os efeitos isolados e associados dos extratos de cúrcuma (raiz) e alecrim (folhas) em linhagens celulares de mastocitoma, carcinoma mamário e osteossarcoma, visibilizaram que a associação destes apresentou maior potencial citotóxico e apoptótico que os extratos isolados, o que reforça a existência de sinergismo entre estes. Por sua vez, isso demonstra a necessidade de maior investigação do uso conjunto dessas substâncias e das possíveis

associações em novos protocolos terapêuticos em ensaios clínicos controlados (LEVINE et al., 2017). Já o extrato bruto de folhas de jatobá promoveu a proliferação de células de osteossarcoma canino (D17) quando em concentrações entre 2000 e 5000µg/mL, bem como provocou a super-expressão de Bcl2, Ki-67 e p53 em ensaio imuno-histoquímico (VIEIRA et al., 2022). Este fato visibiliza a urgente cautela na utilização de fitoquímicos não aprovados e/ou não utilizados conforme a prescrição de um médico especialista.

O cânhamo, ou seja, o extrato da *Cannabis sativa* com baixa concentração de tetrahydrocannabinol, é amplamente utilizado na medicina veterinária, porém com pouco embasamento técnico mediado por pesquisas amplas e controladas. O ácido canabidiólico (CBDA) é o principal composto, mas após a extração térmica, este converte-se em canabiol (CBD), o qual exerce efeitos antitumorais, dentre outros. Este último demonstrou efeitos antiproliferativos e indutores autofágicos e apoptóticos – melhores que o do CBDA – em linhagens neoplásicas caninas (incluindo a D17) quando estas eram expostas a concentrações entre 2,5 e 10µg/mL. Além disso, exerceu efeitos sinérgicos com a vincristina e efeitos ainda não elucidados quando em conjunto com a doxorubicina (HENRY et al., 2021).

O pequi é um fruto frequentemente consumido nas regiões do cerrado e há vários relatos do uso da planta na medicina local, mas a sua casca é pouco explorada. O extrato etanólico da casca do pequi foi avaliado e exerceu efeitos inibitórios no crescimento das células de osteossarcoma – D17 – (IC50 155,2 µg/mL – 72h) e relevante apoptose tardia (BRAGA et al., 2022). Também, em células D17, o extrato hidroalcolico da *Artemisia annua* mostrou-se mais potente que o seu principal ativo isolado – artemisina – o que sugere que outras moléculas podem exercer efeito citotóxico sinérgico, este de maneira dose-dependente (ISANI et al., 2019).

Uma das várias árvores designadas por ipê, presentes na biodiversidade brasileira, a *Tabebuia sp.*, contribuiu com o desenvolvimento do quimioterápico β-lapachona, uma naftoquinona presente no extrato de sua madeira e que exhibe propriedades citotóxicas e genotóxicas. Esta, por sua vez, exibiu efeitos citotóxicos em células de osteossarcoma canino, estes mediados

pela deflagração da via intrínseca da apoptose em uma exposição de 72h, com IC50 de 0,18 $\mu$ M (CRUZ et al., 2018).

Os compostos naturais disponíveis na literatura são vastos e, ainda assim, outros tantos serão descobertos. Com esperança por um medicamento que possa complementar a quimioterapia convencional e com boa tolerabilidade pelos pacientes, carece-se de múltiplas pesquisas para a identificação de novos princípios ativos, estabelecimento de mecanismos de ação, ensaios clínicos randomizados que permitam a avaliação da real eficácia e da segurança do seu uso, além de tecnologias que permitam um uso mais eficaz destes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o *Viscum album* homeopático e o resveratrol quanto ao potencial citotóxico e antiproliferativo desses compostos de forma isolada ou em associação à doxorubicina (controle interno de citotoxicidade), em células de osteossarcoma, *in vitro*.

### **2.2 Objetivos específicos**

Definir o melhor efeito antitumoral (IC 50) do *Viscum album* homeopático, resveratrol e doxorubicina; e visibilizar o mecanismo geral de indução de morte celular.

Avaliar a capacidade do *Viscum album* homeopático, resveratrol e doxorubicina em inibir a migração das células de osteossarcoma.

## **CAPÍTULO II**

### 3 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser encaminhado para a revista *Veterinary and Comparative Oncology*.

#### **Linhagens de osteossarcoma canino e murino respondem ao tratamento *in vitro* com resveratrol e *Viscum album* CH 200**

*Canine and murine osteosarcoma cell lines response to in vitro treatment with resveratrol and Viscum album CH200*

Felipe C S Brasileiro<sup>1\*+</sup>; Giovana Pedro<sup>1</sup>; Mayara S Franzoni<sup>2</sup>; Rodrigo C Oliveira<sup>3</sup>; Cristina O M S Gomes<sup>4</sup>; Flávia K Delella<sup>5</sup>; Carlos E Fonseca-Alves<sup>2+</sup> e Renée Laufer-Amorim<sup>1+</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, BRA.

<sup>2</sup>Departamento Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, BRA.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, BRA.

<sup>4</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BRA.

<sup>5</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, BRA.

\*Autor correspondente: [felipe.brasileiro@unesp.br](mailto:felipe.brasileiro@unesp.br)

\*Informações de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP: Processos 2020/01639-9, 2019/00766-0 e 2019/24079-1; Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq: Processo 309161/2020-7

#### **3.1 Resumo**

O osteossarcoma (OS) é uma neoplasia localmente agressiva e metastática cujas opções terapêuticas atuais mantêm-se pouco efetivas em neoplasias de alto grau/metastáticas, tanto em humanos, quanto nos animais. O *Viscum album* e o resveratrol, com atividade antitumoral, apresentaram citotoxicidade dose-dependente e reduziram a proliferação e motilidade de células de OS humano (*in vitro*); mas ainda não foram testados em células de OS canino e murino. O objetivo deste estudo foi descrever a ação antineoplásica do *V. album* homeopático e do resveratrol, comparados à doxorubicina. Para isso, as linhagens de osteossarcoma canino (D17, OSA 8-4) e murino (UMR 106) foram cultivadas *in vitro*, subdivididas nos grupos tratados e controle, seguido de

avaliação metabólica pela técnica de viabilidade celular (MTT – 24 a 72h), e de motilidade pelo teste de migração (transwell - 24h). Todos os fármacos exibiram inibição seletiva (dose-dependente) da viabilidade celular nas três linhagens celulares testadas. Para as células D17, OSA 8-4 e UMR 106, o *V. album* homeopático obteve IC50 de 22,38µL/mL, 25,19µL/mL e 28,82µL/mL; o resveratrol 18,52µM, 50,29µM e 24,83µM e a doxorubicina 398,8nM, 777,3nM e 918,1nM, respectivamente. As doses encontradas nas IC50 dos compostos naturais bioativos foram todas capazes de inibir a migração celular e induzir a apoptose das linhagens testadas, com destaque para o resveratrol. Nossos resultados demonstram uma ação de diminuição de viabilidade celular, além de menor migração celular, fator importante considerando-se o grande potencial metastático dos OS. Esses resultados corroboram para a necessidade da realização de testes conjuntos destas substâncias para verificar efeitos de sinergismo, antagonismo e adição.

**Palavras-chave:** compostos naturais bioativos; oncologia comparada e translacional; cão; rato.

### 3.2 Abstract

Osteosarcoma (OS) is a locally aggressive and metastatic neoplasm whose current therapeutic options remain ineffective in high-grade/metastatic neoplasms, both in humans and animals. *Viscum album* and resveratrol, natural antitumor agents, showed dose-dependent cytotoxicity and reduced the proliferation and motility of human OS cells (in vitro); but they have not been yet tested in canine and murine OS cells. This study aimed to describe the antineoplastic action of homeopathic *V. album* and resveratrol compared to doxorubicin. For this, canine (D17, OSA 8-4) and murine (UMR 106) osteosarcoma cell lines were cultured in vitro, subdivided into treated and control groups, followed by metabolic assessment by the cell viability technique (MTT – 24 to 72h), and of motility by the migration test (transwell - 24h). All drugs exhibited selective (dose-dependent) inhibition of cell viability in the three cell lines tested. For D17, OSA 8-4, and UMR 106 cells, the homeopathic *V. album* obtained IC50 of 22.38µL/mL, 25.19µL/mL, and 28.82µL/mL; resveratrol 18.52µM, 50.29µM and 24.83µM and doxorubicin 398.8nM, 777.3nM and 918.1nM, respectively. The doses found in the IC50 of the bioactive natural

compounds were inhibitory cell migration and inducing apoptosis in the tested cell lines, especially resveratrol. Our results demonstrate a capacity to decrease cell viability, besides lower cell migration, a significant factor considering the great metastatic potential of OS. These results corroborate the need to work on co-test of these substances to verify the effects of synergism, antagonism, and addiction.

**Keywords:** bioactive natural compounds; comparative and translational oncology; dog; mouse.

### 3.3 Introdução

A incidência do osteossarcoma (OS) em cães é cerca de 10-50 vezes superior à de humanos, e estes compartilham muitas características no tocante à biologia tumoral (MAKIELSKI et al., 2019), o que os torna bons modelos experimentais para humanos. Já ratos, apesar de não apresentarem ocorrência espontânea significativa do OS, são bons modelos de carcinogênese experimental, bem como possibilitam a realização de alo e xenotransplantes e outros estudos de base (BECK et al., 2022).

Cerca de 70-80% dos humanos e cães, respectivamente, com metástases pulmonares ao diagnóstico evoluem para o óbito (BELAYNEH et al., 2021; SZEWCZYK; LECHOWSKI; ZABIELSKA, 2015); e, apesar das evoluções constantes, as terapias disponíveis não apresentam mudanças significativas no prognóstico e sobrevida nas últimas quatro décadas (BECK et al., 2022; BELAYNEH et al., 2021).

Os compostos naturais podem ser adicionados ao tratamento convencional; e a fauna e flora são responsáveis por cerca de 25% de todos os medicamentos anticâncer aprovados desde a década de 80 (HUANG; LU; DING, 2021; VIEIRA et al., 2022). Exemplos deste são o resveratrol e o *Viscum album*, compostos naturais que exercem importante papel antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral, com utilização variada e múltiplas pesquisas, inclusive para o osteossarcoma humano (GALINIAK; AEBISHER; BARTUSIK-AEBISHER, 2019). Tais compostos ainda carecem de pesquisas para a oncologia veterinária; portanto o objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficácia do resveratrol e do *Viscum album*, em cultura de células de osteossarcoma canino e murino, comparados com a doxorrubicina.

