

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**“Análise da sobrevivência de células de osteossarcoma canino  
após irradiação com equipamento de Cobaltoterapia”**

***Paula de Sanctis***

*Acadêmica*

*Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha*

*Supervisor/Co-orientador: Prof. Dr. William  
Fernando Zambuzzi*

*Co-orientadores: Prof. Dr. Luís Fernando  
Barbisan, Prof. Dr. Marco Antônio Rodrigues  
Fernandes. Prof. Dr. Ramon Kaneno e Prof.  
Dr. Rogério Antônio de Oliveira*

*Colaboradores: Me. Brunno Felipe Ramos  
Caetano, Pós-doc. Luis Mauricio Montoya  
Flórez e Pós-doc. Valéria Barbosa de Souza*

Monografia apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, para  
obtenção do título de Bacharel em Física  
Médica.

Botucatu - SP

Outubro 2016

## **Monografia de Conclusão de Curso**

### **“Análise da sobrevivência de células de osteossarcoma canino após irradiação com equipamento de Cobaltoterapia”**

Paula de Sanctis  
Acadêmica

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha  
Orientadora

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi  
Supervisor/Co-orientador

Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan  
Prof. Dr. Marco Antônio Rodrigues Fernandes  
Prof. Dr. Ramon Kaneno  
Prof. Dr. Rogério Antônio de Oliveira  
Co-orientadores

Me. Brunno Felipe Ramos Caetano  
Pós-doc. Luis Mauricio Montoya Flórez  
Pós-doc. Valéria Barbosa de Souza  
Colaboradores

Monografia desenvolvida em nível de Iniciação Científica no Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

CNPq – 445250/2014-3

**Botucatu - SP**

**Outubro 2016**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE. OBRIGADA.

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sanctis, Paula de.

Análise da sobrevivência de células de osteossarcoma canino após irradiação com equipamento de Cobaltoterapia / Paula de Sanctis. - Botucatu, 2016

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Luís Fernando Barbisan

Coorientador: Marco Antônio Rodrigues Fernandes

Coorientador: Rogério Antônio de Oliveira

Coorientador: Ramon Kaneno

Capes: 20601000

1. Osteossarcoma. 2. Radiação ionizante. 3. Microscopia de fluorescência. 4. Técnicas in vitro.

Palavras-chave: Ensaio MTT; In vitro; Microscopia de fluorescência; Osteossarcoma; Radiação ionizante.

## PAULA DE SANCTIS

### ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CANINO APÓS IRRADIAÇÃO COM EQUIPAMENTO DE COBALTOTERAPIA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha.

Supervisor/Co-orientador: Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi.

Co-orientadores: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan, Prof. Dr. Marco Antônio Rodrigues Fernandes, Prof. Dr. Ramon Kaneno e Prof. Dr. Rogério Antônio de Oliveira.

Colaboradores: Me. Brunno Felipe Ramos Caetano, Pós-doc. Luis Mauricio Montoya Flórez e Pós-doc. Valéria Barbosa de Souza.

Parceria: Prof. Dr. José Maurício Sforcin, Pós-doc. Karina Basso Santiago e Pós-doc. Bruno José Conti.

Comissão examinadora:

---

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu

---

Profa. Dra. Diana Rodrigues de Pina Miranda  
Departamento de Doenças Tropicais  
FMB – UNESP – Botucatu

---

Profa. Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima  
Departamento de Química e Bioquímica  
IBB – UNESP – Botucatu

Botucatu, 18 de Novembro de 2016

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, em especial, aos meus pais, Vera Lúcia Rossi Lázaro de Sanctis e Paulo Sérgio de Sanctis, à minha irmã e melhor amiga, Fernanda de Sanctis, aos meus tios João Carlos Rossi Lázaro, Vanderléia Aparecida da Cruz Lázaro, Marcos André de Sanctis e Alessandra Luizetto Grava de Sanctis, à minha prima Laís da Cruz Lázaro e aos meus avós, Belmira Rossi Lázaro e Gregório Lázaro Bardez por tudo aquilo que me ensinaram, pelo grande carinho, amor, apoio e incentivo para que eu sempre desse o melhor de mim e não desanimasse por qualquer dificuldade. Amo muito vocês!

Aos meus amados Mateo, Mirtis, Simba e Brenda (*in memorium*), dos quais tenho uma saudade infinita.

À professora Noeme Sousa Rocha pelo comprometimento, apoio, incentivo e pela incrível pessoa que é.

Ao meu professor e estimado amigo Sandro José Conde por tudo o que aprendi e por quem tenho um carinho enorme.

A todos do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (LCQE), em especial ao mestrando Brunno Felipe Ramos Caetano por toda ajuda, paciência e pela pessoa maravilhosa que é.

Ao professor Paulo Ricardo de Oliveira Bersano, ao pós-doutorando Luis Maurício Montoya Flórez e a pós-doutoranda Valéria Barbosa de Souza pelo apoio, ajuda e por tudo o que aprendi com vocês.

Ao professor Sérgio de Souza Funari e à professora Silvia Maria Velasques de Oliveira pela amizade cultivada.

A todos que se dedicaram e contribuíram de alguma forma para tornar este trabalho possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, em especial à minha mãe pelo apoio em todos os momentos.

À minha orientadora por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho, pela dedicação, incentivo, confiança e ensinamentos, bem como a todos do Departamento de Patologia, em especial ao Luis Maurício por todo apoio.

Aos professores Rogério Antônio de Oliveira e Marco Antônio Rodrigues Fernandes pela amizade, ensinamentos e dedicação.

Ao Paulo Ricardo e à Valéria pela ajuda e por tudo o que aprendi com vocês.

Ao Bruno Felipe pela enorme ajuda no laboratório e no delineamento do experimento, ensinamentos, conselhos e paciência.

Ao mestrando Michel de Campos Vetoratto pela amizade, conselhos e ajuda, bem como a professora Sheila Canevese Rahal pelos conselhos e enorme simpatia.

À professora Flávia Karina Delella pela disponibilização do Laboratório de Cultura Celular, ensinamentos, grande atenção e disponibilidade de material, bem como seus alunos e os professores Claudia Helena Pellizzon e Sérgio Luís Felisbino.

Aos professores Luís Fernando Barbisan e Willian Fernando Zambuzzi pelos ensinamentos, atenção, apoio e dedicação.

A todos do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental e aos funcionários do Departamento de Morfologia pelo tempo que passei com vocês.

Ao Físico Antônio César Pernomian e aos Tecnólogos Natanael Izodoro, Rafaela Ferraz de Camargo e Beatriz Fernanda Diniz de Carvalho do Setor de Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) pela atenção, disposição e amizade.

Ao professor José Maurício Sforcin, aos pós-doutorandos Bruno José Conti e a Karina Basso Santiago pela parceria, atenção e ajuda.

Ao professor Ramon Kaneno pelos ensinamentos, grande apoio, ajuda no delineamento experimental e dedicação, assim como seus alunos, a professora Alexandrina Sartori e todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e

Imunologia.

À Shelly Favorito de Carvalho, ao Tiago dos Santos Tardivo e a todos os funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica pela paciência e enorme atenção.

A todos do Laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, em especial ao Célio Junior da Costa Fernandes pela ajuda e por tudo o que aprendi.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP, Campus de Botucatu, em especial a Rosemeire Aparecida Vicente pela confecção da ficha catalográfica, a Élide Daniele de Antônio e a Rosângela Aparecida Lobo pelas orientações e a Nivaldete Costa Fernandes Cruz por estar sempre apta a ajudar e pelo bom humor contagiante.

Aos funcionários da Seção Técnica de Graduação pelas orientações, em especial ao Éder Lourenço pela ajuda, amizade e paciência.

Aos proprietários dos animais que aceitaram que os mesmos pudessem ser a fonte de estudo deste e de outros muitos trabalhos.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Instituto de Biociências – IBB, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ e Faculdade de Medicina – FMB) pela oportunidade de realizar este trabalho, bem como a minha formação em Física Médica.

A todos que contribuíram de alguma forma para tornar este trabalho possível.

Muito obrigada!

*“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas nunca deixe de seguir em frente”.*

*(Martin Luther King)*

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais”.*

*(Augusto Cury)*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM OSSO LONGO E DE SUAS ESTUTURAS.....5
- Figura 2** – IMAGEM RADIOGRÁFICA DO MEMBRO SUPERIOR ESQUERDO DE UM CÃO COM OSTEOSSARCOMA. OBSERVAM-SE ÁREAS DE DESTRUÇÃO ÓSSEA NA REGIÃO PROXIMAL DA ULNA (SETA AMARELA) E UMA REGIÃO DE CALCIFICAÇÃO COM AUMENTO DO VOLUME DOS TECIDOS MOLES NA REGIÃO DISTAL DA ULNA (SETA AZUL) CAUSADAS PELA NEOPLASIA.....9
- Figura 3** – ESQUEMA DOS DANOS DIRETO (B) E INDIRETO (A) AO DNA CAUSADOS PELA RADIAÇÃO IONIZANTE.....12
- Figura 4** – ESQUEMA DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA CÉLULA QUE RESULTAM NO PROCESSO DE MORTE CELULAR POR NECROSE OU POR APOPTOSE.....13
- Figura 5** – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES DO CICLO DE DIVISÃO CELULAR COM AS SUBDIVISÕES DA MITOSE.....15
- Figura 6** – CULTURA PRIMÁRIA DE OSTEOSSARCOMA CANINO. CÉLULAS TUMORAIS APRESENTANDO PLEOMORFISMO EXPRESSIVO E CÉLULAS MONONUCLEADAS OU BINUCLEADAS (A – SETA BRANCA) – ZEISS®. AS CÉLULAS APRESENTAM NÚCLEOS E NUCLÉOLOS PROEMINENTES (SETAS LARANJA – A E B), SÃO FUSIFORMES, TÊM DIFERENÇA DE FORMA (CIRCULAR – SETA AMARELA – B) E TAMANHO E QUANDO ADERIDAS A SUPERFÍCIE DO FRASCO DE CULTURA (CÍRCULOS VERMELHOS – B), POSSUEM PROLONGAMENTO SEMELHANTES À PSEUDÓPODOS (SETAS VERDES – A).....23
- Figura 7** – CULTURA PRIMÁRIA DE OSTEOSSARCOMA CANINO COM 70/80%, APROXIMADAMENTE, DE CONFLUÊNCIA – ZEISS®. DESTAQUE PARA REGIÕES ONDE AS CÉLULAS ESTÃO BASTANTE COESAS ENTRE SI (CÍRCULOS PRETOS), PRESENÇA DE CÉLULAS BINUCLEADAS OU MULTINUCLEADAS (SETAS LARANJA) COM DESTAQUE DE UMA CÉLULA MULTINUCLEADA (SETA E CÍRCULO VERDES).....23
- Figura 8** – IMAGEM DE MICROSCPIA FLUORESCENTE DE CÉLULAS CORADAS COM AO E EB – AXIONVISION REL 4.7. CÉLULAS VIÁVEIS (SETAS VERDES), CÉLULAS EM APOPTOSE (SETAS BRANCAS) E CÉLULAS EM APOPTOSE TARDIA (SETAS AMARELAS). A E B SÃO REFERENTES AO GRUPO CONTROLE, C É REFERENTE AO TRATAMENTO COM 5 GY, COM DESTAQUE PARA DUAS CÉLULAS VIÁVEIS. D E E SÃO REFERENTES AO TRATAMENTO COM 10 GY E F É REFERENTE AO TRATAMENTO COM 30 GY.....26

**Figura 9** – ARRANJO EXPERIMENTAL DOS TRATAMENTOS UTILIZANDO-SE PLACAS DE 12 POÇOS (COSTAR 3513). DIMENSÕES DA PLACA (MEDIDAS APROXIMADAS): 12.8 CM DE COMPRIMENTO, 8.6 CM DE LARGURA, 2.25CM DE ALTURA E 1.1 CM DE DIÂMETRO.....34