### **3.4 Métodos**

#### **3.4.1 Cultivo celular e grupos experimentais**

Para este estudo foram utilizadas uma linhagem de osteossarcoma murino (UMR106 (CRL-1661, ATCC, USA), uma linhagem de osteossarcoma canino D17 (CCL-183, ATCC, USA) e uma cultura primária estabelecida por nosso grupo (OSA 8-4, FMVZ, UNESP, BRA), proveniente de uma fêmea, 12 anos de idade, com osteossarcoma em fêmur.

As células D17 e OSA 8-4 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) F12 com HEPES e L-glutamina (LGC Biotecnologia, SP, BRA) e a UMR106 em meio DMEM High Glucose – estes acrescidos de 10-20% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, SP, BRA), 1% de solução de gentamicina [10mg/ml] (GIBCO, Life Technologies Corporation, NY, USA) e 0,5% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma Aldrich, MO, USA); incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> à 37,5°C, e expandidas até a confluência de 80% do frasco de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (SPL Life Science, KOR).

Quando já confluentes, o meio era descartado e procedia-se dois enxágues com DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline - LGC Biotecnologia, SP, BRA) estéril, seguidas da dissociação enzimática com solução de tripsina-EDTA [0,25%] (GIBCO, Life Technologies Corporation, NY, USA). Após isso, as células suspensas eram passadas para novas garrafas ou contadas e utilizadas em experimentos.

Os grupos experimentais foram compostos pelas 3 linhagens celulares, comparando-se cada tratamento com os seus controles (meio de cultura e veículo). Os fármacos utilizados para o tratamento foram o *Viscum album* CH200 (InjectCenter, SP, BRA), trans-resveratrol (Sigma Aldrich, SP, BRA) e a doxorubicina (Cayman Chemical, MI, USA).

#### **3.4.2 Análise de viabilidade celular**

As linhagens celulares foram cultivadas em placas de 96 poços (96 wells), contendo 1x10<sup>4</sup> cels/poço. Cada linhagem foi cultivada em triplicata, que após 24 horas era adicionado as diferentes concentrações de cada um dos fármacos. As concentrações testadas de *V. album* foram 5, 10, 20 e 40µL/mL,

do resveratrol para UMR106: 0,24, 1,2, 6 e 30 $\mu$ M; para a D17: 15, 30, 45 e 60 $\mu$ M e para a OSA 8-4: 12,5, 25, 50 e 100 $\mu$ M; e da doxorubicina 0,08, 0,24, 0,72 e 2,16 $\mu$ M. O controle do veículo (Dose "0") foi realizado com quantidade igual à maior dose do composto testado.

O resveratrol e a doxorubicina foram diluídos em DMSO (Dimetilsulfóxido - Dinâmica, SP, BRA); o viscum já se encontrava veiculado, de fábrica, em solução fisiológica. Para o controle de viabilidade 100% utilizou-se a células em seu próprio meio de cultivo, enquanto para o controle do veículo utilizou-se a maior dose empregada na diluição do fármaco. Para o resveratrol e viscum, o tempo de permanência das células com a droga foi de 24he para a doxorubicina foi de 72h.

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT, que resumidamente contava com a adição de solução de MTT [0,5 mg/mL] em cada poço, seguido de incubação da placa por 4 horas. O formazano decorrente da clivagem do tetrazólito foi solubilizado com DMSO (200  $\mu$ L/poço) e homogeneizado por 10 minutos, seguido da definição da absorbância na faixa de 570nm em leitor de microplaca (Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader, Biochrom Ltd., Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA).

Os valores da IC 50, após análise estatística, foram demonstrados pela média dos valores encontrados nas três replicatas, excluindo-se os *outliers*.

### **3.4.3 Análise de migração celular**

A capacidade migratória das células foi avaliada pelo método de Transwell, mediante a utilização de insertos com membranas (Costar – Corning, MA, USA) com poros de 8 $\mu$ m, em placas de 24 poços, subdivididas nos grupos controle(es) e tratamento(s). A quimioatração foi mediada pelo Soro Fetal Bovino (SFB). Estes experimentos foram realizados em quadruplicata.

Para tal, procedeu-se com a expansão celular, seguida da tripsinização e contagem de células, conforme descrito anteriormente. Em cada um dos poços foram adicionados 800 $\mu$ L de DMEM (F12 ou High Glucose, conforme a célula utilizada) contendo 10% de soro fetal bovino. Já nos insertos, um por poço, foram colocados 200 $\mu$ L de suspensão de células em meio de cultivo sem SFB contendo a droga a ser analisada. Atribuiu-se um total de 1x10<sup>4</sup>

células por inserto, visando a otimização da migração sem prejuízo da observação individual das células. Para os fármacos, a dose utilizada foi equivalente à obtida na IC50 do teste de MTT. Após a montagem, as placas foram incubadas por 24h em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, à 37°C.

Após a incubação, o meio contido no inserto e nos poços foi retirado e promoveu-se a fixação das células com metanol 100% por 8 minutos. Com o auxílio de um *swab*, de maneira delicada, as células presentes na parte superior do inserto foram retiradas, já que estas não migraram pelos poros, no intuito de facilitar a visualização das células migradas e evitar vieses.

Os insertos foram corados por Giemsa (Sigma Aldrich, Merck, GER), previamente filtrado, por 15 minutos, e enxaguados delicadamente em água corrente não direcionada. Para a leitura, aguardou-se a completa secagem. A avaliação foi feita em microscópio óptico invertido, com o auxílio de uma lâmina histológica, contando-se as células migradas de 4 campos previamente fotografados – evitando a periferia do inserto. O resultado final deu-se na forma média e desvio padrão, conforme as células contadas na superfície inferior do inserto nas quadruplicadas; comparando-se os grupos tratados e controle, a avaliação estatística também compreendeu a análise de variância (ANOVA).

#### **3.4.4 Análise de apoptose**

As amostras de células de osteossarcoma (D17, OSA 8-4 e UMR 106) foram cultivadas e expandidas até a confluência de 80%, seguidas de tripsinização. Foram contabilizadas  $1 \times 10^6$  células e estas incubadas em frasco de 25 cm<sup>2</sup> por 24h em incubadora de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Foram realizados grupos controles para os reagentes e calibração do citômetro de fluxo, bem como os grupos tratados com resveratrol (24h), *Viscum album* (24h) e doxorubicina (72h), as doses utilizadas foram equivalentes à IC50.

Após a incubação, cada sobrenadante foi centrifugado e adicionado das células tripsinizadas. As suspensões de células [ $1 \times 10^6$  células/mL] foram realizadas com meio contendo cálcio (solução tampão) para análise de apoptose. Para isso, 5µL de Anexina V com APC-conjugado (Becton Dickinson and Company), 5µL de Iodeto de Propídeo (concentração final de 1.5µM) (Sigma

Aldrich, USA) e 5 $\mu$ L de Hoechst (Sigma, USA). Todas as amostras foram incubadas por 15 min em câmara escura à 37°C.

A citometria de fluxo foi realizada com equipamento Fortessa LSR (Becton Dickinson, Mountaus View, CA, USA) com laser azul de 488nm, laser vermelho de 640nm e laser violeta de 405nm. As configurações de filtro para os PMTs que medem a emissão de fluorescência dos fluorocromos aplicados foram 694/50 nm (IP); 620/20 (Anexina-APC) e 450/50 nm (Hoechst). A taxa de aquisição foi de 800 eventos por segundo e, pelo menos 10.000 células foram analisadas por amostra.

Os dados gerados foram dispostos em gráfico de plotagem de contorno incluindo eixo  $< 0t$  (biexponencial) tornando todos os eventos visíveis e devidamente compensados através do software BD FACSDiva™ v6.1 (Becton Dickinson).

#### **3.4.5 Análise estatística**

A análise estatística dos resultados dos Testes de MTT foi realizada com o programa GraphPad Prism 8.0.1 utilizando os testes de regressão não-linear, onde estabeleceu-se a comparação entre o fármaco versus a resposta normalizada (percentual de viabilidade – corrigido pela média do grupo controle, DMEM) dos resultados obtidos pela leitura espectrofotocolorimétrica. Ainda, para a construção dos gráficos foram utilizados os valores médios de cada grupo e seus respectivos desvios padrão. A significância estatística entre os grupos foi avaliada pela análise de variância em sentido único comum com valor de  $p < 0.05$ . Para o teste de migração (Transwell) foi realizada a contagem manual das células, e foi realizada a média, desvio padrão e análise de variância.