**Figura 10** – ARRANJO EXPERIMENTAL DOS TRATAMENTOS UTILIZANDO-SE PLACAS DE 12 POÇOS (COSTAR 3595). DIMENSÕES DA PLACA (MEDIDAS APROXIMADAS): 12.6 CM DE COMPRIMENTO, 8.6 CM DE LARGURA, 1.5CM DE ALTURA E 0.7 CM DE DIÂMETRO.....34

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – VIABILIDADE CELULAR (%) 24 HORAS APÓS O TRATAMENTO PELA DOSE (GY) DE RADIAÇÃO IONIZANTE RECEBIDA.....24
- Gráfico 2** – PORCENTAGEM DE CÉLULAS (%) VIÁVEIS E EM APOPTOSE 24 E 72 HORAS APÓS O TRATAMENTO COM RADIAÇÃO IONIZANTE. AS BARRAS PRETA (24 H) E CINZA (72 H) SÃO REFERENTES AS CÉLULAS VIÁVEIS, ENQUANTO AS BARRAS LARANJA (24 H) E AMARELO (72H) SÃO REFERENTES AS CÉLULAS EM APOPTOSE.....25
- Gráfico 3** - PORCENTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS (%) 24 (LINHA PRETA) E 72 HORAS (LINHA VERMELHA) APÓS O TRATAMENTO COM RADIAÇÃO IONIZANTE.....25

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - RENDIMENTO DA FONTE DE CO-60 (CGY/MIN), DOSE (GY E CGY) E TEMPO DE EXPOSIÇÃO (MIN) DOS GRUPOS TRATADOS COM RADIAÇÃO IONIZANTE PARA O ENSAIO MTT.....20
- Tabela 2** - TEMPERATURA (°C), UMIDADE RELATIVA DO AR (%) E PRESSÃO ATMOSFÉRICA (MMHG) DA SALA DE COMANDO DA UNIDADE DE TELECOBALTOTERAPIA DO HC-FMB.....20
- Tabela 3** - TEMPERATURA (°C), UMIDADE RELATIVA DO AR (%) E PRESSÃO ATMOSFÉRICA (MMHG) DA SALA DE TRATAMENTO DA UNIDADE DE TELECOBALTOTERAPIA DO HC-FMB.....20
- Tabela 4** - RENDIMENTO DA FONTE DE CO-60 (CGY/MIN), DOSE (GY E CGY) E TEMPO DE EXPOSIÇÃO (MIN) DOS GRUPOS TRATADOS COM RADIAÇÃO IONIZANTE PARA O TESTE COM AO/EB.....20
- Tabela 5** - TEMPERATURA (°C), UMIDADE RELATIVA DO AR (%) E PRESSÃO ATMOSFÉRICA (MMHG) DA SALA DE COMANDO DA UNIDADE DE TELECOBALTOTERPIA DO HC-FMB.....21
- Tabela 6** - TEMPERATURA (°C), UMIDADE RELATIVA DO AR (%) E PRESSÃO ATMOSFÉRICA (MMHG) DA SALA DE TRATAMENTO DA UNIDADE DE TELECOBALTOTERPIA DO HC-FMB.....21

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AO** - Laranja de Acridina (ou *Acridine Orange*)
- °C** - Graus Celsius
- CEUA** - Comitê de Ética no Uso de Animais
- cGy** - Centigray
- cm** - Centímetro
- Co-60** - Cobalto-60
- Cox2** - Cicloxigenase-2
- CSA** - Condrossarcoma
- DFS** - Distância fonte superfície
- DMEM** - Meio modificado de Dulbecco (ou *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- DMSO** - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico (ou *deoxyribonucleic acid*)
- EB** - Brometo de Etídio (ou *Ethidium Bromide*)
- Fc** - Fator campo
- FITC** - Tiocianato de fluoresceína
- FMB** - Faculdade de Medicina de Botucatu
- FMVZ** - Faculdade de Medicina Veterinária
- FSA** - Fibrossarcoma
- GAP** – Espaço
- GE** – General Electric Company Medical System
- Gy** - Gray
- h** - Hora
- HC-FMB** - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
- HSA** - Hemangiossarcoma
- IBB** - Instituto de Biociências de Botucatu
- i.e.** – Isto é
- kg** - Quilograma
- MeV** - Megaeletronvolts

**mL** - Mililitros

**mmHg** - Milímetros de mercúrio

**MP** – Membrana plasmática

**MTT** - Metiltiazoltetrazólio (ou 3- [4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

**OSA** - Osteossarcoma

**PBS** - Solução tampão fosfato-salino

**PDP** - Porcentagem de dose profunda

**pH** - Potencial hidrogeniônico

**PLL** - Poli L. Lisina

**Rend** - Rendimento da fonte radioativa

**RI** - Radiação ionizante

**RM** - Ressonância Magnética

**Rend** - Rendimento

**SFB (ou BSA)** - Soro fetal bovino (ou *Bovine Serum Albumin*)

**spOS** - São Paulo – Osteossarcoma

**SSD** - Distância fonte superfície

**t** - Tempo

**TC (ou CT)** - Tomografia Computadorizada

**µg** - Micrograma

**µL** - Microlitro

**µm** - Micrometro

**UNESP** - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

## RESUMO

SANCTIS, P. **Análise da sobrevida de células de osteossarcoma canino após irradiação com equipamento de Cobaltoterapia.** 2016. 50 f. Monografia de conclusão de curso – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, Botucatu, 2016. Orientadora: ROCHA, N. S.

Assim como qualquer outra célula, as ósseas estão em constante renovação, sendo esta mais rápida nos indivíduos jovens devido ao crescimento dos ossos. Durante este processo, as células podem escapar aos mecanismos normais de controle de proliferação e dar origem a tumores de maior ou menor grau de malignidade. O osteossarcoma (OSA) é caracterizado pela infiltração local agressiva dos tecidos subjacentes e apesar de sua infrequência em comparação a neoplasias de outros órgãos, sua importância é relevante por se tratar de um tumor altamente agressivo e resistente tanto à quimioterapia quanto à radioterapia. Essa resistência pode ser resultado de um diagnóstico tardio, uma vez que os animais dependem de seus proprietários para que este seja realizado, o que geralmente acontece quando o tumor já atingiu um estágio avançado, dificultando o tratamento e diminuindo tanto a probabilidade de cura quanto a sobrevida dos animais. Este estudo buscou demonstrar a eficiência de se trabalhar com cultura de células a fim de diminuir a utilização de animais em experimentos e avaliar a sobrevida destas células após as mesmas serem tratadas com diferentes intensidades de radiação ionizante oriunda de um equipamento de Cobaltoterapia. Esperava-se obter uma resposta diretamente proporcional ao tratamento, ou seja, observar uma maior inviabilidade ou morte celular à medida que se aumentasse a intensidade de radiação ionizante. A cultura primária de OSA canino foi cultivada em frascos de cultura contendo meio de cultura DMEM alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino e com 1% de uma solução antibiótica e antimetabólica, sendo mantida em estufa úmida a 37° C. A análise da sobrevida celular foi realizada através do ensaio MTT e do teste de dupla coloração com os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio. Neste foi possível identificar células viáveis e em diferentes estágios de apoptose. Os resultados do ensaio MTT confirmaram a resistência da neoplasia ao tratamento e mostraram que apesar de se ter observado uma viabilidade decrescente com o aumento da dose, esta não é linear. Com este estudo se espera colaborar com a pesquisa em oncologia comparada e multidisciplinar servindo de incentivo para a busca de novos enfoques terapêuticos.

**Palavras – chave:** Osteossarcoma. *In vitro*. Radiação ionizante. Ensaio MTT. Microscopia fluorescente.

## ABSTRACT

SANCTIS, P. **Analysis of Canine Osteosarcoma Cells Survival after Irradiation with Cobalt Equipment.** 2016. 50 f. Monograph - Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2016. Advisor: ROCHA, N. S.

Bone is constantly remodeled by the crucial roles of osteoblast and osteoclast. It is known that during this process specific, cells adopt abnormal proliferation culminating to tumoral phenotype ranging their malignancies. In turn, canine osteosarcoma (OSA) is characterized by aggressive local infiltration and resistance to chemotherapy or radiotherapy as well. This resistance can be a result of a late diagnosis, since these animals depend on its owners for the diagnosis, what usually happens when the cancer has reached an advanced stage, difficulty the treatment and reducing the healing process and the survival of animals. In this sense, aim was to demonstrate the efficiency of cell culture as a biological model to evaluate the effect of different intensities of ionizing radiation from cobalt equipment. In addition, cell culture is a well-known strategy as an alternative method to avoid or reduce at least the number of experimental animals. In this work, primary cell culture of canine OSA was grown in culture flasks containing DMEM high glucose culture media supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic and antimetabolic solution. The cell culture was maintained in a humidified incubator at 37°C. The analysis of cell survival was performed by MTT assay and the dual acridine orange and ethidium bromide fluorescent staining. This was possible to identify OSA cells at different stages of apoptosis under the different intensities of ionizing radiation. The results of the MTT assay confirmed the resistance to OSA treatment and showed that although it was observed a decreasing viability with increasing dose, this was not linear indeed. We expect to contribute for researching comparative oncology and multidisciplinary serving as an opening door to the search effective therapeutic approaches.

**Keywords:** Osteosarcoma. *In vitro*. Ionizing radiation. MTT assay. Fluorescent microscopy.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Tecido ósseo.....	2
2.1.1. Matriz óssea.....	2
2.1.2. Osteoblastos.....	3
2.1.3. Osteoclastos.....	3
2.1.4. Osteócitos.....	3
2.1.5. Células osteoprogenitoras.....	4
2.1.6. Tipos de tecido ósseo e ossos longos.....	4
2.2. Câncer em animais.....	5
2.3. Neoplasias ósseas e osteossarcoma.....	5
2.4. Cultivo celular.....	7
2.5. Diagnóstico e tratamento do osteossarcoma.....	9
2.6. Morte celular.....	12
2.7.1. Morte celular causada por radiação ionizante.....	13
2.7.2. Biologia da radiação.....	14
2.8. Ensaio de viabilidade celular.....	15
2.8.1. Ensaio MTT.....	15

2.8.2. Teste de dupla coloração com (AO/EB).....	16
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Relevância do tema.....	16
4. PERSPECTIVAS.....	17
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
5.1. Origem do material em estudo e aspectos éticos.....	17
5.2. Cultura celular.....	17
5.3. Tratamento com radiação ionizante.....	19
5.4. Avaliação da sobrevivência celular.....	21
5.4.1. Ensaio MTT.....	21
5.4.2. Teste de dupla coloração com AO/EB.....	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
7. CONCLUSÃO.....	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
ANEXOS.....	31
ANEXO A – Atestado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	32
ANEXO B – Protocolo de tratamento das laminulas com Poli L. Lisina (SIGMA - ALDRICH).....	33
ANEXO C – Esquema do arranjo experimental dos tratamentos.....	34

## 1. INTRODUÇÃO

As células do osso podem escapar aos mecanismos normais que controlam sua proliferação e dar origem a tumores de maior ou menor grau de malignidade. A incidência de tumores ósseos em cães é da ordem de 7.9/100000 e destes, 98% são malignos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BOGLIOLO, 2006; NORTH; BANKS, 2009).

Apesar de sua infrequência em comparação a neoplasias de outros órgãos, a importância prática do osteossarcoma (OSA) é relevante devido a dificuldades na sua conduta, pois o OSA trata-se de um tumor mesenquimatoso produtor de matriz óssea caracterizado pela infiltração local agressiva dos tecidos subjacentes com rápida disseminação hematogênica e presença de osteoblastos pleomórficos, que se dividem por mitose com muita frequência (BOGLIOLO, 2006; NORTH; BANKS, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; FRACASSO, 2012).

A radioterapia é amplamente utilizada no tratamento do câncer em pacientes humanos e é igualmente aplicável para pequenos animais (MORRIS, 2007). Entretanto, as células do OSA têm sido consideradas historicamente resistentes à radiação ionizante, de modo que esta é normalmente indicada para pacientes em que a amputação não é uma opção de tratamento ou em combinação com a cirurgia. (FRACASSO, 2012; MORAES, 2009; MANTOVANI, 2016).

A resistência pode se dever a utilização da radioterapia convencional e por isso, recomenda-se a utilização de doses elevadas de radiação ionizante. Dentre os protocolos disponíveis na literatura para o caso do OSA, o mais comumente utilizado é a incidência de cobalto-60 na intensidade de 8 a 10 Grays (Gy) aplicadas em três sessões (FRACASSO, 2012; MORAES, 2009; MANTOVANI; MUTSAERS, 2016).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.2. Tecido ósseo**

O tecido ósseo trata-se de um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por um processo denominado ossificação intramembranosa, que ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, ou pelo processo de ossificação endocondral. Este tecido é composto por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; JUNQUEIRA, 2005).

As células que constituem o tecido ósseo são: os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na sua periferia, os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz e mantêm o tecido ósseo vivo; e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; JUNQUEIRA, 2005).

Como não existe difusão de substâncias através da matriz calcificada do osso, a nutrição dos osteócitos depende de canaliculos que existem na matriz, os quais possibilitam as trocas de moléculas e íons entre os capilares sanguíneos e os osteócitos. Todos os ossos são revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o perióstio e o endóstio, respectivamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO., 2008).

Apesar do tecido ósseo ser um dos tecidos mais duros do corpo, ele é um tecido dinâmico que muda constantemente a sua forma em relação ao tipo de estresse mecânico sofrido por ele, de modo que pressões aplicadas sobre ele levam à reabsorção da matriz, enquanto tensões aplicadas sobre ele levam ao desenvolvimento de um novo tecido ósseo, por exemplo (GARTNER, 2007).

Além disso, o tecido ósseo é um reservatório de vários minerais, armazenando cerca de 99% do cálcio do corpo, por exemplo (GARTNER, 2007).

#### **2.1.1. Matriz óssea**

A matriz óssea tem constituintes inorgânicos e orgânicos. Os componentes inorgânicos da matriz óssea são cristais de hidroxiapatita de cálcio, compostos principalmente por cálcio e fósforo, enquanto que o componente orgânico predominante do tecido ósseo é o colágeno tipo I (GARTNER, 2007).

A associação dos cristais de hidroxiapatita com o colágeno (i. e., todo o

mineral é removido do osso), faz com que os ossos mantenham a sua forma original, mas se tornem muito flexíveis. Se o componente orgânico é extraído do osso, o esqueleto mineralizado ainda mantém sua forma original, mas se torna extremamente quebradiço e pode ser fraturado com facilidade (GARTNER, 2007).

### **2.1.2. Osteoblastos**

Os osteoblastos estão presentes na superfície de ossos em formação, são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz óssea, e apresentam vários receptores para vitaminas, hormônios e citocinas que controlam sua atividade (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; JUNQUEIRA, 2005).

Quando em intensa atividade sintética, são cuboídes, com citoplasma muito basófilo e em estado pouco ativo, tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática reduz. Uma vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, passa a ser chamado de osteócito. A matriz óssea recém-formada, adjacente aos osteoblastos ativos e que não está ainda calcificada, é denominada de osteóide (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

### **2.1.3. Osteoclastos**

Os osteoclastos tratam-se de células gigantes, móveis, multinucleadas e extremamente ramificadas resultantes da fusão de macrófagos, originários da medula óssea. As ramificações são muito irregulares, apresentando forma e espessura variáveis. Seu citoplasma é granuloso e contém inúmeros lisossomos e um aparelho de Golgi bem desenvolvido (JUNQUEIRA; CARNEIRO., 2008; JUNQUEIRA, 2005).

Frequentemente, nas áreas de reabsorção de tecido ósseo, encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos, colocadas em depressões da matriz escavada pela atividade dos osteoclastos e denominadas de Lacunas de Howship (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

### **2.1.4. Osteócitos**

Os osteócitos, essenciais para a manutenção da matriz óssea, tratam-se de pequenas células achatadas que exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pouco desenvolvido e núcleo com cromatina condensada (JUNQUEIRA; CARNEIRO., 2008; JUNQUEIRA, 2005).

Essas células residem dentro da matriz extracelular (MEC) calcificada, em espaços denominados de lacunas, as quais contêm apenas um osteócito. Além disso, apresentam muitos prolongamentos citoplasmáticos, que possuem junções comunicantes em suas extremidades, por onde ocorre a difusão de metabólicos que os nutrem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; JUNQUEIRA, 2005).

O tecido ósseo se mantém vivo graças ao funcionamento dos osteócitos, apesar do seu citoplasma não apresentar características de células com intensa atividade metabólica e sua morte é seguida por reabsorção da matriz (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; JUNQUEIRA, 2005).

#### **2.1.5. Células osteoprogenitoras**

As células osteoprogenitoras originam-se de células mesenquimais embrionárias e mantêm sua capacidade de passar por mitoses. Estas células localizam-se na camada celular interna do periósteo, revestindo os canais de Havers, e no endósteo, sendo mais ativas durante o período de crescimento ósseo intenso (GARTNER, 2007).

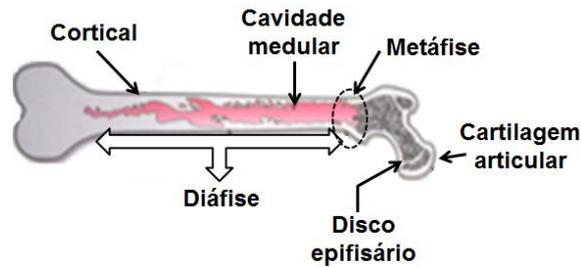
Além disso, são derivadas do mesênquima embrionário, permanecem no mesmo lugar durante toda a vida, podem passar por divisões mitóticas e têm o potencial de se diferenciar em osteoblastos, sendo que em certas condições de baixa tensão de oxigênio, podem diferenciar-se em células condrogênicas (GARTNER, 2007).

#### **2.1.6. Tipos de tecidos ósseos e ossos longos**

Observando-se a olho nu a superfície de um osso serrado, verifica-se que ele é formado por partes sem cavidades visíveis, o osso compacto, e por partes com muitas cavidades intercomunicantes, o osso esponjoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Nos ossos longos as extremidades ou epífises são formadas por osso esponjoso com uma delgada camada superficial compacta. A diáfise é quase totalmente compacta, com pequena quantidade de osso esponjoso na sua parte profunda, delimitando o canal medular (JUNQUEIRA; CARNEIRO., 2008).

O canal medular da diáfise e as cavidades do osso esponjoso são ocupados pela medula óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO., 2008).



**Figura 1** – Representação de um osso longo e suas estruturas (adaptado de BOGLIOLO, 2006).

## 2.2. Câncer em animais

O câncer é uma das principais causas de morte em animais de companhia. A prevalência de câncer em cães e gatos está crescendo assim como o número de fatores que contribuem para este aumento, que em parte refletem o envelhecimento desta população. Além disso, assim como em outras doenças, a boa alimentação e a medicina preventiva resultam em uma vida mais longa e que, entretanto, farão com que a incidência de câncer aumente conseqüentemente (NORTH; BANKS, 2009; DE NARDI et al., 2002).

Estima-se que um em cada cinco cães desenvolverá câncer, sendo o de pele e o do tecido subcutâneos os de maior prevalência, seguidos dos tumores mamários, hematopoiéticos e ósseos. 45% dos óbitos de cães com mais de dez anos de idade são causados por câncer e certas raças como Boston Terrier, Boxer, Cocker Spanial, Poodle, Pastor Alemão e Golden Retriever, apresentam alta incidência de casos de câncer; outras, como Beagle, Collie e Teckel, têm menor prevalência da doença (DALECK; NARDI, 2008; DALECK; NARDI, 2016; DE NARDI et al., 2002).

Alguns estudos demonstram que os riscos de certos tipos de câncer (mama, ovário e próstata) são reduzidos com a castração precoce em cães e gatos, ou seja, antes do primeiro cio e da maturidade sexual no indivíduo do sexo masculino, que é em torno dos seis meses de idade. Sobre a distribuição dos vários tipos de tumor, na maioria dos levantamentos estatísticos constata-se que os tumores de pele e os de tecido mole são os mais frequentes (DALECK; NARDI, 2016).

## 2.3. Neoplasias ósseas e osteossarcoma

As células do osso podem escapar aos mecanismos normais de proliferação e originar tumores de maior ou menor grau de malignidade. Os tumores benignos são denominados de condromas, e os malignos, condrossarcomas (CSA); os formados de células ósseas são os osteomas, que são benignos, e os OSAs, que são

malignos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A incidência de tumores ósseos em cães é da ordem de 7.9/100000 e destes, 98% são malignos. Apesar de sua infreqüência em comparação a neoplasias de outros órgãos, sua importância é relevante devido às dificuldades na sua conduta e também por representar um excelente modelo *in vivo* para o OSA humano (BOGLIOLO, 2006; NORTH; BANKS, 2009; BERSANO, 2006).

Tumores ósseos compõem um extenso espectro de lesões, algumas inócuas, outras rapidamente letais, que faz com que tais lesões precisem ser adequadamente diagnosticadas e tratadas a fim de permitir a sobrevivência dos doentes e um menor número possível de sequelas (BOGLIOLO, 2006; NORTH; BANKS, 2009; BERSANO, 2006).

O estudo necessita ser dinâmico, com correlação clínico-radiológica e patológica para se chegar ao diagnóstico correto. O aspecto histológico de algumas neoplasias é pouco característico e pode ser confundido com outras condições não neoplásicas cujos tratamentos diferem enormemente como, por exemplo, o tumor de células gigantes genuíno e o tumor marrom hiperparatireoidismo (BOGLIOLO, 2006; NORTH; BANKS, 2009; BERSANO, 2006).

Os tumores ósseos podem ser divididos em primários, metastáticos e que invadem os ossos. Em relação aos primários, o mais comum é o OSA, o qual representa 85%, aproximadamente, dos tumores ósseos, enquanto os condrossarcomas, os fibrossarcomas (FSA) e os hemangiossarcomas (HSA) representam de 5 a 10%, aproximadamente (NORTH; BANKS, 2009; GOMES et al., 2006).

As neoplasias ósseas ocorrem principalmente em cães de porte grande a gigante e mais comumente em cães de meia idade a idosos. Além disso, o aumento do peso é um fator de risco de grande importância que está associado ao aumento da incidência do tumor. (GOMES et al, 2006; BERSANO, 2006; OLIVEIRA, 2008).

O OSA é um tumor mesenquimatoso produtor de matriz óssea caracterizado pela infiltração local agressiva dos tecidos subjacentes com rápida disseminação hematogênica e presença de osteoblastos pleomórficos, que se dividem por mitose com muita freqüência (JUNQUEIRA; CARNEIRO., 2008; NORTH; BANKS, 2009; FRACASSO, 2012; BERSANO, 2006).

Tanto o esqueleto axial quanto o apendicular podem ser acometidos, sendo

mais frequentes nas áreas de metáfise de ossos longos como, por exemplo, as regiões distal do rádio, proximal do úmero, distal do fêmur e, proximal e distal da tíbia. Observa-se ainda uma maior prevalência nos membros anteriores em relação aos posteriores, em uma proporção de 2:1 (NORTH; BANKS, 2009; FRACASSO, 2012; BERSANO, 2006).

Por ser localmente agressivo, o OSA causa lises e/ou produção de osso e inchaço dos tecidos moles, e pode causar fraturas patológicas (NORTH; BANKS, 2009). A característica identificadora das células neoplásicas de OSA é a sua capacidade de produzir osteóide, a matriz colagenosa que pode ficar mineralizada, transformando-se em osso e em sua variedade mais comum tem-se a presença de osteoblastos fusiformes que são visualizados como células triangulares ou fusiformes curtas com núcleos ovoides e distendidos (FRACASSO, 2012).

As raças com maior incidência de OSA são: Rottweiler, Fila Brasileiro, São Bernardo, Dinamarquês, Setter Irlandês, Doberman, Pastor Alemão, Golden Retriever, Boxer, Labrador e Mastiff (FRACASSO, 2012; BERSANO, 2006).