### **3.5 Resultados**

#### **3.5.1 Viabilidade celular**

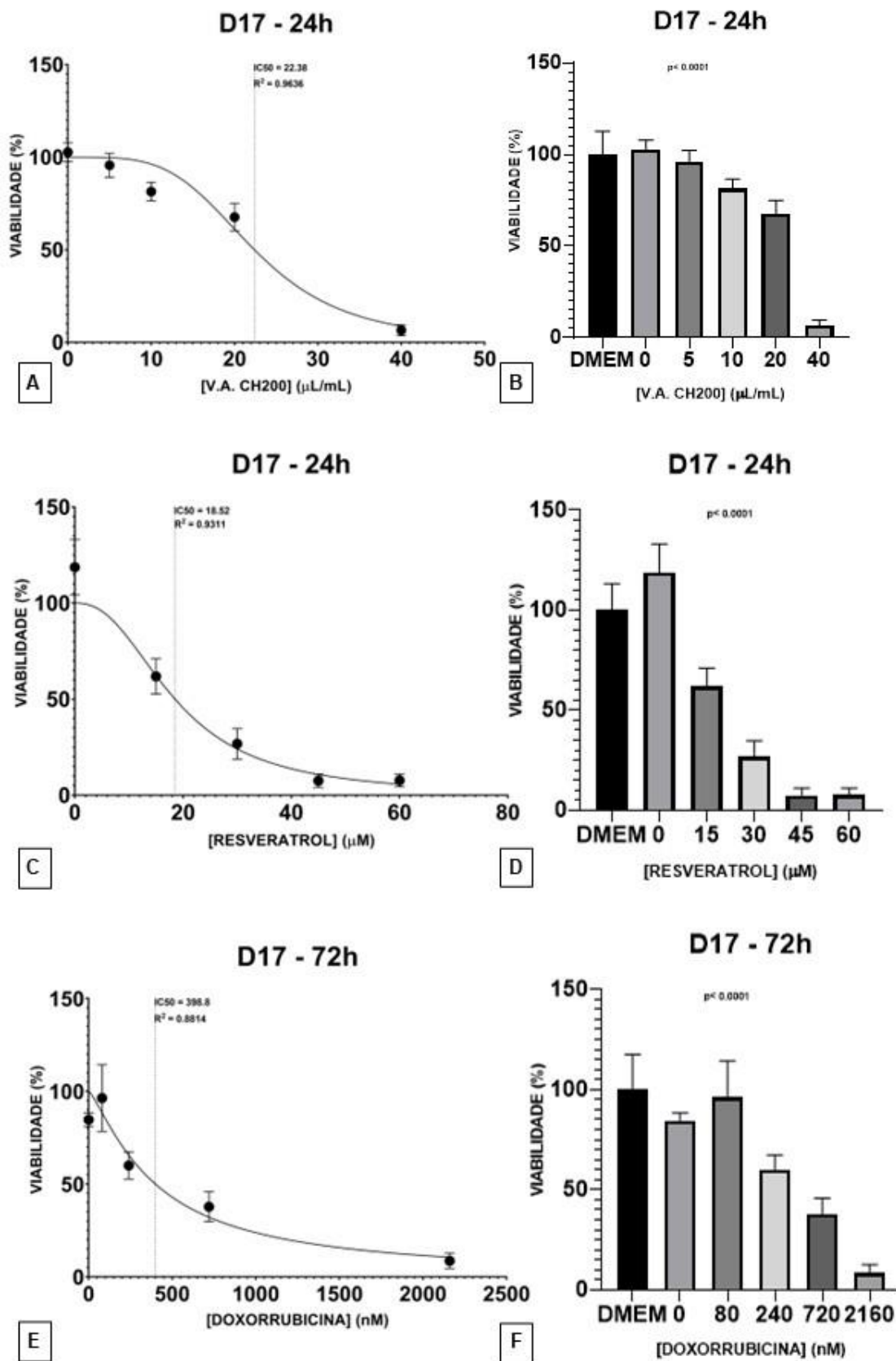
A tabela 1 e as figuras 1, 2 e 3 ilustram as respostas das células de osteossarcoma aos fármacos utilizados. Todas as células, quando comparados os controles (meio de cultivo) com as doses testadas, obtiveram significância estatística pelo teste ANOVA com  $p < 0,001$ .

**Tabela 1:** Valores de IC50 para os fármacos testados.

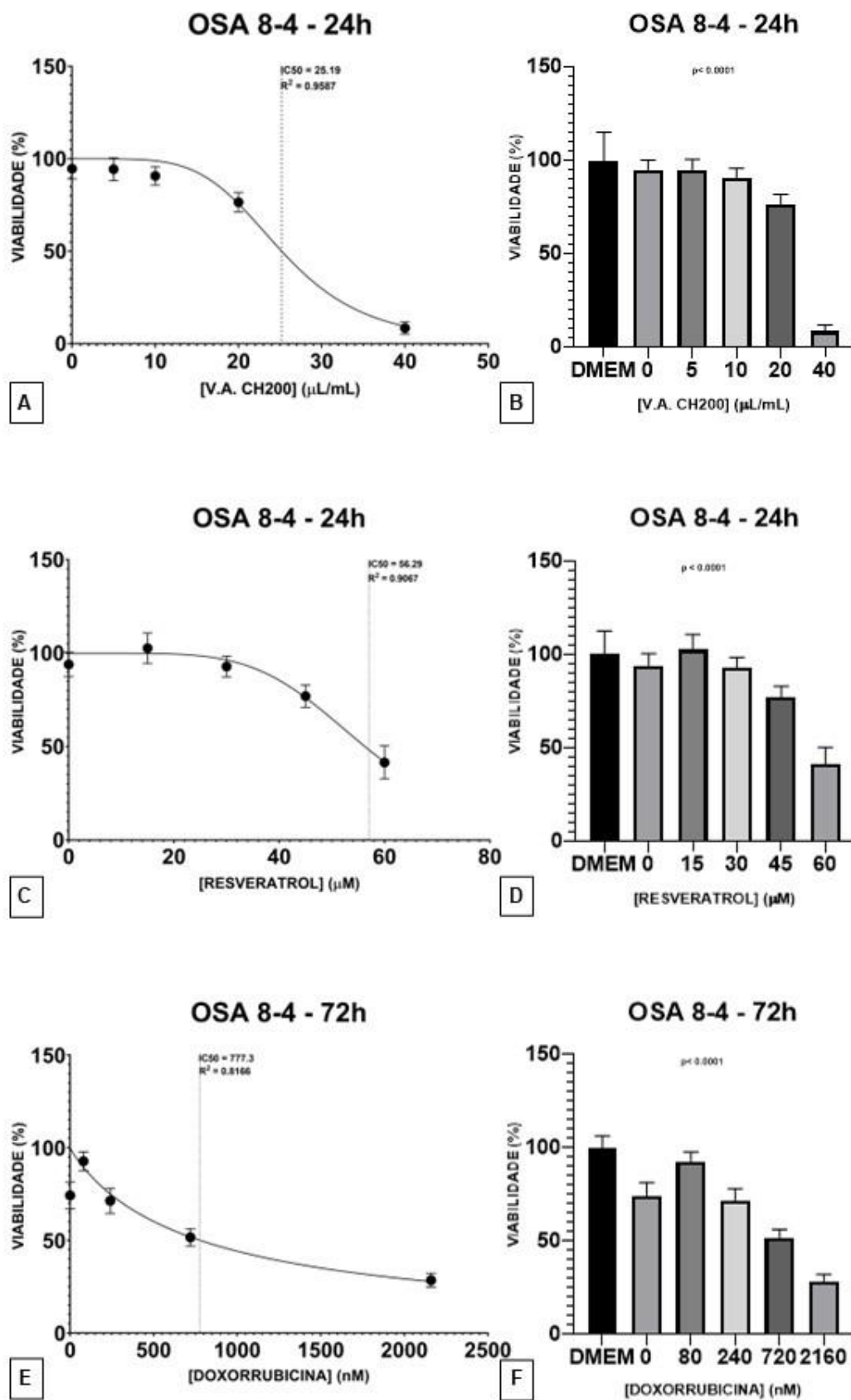
	<i>Viscum album</i> CH200	Resveratrol	Doxorrubicina
<b>D17</b>	22,38 $\mu$ L/mL	18,52 $\mu$ M	398,8nM
<b>OSA 8-4</b>	25,19 $\mu$ L/mL	50,29 $\mu$ M	777,3nM
<b>UMR 106</b>	28,82 $\mu$ L/mL	24,83 $\mu$ M	918,1nM

O *Viscum album* homeopático exerceu efeito citotóxico em todas as linhagens celulares, nas quais a UMR-106 mostrou-se novamente mais resistente conforme o incremento da dose, e a D17 mais susceptível. A doxorrubicina não apresentou resultados significativos de redução da viabilidade em 24h, mesmo com a utilização de doses de 16  $\mu$ M (maior concentração relativa a maior dose de uso clínico). Porém, quando o tempo de exposição à droga passou para 72h, a dosagem efetiva passou para a escala de nanomolar (nM), com resultados expressivos na queda da viabilidade em todas as células.

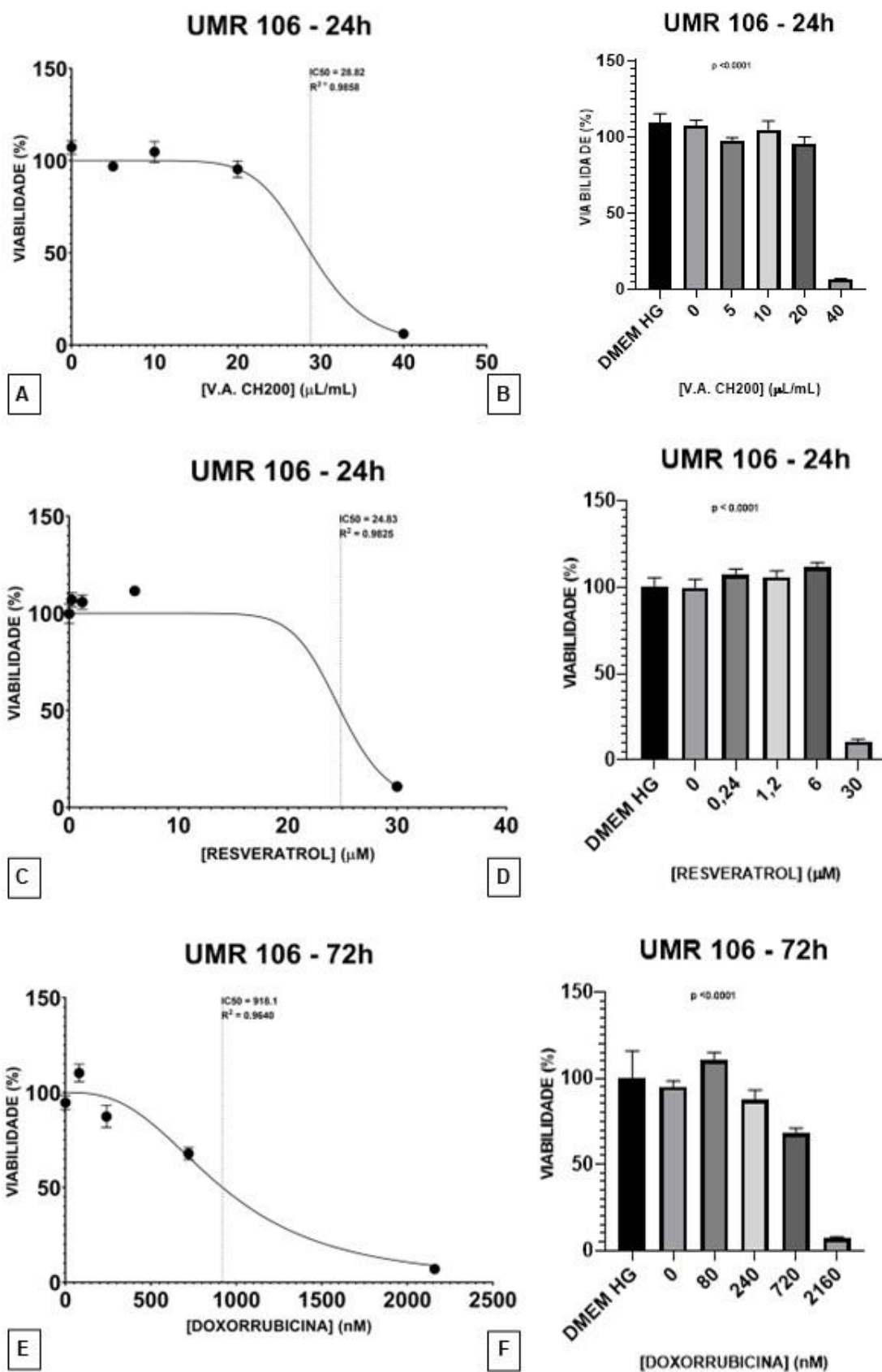
Para o resveratrol, todas as células apresentaram queda na atividade metabólica conforme se aumentava a concentração do composto natural. A linhagem D17 se apresentou mais susceptível que a OSA 8-4, ambas de osteossarcoma canino. A D17 apresentou uma queda consecutiva da viabilidade conforme era aumentada a dose testada. Já a UMR-106 e a OSA 8-4, demonstraram maior resistência ao aumento na concentração do resveratrol antes que houvesse queda significativa na viabilidade celular.