Entretanto, estudos demonstram que a ocorrência do OSA está mais relacionada ao porte do que a raça do animal. Cães acima de 36.5 kg apresentam de 61 a 185 vezes mais risco quando comparados aos com menos de 9 kg, o que pode se dever a microfraturas causadas pela intensa atividade deles quando filhotes, o que poderia induzir a formação do tumor na fase adulta (FRACASSO, 2012; BERSANO, 2006).

#### **2.4. Cultivo celular**

Quando as células são removidas a partir de fragmentos de órgãos interrompendo assim as suas relações normais com as células vizinhas, tem-se o que é denominado de cultura de células, a qual passa a crescer em recipientes estéreis, os de frascos de cultura (RYAN, 2008; MIGITA, 2012).

Uma cultura celular é dita primária, quando as células foram diretamente obtidas de um tecido humano ou animal. Estas células possuem morfologia idêntica a do tecido de origem e mantêm as características fisiológicas deste, além de apresentar diversos clones neoplásicos, o que lhe torna representativa das condições naturais de um organismo e, portanto, um bom modelo *in vitro* em oncologia com terapêutica (MIGITA, 2012; BERSANO, 2011; FRESHNEY, 2010).

Tem-se também as linhagens celulares contínuas, nas quais as células sofreram imortalização, i.e., adquiriram a capacidade de se multiplicar indefinidamente e tendem a apresentar menor variação nos resultados obtidos do que uma cultura primária, porém não expressam o que efetivamente ocorre com o paciente (MIGITA, 2012; BERSANO, 2011; FRESHNEY, 2010).

A vantagem de se trabalhar com cultura de células se deve ao fato de que células mantidas em cultura são modelos biológicos mais simples que os estabelecidos com base em animais de experimentação. Entretanto tem-se algumas limitações, uma vez que elas não estão inseridas em uma estrutura tridimensional, formando uma monocamada, e pela não existência de outros tipos celulares adjacentes, como ocorre no tumor *in vivo*. (MIGITA, 2012).

O crescimento das células, após descongelamento, em geral, é lento. Por isso, se recomenda o uso de meio com 20% de soro fetal bovino, até que o crescimento volte ao normal. Com este mesmo objetivo, a troca de meio nos primeiros dias deve ser evitada, permitindo o acúmulo de fatores de crescimento produzidos pelas células (PERES, 2005).

Ao se trabalhar com cultura de células, é necessário um ambiente estéril, realizar todos os procedimentos tomando todos os cuidados assépticos, além de controlar a temperatura e a umidade da estufa. Isto porque, uma vez que as células são cultivadas em meios ricos em nutrientes, a possibilidade de ocorrer propagação de microrganismos contaminantes é alta (PERES, 2005; GUIMARÃES, 2010).

Amostras congeladas já contaminadas ou contaminadas durante o congelamento ou descongelamento irão manifestar a presença de microrganismos já nos primeiros dias ou após a primeira troca de meio. No entanto, contaminações com micoplasma não são tão aparentes, mas um retardo prolongado no crescimento pode indicar tal contaminação. A observação destes aspectos é, portanto, extremamente útil para o sucesso do cultivo celular (PERES, 2005; GUIMARÃES, 2010).

Uma forma rápida e eficaz de se verificar viabilidade das células antes e após o descongelamento é o teste com o corante Azul de Tripán, uma vez que este normalmente não atravessa a membrana externa da célula, exceto quando esta estiver lesada a ponto de permitir a entrada de moléculas para o seu interior, o que indica que ela está morta (FRANCO et al., 2010).

No caso de células oriundas de tecidos duros, como as células ósseas, tem-se a necessidade de adesão das células a uma superfície de contato para que proliferação possa ser iniciada. Para tal os frascos de cultura devem possuir uma carga negativa, a qual é responsável por mediar a produção de proteínas de adesão e proteoglicanos que irão iniciar o processo de adesão da célula à superfície do frasco. (ALVES et al., 2010).

Além disso, a matriz extracelular interage com a carga negativa do frasco e, então, as células se ligam à matriz por receptores específicos. Quando em cultura, as células aderentes se espalham por todo o fundo do frasco formando o que é denominado de monocamada celular (ALVES et al., 2010).

## 2.5. Diagnóstico e tratamento do osteossarcoma

Um diagnóstico histológico do OSA requer uma biópsia suficientemente grande para que o OSA não seja confundido com uma reação periosteal (formação de novo osso em resposta a ferimentos ou outros estímulos do periósteo em torno do osso), osteomielite (doença infecciosa causada geralmente por bactérias), CSA, HSA ou FSA (NORTH; BANKS, 2009).

Para o diagnóstico clínico do OSA são necessários dados da radiologia convencional, utilizando-se os métodos de imagem como tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) e a cintilografia óssea para se avaliar a extensão da lesão no osso e a invasão de outros ossos e de tecidos moles, sobretudo como parte do protocolo de tratamento alternativo à amputação, como a substituição óssea, parcial ou total, por endopróteses não convencionais. Estes métodos são aplicados também na avaliação de conteúdos das lesões (líquidos, sangue, pigmento de hemossiderina, etc.) (BOGLIOLO, 2006).



**Figura 2** - Imagem radiográfica do membro superior esquerdo de um cão com osteossarcoma. Observam-se áreas de destruição óssea na região proximal da ulna (seta amarela) e uma região de calcificação com aumento do volume dos tecidos moles na região distal da ulna (seta azul) causadas pela neoplasia (FRACASSO, 2012 – Imagem cedida pela FMVZ, 2008).

Os tumores ósseos benignos, mais comuns do que os malignos, são geralmente lesões de crescimento lento, de limites precisos, com ou sem halo de esclerose de reparo; quando apresentam reação perióstica, esta é do tipo insuflante, sem interrupção ou contínua ou, ainda homogênea podendo, também, se formar o triângulo de Codman sólido (BOGLIOLO, 2006).

Os tumores malignos, em geral de crescimento rápido, alcançam volume maior e mostram, nos exames de imagem, limites imprecisos ou áreas de indefinição, sem esclerose reativa em torno da lesão, a qual pode ter aspecto em mama geográfico, moteado ou permeativo. Quando há reação perióstica, ela pode ser do tipo insuflante, laminar única ou múltipla (capas múltiplas), interrompidas ou descontínuas (BOGLIOLO, 2006).

Segundo BOGLIOLO (2006), outros tipos de reação perióstica podem ocorrer nas lesões malignas, são elas: espiculado ou “em raio de sol” e triângulo de Codman vazio. Ainda do ponto de vista radiográfico, as lesões malignas podem apresentar também ruptura da cortical e invasão dos tecidos moles.

Segundo este mesmo autor, a sede mais frequente de metástases de tumores ósseos são os pulmões, de modo que são realizadas radiografias e TC do tórax nos casos de neoplasias malignas. Dor e/ou aumento de volume são os principais sintomas e sinais dos tumores ósseos.

A terapia do câncer deve sempre ser feita especificamente para se adequar a um caso individual, levando em consideração biologia, histologia, grau e extensão do tumor (MORRIS et al., 2007).

De acordo com MORRIS et al. (2007), uma cura completa, i. e., a erradicação de todas as células precursoras do tumor, é o resultado desejável do tratamento, mas mesmo os métodos mais efetivos disponíveis atualmente não conseguem alcançar com êxito tal alvo em todos os casos.

A cirurgia é considerada uma das medidas mais eficazes de tratamento para a maioria das neoplasias sólidas nos animais e, geralmente, oferece as melhores chances de cura. Uma das indicações é a citorredução da massa tumoral antes da radioterapia, na qual se terá a remoção física de todas as células do tumor, uma vez que, na maioria dos casos, uma margem de tecido normal, denominada de margem de segurança, é incluída na excisão cirúrgica (MORRIS et al., 2007).

Outro motivo, segundo os estudos de MORRIS (2007), é a profilaxia, porque castrar uma cadela, por exemplo, antes do primeiro ou segundo cio reduz

significativamente o risco de um posterior desenvolvimento de tumores mamários, por exemplo.

Entretanto, falhas no tratamento cirúrgico podem resultar em: tumor benigno incompletamente ressecionado na primeira tentativa e, nesse caso, o tumor irá crescer novamente no local do tumor primário ou adjacente; contaminação de tecido normal com células do tumor no momento da cirurgia por meio de hemorragia, instrumentos cirúrgicos ou via drenagem cirúrgica; metástases em órgãos distantes antes do tratamento cirúrgico e, nesse caso, o animal irá subsequentemente desenvolver problemas relacionados a tumores metastáticos em outros locais (MORRIS et al., 2007).

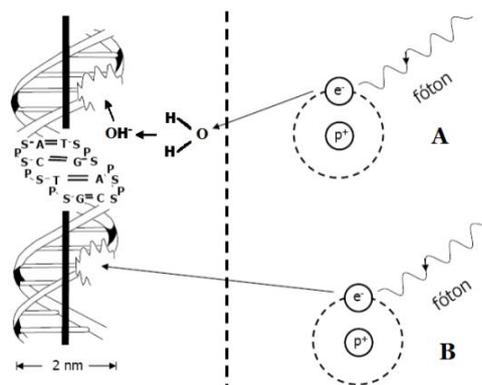
Os agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer possuem baixo índice terapêutico, uma vez que a dose que produz a resposta terapêutica desejada é muito próxima à que produz uma resposta tóxica indesejável (HOSKINS, 2008).

Já a radioterapia é amplamente utilizada no tratamento do câncer em pacientes humanos e é igualmente aplicável ao tratamento da doença em pequenos animais. No caso do OSA, ela é indicada quando a cirurgia não é possível ou em combinação com a cirurgia, podendo prolongar a sobrevida dos pacientes (MORRIS et al., 2007; OLIVEIRA, 2008).

A radiação é uma forma de energia que, quando absorvida por tecidos vivos, causa excitação e ionização dos componentes de átomos ou moléculas no caminho do feixe da onda. Reações químicas subsequentes resultam em quebra de pontes moleculares e podem resultar em morte apoptótica das células, caso as moléculas críticas para a viabilidade da célula sejam rompidas (MORRIS et al., 2007).

O “alvo crítico” geralmente considerado é o ácido desoxirribonucleico (DNA) nuclear, mas outras moléculas em outras partes das células como proteínas e lipídeos, por exemplo, também podem ser danificadas e contribuir para lesão celular induzida por radiação (MORRIS et al., 2007).

Os danos direto e indireto ao DNA causados pela radiação ionizante (RI) são apresentados na Figura 3, onde em B observam-se quebras das ligações estruturais do DNA e em A, a reação do elétron com uma molécula de água formando um radical livre, a hidroxila, a qual é altamente reativa com as estruturas celulares.



**Figura 3** – Esquema dos danos direto (B) e indireto (A) ao DNA causados pela radiação ionizante (SILVA, 2013; BONATO, 2011).

As células do OSA têm sido consideradas historicamente resistentes à radiação, de modo que a radioterapia é normalmente indicada como uma terapia coadjuvante ou em casos em que a amputação não é uma opção de tratamento. Tal resistência pode se dever a utilização da radioterapia convencional e por isso, recomenda-se a utilização de doses elevadas de radiação ionizante (FRACASSO, 2012; MORAES, 2009; MANTOVANI; MUTSAERS, 2016; HOSKINS, 2008).

Dentre os protocolos de radioterapia disponíveis na literatura para o caso do OSA, o mais comumente utilizado é a incidência de cobalto-60 na intensidade de 8 a 10 Grays (Gy) aplicadas em três sessões (FRACASSO, 2012; MORAES, 2009; MANTOVANI; MUTSAERS, 2016; HOSKINS, 2008).

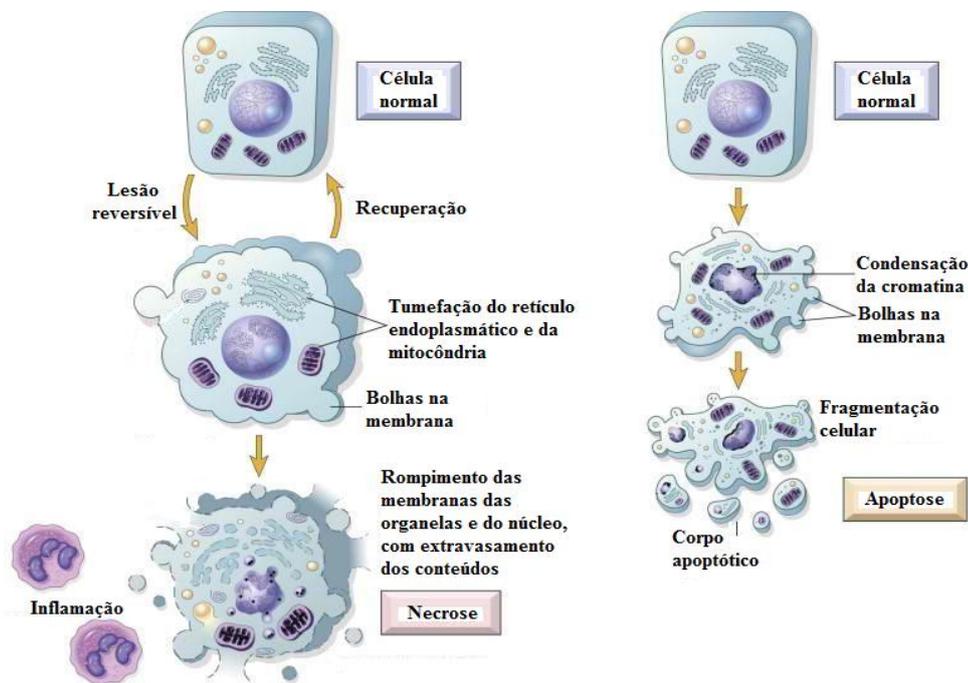
A maioria dos animais precisa de anestesia breve durante cada sessão de radioterapia, o que pode ser prejudicial para os animais idosos principalmente, pois o episódio anestésico pode exacerbar uma disfunção orgânica subclínica preexistente e produzir falência orgânica evidente. (FRACASSO, 2012; MORAES, 2009; MANTOVANI; MUTSAERS, 2016; HOSKINS, 2008; NATIONAL CANCER INSTITUTE).

## 2.6. Morte celular

As duas formas de morte celular de maior ocorrência em mamíferos são a necrose e a apoptose, sendo a necrose nada ou pouco previsível, promovendo reações inflamatórias locais, enquanto a apoptose é expressa de forma programada e silenciosa e não promove inflamação (FRANCO et al., 2010).

Na necrose tem-se a tumefação celular, isto é, tamanho aumentado, a membrana plasmática (MP) rompida, assim como as membranas do núcleo e das

organelas, causando o extravasamento do conteúdo celular, além da formação de bolhas na MP e, em certos tipos celulares, a condensação da cromatina assim como ocorre na apoptose (COTRAN; ROBBINS, 2010; FRANCO et al., 2010; BERTOLLO, 2010). Já na apoptose, o tamanho da célula é reduzido, devido ao carreamento de água para fora da célula por conta do efluxo de potássio, o núcleo é fragmentado, a MP tem sua estrutura alterada mas não é rompida, e os conteúdos celulares são mantidos intactos, podendo ser liberados em corpos apoptóticos devido a fissões do citoplasma. Além disso, observa-se a condensação da cromatina e a formação de bolhas na MP (COTRAN; ROBBINS, 2010; FRANCO et al., 2010).



**Figura 4** – Esquema das alterações morfológicas da célula que resultam no processo de morte celular por necrose ou por apoptose (adaptado de COTRAN; ROBBINS, 2010).

### 2.6.1. Morte celular causada por radiação ionizante

A maioria das células morre do que é conhecido como uma morte reprodutiva ou devido a doses clínicas padrão, em que o efeito da radiação ionizante é limitado às células em divisão, isso pelo fato de que os efeitos clínicos dependem da fração de crescimento e do tempo de duplicação das células tumorais (NORTH; BANKS, 2009).

De acordo com a faixa de energia utilizada em oncologia veterinária, tem-se que o maior efeito é o indireto devido à produção de radicais livres, pois as células vivas consistem de aproximadamente 85% de água, de modo que o principal alvo

da radiação ionizante são as moléculas de água, resultando na produção do radical hidroxila, o qual danifica o material genético celular (NORTH; BANKS, 2009).

Entretanto, segundo NORT e BANKS (2009), os efeitos da radiação não são especificamente para células neoplásicas, de modo que os tecidos normais de proliferação rápida, conhecidos como tecidos de resposta rápida ou aguda também são suscetíveis de danos.

Células normais que se dividem mais lentamente, como as ósseas, por exemplo, são afetadas pela radiação, mas as mudanças podem levar de meses a anos para começar a aparecer por se tratarem de tecidos de resposta tardia (NORTH; BANKS, 2009).

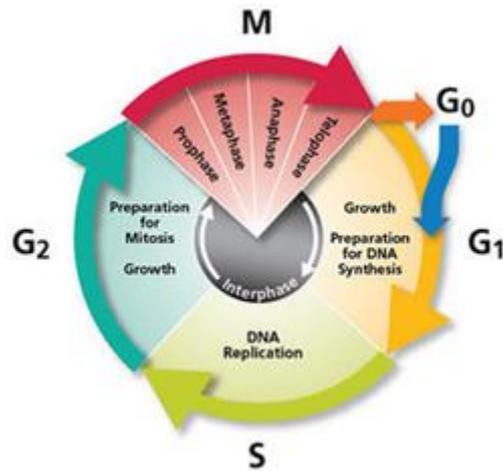
### **2.6.2. Biologia da radiação**

A resposta de células vivas e tecidos à radiação depende da dose ou taxa de dose de radiação aplicada e da radiosensibilidade da população celular. A radiosensibilidade varia de acordo com vários fatores e um dos mais importantes é a fração de crescimento da população celular (MORRIS et al., 2007).

Células em divisão são geralmente mais sensíveis à radiação que células diferenciadas em não divisão. Assim, tecidos com alta proporção de células em divisão como, por exemplo, medula óssea e epitélio gastrintestinal, são mais radiosensíveis que tecidos que não estão em proliferação como, por exemplo, tecidos fibrosos e musculoesquelético, o mesmo se aplica aos tumores com alta fração de crescimento, pois tendem a ser mais sensíveis à radiação (MORRIS et al., 2007).

Células na fase M (mitótica) do ciclo celular são mais radiosensíveis, e aquelas na fase S (replicação de DNA) são mais resistentes assim como as células em G<sub>0</sub> (em crescimento e preparação para a mitose) (MORRIS et al., 2007; THAUHATA et al., 2014).

Observa-se na Figura 5 a seguir um esquema do conjunto de processos que ocorrem numa célula viva no ciclo de divisão celular.



**Figura 5** - Representação esquemática das fases do ciclo de divisão celular com as subdivisões da mitose (BD BIOSCIENCES).

A oxigenação das células também é tida como fator significativo na determinação da radiosensibilidade. A maior parte das células tumorais existe em tensão baixa de oxigênio, isto é, são células hipóxicas, devido ao fato de que uma distância de 100  $\mu\text{m}$  de um leito capilar resulta em hipóxia. Este fato as torna de 2.5 a 3 vezes menos sensíveis à radiação que células normalmente oxigenadas, isso porque a hipóxia protege as células dos danos promovidos pela radiação ionizante através da radiólise da água na macromolécula do DNA (MORRIS et al., 2007; NORTH; BANKS, 2009; HAMANN, 2016).

Com isso, ao se fracionar a dose de tratamento promove-se primeiramente a morte celular das células tumorais mais oxigenadas e permite-se o reparo dos vasos sanguíneos, os quais irão vascularizar melhor o tumor, ofertando assim mais oxigênio para as células tumorais hipóxicas (HAMANN, 2016).

Entretanto, altos níveis de oxigênio repararam os danos dos radicais livres. (MORRIS et al., 2007; NORTH; BANKS, 2009).

## 2.7. Ensaios de viabilidade celular

### 2.7.1. Ensaio MTT

O teste de viabilidade celular com MTT se baseia na redução do MTT, um sal tetrazólico, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis para formar um cristal chamado de Azul de Formazan, tornando possível medir a respiração celular,

a qual é proporcional a quantidade de Formazan produzida e, conseqüentemente, ao número de células viáveis (BERTOLLO, 2010).

### **2.7.2. Teste de dupla coloração com AO/EB**

A microscopia de fluorescência se baseia na capacidade que as substâncias fluorescentes têm de transformar luz ultravioleta em cores visíveis. Existem várias substâncias que têm grande afinidade com componentes celulares como o núcleo e a mitocôndria, e que podem ser acoplados àquelas substâncias fluorescentes, permitindo a sua visualização. Um exemplo é a laranja de acridina (ou do inglês *Acridine Orange* - AO), que se liga ao DNA do núcleo das células. (JUNQUEIRA, 2005).

Na análise das células utilizando-se um microscópio fluorescente, o critério para a identificação das células segue as seguintes considerações: células viáveis são coradas em verde, células em apoptose precoce são coradas em verde e apresentam condensação da cromatina, células em apoptose tardia são coradas em laranja e células em necrose são coradas em vermelho, apresentando morfologia nuclear semelhante a de células viáveis (KASIBHATLA et al., 2006; RIBBLE et al., 2005; LIU *et al.*, 2014; GARCÍA et al., 2015 e RENJU et al., 2014).

A AO trata-se de um corante vital que cora tanto as células viáveis quanto as inviáveis, enquanto o EB, um intercalante da dupla fita do DNA, cora apenas as células que perderam a integridade da membrana, sendo que as células em apoptose tardia apenas incorporam o EB. (KASIBHATLA et al., 2006).

## **3. OBJETIVOS**

Demonstrar a eficiência de se trabalhar com uma cultura primária de células a fim de diminuir a utilização de animais em experimentos e avaliar a sobrevivência destas células após as mesmas serem tratadas com diferentes intensidades de radiação ionizante oriunda de um equipamento de Cobaltoterapia.

Obter uma resposta diretamente proporcional ao tratamento, ou seja, observar uma maior inviabilidade ou morte celular à medida que se aumentar a intensidade de radiação ionizante.

### **3.1. Relevância do tema**

Apesar de se tratar de uma neoplasia pouco incidente, o OSA é altamente agressivo e de difícil conduta, uma vez que os animais dependem de seus proprietários para que exames que permitem diagnosticar a neoplasia sejam realizados e, geralmente, estes são feitos quando o tumor já está em um estágio avançado, dificultando o tratamento, diminuindo as chances de cura e a sobrevivência dos animais (BOGLIOLO, 2006).

## **4. PERSPECTIVAS**

Em trabalhos futuros pretende-se realizar ensaios de viabilidade celular com diferentes tempos de análise após a irradiação, simular um tratamento completo, além de fazer um estudo mais aprofundado da epidemiologia desta neoplasia e comparar a resposta ao tratamento das células neoplásicas com as células saudáveis, a fim de se aprimorar os protocolos já existentes ou chegar a um novo.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Origem do material em estudo e aspectos éticos**

Obteve-se um parecer favorável do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu (Protocolo nº 98/2008 – CEUA), o qual está presente no Anexo A deste trabalho. Além disso, os proprietários dos animais autorizaram a utilização dos mesmos com um termo de esclarecimento.

Os cultivos celulares primários de OSA canino foram obtidos a partir do tumor de animais de médio e grande porte acometidos nos ossos do esqueleto apendicular, com idades variando de 6 a 11 anos. Estes animais foram diagnosticados pelo exame citológico e confirmados pelo histopatológico no Hospital Veterinário e Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, de março de 2008 a janeiro de 2011.

Todas as culturas celulares caracterizadas tiveram a denominação de spOS (São Paulo – Osteossarcoma), sendo aquelas em que as marcações para a expressão da Cicloxigenase-2 (Cox2) foram negativas ou de baixa intensidade pela citometria de fluxo, ou seja, cujos valores estão abaixo de um (<1%), foram identificadas com

números ímpares e aquelas que obtiveram expressões iguais e maiores a um ( $\geq 1\%$ ), foram identificadas com números pares.