**Figura 1:** Viabilidade celular da linhagem D17 de osteossarcoma canino. Curva de regressão não-linear e definição da IC50 e distribuição de médias normalizadas pelo controle, após 24 ou 72 horas do tratamento. **A e B)** *V. album*; **C e D)** Resveratrol; **E e F)** Doxorubicina.



**Figura 2:** Viabilidade celular da linhagem OSA 8-4 de osteossarcoma canino. Curva de regressão não-linear e distribuição de médias normalizadas pelo controle, após 24 ou 72 horas do tratamento. **A e B)** *V. album*; **C e D)** Resveratrol; **E e F)** Doxorubicina.



**Figura 3:** Viabilidade celular da linhagem UMR 106 de osteossarcoma murino. Curva de regressão não-linear e definição da IC50 e distribuição de médias normalizadas pelo controle, após 24 ou 72 horas do tratamento. **A e B)** *V. album*; **C e D)** Resveratrol; **E e F)** Doxorrubicina.

### 3.5.2 Migração celular

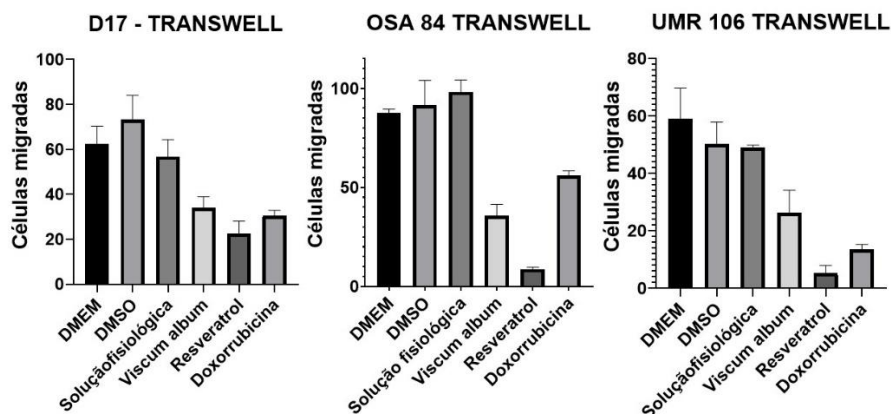
A análise de migração revelou que todos os fármacos foram capazes de reduzir a migração das células de osteossarcoma canino. Os valores comparados dos fármacos e seus veículos são observados na tabela 2 e 3 e nas figuras 4 e 5.

**Tabela 2:** Ensaio de migração celular – média e desvio padrão da contagem de células migradas nas quadruplicatas.

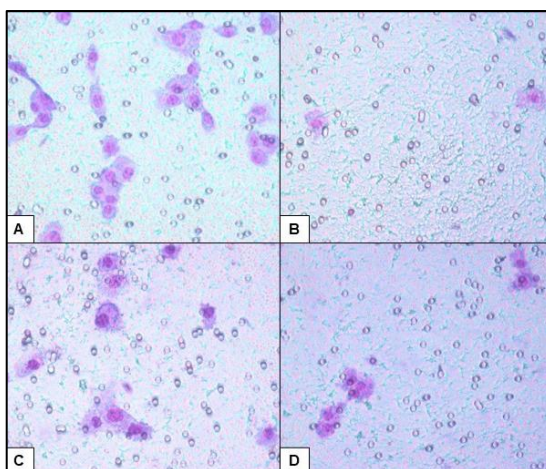
	D17			OSA 8-4			UMR 106		
	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N
<b>DMEM</b>	62,50	7,8528	4	87,50	2,0817	4	59,00	10,7083	4
<b>DMSO</b>	73,25	10,8128	4	91,50	12,5831	4	50,25	7,6322	4
<b>Solução Fisiológica</b>	56,75	7,6322	4	98,25	6,0759	4	49,00	0,8165	4
<b>Viscum album</b>	34,00	4,9666	4	35,75	5,7373	4	26,25	7,8899	4
<b>Resveratrol</b>	22,50	5,5678	4	8,75	0,9574	4	5,25	2,6300	4
<b>Doxorrubicina</b>	30,50	2,3805	4	56,00	2,4495	4	13,50	1,7321	4

**Tabela 3:** Ensaio de migração celular – significância estatística ( $p < 0,05$ )

	GRUPO COMPARADO	TESTE T	ANOVA	
<b>D17</b>	DMEM vs DMSO	0,1588		
	DMEM vs SOL FISIO	0,3341		
	DMEM vs VA CH200	0,0009		
	DMEM vs RESVERATROL	0,0002	<0,0001	
	DMEM vs DOXORRUBICINA	0,0002		
	SOL FISIO vs VA CH200	0,0025		
	DMSO vs RESVERATROL	0,0002		
	DMSO vs DOXORRUBICINA	0,0002		
<b>OSA 8 4</b>	DMEM vs DMSO	0,5533		
	DMEM vs SOL FISIO	0,0155		
	DMEM vs VA CH200	<0,0001		
	DMEM vs RESVERATROL	<0,0001	<0,0001	
	DMEM vs DOXORRUBICINA	<0,0001		
	SOL FISIO vs VA CH200	<0,0001		
	DMSO vs RESVERATROL	<0,0001		
	DMSO vs DOXORRUBICINA	0,0015		
<b>UMR 106</b>	DMEM vs DMSO	0,2316		
	DMEM vs SOL FISIO	0,1119		
	DMEM vs VA CH200	0,0026		
	DMEM vs RESVERATROL	<0,0001	<0,0001	
	DMEM vs DOXORRUBICINA	0,0002		
	SOL FISIO vs VA CH200	0,0012		
	DMSO vs RESVERATROL	<0,0001		
	DMSO vs DOXORRUBICINA	<0,0001		



**Figura 4:** Ensaio de migração celular (Transwell): Notar as células migradas (média e desvio padrão) entre os grupos controle e tratado para as células D17, OSA 8-4 e UMR 106.

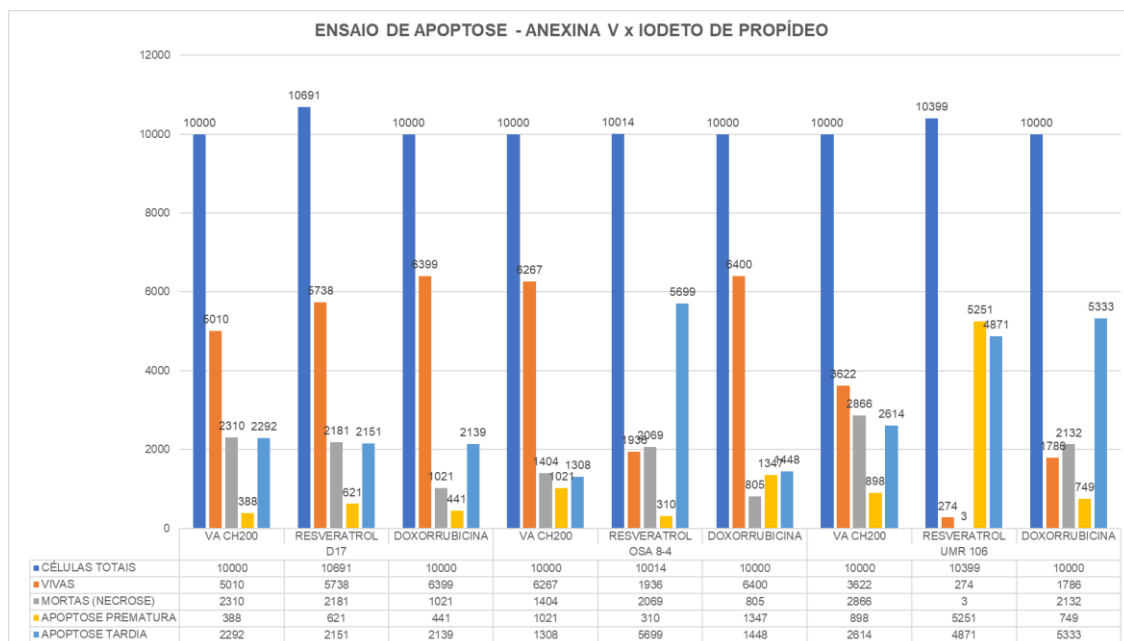


**Figura 5:** Fotomicrografias do teste de migração da cultura de osteossarcoma canino OSA 8-4. Observam-se as células que migraram pelos poros (8µm) para a superfície inferior da membrana do inserto. Giemsa, 40x (obj). **A)** Controle (DMEM); **B)** Resveratrol; **C)** Doxorrubicina; **D)** *Viscum album*.

Para as culturas caninas (D17 e OSA 8-4) e a cultura de OS murino (UMR 106) o resveratrol foi o fármaco que exerceu o maior efeito inibitório na migração celular, na IC50 preconizada. Os demais fármacos apresentaram uma ação inibitória de migração, quando comparado com o controle, porém de menor ação.

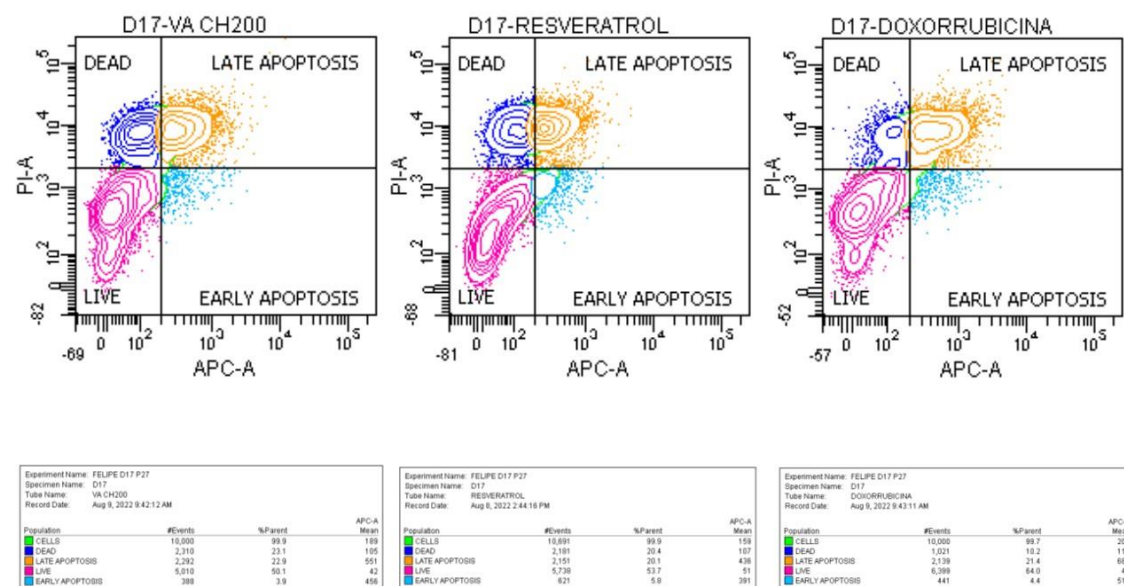
### 3.5.3 Ensaio de apoptose

De maneira geral, a análise (figura 6) revelou que, para as células testadas e os compostos nas doses da IC50, o tipo de morte celular predominante foi a apoptose e o composto com maior potencial apoptótico foi o resveratrol. A apoptose tardia foi mais detectada do que a apoptose prematura em todas as amostras, exceto no uso do resveratrol para a célula UMR 106.

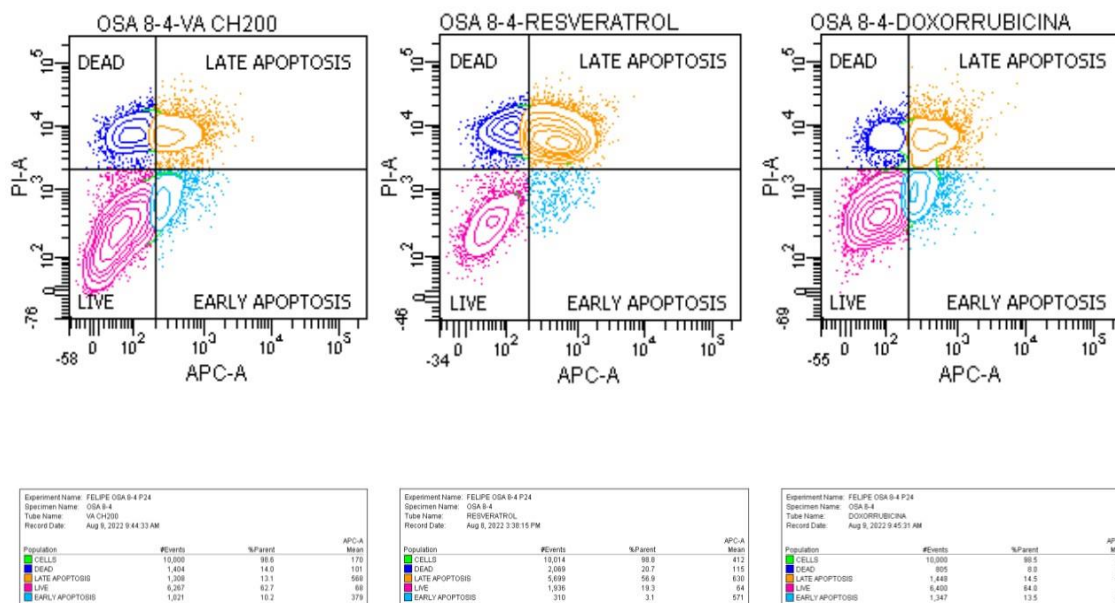


**Figura 6** – Ensaio de Apoptose. Notar que, no geral, as células perderam sua viabilidade mais por apoptose tardia, independente do tratamento e da célula utilizada.

Para a D17 (figura 7), o *Viscum album* CH200 induziu uma maior morte celular quando comparado aos outros fármacos, apesar da resposta similar destes e a apoptose (prematura e tardia) foi responsável por 26,8% das 49,9% que estavam inviáveis. Já para a OSA 8-4 (figura 8), o resveratrol gerou uma intensa morte celular por apoptose tardia (56,9%) moderada por necrose (20,7%) e discreta por apoptose prematura (3.1%).

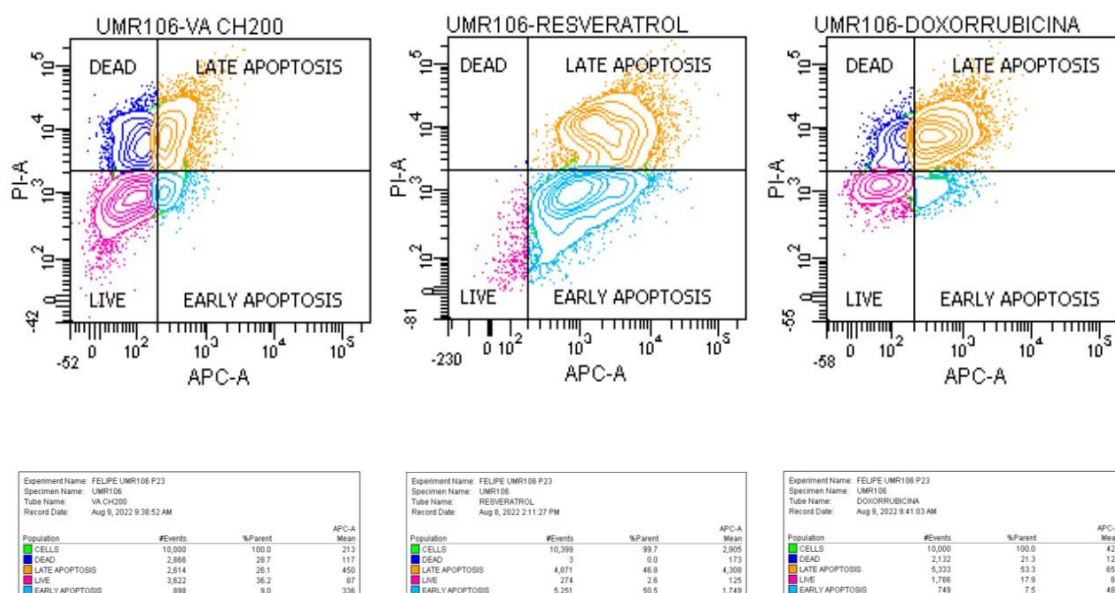


**Figura 7** – Ensaio de Apoptose (Anexina V x Iodeto de Propídeo): Notar o desempenho similar do *Viscum album* CH200, do resveratrol e da doxorubicina em promover a apoptose das células de osteossarcoma canino metastático (D17).



**Figura 8** – Ensaio de Apoptose (Anexina V x Iodeto de Propídeo): Notar a maior indução apoptótica tardia do resveratrol, bem como o menor número de células viáveis da OSA 8-4 quando do uso do mesmo fármaco.

A UMR 106 (figura 9) exibiu marcada morte celular quando administrada a dose da IC50 do resveratrol, permanecendo com somente 2,6% de células viáveis. As células apoptóticas corresponderam a 97,3% (prematura 50,5% e tardia 46,8%) do total contado, e a necrose equivaliu a 0% (somente 3 células).



**Figura 9** – Ensaio de Apoptose (Anexina V x Iodeto de Propídeo): Notar o intenso efeito apoptótico mediado pelo resveratrol nas células da UMR 106.

### 3.6 Discussão

Para este experimento foram utilizadas duas culturas de células de osteossarcoma canino, uma comercial e uma estabelecida por nosso grupo de pesquisa, além de uma de osteossarcoma murino como forma de verificar a resposta de dois compostos naturais, *Viscum album* homeopático e Resveratrol e a quimioterápico de escolha para tratamento de cães com OS, a doxorrubicina. Modelos *in vitro*, estabelecidos a partir de neoplasias de ocorrência natural, como no caso das linhagens caninas D17 e OSA 8-4, ou induzidos, como o modelo murino (UMR106) são importantes para testes de fármacos com potencial preditivo para estudos em oncologia comparada.

Ainda, o tratamento disponível para os animais com OS, bem como para os humanos, se manteve em um platô, sem grande melhoria de sobrevida ou inibição de metástase (DE LUCA et al., 2022). O uso de fármacos previamente aprovados para uso humano ou veterinário, em um cenário de reposição de fármacos (*drug repurposing*) bem com o uso de compostos naturais, como adjuvantes ao tratamento quimioterápico convencional têm tido seu papel na melhora do prognóstico dos pacientes.

Tobeiha et al. (2021) descrevem a ação de diferentes compostos naturais no tratamento de OS humano, seja *in vivo* ou *in vitro*, com resultados promissores. Já em OS canino o licopeno, extrato de raiz de cúrcuma e folhas de alecrim demonstraram efeito antineoplásico em culturas celulares (LEVINE et al., 2017; WAKSHLAG; BALKMAN, 2010). Em medicina veterinária, o Resveratrol já foi usado *in vitro* com sucesso em culturas celulares de hemangiossarcoma canino (CARLSON et al., 2018) e glioblastoma (EMPL et al., 2012).

O resveratrol foi capaz de reduzir a atividade metabólica das células de osteossarcoma canino de maneira dose dependente em ambas as culturas de células, onde a maior concentração exerceu melhor resposta ao tratamento. Os resultados deste estudo estão em conformidade com o que foi encontrado por Peng e Jiang (2018); os autores utilizaram o resveratrol [20 e 40 $\mu$ M] em células de osteossarcoma humano e obtiveram inibição do crescimento celular,

redução das células-tronco tumorais, indução apoptótica e inibição da via JAK2-STAT3.