## 5.2. Cultura celular

O vial de células (spOS-8, congeladas desde 21/12/2011, com densidade de  $2 \times 10^6$  células/mL. As células se encontravam, no máximo, na nona passagem) foi transportado do Departamento de Patologia da FMVZ para o Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) em um recipiente apropriado contendo nitrogênio líquido e, posteriormente, as células foram descongeladas em banho-maria a  $36^\circ\text{C}$  com agitação suave por, aproximadamente, 2 min.

Posteriormente, as células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose* (DMEM alta glicose – GIBCO 11995–065) suplementado com 10% de SFB (GIBCO 12657–029) e com 1% de uma solução antibiótica e antimetabólica (GIBCO, 100x), sem do mantidas em estufa úmida (THERMO SCIENTIFIC) contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ .

Apenas quando descongeladas, elas foram cultivadas com meio suplementado com 20% de SFB, conforme recomendado na literatura e de acordo com as orientações presentes no guia de cultura de células animais da American Type Culture Collection (ATCC®), o Animal Cell Culture Guide.

Para se verificar a viabilidade celular, realizou-se um teste com o corante Azul de Tripan (SIGMA® T8154) e verificou-se que a viabilidade era de 82.55%, aproximadamente, e que a concentração das células após o descongelamento era de  $1.23 \times 10^6$  células/mL, aproximadamente.

As células foram observadas em um microscópio invertido (ZEISS®) e repicadas sempre que atingiram uma subconfluência em torno de 80%. Além disso, observou-se que as células não estavam contaminadas por fungos ou bactérias, verificou-se a presença de poucos debris e que não houve mudança na coloração do meio, de modo que não houve alteração do pH.

Para se realizar a expansão das células e também para o plaqueamento das mesmas, utilizou-se a solução tampão fosfato-salino (PBS – GIBCO, 1x, pH 7.2) e a tripsina (TRYPLE SELECT – INVITROGEN 12563–029). Durante a expansão, parte das células foram ressuspensas em 1 mL de meio de congelamento,

contendo meio de cultura completo e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO – DINÂMICA), sendo posteriormente congeladas a -80°C no biofreezer (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC™ INNOVA® U 101).

Para a determinação da concentração de trabalho utilizando-se placas de 96 poços (COSTAR 3595), realizou-se um teste de citotoxicidade com metiltiazoltetrazólio (MTT – SIGMA® M 2128), afim de não haver poucas células nem causar inibição por contato, ou seja, a quantidade de células excede um número tal que impossibilita o crescimento celular fazendo com que as mesmas se inibam até a morte.

Também se realizou um teste para determinar a concentração de trabalho com utilizando-se placas de 12 poços (COSTAR 3513).

Os tratamentos foram realizados com as células na décima quinta passagem.

### **5.3. Tratamento com radiação ionizante**

As amostras foram transportadas dentro de uma bolsa térmica do Departamento de Morfologia do IBB até o Setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC – FMB), o que levou em média 10.32 minutos, aproximadamente, em todos os tratamentos realizados (em triplicata).

No Setor de Radioterapia os tratamentos foram realizados utilizando-se a Unidade de Telecobaltoterapia (GE – *General Electric Company Medical System*, USA; CGR MeV, ALCYON, N°: 1008; Z 13 A 3, W1 53201), com um campo de irradiação de 30 cm x 30 cm, distância fonte superfície (SSD) de 80.0 cm e profundidade de 0.5 cm (para se obter uma porcentagem de dose profunda (PDP) de 100%).

De acordo com estudos de MANTOVANI e MUTSAERS (2016), trabalhou-se com o seguinte arranjo experimental (vide imagens no ANEXO C): A mesa e o *gantry* foram posicionados a 0°, 5 placas de acrílico foram colocadas sob a amostra tratada para evitar o retroespalhamento da radiação ionizante e 1 placa de acrílico foi colocada sobre a amostra para eliminar o GAP de ar (espaçamento ou distanciamento entre os campos dos feixes, na superfície de entrada dos mesmos), a fim de homogeneizar a dose absorvida.

A temperatura, a umidade relativa do ar e a pressão atmosférica foram medidas três vezes (SETTING, Certif.: PS-11-006/14, TP-10-562/14, N°

Instrumental Padrão: TB-01, Datas de calibração: 06/11/2014, 31/10/2014) e, posteriormente, calculou-se a média desses valores (Tabelas 2, 3, 5, 6, 8 e 9).

O tempo de exposição (t), em minutos, dos grupos tratados foi calculado pela seguinte equação:

$$t = \frac{\text{Dose}}{(\text{PDP}) \times (\text{Fc}) \times (\text{Rend})}$$

Onde PDP é a porcentagem de dose profunda, Fc é o fator campo (igual a 1.109) e Rend é o rendimento da fonte radioativa (Co-60).

O Fc trata-se da razão da dose para um dado campo em relação à dose para o campo de referência (10 cm x 10 cm), na profundidade de dose máxima. A PDP trata-se de uma relação percentual da dose em determinada profundidade em relação à profundidade de dose máxima (equilíbrio eletrônico) e é elevada com a área do campo, uma vez que com o aumento do volume irradiado tem-se uma maior quantidade de radiação espalhada.

**Tabela 1** – Rendimento da fonte de Co-60 (cGy/min), dose (Gy e cGy) e tempo de exposição (min) dos grupos tratados com radiação ionizante para o ensaio MTT

Rendimento da fonte de Co-60 (cGy/min)	Dose (Gy)	Dose (cGy)	Tempo de exposição (min)
70.70	5.00	500.00	6.4
	10.00	1000.00	12.8
	15.00	1500.00	19.8
	20.00	2000.00	25.6
	30.00	3000.00	38.4

**Tabela 2** – Temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pressão atmosférica (mmHg) da sala de comando da Unidade de Telecobaltoterapia do HC-FMB

Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)	Pressão (mmHg)
17.0	45.0	686.25
18.0	44.0	687.00
18.0	43.0	687.00
<b>Média</b>	17.67	44.0
		686.75

**Tabela 3** – Temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pressão atmosférica (mmHg) da sala de tratamento da Unidade de Telecobaltoterapia do HC-FMB

Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)	Pressão (mmHg)
18.0	43.0	687.00
18.0	43.0	687.00
18.0	43.0	687.00
<b>Média</b>	18.0	43.0
		687.00

**Tabela 4** – Rendimento da fonte de Co-60 (cGy/min), dose (Gy e cGy) e tempo de exposição (min) dos grupos tratados com radiação ionizante para o teste com AO/EB

Rendimento da fonte de Co-60 (cGy/min)	Dose (Gy)	Dose (cGy)	Tempo de exposição (min)
68.08	5.00	500.00	7.0
	10.00	1000.00	14.0
	30.00	3000.00	40.0

**Tabela 5** – Temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pressão atmosférica (mmHg) da sala de comando da Unidade de Telecobaltoterapia do HC-FMB

Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)	Pressão (mmHg)
20.0	55.0	684.06
20.0	56.0	685.56
20.0	5.0	685.56
<b>Média</b>	20.0	55.67

**Tabela 6** – Temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e pressão atmosférica (mmHg) da sala de tratamento da Unidade de Telecobaltoterapia do HC-FMB

Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)	Pressão (mmHg)
20.0	54.0	684.81
20.0	54.0	685.56
20.0	55.0	685.56
<b>Média</b>	20.0	54.34

## 5.4. Avaliação da sobrevivência celular

### 5.4.1. Ensaio MTT

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, divididas em um grupo controle e cinco grupos tratados (com as doses de 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy e 30 Gy,) 24 h antes de serem irradiadas (tratadas) no Setor de Radioterapia utilizando-se a Unidade de Telecobaltoterapia.

Em seguida, elas retornaram para a estufa úmida e após 24h foi realizado o ensaio MTT para se verificar a viabilidade celular (mitocondrial), no qual o MTT foi administrado nas amostras (100 µL por poço) e, após 3 h de incubação, ele foi retirado e colocou-se o DMSO (100 µL por poço), o qual foi utilizado para romper a membrana celular, dissolver o Formazan e possibilitar a leitura das placas, a qual foi realizada a 540nm através de um leitor Elisa (BIOTEK ELx800®).

Os valores da absorbância foram salvos em uma tabela pelo software Gen5 e expressos em porcentagem de viabilidade mitocondrial. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software Prism, sendo feito o teste ANOVA com 5% de significância ( $p < 0.05$ ).

### 5.4.2. Teste de dupla coloração com AO/EB

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços, nas quais uma lamínula de vidro redonda tratada com PLL (Poli L. Lisina) foi colocada dentro dos poços e trabalhou-se com  $1.00 \times 10^5$  células por poço. O Tratamento com PLL é descrito no Anexo B.

O teste foi realizado 24 h e 72 h após o tratamento com a coloração das células através de uma solução composta por dois corantes fluorescentes, a laranja de acridina (AO – C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub> – SIGMA 158550-25G) e o brometo de etídio (EB – C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub> – SIGMA E7637-1G), ambos numa concentração de 100 µg/mL em PBS.

Para a análise dos resultados, as lamínulas foram retiradas dos poços e lavadas com PBS a fim de se retirar qualquer resíduo do meio de cultura, uma vez que este contém *phenol red*, o que poderia interferir na leitura. Feito isso, colocaram-se 30µL da solução com os dois corantes sobre a lamínula e ela foi colocada em uma lâmina de vidro para microscópio, sendo incubada a temperatura ambiente por 20 minutos ao abrigo da luz.

Posteriormente, as lâminas foram analisadas utilizando-se um microscópio fluorescente (ZEISS®) com aumento de 400x e filtro 3 FITC. 200 células foram contadas. As imagens foram salvas utilizando-se o software Axionvision Rel 4.7 e os gráficos foram feitos utilizando-se o software OriginPro 8.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

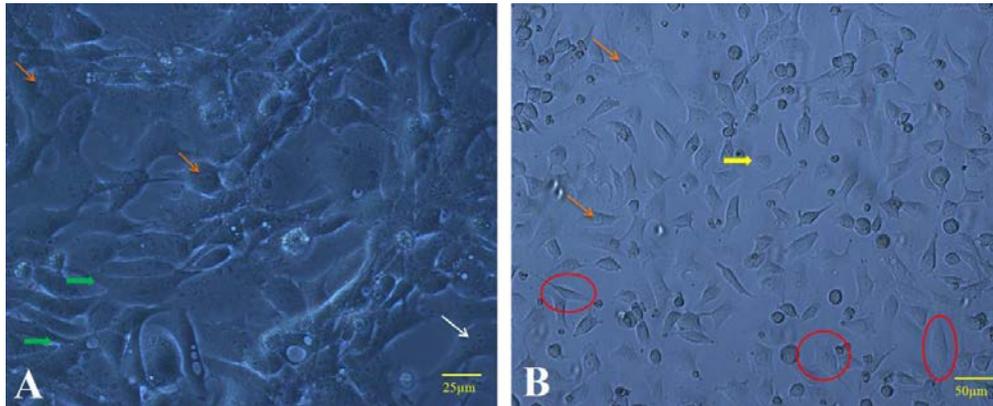
Trabalhar com uma cultura primária no intuito de avaliar terapias, além de ser um modelo biológico mais simples, é eficiente devido as células manterem a morfologia e características fisiológicas do seu tecido de origem, assim como descrito por MIGITA (2012), BERSANO (2006), e por FRESHNEY (2010).

A cultura primária de OSA canino utilizada neste trabalho apresenta predomínio do padrão osteoblástico, o que lhe confere a denominação de osteossarcoma osteoblástico. A seguir são apresentadas imagens dessa cultura obtidas a partir de um microscópio invertido (ZEISS®) e do *software* ZEN.

Observou-se um pleomorfismo em relação ao tamanho das células e que, elas apresentam uma forma arredondada quando não estão aderidas à superfície do frasco, e, quando aderidas, adquirem um aspecto fusiforme e prolongamentos semelhantes à pseudópodos, como apresentado na Figura 6. Observou-se também células binucleadas e/ou multinucleada, o que é uma característica de células neoplásicas, uma vez que as mesmas não seguem os padrões do processo de divisão celular de uma célula sadia.