Li et al. (2009) e Liu et al. (2012) também obtiveram resultados similares com estas concentrações em células de osteossarcoma humano. Salientamos ainda, que as linhagens de osteossarcoma canino e murino – D17, OSA 8-4 e UMR 106 - se mostraram um bom modelo para estudos comparados com OSA humano, já que foram sensíveis a mesma faixa de doses de resveratrol do que linhagens de OSA humana.

O *Viscum album* (VA) homeopático (CH 200) apresentou valores de IC50 similares entre as três células utilizadas e este fato pode, futuramente, tornar-se um facilitador na padronização de protocolos terapêuticos caso mantenha respostas similares em estudos *in vivo*. Valle et al. (2020) em células de osteossarcoma humano (U- 2 OS) obtiveram IC50 de 6.62  $\mu\text{L/mL}$  para o VA D3 e 5.5  $\mu\text{L/mL}$  para o VA D30, evidenciando queda da viabilidade celular com baixas dosagens. Para o VA CH200 utilizado nesses experimentos, as IC50 em nossas células variaram entre 22,38 – 28,82  $\mu\text{L/mL}$ , o que também se configuram como pequenas doses.

A associação do *Viscum album*, na dose de 5  $\mu\text{g/mL}$  com mebendazole (0.03  $\mu\text{M}$ ) para o tratamento *in vitro* de glioma canino demonstrou um aumento da morte celular e uma perspectiva de tratamento para um tipo de neoplasia com poucas opções com resposta adequada (WRIGHT; WATANABE; KOEHLER, 2022). Em pacientes humanos com OS, o uso de viscum se mostrou um promissor adjuvante ao tratamento, por prolongar o tempo livre de doença em pacientes que tiveram recidiva do tumor (LONGHI; MARIANI; KUEHN, 2009).

A doxorubicina foi anteriormente testada pelo grupo (dados não publicados) nas células D17 e OSA 8-4 em ensaios de 24h de exposição à droga, com doses de até 16 $\mu\text{M}$ , sem alterações significativas na viabilidade celular. Apesar disso, Bernardino et al. (2018) obtiveram inibição seletiva da atividade metabólica das células primárias de osteossarcoma canino, com valores médios de 2 $\mu\text{M}$  exercendo efeito citoestático.

Marley et al., (2013), também em linhagem D17, encontraram IC50 de 92nM com períodos de 72h. Após o ajuste do tempo, os experimentos com a D17, OSA 8-4 e UMR 106 obtiveram a IC50 na faixa nanomolar de concentração. Estes resultados corroboram que as células de osteossarcoma carecem de um maior período de exposição à doxorubicina para que haja significativa queda na viabilidade celular.

A expressão de genes de resistência a droga, *MDR1*, *ABCC1* e *ABCG2* foram avaliados nas linhagens D17 e OSA8.4 (resultados não apresentados), observando-se o aumento de expressão de *ABCG2* em ambas as células, em comparação com uma linhagem de carcinoma de mama canino multirresistente a drogas (usado como controle de multirresistência). O gene *MDR1* estava super expresso somente na OSA8.4, e o *ABCC1* está sub expresso nas duas culturas.

Alguns trabalhos apresentam resultados que reforçam a necessidade de mais testes de associação de drogas, a exemplo dos benefícios entre a associação do resveratrol e a doxorubicina. A doxorubicina apresenta acentuada cardiotoxicidade, fato que inviabiliza a administração de altas doses e, também, a manutenção de terapia prolongada. Em modelo murino, Tatlidede et al. (2009) mostraram a prevenção do estresse oxidativo e cardioproteção exercida pelo resveratrol quando em aplicação conjunta com a doxorubicina, o que no futuro poderá permitir o uso de doses mais elevadas de doxorubicina.

Toda essa proteção ao cardiomiócito já é um excelente motivo para a associação terapêutica destes fármacos, mas além disso, o resveratrol demonstrou a habilidade em reverter a resistência à doxorubicina, ressensibilizando as células ao fármaco. Carlson et al. (2018) demonstraram, em cultura de células de hemangiossarcoma canino, que o resveratrol exerceu seu potencial citotóxico/pró-apoptótico e sensibilizou as células ao tratamento com a doxorubicina. Então, o co-tratamento tem a capacidade de resgate terapêutico, bem como exercer citoproteção aos danos oxidativos.

A habilidade da célula em promover uma migração eficiente é um passo fundamental para a ocorrência do processo de metástase. Esta ocorre por meio do rearranjo do citoesqueleto por meio da vimentina, bem como outras proteínas com funções estruturais similares (AMARAL et al., 2018). Em média, as células neoplásicas costumam ter entre 10 e 20  $\mu\text{m}$ , o que as impossibilitaria de passar pelo poro da membrana do inserto do Transwell (8  $\mu\text{m}$ ), sem que essas apresentassem tal capacidade migratória quando expostas a uma solução contendo um quimioatratante – neste caso o SFB na proporção de 10% do meio de cultivo.

Nossos resultados evidenciaram a capacidade superior do resveratrol em limitar o potencial migratório das células de osteossarcoma canino e murino. A doxorubicina e o *Viscum album* CH 200 também apresentaram bons resultados, porém inferiores aos do resveratrol, todos nas doses da IC50. As células D17 foram isoladas de metástase pulmonar de osteossarcoma, portanto, possuem a capacidade migratória e, para o resveratrol, estas foram as que apresentaram a menor resposta de inibição de migração celular, em comparação com o *Viscum album* CH200 e a doxorubicina.

O ensaio de apoptose com a dupla coloração Anexina V/Iodeto de Propídio possibilitou a verificação de que as células de osteossarcoma testadas tiveram significativa indução de sofrimento celular quando utilizadas as doses de IC50 do *Viscum*, resveratrol e doxorubicina. O principal mecanismo de morte, foi a apoptose (precoce e tardia), mas com significativa taxa de necrose também, exceto para UMR 106 quando do uso de resveratrol, já que 100% foi por indução apoptótica. Somente para a D17 o *Viscum album* exibiu maior potencial de indução da apoptose que os outros compostos.

De Luca et al. (2022) verificaram que o resveratrol induziu a apoptose em células de osteossarcoma humano de maneira dose dependente e com bons resultados; fato também comprovado por Li et al. (2009) e acrescido da pequena ação sobre osteoblastos normais. Em células de hemangiossarcoma canino, o resveratrol exibiu efeitos apoptóticos quando usado isolado ou em associação com a doxorubicina, todos concentração-dependente (CARLSON et al., 2018).

Por sua vez, Kleinsimon et al., 2017, analisou e confirmou a vasta capacidade de indução apoptótica por diferentes tipos de visco, sendo que em todos eles os resultados sugeriam a ativação da via mitocondrial para a deflagração da apoptose, bem como alterações de caspases, bax e bcl2. Quando combinados com doxorrubicina, doses baixas provocaram efeitos sinérgicos, enquanto doses altas provocaram efeitos aditivos ao potencial apoptótico.

Não há relatos na literatura da ação do resveratrol e *Viscum album* homeopático em estudos *in vitro* ou *in vivo* em OS caninos, sendo este um primeiro passo para o potencial terapêutico deste composto natural. Nossos resultados demonstram uma ação de diminuição de viabilidade celular, além de menor migração celular, fator importante considerando-se o grande potencial metastático dos OS. Nossos resultados visibilizaram que o mecanismo de ação principal dos compostos testados é a indução apoptótica.

Esses resultados corroboram para a necessidade da realização de testes conjuntos destas substâncias para verificar efeitos de sinergismo, antagonismo e adição. Tais resultados podem amparar futuros testes clínicos, definição de protocolos terapêuticos de associação de compostos naturais às terapias convencionais, bem como estimular a utilização de métodos tecnológicos que melhorem o desempenho dessas drogas e/ou permitam o desenho de novos medicamentos com maiores efeitos citotóxicos direcionados as células tumorais e menores efeitos colaterais sistêmicos que os atuais.

Por fim, os compostos naturais testados neste estudo: resveratrol, e o *Viscum album* CH 200; além do quimioterápico de escolha para o tratamento de OS canino, a doxorrubicina, foram capazes de reduzir a atividade metabólica e a viabilidade celular das células de osteossarcoma canino e murino (D17, OSA 8-4 e UMR 106), bem como diminuir significativamente o potencial migratório e induzir morte celular, em especial por apoptose. Tais resultados abrem perspectivas promissoras para a associação de fármacos com menores efeitos colaterais para os pacientes e menor contaminação ambiental, além de darem suporte à necessidade de mais pesquisas comparadas e translacionais.

### 3.7 Referências

AMARAL, C. B. et al. Vimentin, osteocalcin and osteonectin expression in canine primary bone tumors: diagnostic and prognostic implications. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 5, p. 1289–1296, 1 out. 2018.

ANGULO, P. et al. Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. **Journal of hematology & oncology**, v. 10, n. 1, 7 jan. 2017.

BECK, J. et al. Canine and murine models of osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, v. 59, n. 3, p. 399–414, 1 maio 2022.

BELAYNEH, R. et al. Update on Osteosarcoma. **Current Oncology Reports**, v. 23, n. 6, 1 jun. 2021.

BERNARDINO, P. N. et al. Positive effects of antitumor drugs in combination with propolis on canine osteosarcoma cells (spOS-2) and mesenchymal stem cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 104, p. 268–274, 1 ago. 2018.

BHASKARA, V. K. et al. Resveratrol, cancer and cancer stem cells: A review on past to future. **Current Research in Food Science**, v. 3, p. 284–295, 1 nov. 2020.

BONAMIN, L. V.; DE CARVALHO, A. C.; WAISSE, S. *Viscum album* (L.) in experimental animal tumors: A meta-analysis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 6, p. 2723, 1 jun. 2017.

BONNETT, B. et al. Mortality in over 350,000 Insured Swedish dogs from 1995–2000: I. Breed-, Gender-, Age- and Cause-specific Rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 46, n. 3, p. 105, 2005.

CARLSON, A. et al. Anticancer Effects of Resveratrol in Canine Hemangiosarcoma Cell Lines. **Veterinary and comparative oncology**, v. 16, n. 2, p. 253, 1 jun. 2018.

CHHABRA, G. et al. Recent Advancements on Immunomodulatory Mechanisms of Resveratrol in Tumor Microenvironment. **Molecules 2021, Vol. 26, Page 1343**, v. 26, n. 5, p. 1343, 3 mar. 2021.

CHOI, J. H.; RO, J. Y. The 2020 WHO Classification of Tumors of Bone: An Updated Review. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 28, n. 3, p. 119–138, 1 maio 2021.

COSTA, C. D. et al. Characterization of OCT3/4, Nestin, NANOG, CD44 and CD24 as stem cell markers in canine prostate cancer. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 108, p. 21–28, 1 mar. 2019.

CRUZ, V. S. et al.  $\beta$  Lapachone blocks the cell cycle and induces apoptosis in canine osteosarcoma cells<sup>1</sup>. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 2224–2232, 1 dez. 2018.

DE LUCA, A. et al. Multiple Effects of Resveratrol on Osteosarcoma Cell Lines. **Pharmaceuticals 2022, Vol. 15, Page 342**, v. 15, n. 3, p. 342, 11 mar. 2022.

EMPL, M. T. et al. The growth of the canine glioblastoma cell line D-GBM and the canine histiocytic sarcoma cell line DH82 is inhibited by the resveratrol oligomers hopeaphenol and r2-viniferin. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 12, n. 2, p. 149–159, 1 jun. 2012.

GALINIAK, S.; AEBISHER, D.; BARTUSIK-AEBISHER, D. Health benefits of resveratrol administration. **Acta Biochimica Polonica**, v. 66, n. 1, p. 13–21, 28 fev. 2019.

GATTI, M. et al. In vitro and in vivo characterization of stem-like cells from canine osteosarcoma and assessment of drug sensitivity. **Experimental Cell Research**, v. 363, n. 1, p. 48–64, 1 fev. 2018.

GU, J. et al. Neuroprotective Effect of Trans-Resveratrol in Mild to Moderate Alzheimer Disease: A Randomized, Double-Blind Trial. **Neurology and Therapy**, v. 10, n. 2, p. 905, 1 dez. 2021.

HENRY, J. G. et al. The effect of cannabidiol on canine neoplastic cell proliferation and mitogen-activated protein kinase activation during autophagy and apoptosis. **Veterinary and comparative oncology**, v. 19, p. 253–265, 2021.

HUANG, M.; LU, J.-J.; DING, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, p. 5–13, 2021.

ISANI, G. et al. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. and Pure Artemisinin on the D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–9, 2019.

K. M. S. BRAGA, V. S. CRUZ, E. ARNHOLD, E. G. A. Recycled Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) Shell Ethanolic Extract Induces Apoptosis in Canine Osteosarcoma Cells. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, 6 abr. 2022.

KIENLE, G. S.; KIENE, H. Review article: Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. **Integrative cancer therapies**, v. 9, n. 2, p. 142–157, jun. 2010.

KLEINSIMON, S. et al. *Viscum*TT induces apoptosis and alters IAP expression in osteosarcoma in vitro and has synergistic action when combined with different chemotherapeutic drugs. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 7 jan. 2017.

LEVINE, C. B. et al. Cellular effects of a turmeric root and rosemary leaf extract on canine neoplastic cell lines. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 13 dez. 2017.

LI, Y. et al. Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. **European journal of pharmacology**, v. 609, n. 1–3, p. 13–18, 1 maio 2009.

LIU, Z.; LI, Y.; YANG, R. Effects of resveratrol on vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma cells and cell proliferation. **Oncology Letters**, v. 4, n. 4, p. 837, out. 2012.

LONGHI, A.; MARIANI, E.; KUEHN, J. J. A randomized study with adjuvant mistletoe versus oral Etoposide on post relapse disease-free survival in osteosarcoma patients. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 27–33, 1 abr. 2009.

LUX, S. et al. The antinociceptive effect of resveratrol in bone cancer pain is inhibited by the Silent Information Regulator 1 inhibitor selisistat. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 816–825, 1 maio 2019.

MAKIELSKI, K. M. et al. Risk Factors for Development of Canine and Human Osteosarcoma: A Comparative Review. **Veterinary Sciences 2019, Vol. 6, Page 48**, v. 6, n. 2, p. 48, 25 maio 2019.

MARLEY, K. et al. The effects of taurolidine alone and in combination with doxorubicin or carboplatin in canine osteosarcoma in vitro. **BMC veterinary research**, v. 9, 18 jan. 2013.

MARTIN, T. W. et al. Outcome and prognosis for canine appendicular osteosarcoma treated with stereotactic body radiation therapy in 123 dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 19, p. 284–294, 2021.

NERADIL, J.; VESELSKA, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. **Cancer Science**, v. 106, n. 7, p. 803, 1 jul. 2015.

PANG, L. Y. et al. Global Gene Expression Analysis of Canine Osteosarcoma Stem Cells Reveals a Novel Role for COX-2 in Tumour Initiation. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e83144, 8 jan. 2014.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 2, p. 147–156, fev. 2008.

PENG, L.; JIANG, D. Resveratrol eliminates cancer stem cells of osteosarcoma by STAT3 pathway inhibition. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, 1 out. 2018.

REGAN, D.; GARCIA, K.; THAMM, D. Clinical, Pathological, and Ethical Considerations for the Conduct of Clinical Trials in Dogs with Naturally Occurring Cancer: A Comparative Approach to Accelerate Translational Drug Development. **ILAR journal**, v. 59, n. 1, p. 99–110, 1 dez. 2018.

SANTALIZ-RUIZ, L. E. et al. Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. **International journal of cancer**, v. 135, n. 12, p. 2741–2748, 15 dez. 2014.

SCHLODDER, D.; GARDIN, N. E. Estudos clínicos com Helixor (Viscum album) para o tratamento deo câncer. **Arte Médica Ampliada**, v. XXXI, n. 1, p. 14–18, 2011.

SEVRI, G. et al. Cytotoxic and Apoptotic Effects of Curcumin on D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line [1] Kurkuminin D-17 Köpek Osteosarkom Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri. **Univ Vet Fak Derg**, v. 27, n. 4, p. 465–473, 2021.

SZEWCZYK, M.; LECHOWSKI, R.; ZABIELSKA, K. What do we know about canine osteosarcoma treatment?-review. **Vet Res Commun**, v. 39, p. 61–67, 2015.

TATLIDEDE, E. et al. Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. **Free Radical Research**, v. 43, n. 3, p. 195–205, 2009.

THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011.

TOBEIHA, M. et al. Potential of natural products in osteosarcoma treatment: Focus on molecular mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112257, 1 dez. 2021.

VALLE, A V; AGUIAR, L R; BRUNEL, H S S; MALARD, P F AND ANDRADE, R. V. Homoeopathic Viscum album extract inhibits the growth of osteosarcoma cells. **Journal of Integrated Standardized Homoeopathy** •, v. 3, n. 2, p. 1–5, 2020.

VESELSKA, R. et al. Nestin expression in osteosarcomas and derivation of nestin/CD133 positive osteosarcoma cell lines. **BMC cancer**, v. 8, 16 out. 2008.

VIEIRA, V. S. et al. Crude extract of Jatobá leaves promotes canine osteosarcoma cell D17 proliferation. **Veterinary World**, v. 15, n. 5, p. 1283–1289, 2022.

WAKSHLAG, J. J.; BALKMAN, C. E. Effects of lycopene on proliferation and death of canine osteosarcoma cells. **American journal of veterinary research**, v. 71, n. 11, p. 1362–1370, nov. 2010.

WANG, M. L.; CHIOU, S. H.; WU, C. W. Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. **OncoTargets and therapy**, v. 6, p. 1207, 2013.

WILSON, H. et al. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 175, n. 1, p. 69–75, jan. 2008.

WITHERS, S. S. et al. In vitro and in vivo activity of liposome-encapsulated curcumin for naturally occurring canine cancers. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 16, n. 4, p. 571–579, 1 dez. 2018.

WRIGHT, A.; WATANABE, R.; KOEHLER, J. W. European Mistletoe (*Viscum album*) Extract Is Cytotoxic to Canine High-Grade Astrocytoma Cells In Vitro and Has Additive Effects with Mebendazole. **Veterinary Sciences 2022, Vol. 9, Page 31**, v. 9, n. 1, p. 31, 15 jan. 2022.

## **CAPÍTULO III**

#### 4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em virtude dos bons resultados obtidos neste experimento, serão performadas análises que determinem os mecanismos de ação do resveratrol, *Viscum album* e doxorubicina nas células de osteossarcoma canino e murino (D17, OSA 8-4 e UMR 106). Ainda, poderá ser realizada imunocitoquímica – das células cultivadas sobre lamínulas – para a caspase 3, 8 e 9, Bax, Bcl2, conforme os resultados da anexina sugeriram marcada participação da via apoptótica.

Dada a participação das células-tronco tumorais (CSC) na manutenção das subpopulações neoplásicas, serão isoladas as CSC das culturas trabalhadas por meio da técnica de formação de esferoide em placas de ultrabaixa adesão com o auxílio de meio permissivo. Nestas, serão testados os fármacos e verificada a capacidade de inibição da viabilidade celular dessa subpopulação. Para a confirmação, serão testados marcadores de células tronco por citometria de fluxo; a priori, serão utilizados NANOG, OCT3/4 e Nestin.

Recentemente recebemos duas linhagens de osteossarcoma humano, Saos 2 e MG63, e estas serão utilizadas de maneira comparada para todos os testes realizadas com as de cão e rato. Os resultados totais deste estudo, e dos testes a serem performados, comporão as informações de oncologia comparada e translacional a serem publicadas em periódico internacional de alto impacto e acesso livre.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, C. B. et al. Vimentin, osteocalcin and osteonectin expression in canine primary bone tumors: diagnostic and prognostic implications. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 5, p. 1289–1296, 1 out. 2018.

ANGULO, P. et al. Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. **Journal of hematology & oncology**, v. 10, n. 1, 7 jan. 2017.

BECK, J. et al. Canine and murine models of osteosarcoma. **Veterinary Pathology**, v. 59, n. 3, p. 399–414, 1 maio 2022.

BELAYNEH, R. et al. Update on Osteosarcoma. **Current Oncology Reports**, v. 23, n. 6, 1 jun. 2021.