Na Figura 7 nota-se um padrão de crescimento extremamente agressivo. Como as células neoplásicas, diferentemente de células sadias, continuam

crescendo após entrarem em contato umas com as outras, também observam-se regiões com sobreposição de células, onde as mesmas crescem sobrepostas.



**Figura 6** – Cultura primária de osteossarcoma canino. Células tumorais apresentando pleomorfismo expressivo e células mononucleadas ou binucleadas (A – seta branca) – ZEISS®. As células apresentam núcleos e nucléolos proeminentes (setas laranja – A e B), são fusiformes, têm diferença de forma (circular – seta amarela – B) e tamanho e quando aderidas a superfície do frasco de cultura (círculos vermelhos – B), possuem prolongamento semelhantes à pseudópodos (setas verdes – A).

Embora os autores não façam referência a morfologia da cultura frente ao tratamento, é importante ressaltar que nos resultados obtidos nesse trabalho não foi possível perceber alterações na morfologia das células 24 horas após o tratamento utilizando-se um microscópio óptico invertido. Entretanto, quando coradas com a solução AO/EB, observaram-se alterações específicas, o que demonstra que não é aconselhável tirar conclusões tão somente pela morfologia.



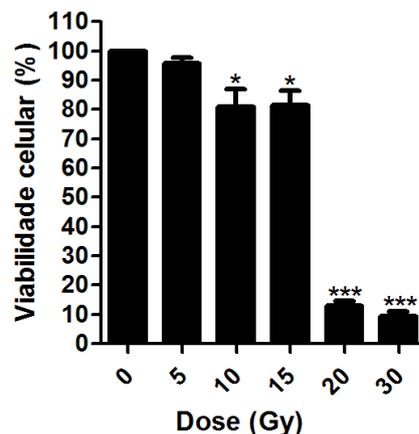
**Figura 7** – Cultura primária de osteossarcoma canino com 70/80%, aproximadamente, de confluência – ZEISS®. Destaque para regiões onde as células estão bastante coesas entre si (círculos pretos), presença de células binucleadas ou multinucleadas (setas laranja) com destaque de uma célula multinucleada (seta e círculo verdes).

A interação da radiação ionizante com as células promove efeitos diretos e indiretos, levando a sua morte. De acordo com NORTH e BANKS (2009), na Medicina Veterinária o maior efeito é o indireto devido à produção de radicais livres, uma vez que as células consistem de, aproximadamente, 85% de água.

Dentre outros fatores, a sobrevivência da célula depende da integridade da membrana mitocondrial e plasmática. Com o ensaio MTT, verificou-se que com a dose de 30 Gy aproximadamente 90% das células não estavam viáveis. O tratamento com 20 Gy apresentou resultado semelhante.

Além disso, observa-se que não houve uma diferença significativa na eficiência do tratamento para as doses de 10 Gy e de 15 Gy, e que praticamente não se observa morte celular com a dose de 5 Gy. Esses resultados sugerem que a eficiência de um tratamento com uma dose final de 20 Gy seria semelhante a um com uma dose final de 30 Gy, o que condiz com os protocolos existentes pensando em três sessões de 8 Gy, que resultam em uma dose final próxima de 20 Gy.

O Gráfico 1 a seguir apresenta a viabilidade celular expressa em porcentagem pela dose de radiação ionizante recebida.



**Gráfico 1** - Viabilidade celular (%) 24 horas após o tratamento pela dose (Gy) de radiação ionizante recebida. Diferença estatística de  $p < 0.01$  (\*) e de  $p < 0.0001$  (\*\*\*)

Como observado por MATOVANI et al. (2016), o OSA trata-se de um tumor radioresistente, sendo necessárias doses elevadas para se obter uma resposta satisfatória, o que é uma desvantagem dessa terapia devido aos efeitos tóxicos causados.

Assim como descrito MORRIS et al. (2007), a fração de crescimento da população celular está relacionada com a radiosensibilidade da população celular, de modo que células em divisão são geralmente mais sensíveis à radiação que células diferenciadas em não divisão, como as células ósseas.

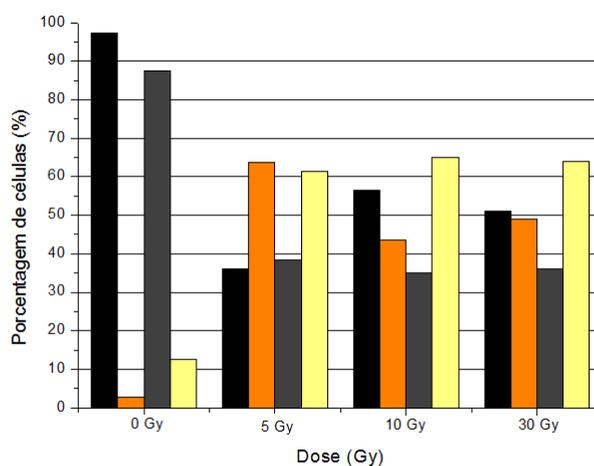
Não se verificou a mesma porcentagem de viabilidade apresentada no estudo de MATOVANI et al. (2016), a qual foi próxima de 70% para a dose de 10 Gy em uma das linhagens utilizadas, mas isso pode estar relacionado ao fato das análises desses autores terem sido realizadas 72 h após o tratamento e por eles

terem utilizado linhagens imortalizadas e não uma cultura primária, como neste trabalho.

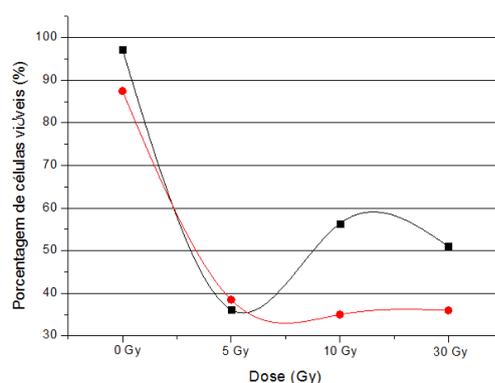
Com os resultados do teste de dupla coloração com AO/EB, calculou-se a porcentagem de células em apoptose pela seguinte equação adaptada de RENJU et al., 2014:

$$\text{Células em apoptose (\%)} = \frac{\text{células em apoptose} \times 100}{\text{células viáveis} + \text{células em apoptose}}$$

Verificou-se que a inviabilidade celular entre 24 h e 72 h praticamente não foi alterada para a dose de 5 Gy. Por outro lado, para as doses de 10 e 30 Gy, obteve-se um aumento de, aproximadamente, 20%, como se observa nos Gráficos 2 e 3. Tal aumento pode ser resultante de efeitos tardios da radiação ionizante ou estar relacionado ao tempo de duração do ciclo celular.



**Gráfico 2** – Porcentagem de células (%) viáveis e em apoptose 24 e 72 horas após o tratamento com radiação ionizante. As barras preta (24 h) e cinza (72 h) são referentes as células viáveis, enquanto as barras laranja (24 h) e amarelo (72h) são referentes as células em apoptose.



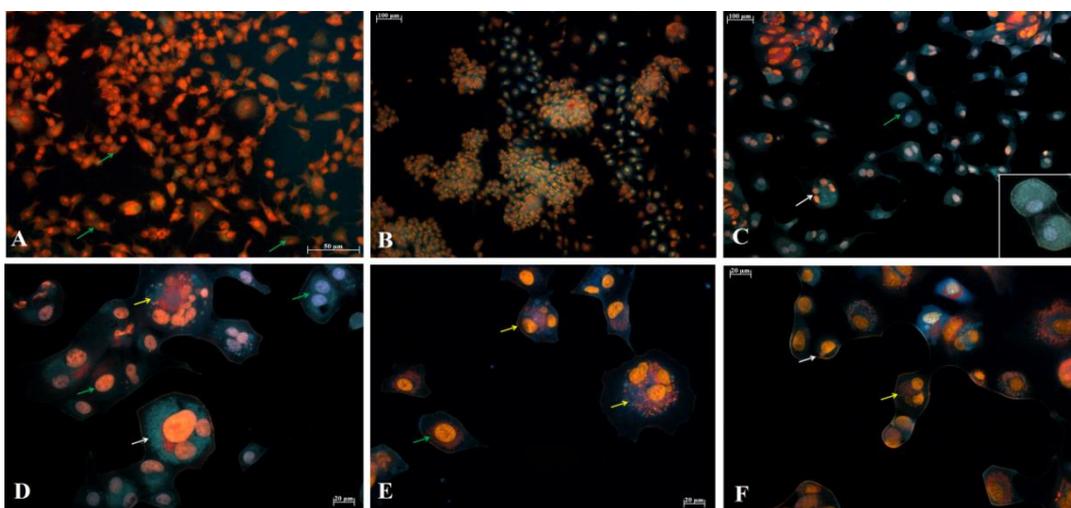
**Gráfico 3** – Porcentagem de células viáveis (%) 24 horas (linha preta) e 72 horas (linha vermelha) após o tratamento com radiação ionizante.

Na análise das lâminas verificou-se que o EB corou o núcleo das células que perderam a integridade da MP, assim como descrito por KASIBHATLA, S. et al.

(2016). Em conformidade com o que é apresentado nos estudos de KASIBHATLA et al. (2016), RIBBLE et al. (2005), LIU et al. (2014), GARCÍA et al. (2015) e RENJU et al. (2014), as células em apoptose apresentaram uma coloração do núcleo mais alaranjada devido à incorporação da AO.

Células viáveis se apresentaram coradas uniformemente em verde, mas também se verificou células com o núcleo intacto corado em laranja, o que se deve ao corante AO, uma vez que, como descrito por KASIBHATLA et al. (2016), este corante cora tanto células viáveis quanto inviáveis.

Também se observou a formação de corpos apoptóticos e em nenhum dos grupos se observaram células em necrose.



**Figura 8** – Imagem de microscopia fluorescente de células coradas com AO e EB – Axionvision Rel 4.7. Células viáveis (setas verdes), células em apoptose (setas brancas) e células em apoptose tardia (setas amarelas). A e B são referentes ao grupo controle, C é referente ao tratamento com 5 Gy, com destaque para duas células viáveis. D e E são referentes ao tratamento com 10 Gy e F é referente ao tratamento com 30 Gy.

Células em apoptose tardia, como se observa na Figura 8 em D e E (também presente em F, mas não tão evidente), apresentam um contraste entre núcleo e citoplasma. Em todos os ensaios realizados, não se observou influência da mudança de temperatura, pressão atmosférica e umidade relativa do ar em relação à inviabilidade das células, apesar de se ter 12.5% de morte celular no grupo controle na análise de 72 h. Tal observação pode ser resultado da competição das células por espaço.

Além disso, verificou-se com ensaio MTT anterior que este deve ser realizado com pelo menos 24 h após o tratamento, pois o ciclo celular pode levar de 14 a 36 h, como apresentado por TAUHATA, L. et al. (2014).

## **7. CONCLUSÃO**

Nas condições em que foi realizada esta pesquisa, os objetivos foram alcançados, uma vez que trabalhar com culturas de células se mostrou eficiente e foi possível, através de dois ensaios diferentes, avaliar a sobrevivência das células após o tratamento.

Apesar da inviabilidade das células não ter decrescido de forma linear, constatou-se com o ensaio MTT que a viabilidade é reduzida em função da dose de radiação ionizante recebida. Além disso, os resultados deste ensaio confirmaram a resistência da neoplasia ao tratamento.

Essa não linearidade também foi observada no teste de dupla coloração e mesmo os resultados não sendo idênticos aos do ensaio MTT, pode-se afirmar que a terapia é eficiente para o tratamento da neoplasia.

Esses resultados, associados ao fato de que culturas primárias de células apresentam uma resposta muito semelhante a dos tecidos de sua origem, podem servir de incentivo a estudos de investigação dos mecanismos envolvidos na resistência à radioterapia e aprimoramento das terapias existentes até o momento.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ALVES, E. A. A.; GUIMARÃES, A. C. R.; SOUZA, D. S. et al. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, capt. 5, v. 2, 2010, 220-221 p.

BERSANO, P.R.O. Expressão in vitro da Cicloxigenase-2 (Cox2) no Osteossarcoma exposto a Inibidor Seletivo da Cox2. Botucatu, 2011. 4, 10, 13, 15, 18 p. Dissertação (Doutorado). Universidade Estadual Paulista.

BERSANO, P.R.O. Expressão imunistoquímica da Cicloxigenase-2 (Cox2) e quantificação das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) nos diferentes padrões histológicos do osteossarcoma canino. Viçosa, 2006. 10, 12, 13 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa.

BERTOLLO, C. M. Mecanismos de morte celular induzida pela radiação  $\gamma$  e expressão de proteínas nas novas linhagens de câncer de mama humano MACL-1 e MGSO-3. Belo Horizonte, 2010. 37, 45, 46, 61, 62, 90, 91 p. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais.

BD Biosciences. Cell Cycle and Cell Proliferation: An Overview. Disponível em: <<http://www.bdbiosciences.com/in/research/apoptosis/analysis/index.jsp>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

BONATO, C. C.; ELNECAVE, R. H. Alterações tireoidianas associadas à radiação externa em crianças e adolescentes. 359-366 p. Scielo, 2011. 361 p. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-2730201100060002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-2730201100060002)>. Acesso em: 01 jul. 2016.

BOGLIOLO, L.; FILHO B. G. Bogliolo, Patologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7ª ed., 2006, 999, 1000, 1008 p.

COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro: Elsevier Editada Ltda., 8ª ed., 2010, 13 p.

DALECK, C. R.; NARDI, A. B. De; RODASKI, S. Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 1ª ed., 2009, 2 p.

DALECK, C. R.; NARDI, A. B. De; RODASKI, S. Oncologia em cães e gatos. Rio de Janeiro: Roca, 2ª ed., 2016, 2, 6 e 7 p.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Archives of Veterinary Science (ISSN: 1517-784X), v.7, n.2, p. 15-26, 2002. 16 p.

FRANCO, M; MONTENEGRO, M. R.; BRITO, T.; BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. Patologia: Processos gerais. São Paulo, Atheneu, 5ª ed., 2010, 47-48 p.

\*ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 6023**: informações e documentação – referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

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

GARCÍA, I. A.; ÁLVAREZ, L.; CARDOSO, A.; et al. Cytotoxic Activity and Chemical Composition of the Root Extract from the Mexican Species *Linum scabrellum*: Mechanism of Action of the Active Compound 6-Methoxypodophyllotoxin. Hindawi Publishing Corporation, 2015, 4p.

GOMES, C.; FERREIRA, M.P.; FERREIRA, K.C.R.S. Estudo epidemiológico de cães com imagens radiográficas compatíveis com neoplasias ósseas. Acta Sci. Vet., v.34, 2006, 160 p.

GUIMARÃES, A. C. R; ALVES, E. A. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde – Cultivo Celular. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, capt. 5, v.2, 2010, 226 p.

HAMANN, J. 5 R's da Radiologia. Disponível em:<<http://www.jhhamannmundodaradiologia.blogspot.com.br/2016/04/5-rs-da-radiologia.html?m=1>>. Acesso em: 05 jun. 2016.

HOSKINS, J. D. Geriatria e Gerontologia do Cão e Gato. São Paulo: ROCA, 2008, 2ª ed., 73, 81 p.

JUNQUEIRA L. C. U. Biologia estrutural dos tecidos: histologia. Rio de Janeiro: GEN, 2005, 1ª ed., 57-58 p.

JUNQUEIRA L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia básica. Rio de Janeiro: GEN, 2008, 11ª ed., 135, 136, 139, 142, 149 p.

KASIBHATLA, S.; MENDES, G. P. A.; BRUNNER, T.; GREEN, D. R. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. 2006. Disponível em:<[https://www.researchgate.net/publication/223967646\\_Acridine\\_OrangeEthidium\\_Bromide\\_AOEB\\_Staining\\_to\\_Detect\\_Apoptosis](https://www.researchgate.net/publication/223967646_Acridine_OrangeEthidium_Bromide_AOEB_Staining_to_Detect_Apoptosis)>. Acesso em: 16 mar. 2016.

LIU, K.; LIU, P. C.; LIU, R.; WU, X. Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry. Medical Science, p. 15-20, 2014.

MANTOVANI, F. MUTSAERS, A. Effects of epidermal growth factor receptor kinase inhibition on radiation response in canine osteosarcoma cells. BMC Veterinary Research, 2016, 2, 3, 5, 6 p.

MIGITA, N. A. Cultivo celular *in vitro*: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. Botucatu, 2012. 12-15 p. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista.

\*ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 6023**: informações e documentação – referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

MORAES J. S. T. Osteossarcoma apendicular canino – Revisão de Literatura. Botucatu, 2009, 19 p.

MORRIS J.; DOBSON J. Oncologia em Pequenos Animais. São Paulo: Roca, 2007, 1ª ed., 29, 30, 32-34 p.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Bone Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/bone/bone-fact-sheet>>. Acesso em: 01 ago. 2016.

NORTH S. M.; BANKS T. A. Small Animal Oncology: an introduction. China: Elsevier, 2009, 1ª ed., 1, 11-13, 15, 19, 45, 97, 209 p.

OLIVEIRA, F.; SILVEIRA, P. R. Osteossarcoma em cães. Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária, 2008, 3, 7, 13 p.

PERES C. M.; CURI R. Como Cultivar Células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 1ª ed., 7, 11-13 p.

RENJU, G. L.; MURALEEDHARA, K. G.; BANDUQULA, V. R. Effect of lycopene isolated from *Chlorella marina* on proliferation and apoptosis in human prostate cancer cell line PC-3. Reserch Gate, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25073513>>. Acesso em: 27 mar. 2016.

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. BMC Biotechnol, 2005, 2, 4, 6 p.

RYAN, J. A. Introduction to Animal Cell Culture: Technical Bulletin. USA: Coning, 2008, 1 p. Disponível em: <[http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro\\_animal\\_cell\\_culture.pdf](http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro_animal_cell_culture.pdf)>. Acesso em 25 fev. 2016.

SILVA, A. Proteção Radiológica: Fundamentos de Radiologia. Universidade de Brasília, 2013. 18 p. Disponível em: <<https://www.erasiologia.files.wordpress.com/2013/09/aula-04-fundamentos-de-radiobiologia.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2016.

TAUHATA, L. *et. al.* Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. Rio de Janeiro: Instituto de Radioproteção e Dosimetria e CNEN, 10ª revisão, 2014, 109-110 p.

\*ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 6023**: informações e documentação – referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

# ***ANEXOS***

## ANEXO A – Atestado da Comissão de Ética no Uso de Animais

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO 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 Cicloxigenase-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 – 18618-000  
☎/fax: 14-3811-6105 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

**SIGMA-ALDRICH®**

## **Poly-L-Lysine Cell Attachment Protocol**

By: George Sitterley, *BioFiles* 2008, 3.8, 12.

**Poly-Lysine (Cat. Nos. P7280, P6407, P7405, P9155, P6282, P5899, P4707\*, P4832\*)**

Optimal conditions must be determined for each cell line and application.

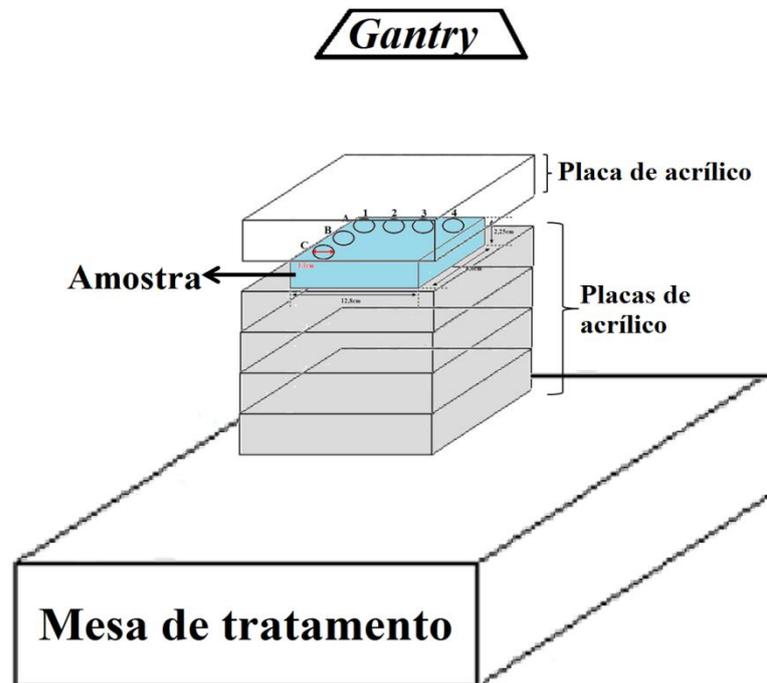
1. Add 50 mL of sterile tissue culture grade water to 5 mg of poly-lysine.
2. Aseptically coat culture surface with 1.0 mL/25 cm<sup>2</sup> (only). Rock gently to ensure even coating of the culture surface.
3. After 5 minutes, remove solution by aspiration and thoroughly rinse surface with sterile tissue culture grade water.
4. Allow to dry at least 2 hours before introducing cells and medium.

\*NOTE: Step 1 is not necessary for Poly-lysine Solution, (Cat. Nos. P4707 and P4832).

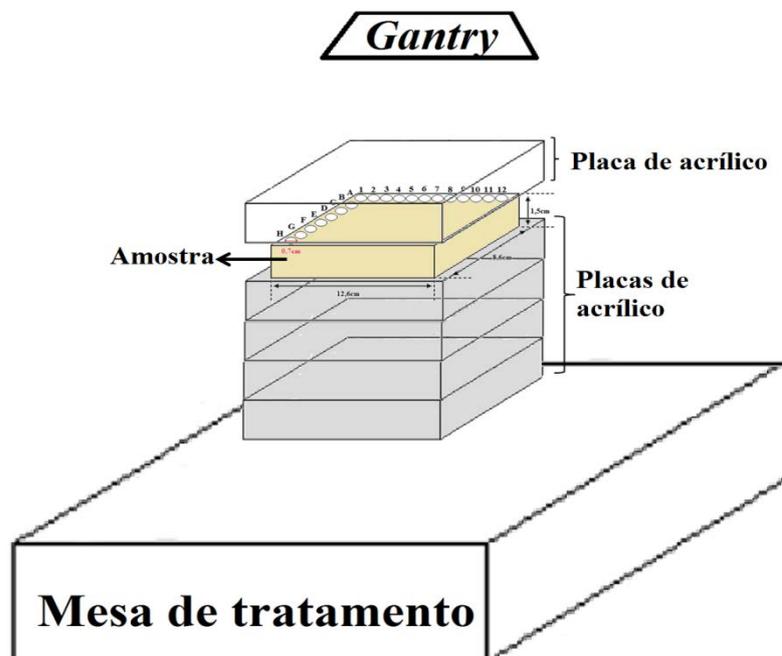
**Observação 1:** Antes de serem tratadas com Poli L. Lisina, as lamínulas foram limpas com detergente neutro e secas em temperatura ambiente. Feito isso, elas foram autoclavadas.

**Observação 2:** Este tratamento foi realizado porque o PLL trata-se de um polímero que melhora a adesão celular e o objetivo era que as células, inclusive as mortas, continuassem aderidas a superfície da lamínula, de modo que as mesmas pudessem ser contabilizadas na análise das lâminas.

ANEXO C – Esquema do arranjo experimental dos tratamentos



**Figura 9** – Arranjo experimental dos tratamentos utilizando-se placas de 12 poços (COSTAR 3513). Dimensões da placa (medidas aproximadas): 12,8 cm de comprimento, 8,6 cm de largura, 2,25cm de altura e 1,1 cm de diâmetro.



**Figura 10** – Arranjo experimental dos tratamentos utilizando-se placas de 96 poços (COSTAR 3595). Dimensões da placa (medidas aproximadas): 12,6 cm de comprimento, 8,6 cm de largura, 1,5cm de altura e 0,7 cm de diâmetro.