BERNARDINO, P. N. et al. Positive effects of antitumor drugs in combination with propolis on canine osteosarcoma cells (spOS-2) and mesenchymal stem cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 104, p. 268–274, 1 ago. 2018.

BHASKARA, V. K. et al. Resveratrol, cancer and cancer stem cells: A review on past to future. **Current Research in Food Science**, v. 3, p. 284–295, 1 nov. 2020.

BONAMIN, L. V.; DE CARVALHO, A. C.; WAISSE, S. *Viscum album* (L.) in experimental animal tumors: A meta-analysis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 6, p. 2723, 1 jun. 2017.

BONNETT, B. et al. Mortality in over 350,000 Insured Swedish dogs from 1995–2000: I. Breed-, Gender-, Age- and Cause-specific Rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 46, n. 3, p. 105, 2005.

CARLSON, A. et al. Anticancer Effects of Resveratrol in Canine Hemangiosarcoma Cell Lines. **Veterinary and comparative oncology**, v. 16, n. 2, p. 253, 1 jun. 2018.

CHHABRA, G. et al. Recent Advancements on Immunomodulatory Mechanisms of Resveratrol in Tumor Microenvironment. **Molecules 2021, Vol. 26, Page 1343**, v. 26, n. 5, p. 1343, 3 mar. 2021.

CHOI, J. H.; RO, J. Y. The 2020 WHO Classification of Tumors of Bone: An Updated Review. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 28, n. 3, p. 119–138, 1 maio 2021.

COSTA, C. D. et al. Characterization of OCT3/4, Nestin, NANOG, CD44 and CD24 as stem cell markers in canine prostate cancer. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 108, p. 21–28, 1 mar. 2019.

CRUZ, V. S. et al.  $\beta$  Lapachone blocks the cell cycle and induces apoptosis in canine osteosarcoma cells<sup>1</sup>. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 2224–2232, 1 dez. 2018.

DE LUCA, A. et al. Multiple Effects of Resveratrol on Osteosarcoma Cell Lines. **Pharmaceuticals** **2022**, Vol. 15, Page 342, v. 15, n. 3, p. 342, 11 mar. 2022b.

EMPL, M. T. et al. The growth of the canine glioblastoma cell line D-GBM and the canine histiocytic sarcoma cell line DH82 is inhibited by the resveratrol oligomers hopeaphenol and r2-viniferin. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 12, n. 2, p. 149–159, 1 jun. 2012.

GALINIAK, S.; AEBISHER, D.; BARTUSIK-AEBISHER, D. Health benefits of resveratrol administration. **Acta Biochimica Polonica**, v. 66, n. 1, p. 13–21, 28 fev. 2019.

GATTI, M. et al. In vitro and in vivo characterization of stem-like cells from canine osteosarcoma and assessment of drug sensitivity. **Experimental Cell Research**, v. 363, n. 1, p. 48–64, 1 fev. 2018.

GU, J. et al. Neuroprotective Effect of Trans-Resveratrol in Mild to Moderate Alzheimer Disease: A Randomized, Double-Blind Trial. **Neurology and Therapy**, v. 10, n. 2, p. 905, 1 dez. 2021.

HENRY, J. G. et al. The effect of cannabidiol on canine neoplastic cell proliferation and mitogen-activated protein kinase activation during autophagy and apoptosis. **Veterinary and comparative oncology**, v. 19, p. 253–265, 2021.

HUANG, M.; LU, J.-J.; DING, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, p. 5–13, 2021.

ISANI, G. et al. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. and Pure Artemisinin on the D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–9, 2019.

K. M. S. BRAGA, V. S. CRUZ, E. ARNHOLD, E. G. A. Recycled Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) Shell Ethanolic Extract Induces Apoptosis in Canine Osteosarcoma Cells. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, 6 abr. 2022.

KIENLE, G. S.; KIENE, H. Review article: Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. **Integrative cancer therapies**, v. 9, n. 2, p. 142–157, jun. 2010.

KLEINSIMON, S. et al. *Viscum*TT induces apoptosis and alters IAP expression in osteosarcoma in vitro and has synergistic action when combined with different chemotherapeutic drugs. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 7 jan. 2017.

LEVINE, C. B. et al. Cellular effects of a turmeric root and rosemary leaf extract on canine neoplastic cell lines. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 13 dez. 2017.

LI, Y. et al. Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. **European journal of pharmacology**, v. 609, n. 1–3, p. 13–18, 1 maio 2009.

LIU, Z.; LI, Y.; YANG, R. Effects of resveratrol on vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma cells and cell proliferation. **Oncology Letters**, v. 4, n. 4, p. 837, out. 2012.

LONGHI, A.; MARIANI, E.; KUEHN, J. J. A randomized study with adjuvant mistletoe versus oral Etoposide on post relapse disease-free survival in osteosarcoma patients. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 27–33, 1 abr. 2009.

LUX, S. et al. The antinociceptive effect of resveratrol in bone cancer pain is inhibited by the Silent Information Regulator 1 inhibitor selisistat. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 816–825, 1 maio 2019.

MAKIELSKI, K. M. et al. Risk Factors for Development of Canine and Human Osteosarcoma: A Comparative Review. **Veterinary Sciences 2019, Vol. 6, Page 48**, v. 6, n. 2, p. 48, 25 maio 2019.

MARLEY, K. et al. The effects of taurolidine alone and in combination with doxorubicin or carboplatin in canine osteosarcoma in vitro. **BMC veterinary research**, v. 9, 18 jan. 2013.

MARTIN, T. W. et al. Outcome and prognosis for canine appendicular osteosarcoma treated with stereotactic body radiation therapy in 123 dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 19, p. 284–294, 2021.

NERADIL, J.; VESELSKA, R. Nestin as a marker of cancer stem cells. **Cancer Science**, v. 106, n. 7, p. 803, 1 jul. 2015.

PANG, L. Y. et al. Global Gene Expression Analysis of Canine Osteosarcoma Stem Cells Reveals a Novel Role for COX-2 in Tumour Initiation. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e83144, 8 jan. 2014.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 2, p. 147–156, fev. 2008.

PENG, L.; JIANG, D. Resveratrol eliminates cancer stem cells of osteosarcoma by STAT3 pathway inhibition. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, 1 out. 2018.

REGAN, D.; GARCIA, K.; THAMM, D. Clinical, Pathological, and Ethical Considerations for the Conduct of Clinical Trials in Dogs with Naturally Occurring Cancer: A Comparative Approach to Accelerate Translational Drug Development. **ILAR journal**, v. 59, n. 1, p. 99–110, 1 dez. 2018.

SANTALIZ-RUIZ, L. E. et al. Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. **International journal of cancer**, v. 135, n. 12, p. 2741–2748, 15 dez. 2014.

SCHLODDER, D.; GARDIN, N. E. Estudos clínicos com Helixor (Viscum album) para o tratamento deo câncer. **Arte Médica Ampliada**, v. XXXI, n. 1, p. 14–18, 2011.

SEVRI, G. et al. Cytotoxic and Apoptotic Effects of Curcumin on D-17 Canine Osteosarcoma Cell Line [1] Kurkuminin D-17 Köpek Osteosarkom Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri. **Univ Vet Fak Derg**, v. 27, n. 4, p. 465–473, 2021.

SZEWCZYK, M.; LECHOWSKI, R.; ZABIELSKA, K. What do we know about canine osteosarcoma treatment?-review. **Vet Res Commun**, v. 39, p. 61–67, 2015.

TATLIDEDE, E. et al. Resveratrol treatment protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by alleviating oxidative damage. **Free Radical Research**, v. 43, n. 3, p. 195–205, 2009.

THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenet Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011.

TOBEIHA, M. et al. Potential of natural products in osteosarcoma treatment: Focus on molecular mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112257, 1 dez. 2021.

VALLE, A V; AGUIAR, L R; BRUNEL, H S S; MALARD, P F AND ANDRADE, R. V. Homoeopathic *Viscum album* extract inhibits the growth of osteosarcoma cells. **Journal of Integrated Standardized Homoeopathy** •, v. 3, n. 2, p. 1–5, 2020.

VESELSKA, R. et al. Nestin expression in osteosarcomas and derivation of nestin/CD133 positive osteosarcoma cell lines. **BMC cancer**, v. 8, 16 out. 2008.

VIEIRA, V. S. et al. Crude extract of Jatobá leaves promotes canine osteosarcoma cell D17 proliferation. **Veterinary World**, v. 15, n. 5, p. 1283–1289, 2022.

WAKSHLAG, J. J.; BALKMAN, C. E. Effects of lycopene on proliferation and death of canine osteosarcoma cells. **American journal of veterinary research**, v. 71, n. 11, p. 1362–1370, nov. 2010.

WANG, M. L.; CHIOU, S. H.; WU, C. W. Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. **Oncotargets and therapy**, v. 6, p. 1207, 2013.

WILSON, H. et al. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 175, n. 1, p. 69–75, jan. 2008.

WITHERS, S. S. et al. In vitro and in vivo activity of liposome-encapsulated curcumin for naturally occurring canine cancers. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 16, n. 4, p. 571–579, 1 dez. 2018.

WRIGHT, A.; WATANABE, R.; KOEHLER, J. W. European Mistletoe (*Viscum album*) Extract Is Cytotoxic to Canine High-Grade Astrocytoma Cells In Vitro and Has Additive Effects with Mebendazole. **Veterinary Sciences 2022, Vol. 9, Page 31**, v. 9, n. 1, p. 31, 15 jan. 2022.

## ANEXO



## ATESTADO

**Atesto** que o Projeto "Comparação da resposta in vitro entre os tratamentos com Resveratrol, Viscum album e/ou Doxorubicina em cultura de células de Osteossarcoma Canino" **Protocolo CEUA 0182/2020**, a ser conduzido por Felipe César da Silva Brasileiro, responsável/orientador Renée Laufer Amorim, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

<b>Finalidade</b>	PESQUISA CIENTÍFICA
<b>Vigência do projeto</b>	01/02/2021 a 01/11/2021
<b>Nome Comum / Espécie / Linhagem</b>	//
<b>Raça</b>	
<b>Nº de animais machos</b>	0
<b>Nº de animais fêmeas</b>	0
<b>Nº de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Peso médio de animais machos</b>	0
<b>Peso médio de animais fêmeas</b>	0
<b>Peso médio de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Idade</b>	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
<b>Procedência</b>	FMVZ - UNESP, Campus Botucatu.

**Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 18/11/2020**

**JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO**  
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu