

Áurio Odair Gomes Lopes

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Coordenadora do projecto: Doutora Célia Maria Gomes Freitas

Identificação e caracterização de células estaminais
tumoriais no osteossarcoma e suas implicações na
resistência à quimioterapia



Universidade de Coimbra

2010



Trabalho realizado nos seguintes locais:

- Instituto de Biofísica e Biomatemática, IBILI – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- Cento de Histocompatibilidade de Coimbra – Hospital da Universidade de Coimbra, Coimbra

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra, para prestação de
provas de Mestrado em Engenharia Biomédica

Parte deste trabalho está publicado nos seguintes abstracts:

C. M. F. Gomes, S. R. M. Neves, A. O. G. Lopes, A. J. Abrunhosa, P. C. P. S. Simões, A. A. Paiva, M. Botelho, "Role of Cancer Stem Cells in [¹⁸F]FDG uptake and Therapy Response in Osteosarcoma" - Aceite para apresentação oral no World Molecular Imaging Congress (8 a 11 de Setembro de 2010, Kyoto, Japão)

A. O. G. Lopes, S. R. M. Neves, A. do Carmo, A. A. Paiva, M. Botelho, C. M. F. Gomes " Identification of Cancer Stem Cells in Osteosarcoma and their Implications in Response to Chemotherapy" - Aceite para apresentação em poster no 16th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research (26 a 28 de Setembro 2010, Coimbra, Portugal).

S. R. M. Neves, A. O. G. Lopes, A. do Carmo, A. J. Abrunhosa, P. C. P. S. Simões, A. A. Paiva, M. Botelho, C. M. F. Gomes " Cancer Stem Cell Populations in Osteosarcoma: implications for [¹⁸F]FDG uptake and Response to Therapy " - Aceite para apresentação oral no Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (9 a 13 de Outubro 2010, Viena, Áustria)

Aos meus Pais

Agradecimentos

À Senhora Professora Doutora Célia Maria Freitas Gomes orientadora e supervisadora deste trabalho que realizei no âmbito da cadeira de Projecto do Curso de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, desejo expressar os meus agradecimentos pela sua orientação, pela amizade, simpatia e por toda a paciência que sempre teve comigo. Estou-lhe eternamente agradecido por tudo.

À Senhora Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, directora do Instituto de Biofísica/Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, os meus agradecimentos por tudo o apoio directo ou indirecto prestado. Estes agradecimento são extensíveis a todos os profissionais deste Instituto.

Ao Professor Doutor Miguel Morgado, coordenador da cadeira de Projecto em que se insere a dissertação da Tese de Mestrado, os meus agradecimentos pela, simpatia e disponibilidade.

À Doutora Anália do Carmo, do Centro de Neurociência e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, os meus agradecimentos pelos apoio prestado nos estudos do ciclo celular.

Ao Doutor Artur Paiva, do Centro de Histocompatibilidade dos Hospitais da Universidade de Coimbra, os meus agradecimentos pelo apoio prestado nos estudo de caracterização das células em termos de expressão dos marcadores por citometria de fluxo.

Ao Engenheiro Francisco Caramelo, os meus agradecimentos pelas sugestões e simpatia.

À minha família que constituiu o meu maior apoio neste período, em especial ao meu pai André Lopes, minha mãe Rosa Gomes e meus irmãos Elizeu Lopes, Lisinayte Lopes e Heidy Lopes.

À minha namorada, Maria Medina, por todo o apoio prestado.

Aos amigos, especialmente Elisandra Lopes e Edson Bragança, pelos apoios prestados ,obrigado pelos conselhos, pelos sorrisos, por tudo.

Aos colegas de curso, pela simpatia e apoio, em especial a Sara Neves, Sara Inocência, Mariana Madeira, Mariana Rufino, Sónia Tavares e João Medeiros.

Índice

Agradecimentos	VII
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XIII
Lista de Abreviaturas	XV
Resumo	XVII
Summary	XIX
Capítulo 1	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Objectivos	2
1.2.1 Objectivos gerais.....	2
1.2.2 Objectivos específicos.....	2
Capítulo 2	3
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Osteossarcoma.....	3
2.1.1 Etiologia e Factores de Risco.....	4
2.1.2 Abordagem Terapêutica	5
2.2 Ciclo Celular.....	7
2.3 Teoria das Células estaminais cancerígenas	7
2.3.1 Propriedades das células estaminais tumorais.....	9
2.3.2 Implicações terapêuticas da teoria das CSCs.....	10
Capítulo 3	13
3. Materiais e Métodos.....	13
3.1 Linha celular e cultura de células.....	13
3.2 Teste de viabilidade celular com azul de tripano.....	14
3.3 Isolamento de CSCs pelo método de formação de esferas	14
3.4 Caracterização das CSC	15

3.4.1	Expressão de marcadores de células estaminais mesenquimatosas.....	15
3.4.2	Capacidade de diferenciação osteogénica.....	16
3.4.3	Avaliação do potencial tumorigénico das sarcosferas	16
3.5	Estudos de citotoxicidade	17
3.5.1	Agentes antineoplásicos.....	17
3.5.2	Curvas de dose-resposta	18
3.6	Análise do ciclo celular	20
3.7	Análise estatística.....	20
Capítulo 4	21
4.	Resultados	21
4.1	Isolamento das CSCs a partir da linha celular humana de OS (MNNG/HOS).....	21
4.2	Caracterização das linhas celulares de OS e das sarcosferas	23
4.2.1	Análise da expressão dos marcadores das MSCs por citometria de fluxo ...	23
4.2.2	Indução de diferenciação das CSC em osteoblastos	24
4.2.3	Potencial tumorigénico das CSCs	25
4.3	Quimiosensibilidade das células aderentes MNNG/HOS, MNNG/SAR e das CSCs	27
4.3.1	Sensibilidade das células MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs à doxorrubicina	27
4.3.2	Sensibilidade das células MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs à cisplatina	28
4.3.3	Sensibilidade das células MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs ao Metotrexato.	29
4.4	Análise do ciclo celular das MNNG/HOS e CSC	30
Capítulo 5	35
5.	Discussão.....	35
Capítulo 6	41
6.	Conclusões.....	41
Capítulo 7	43
7.	Trabalhos futuros	43
Bibliografia	45

Lista de Figuras

Figura 1. Sarcosferas isoladas a partir da linha celular MNNG/HOS.	22
Figura 2. Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores das MSCs.....	24
Figura 3. Coloração com Alizarin Red S das CSCs após 21 dias.....	25
Figura 4. A Imagem representativa da formação de tumores às 4 semanas	26
Figura 5. Curvas de dose-resposta da DOX nas linhas celulares.....	28
Figura 6. Curvas de dose-resposta da CIS nas linhas celulares	29
Figura 7. Curvas de dose-resposta do MTX nas linhas celulares	30
Figura 8. Histogramas do ciclo celular das MNNG/HOS e CSCs.	32
Figura 9. Análise quantitativa da distribuição das células MNNG/HOS e CSCs	33

Lista de Tabelas

Tabela 1. Mecanismos de acção dos agentes quimioterapêuticos utilizados no tratamento da OS (1).	6
Tabela 2. Doses de agentes de quimioterapia utilizados nos estudos de citotoxicidade. 19	
Tabela 3. Volumes dos tumores em ratinhos inoculados com CSCs e com células MNNG/HOS.	26
Tabela 4. Efeitos citotóxicos dos agentes quimioterapêuticos nas linhas celulares aderentes MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs.	30

Lista de Abreviaturas

ABC	ATP-binding cassette
ATP	trifosfato de adenosina
BMPs	proteínas morfogenéticas do osso
BCRP	proteína associada à multirresistência no cancro de mama
bFGF	factor de crescimento fibroblástico básico
CHK1/2	proteínas cinases 1 e 2 reguladoras do ciclo celular
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CSCs	células estaminais cancerígenas
CIS	cisplatina
DHFR	di-hidrofolato redutase
DMEM/F12	meio de Eagle modificado/F12
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOX	doxorubicina
EGF	factor de crescimento epidermal
EURAMOS	Grupo de Estudos Europeu e Americano de Osteossarcoma
FBS	soro fetal bovino
IC ₅₀	concentração do citostático que inibe a proliferação celular em 50%
MDR	resistência a múltiplos fármacos
MRP1/2	proteína associada à multirresistência-tipo 1 e 2
MSC	células estaminais mesenquimatosas
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MTX	metotrexato
OS	osteossarcoma
PBS	tampão salino de fosfato

Pgp	glicoproteína-P
PI	iodeto de propídeo
RNA	ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RPM	rotações por minutos
SCs	células estaminais

Resumo

Objectivo: Há evidências crescentes de que os tumores contêm uma subpopulação de células com propriedades semelhantes às encontradas nas células estaminais. Estas células são denominadas de células estaminais tumorais (CSCs), e são as responsáveis pelo início do desenvolvimento do tumor, resistência às terapias convencionais e aparecimento de recidivas. Neste trabalho, pretendemos identificar e caracterizar a presença de uma população de CSCs numa linha celular humana de osteossarcoma (MNNG/HOS) e explorar o seu papel na resposta à quimioterapia.

Materiais e Métodos: As CSCs foram isoladas utilizando método de formação de esferas em meio sem de soro e em superfícies não aderentes. Depois disso, foram caracterizadas em termos de expressão de marcadores de células estaminais mesenquimatosas por citometria de fluxo, capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, e potencial tumorigénico em ratinhos atímicos BALB/C. Avaliou-se a quimiossensibilidade das células MNNG/HOS, MNNG/SAR e das CSCs aos agentes de quimioterapia utilizados no tratamento do osteossarcoma que incluem a doxorrubicina (DOX), a cisplatina (CIS) e o metotrexato (MTX). A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT após um período de incubação de 48h. A distribuição das células pelas várias fases do ciclo celular após incubação com os agentes antineoplásicos foi analisada por citometria de fluxo com iodeto de propídeo.

Resultados: Foi identificada uma subpopulação de células com características de células estaminais na linha celular MNNG/HOS. Estas células formaram agregados celulares esféricos (CSCs) quando cultivadas em meio de cultura sem soro, foram

positivas para os marcadores de células estaminais mesenquimatosas (CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺, CD13⁺), diferenciaram-se em osteoblastos, e desenvolveram massas tumorais quando inoculadas em ratinhos imunocomprometidos. Estas células mostraram ser mais resistentes à quimioterapia do que as células MNNG/HOS. As doses de citostáticos que inibem a proliferação celular em 50% (IC₅₀) da DOX (0,80±0,22 µM), CIS (14,71±1,68 µM) e MTX (0,05±0,02 µM), foram significativamente superiores (p <0,05) aos valores verificados nas linhas celulares aderentes MNNG/HOS (DOX: 0,30±0,07 µM; CIS: 6,61±1,24µM; MTX: 0,006±0,001 µM) e MNNG/SAR (DOX: 0,26±0,04 µM; CIS: 7,96±2,88 µM; MTX: 0,006±0,001 µM). Os três agentes citostáticos induziram paragens do ciclo celular na fase G2/M nas células MNNG/HOS. Contrariamente, não foram observadas alterações significativas no ciclo celular das CSCs em relação à situação de controlo.

Conclusões: A linha celular MNNG/HOS contém células com características de células estaminais tumorais. Estas células são mais resistentes aos agentes de quimioterapia convencionais do que a linha celular parental. Assim, os tratamentos convencionais actualmente utilizados no tratamento do osteossarcoma podem não ser eficazes na eliminação desta subpopulação celular, as quais podem dar origem ao reaparecimento do tumor após terapia.

Summary

Aim: There are growing evidences that tumors contain a subset of cells with stem like properties. These cells are referred as cancer stem cells (CSCs) and are responsible for driving tumor growth, resistance to conventional therapies and recurrence. We aimed to isolate and characterize a subpopulation of putative CSCs in an human osteosarcoma cell line (MNNG/HOS) and to explore their role in response to chemotherapy.

Methods: CSCs were isolated using the sphere-forming assay in serum-free medium under non-adherent conditions and characterized in terms of expression of mesenchymal stem cell (MSC) surface markers by flow cytometry, ability to differentiate into osteoblasts, and its tumorigenic potential through their ability to generate tumors in BALB/C nude mice. The chemosensitivity of MNNG/HOS, MNNG/SAR and CSCs to the cytotoxic agents commonly used to treat osteosarcoma including doxorubicin (DOX), cisplatin (CIS) and methotrexate (MTX) was evaluated using the MTT colorimetric assay after an incubation period of 48h. Cell cycle progression following chemotherapy was analyzed by flow cytometry with propidium iodide.

Results: A subpopulation of tumor cells with stem-like properties was identified in the MNNG/HOS cell line. These cells formed sphere-clusters (CSCs) when cultured in serum-free medium, were positive for MSC markers (CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺, CD13⁺), differentiated into osteoblasts and developed tumours when inoculated in immunocompromised mice. These cells revealed to be more resistant to chemotherapy in comparison with adherent MNNG/HOS and MNNG/SAR cells. The half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of DOX (0,80±0,22 µM), CIS (14,71±1,68 µM) and MTX (0,05±0,02 µM) were significantly higher (p<0,05) than those in MNNG/HOS cells (DOX: 0,30±0,07 µM; CIS: 6,61±1,24µM; MTX: 0,006±0,001 µM) and MNNG/SAR (DOX: 0,26±0,04 µM; CIS: 7,96±2,88 µM; MTX: 0,006±0,001 µM). All drugs induced a G2/M cell

cycle arrest in MNNG/HOS cells. In opposite, no significant changes were observed in cell cycle of CSC.

Conclusions: The MNNG/HOS cell lines contain a subpopulation of cells with stem-like properties. These cells are relatively resistant to conventional chemotherapeutic agents compared with parental cell line. Therefore conventional drugs might not address this subset of cells that can be responsible for tumor regrowth after therapy.

Capítulo 1

1.1 Introdução

O osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo maligno primário que afecta principalmente crianças, adolescentes e adultos jovens (1). Localiza-se frequentemente na metáfise dos ossos longos, sobretudo nos ossos dos membros inferiores (2). O sintoma mais comum no momento do diagnóstico é a dor que no início é intermitente e de leve intensidade, tornando-se contínua e intensa com o decorrer do tempo. Há um aumento visível e anómalo do osso e pode ocorrer fractura patológica (3).

Com a introdução de novas abordagens terapêuticas que incluem quimioterapia pré-operatória (neo-adjuvante), cirurgia e quimioterapia pós-operatória (adjuvante), houve um aumento significativo da taxa de sobrevivência global destes pacientes em 60 - 70% (4, 5). Apesar disso, cerca de 50% dos doentes sem metástases na altura do diagnóstico, desenvolvem doença metastática devido ao desenvolvimento de resistência à terapia. A intensificação dos regimes de quimioterapia não se traduziu numa melhoria significativa no prognóstico destes doentes (1), o que mostra que as terapias convencionais não conseguem eliminar a totalidade das células tumorais e impedir a progressão da doença.

Há evidências crescentes que os tumores sólidos, por exemplo o OS, estão organizados hierarquicamente e são mantidos por uma subpopulação de células que, além de serem as responsáveis pelo início do desenvolvimento do tumor, estão implicadas no seu crescimento, capacidade em metastatizar, resistência aos tratamentos de quimioterapia e aparecimento de recidivas (6, 7).

Pelo facto de essas células apresentarem algumas semelhanças com as células estaminais (SCs), foram denominadas de células estaminais tumorais (CSCs, do inglês *Cancer Stem Cells*). Estas células para além de terem a capacidade de auto-renovação, dividem-se de forma assimétrica dando origem a uma célula igual a ela própria e a células em diferentes estados de diferenciação (8). Além disso têm propriedades intrínsecas tais como o seu estado de quiescência e expressão de transportadores ABC, o que as torna menos vulneráveis à acção dos agentes citotóxicos e por conseguinte resistentes às terapias convencionais.

Este trabalho tem como objectivo explorar o papel das CSCs na carcinogénese do OS e no desenvolvimento de resistência à quimioterapia.

1.2 Objectivos

1.2.1 Objectivos gerais

Explorar o papel das CSCs na carcinogénese do OS e no desenvolvimento de resistência à quimioterapia

1.2.2 Objectivos específicos

- Isolamento das CSCs a partir de uma linha celular humana de osteossarcoma MNNG/SAR pelo método de formação de esferas.
- Caracterização das CSCs: análise da expressão de marcadores de células estaminais mesenquimatosas; capacidade de diferenciação em osteoblastos; avaliação do potencial tumorigénico em ratinhos atímicos.
- Avaliação da sensibilidade das CSCs aos agentes de quimioterapia utilizados no tratamento do OS (doxorubicina, cisplatina e metotrexato).
- Avaliação das alterações induzidas no ciclo celular pelos mesmos agentes de quimioterapia.

Capítulo 2

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Osteossarcoma

Os tumores ósseos estão entre os mais raros de todos os tipos de neoplasias. Por ano, cerca de 1.500 novos casos de sarcomas ósseos são registados nos E.U.A., enquanto 93 mil novos casos de cancro de pulmão e 88 mil novos casos de cancro de mama são diagnosticados. Por isso, em termos globais, os tumores ósseos são relativamente pouco frequentes (1).

No entanto, muitos dos tumores osteogénicos (osteossarcoma, condrossarcoma e sarcoma de Ewing), afectam sobretudo crianças e jovens, que são muitas vezes submetidos à cirurgia radical seguido de tratamentos quimioterapêuticos bastantes agressivos (1). Entre os vários tipos de tumores ósseos, osteossarcoma (OS) é o tumor ósseo primário mais frequente e em geral, mais de 80 - 90% dos casos ocorrem nos ossos longos (5).

Embora possa surgir em qualquer idade, o OS é extremamente raro antes dos 5 anos de idade e pouco frequente até aos 10 anos de idade. O pico de incidência ocorre no início da adolescência e é seguido por um rápido declínio. Em pessoas mais velhas, os casos de OS diminuíram com o aumento da idade. Qualquer osso do corpo humano pode ser afectado, mas os ossos dos membros superiores e inferiores são os mais afectados (3).

O OS afecta mais homens que mulheres na proporção de 1,5:1. Nas pessoas do sexo feminino o pico de incidência ocorre mais cedo do que nos homens, pelo facto da fase de crescimento ósseo acelerado ocorrer mais cedo (5). Nas faixas etárias acima dos 10 anos, o tumor é mais comum nos rapazes do que nas raparigas. Abaixo dos 10 anos de idade, há maior probabilidade de desenvolvimento de OS nas meninas do que nos meninos (1).

2.1.1 Etiologia e factores de risco

As causas do OS não são completamente conhecidas (1, 3, 4). Muitos estudos têm demonstrado uma correlação entre a rápida taxa de crescimento ósseo na puberdade e a ocorrência de OS. De facto, o pico de incidência de OS verifica-se durante a puberdade, período em que o crescimento do osso é mais acelerado.

A exposição à radiação é o único factor de risco de origem exógena que está comprovado (3). A radiação está envolvida em aproximadamente 2% dos casos de OS. Os casos induzidos por radiação, apesar de raros, ocorrem em pessoas de idades mais avançadas e resultam do facto de terem estado expostas à radiação em criança.

Certas patologias como por exemplo a doença de Paget, osteocondroma hereditário múltiplo e retinoblastoma, são conhecidas por estarem associadas a uma maior incidência de OS (1, 5).

Há evidências que a via de sinalização supressora de tumor (p53) parece estar envolvida na patogénese do OS (9). Em condições fisiológicas normais a proteína p53 regula a síntese de DNA. Quando o DNA genómico sofre danos a célula produz a proteína p53, que induz a paragem da divisão celular na fase G1/S do ciclo celular enquanto o DNA é reparado. Assim a mutação genética não é transmitido às células filhas. Se o dano cromossómico for irreparável a p53 activa mecanismos apoptóticos.

A ocorrência de mutações na proteína p53 conduzem à desregulação de mecanismos apoptóticos, activação de oncogenes e propagação de mutações genéticas. Marina *et al.* num estudo recente demonstraram que 22% das amostras de OS apresentaram mutações do gene p53 (9).

2.1.2 Abordagem terapêutica

A taxa de sobrevivência global em 5 anos dos doentes com OS era de apenas 10 - 20% antes da década de 1970, altura em que o principal tratamento utilizado era a amputação do membro (1). Ao longo das últimas três décadas, o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas juntamente com a aplicação de quimioterapia sistémica, permitiu reduzir o número de amputação dos membros, e levou a um aumento da taxa de sobrevivência global de 60 - 70% (1, 4).

Actualmente a modalidade terapêutica utilizada no tratamento dos doentes com OS consiste, na aplicação de quimioterapia neoadjuvante para redução da massa tumoral seguida de cirurgia para remoção do tumor com margens adequadas e quimioterapia adjuvante. Os três principais agentes quimioterapêuticos recomendados pelo Grupo de Estudos Europeu e Americano de Osteossarcoma (EURAMOS) são a doxorubicina (DOX), cisplatina (CIS) e o metotrexato (MTX) (10).

A DOX, comercialmente designada por adriamicina[®], Doxo-cell[®], é um antibiótico pertencente a classe das antraciclinas. Em 1969, foi isolado da bactéria *streptomyces peucetius caesius* e verificou-se que possui uma elevada acção antineoplásica. Desde a sua descoberta tem sido um dos agentes anti-tumoral mais prescrito devido ao seu elevado espectro de acção (11). É utilizado no tratamento de vários tipos de cancro tais como, cancro da mama, osteossarcoma, leucemia aguda, cancro da tiróide, bexiga, ovário, neuroblastomas, etc. A DOX é frequentemente utilizado em regimes de quimioterapia de associação em conjunto com outros fármacos citotóxicos (12).

O mecanismo de acção da DOX está relacionada com a sua ligação ao DNA e a inibição da síntese do ácido nucleico, ligação à membrana lipídica celular com a topoisomerase II formando complexos de DNA passíveis de clivagem. Estudos efectuados com este agente em culturas de células, demonstram uma rápida penetração na célula e ligação à cromatina perinuclear, rápida inibição da actividade mitótica e da síntese de ácido nucleico (11).

A CIS ou cis-diaminodicloroplatina II foi sintetizado em 1844 por Michele Peyrone, ficando com a designação de cloreto de Peyrone. Rosenberg et al., num estudo

sobre o crescimento das bactérias, observou que a cisplatina inibia a divisão celular. Este efeito alertou para o facto deste agente poder ser usado para inibir o crescimento das células tumorais. Assim, em 1970 os efeitos da cisplatina foram testados e comprovados em sarcomas implantados artificialmente em ratos (13). A cisplatina constitui, nos dias de hoje, um dos três fármacos mais usados mundialmente na quimioterapia de vários tipos de cancro, nomeadamente no tumor de testículo, osteossarcoma, leucemia aguda, cancro gástrico, carcinoma de bexiga, carcinoma do ovário e neuroblastomas (14).

O mecanismo de acção da cisplatina é atribuída à sua ligação ao DNA, com formação de aductos, originando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais no DNA. O efeito citotóxico da cisplatina é, assim, causado pela inibição da transcrição e replicação e induzindo a morte celular programada por apoptose (12, 14).

O MTX tal como a doxorrubicina foram descoberto por volta de 1970. Contrariamente ao que se verificou com a doxorrubicina, a aceitação do metotrexato como um agente de quimioterapia foi bastante controverso. Só após a publicação de vários estudos que comprovaram a sua eficácia, o metotrexato foi incorporado nos vários protocolos quimioterapêutico (4). Este fármaco inibe competitivamente a enzima di-hidrofolato redutase (DHFR) que é responsável pela conversão do ácido fólico em tetra-hidrofolato (THF). O THF é um co-factor necessário para a transferência de carbono de muitas reacções metabólicas, incluindo a síntese de bases azotadas, ao inibir a síntese de bases azotadas, leva à paragem da síntese de DNA e RNA, e consequentemente ao bloqueio da replicação celular(14).

Os mecanismos de acção dos agentes de quimioterapia estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Mecanismos de acção dos agentes quimioterapêuticos utilizados no tratamento da OS (1).

Agentes	Mecanismos de acção
Doxorrubicina	A doxorrubicina intercala-se nos pontos de quebra da dupla hélice do DNA e inibe a síntese de DNA e RNA.
Cisplatina	A cisplatina liga-se directamente ao DNA do tumor e inibe a síntese de DNA através da formação de ligações cruzadas no DNA.
Metotrexato	O metotrexato é um antimetabólito do ácido fólico, inibe a síntese de purinas necessárias para a síntese de DNA, RNA e proteínas.

2.2 Ciclo celular

A divisão celular é um fenómeno cíclico, ao fim do qual uma célula origina duas células-filhas. Cada célula-filha recebe da célula progenitora exactamente o mesmo número e tipo de cromossomas. Antes de sofrer nova divisão, a célula aumenta de volume e duplica os seus componentes nucleares e do citoplasma. A investigação citológica permite concluir que todo o processo de duplicação é controlado pelos cromossomas. Dá-se a designação de mitose à divisão do núcleo que condiciona uma distribuição equitativa dos cromossomas pelos dois núcleos-filhos. A divisão subsequente do citoplasma chama-se citocinese.

Uma célula apresenta, assim, diferentes fases que incluem, por um lado, a síntese dos seus constituintes (particularmente um novo complemento de DNA) e, por outro, a divisão em duas células-filhas. Ao processo de síntese segue-se, pois, a divisão da célula numa sequência regular a que se dá o nome de ciclo celular. As fases desse ciclo são designadas pelas letras M, G₁, S e G₂. A fase M, corresponde à mitose, em que os cromossomas se tornam visíveis; ocupa cerca de 1 ou 2 horas do ciclo. O período maior do ciclo é preenchido pelas fases G₁, S e G₂, que o seu conjunto constituem a interfase. Na fase G₁ ocorre a síntese de RNA e proteínas, na fase S tem lugar a duplicação de DNA e na fase G₂ ocorre a síntese de proteínas necessárias à formação do fuso mitótico (15, 16).

2.3 Teoria das células estaminais cancerígenas

Os mecanismos celulares subjacentes a heterogeneidade dos tumores têm sido alvos de uma intensa pesquisa científica. Actualmente, há evidências crescentes de que os tumores, particularmente os tumores sólidos, possuem uma subpopulação de células que, além de serem as responsáveis pelo início do desenvolvimento, estão implicadas no seu crescimento, capacidade em metastatizar, resistência aos tratamentos de quimioterapia e aparecimento de recidivas (1, 8).

Pelo facto destas células terem algumas semelhanças com as células estaminais (SCs), os primeiros investigadores chamaram-nas de células estaminais cancerígenas (CSCs, do inglês Cancer stem cells) (1). A teoria das CSCs assume que as células que

Capítulo 2

constituem a massa tumoral estão organizadas segundo uma hierarquia. No topo desta hierarquia está a subpopulação das CSCs, que têm a capacidade de dar origem ao tumor e de sustentar o seu crescimento.(6, 8) Estas células quando transplantadas em ratinhos imunocomprometidos são capazes de dar origem a tumores com as mesmas características em termos de organização hierárquica e heterogeneidade celular que o tumor original (7).

Uma das primeiras experiências que confirmou a existências das CSCs foi realizada em 1960, quando células de um tumor primário foram retiradas de um doente e transplantadas noutras partes do seu corpo. O resultado desta experiência mostrou que apenas uma pequena percentagem de células transplantadas produziu um tumor. Por causa das questões éticas suscitadas por este tipo de experiências, ela foi suspensa e substituída por um modelo animal (17).

Outra evidência para a existência das CSCs veio de um caso de leucemia mielóide aguda. Uma subpopulação de células deste tumor, cerca de 0,01-1% da população total, induziu leucemia quando foram transplantadas em ratinhos imunocomprometidos (6). Recentemente, CSCs têm sido identificadas em gliomas, melanomas e diferentes tipos de carcinomas, fornecendo indicações do seu envolvimento na origem destas neoplasias (7, 18).

Ainda não foram encontrados marcadores específicos capazes de identificarem as CSCs. Em muitos estudos, a identificação das CSCs tem sido feita através da utilização de um conjunto de marcadores específicos das SCs do órgão de origem do tumor (6).

Em 1997, Bonnet et al. identificaram em doentes de leucemia mielóide aguda, uma subpopulação de células imaturas, caracterizadas por serem positivas para o marcador de superfície CD34 e negativas para o marcador CD38 (CD34⁺/CD38⁻). No mesmo estudo, transplantaram estas células e as que exibiam o fenótipo típico da leucemia (CD34⁺/CD38⁺) em ratinhos imunocomprometidos para avaliar a capacidade tumorigénica das mesmas. Os resultados mostraram que apenas as células CD34⁺/CD38⁻, foram capazes de formar tumores. A descoberta desta subpopulação de células foi a primeira prova da existência de CSCs em tumores hematopoiéticos (19).

Os marcadores de superfície CD133 e CD44 têm sido utilizados para identificar CSCs em diferentes tumores sólidos. De facto, diferentes tipos de cancro, incluindo cancro de cérebro, pâncreas, próstata e carcinomas pulmonares foram positivos para o

marcador CD133. As CSCs já foram identificadas em sarcomas osteogénicos. Culturas de células obtidas a partir de amostras de biopsias de condrossarcomas, foram analisadas e revelaram a presença de uma subpopulação de células positivas aos marcadores CD105, CD133 e CD44 (6). Contudo, estes marcadores não são específicos de CSCs.

2.3.1 Propriedades das células estaminais tumorais

A transformação das células estaminais em CSCs deve-se a acumulação de mutações genéticas (mutações em oncogenes e genes supressores de tumor) e alterações epigenéticas (metilação anormal e modificação das histonas) (20).

Não obstante, as CSCs continuam a partilhar propriedades importantes com as SCs, tais como, capacidade de auto-renovação (por divisão simétrica ou assimétrica) e diferenciação em várias linhagens celulares (21). O processo de auto-renovação, resulta em duas células filhas, tendo ambas a mesma capacidade de replicação e de gerar linhas celulares diferenciadas tal como a célula mãe. Está é a divisão simétrica, na divisão assimétrica cada CSC dá origem a uma CSC e uma célula progenitora mais diferenciada, a qual em divisões subsequentes dá origem a células em diferentes estados de diferenciação (17). A capacidade de auto-renovação das CSCs é uma propriedade que está associada a etiologia tumoral e contribui consideravelmente para a heterogeneidade celular típica dos tumores sólidos.

Existem propriedades intrínsecas das CSCs que as associam ao desenvolvimento de resistência à quimioterapia, a capacidade de entrarem num estado quiescente e a expressão de transportadores transmembranares específicos, que têm a capacidade de bombear múltiplos agentes citotóxicos para fora das células, diminuindo a sua acumulação intracelular e por conseguinte a sua eficácia terapêutica.

O primeiro destes transportadores a ser identificado e caracterizado foi a glicoproteína-P (também conhecida como MDR1; é codificada pelo gene ABCB1), que é um membro da superfamília dos transportadores ABC (*ATP-binding Cassete*) (22, 23).

Outros membros desta família, como *multidrug-resistance-associated protein* (MRP1; codificada pelo gene ABCC1) e a *breast-cancer-related protein* (BCRP; codificada pelo gene ABCG2), são também responsáveis por mecanismos de resistência aos agentes quimioterapêuticos (23).

Alguns estudos confirmam os mecanismos de resistência mediada por estes transportadores. Hadnagy et al. demonstraram num estudo, que a não retenção do corante Hoechst 33342 pelas CSCs, resulta de processo activo pelo qual o transportador MDR1 é o responsável. Para suportar esta hipótese, verificaram que a utilização de um inibidor do MDR1 – verapamil, permite reduzir o efluxo de Hoechst 33342 e aumentar a sua retenção(24).

Baldine et al. reportaram, num estudo sobre a expressão de Glicoproteína-P em 92 doentes tratados com cirurgia e quimioterapia, que há um grande aumento dos níveis de expressão deste transportador nestes doentes(25).

2.3.2 Implicações terapêuticas da teoria das CSCs

A identificação das CSCs introduz novas implicações terapêuticas. Actualmente, os métodos de tratamento utilizados caracterizam-se por serem pouco selectivos, isto é, tanto as células tumorais como as normais são alvos dos agentes quimioterapêuticos. Além disso, esta falta de selectividade é uma das causas da ineficácia terapêutica e dos severos efeitos secundários que estes tratamentos provocam. Por outro lado como a maioria dos fármacos têm como alvo células com elevada actividade proliferativa, podem não eliminar CSC em estado quiescente, que assim sobrevivem à terapia e podem dar origem ao reaparecimento do tumor. Se a teoria das CSCs provar estar correcta, os métodos terapêuticos futuros seriam destinados à eliminação selectiva das CSCs e não as células que formam a massa tumoral.

A resistência das CSCs à quimioterapia parece estar relacionada com o aumento de expressão da proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2, activação de mecanismos de reparação de DNA e sobre-expressão de proteínas transportadoras transmembranares ABC. O aumento da expressão da Glicoproteína-P e da BCRP são os casos mais reportados (17). Al-Hajj et al., demonstraram que um grande aumento da expressão destas proteínas nas CSCs do tumor da mama, torna estas células resistentes a todas as terapias aplicadas (26). Estes resultados sugerem que as CSCs, indiferenciadas e em estado quiescente, são resistentes aos agentes de quimioterapia, que actuam sobretudo nas células diferenciadas. Por isso, a subpopulação das CSCs pode ser a responsável pelo aparecimento de metástases e recorrência após tratamento.

O aprofundamento do conhecimento sobre a biologia das CSCs, nomeadamente na descoberta de metodologias capazes de as identificar na heterogeneidade do tecido tumoral e de factores capazes de induzir a sua diferenciação, tornará possível o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas direccionadas às CSCs, e assim melhor a resposta dos doentes à terapia.

Algumas hipóteses e trabalhos promissores apontam neste sentido. Bao et al, demonstraram que as proteínas cinases reguladoras do ciclo celular CHK1 e CHK2, têm um papel crucial na resistência das CSCs (CD133⁺) à radioterapia no tratamento de doentes com glioma (tumor maligno do cérebro). Verificaram que a inibição farmacológica destas proteínas *in vivo* e *in vitro*, resultou num decréscimo de resistência das células à radiação ionizante (27).

Piccirillo et al. observaram, *in vitro*, uma redução do número das CSCs de gliomas, após a exposição das mesmas às proteínas morfogenéticas do osso (BMPs). As BMPs em condições normais induzem a diferenciação de neurónios precursores em astrócitos maduros. Em modelos animais de glioma, verificaram que a BMP4 inibia o crescimento do tumor (28). Os resultados destes estudos sugerem a utilização de abordagens terapêuticas alternativas às convencionais, pois procuram induzir a diferenciação ou eliminação selectiva das CSCs dos gliomas. Estas abordagens podem ser extensíveis a outros tipos de tumores malignos.

Capítulo 3

3. Materiais e Métodos

3.1 Linha celular e cultura de células

A linha celular humana de osteossarcoma MNNG/HOS foi obtida da *American Type Cell Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, E.U.A) e cultivada em monocada em meio de cultura RPMI-1640 (R4130, Sigma-Aldrich®) contendo 10% de soro bovino fetal (FBS) (Gibco Invitrogen Life Technologies) e 1% de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich®). As células foram mantidas numa incubadora humidificada a 37°C com 5% CO₂ e 95% de ar. A subcultura das células foi efectuada numa câmara de fluxo laminar em condições de esterilidade 2 vezes por semana sempre que as células apresentavam 80-90% de confluência. Brevemente, após remoção do meio celular e lavagem com solução de tampão salino de fosfato (PBS), incubaram-se as células com uma solução de 0,04% tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich®), a 37°C durante breves minutos para destacar as células da superfície do frasco. De seguida adicionaram-se 5 ml de meio de cultura contendo FBS para parar a reacção da tripsina e centrifugaram-se a 1000 rpm, 19°C durante 5 min. Por fim descartou-se o sobrenadante, ressuspenderam-se as células em meio novo de cultura e transferiram-se para novos frascos de cultura numa diluição de 1:6 (v/v). Estas células não foram previamente expostas a agentes citotóxicos para desenvolvimento de resistência.

3.2 Teste de viabilidade celular com azul de tripano

A viabilidade celular foi determinada antes de todas os ensaios pelo método de exclusão com o corante azul de tripano. A 20 µl de suspensão celular adicionou-se igual volume de 0,4 % de azul de tripano (Sigma Chemical, St. Louis, USA). A suspensão corada foi colocada num hemacitómetro (câmara de Neubauer) e observada no microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS 100). Apenas as células não viáveis, aquelas cujo as membranas se encontram danificadas coram de azul. As células viáveis permanecem não coradas. A viabilidade é dada em percentagem do número de células viáveis em relação ao número total de células. Em todas as experiências realizadas, foram utilizadas células que com mais de 90% de viabilidade.

3.3 Isolamento de CSCs pelo método de formação de esferas

O isolamento das CSCs a partir da linha celular MNNG/HOS foi realizado pelo método de formação de esferas em superfícies não aderentes. Para tal, as células MNNG/HOS em fase de crescimento exponencial foram tripsinizadas e transferidas para placas de 6 poços (Sarstedt AG & Co., Alemanha), previamente revestidos com uma solução poly-HEMA (0.8mg/cm², 0.4mL/poço) numa densidade de 60x10³ células/poço em 2 ml de meio N2 com 1% de metilcelulose (M0387, Sigma-Aldrich®). As placas foram mantidas na incubadora a 37°C numa atmosfera humedecida com 5% CO₂ e 95% de ar.

O meio N2 consiste em meio DMEM/F12 (*Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/F12 mixture F-12 HAM, D2906, Sigma-Aldrich®)*) suplementado com 1,2 g/mL de bicarbonato de sódio (S6297, Sigma-Aldrich®), 20 nM de progesterona (P7556, Sigma-Aldrich®), 100 mM de putrescine (P5780, Sigma-Aldrich®), 1% (v/v) de suplemento de insulina-transferrina-selenite (Gibco Invitrogen Life Technologies) e 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich®). Este meio foi filtrado e misturado com um volume igual de uma solução 2% metilcelulose previamente esterilizado para prevenir a reagregação celular. De dois em dois dias, foram adicionados 10 ng/mL de factor de crescimento humano epidermal (EGF, E9644, Sigma-Aldrich®) e 10 ng/mL do factor de crescimento fibroblástico básico (bFGF, PeproTech, EC, London).

Ao fim de 7 dias, as esferas em suspensão (denominadas de sarcosferas) foram removidos das placas de 6 poços, lavadas com solução de PBS e cultivadas em meio de cultura RPMI contendo 10% de FBS em frascos de cultura aderentes T-75. Após atingirem 60-70% de confluência as células foram recolhidas e transferidas novamente para placas de 6 poços não aderentes em meio N2/1% metilcelulose para induzir a formação de sarcosferas secundárias. Este procedimento foi repetido mais uma vez para avaliar a capacidade de auto-renovação das sarcosferas. Para determinar a capacidade das sarcosferas em darem origem a uma cultura em monocamada com propriedades semelhantes às da linha celular original MNNG/HOS, foram transferidas sarcosferas de terceira geração para frascos de cultura não aderentes e cultivadas em monocamada nas mesmas condições que as células MNNG/HOS. Estas células foram denominadas de MNNG/SAR e utilizadas nos estudos subsequentes.

3.4 Caracterização das CSC

3.4.1 Expressão de marcadores de células estaminais mesenquimatosas

As células foram analisadas em termos de expressão de marcadores de superfície de células estaminais mesenquimatosas (MSCs) por citometria de fluxo. De acordo com o critério da Sociedade Internacional para Terapia Celular (29), as MSCs são positivas para os marcadores CD73, CD90 e CD105 e negativas para os marcadores CD11b, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR. As células cultivadas em monocamada MNNG/HOS e MNNG/Sar e as sarcosferas em suspensão foram desagregadas com tripsina-EDTA e acutase (Gibco Invitrogen, Life Technologies), respectivamente. Transferiram-se 200 µl de cada suspensão celular contendo 2×10^6 cells/mL em PBS para tubos de plástico e incubaram-se com os anticorpos monoclonais marcados com os respectivos fluoróforos durante 10 minutos num ambiente escuro. Depois de lavadas duas vezes com 250 µL de PBS, para remover o excesso do anticorpo, as células marcadas foram analisadas por citometria de fluxo. A leitura das amostras foi realizada num citómetro de fluxo BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson, S.A., USA), usando o software de aquisição CellQuest (BD Biosciences).

Os anticorpos utilizados foram os seguintes: *phycoerythrin* (PE)-conjugado com CD73 (BD Pharmingen™) e CD105 (Immunostep), *allophycocyanin* (APC)-conjugado com

CD90 (BD Pharmingen™), *Pacific blue* (PB)-conjugado com CD11b (BD Pharmingen™), PE-Cy7-conjugado com CD19 (eBioscience), *peridinin-cholophyll-protein complex* (PerCP)-Cy5.5-conjugado com CD34 (BD Pharmingen™), *Pacific orange* (PO)-conjugado com CD45 (Gibco® Invitrogen Life Technologies) e *fluorescein isothiocyanate* (FITC)-conjugado com HLA-DR (eBioscience)."

3.4.2 Capacidade de diferenciação osteogénica

A capacidade de diferenciação das sarcosferas em células do tecido ósseo foi avaliada utilizando o Kit de diferenciação osteogénica da STEMPRO® (Gibco Invitrogen Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante.

Para o efeito, as sarcosferas de terceira geração foram transferidas para um frasco T-75 e cultivadas em meio de cultura próprio para MSCs que era composto por DMEM de baixa glucose, (31885, Gibco), 10% soro qualificado para MSC, 200 mM glutamina (59202C, Sigma-Aldrich®); e 1% de antibiótico/antimicótico. Após atingirem 60-80% de confluência, as células foram transferidas para placas de 12 poços (2×10^5 células/poço) e cultivadas no mesmo meio durante 4 dias a 37°C. Findo este período, o meio de cultura das MSC foi substituído pelo meio de diferenciação osteogénica (Meio basal de diferenciação em osteócitos/condrócito com um suplemento indutor da osteogénese (9:1, v/v), STEMPRO® e 1% de antibiótico/antimicótico). As células foram cultivadas durante 21 dias, sendo o meio de cultura renovado a cada 3-4 dias. Por fim, o meio de diferenciação foi removido e as células lavadas com PBS e fixadas com uma solução de formaldeído 4% durante 30 minutos. Após a fixação, os poços foram lavados com água destilada e incubados com uma solução 2% de Alizarin Red (pH 4,2) durante 3 minutos. Após o período de incubação, lavaram-se as células três vezes com água destilada e observaram-se num microscópio invertido de contraste de fase (Nikon TS 100, Nikon) para verificar a formação de depósitos de cálcio.

3.4.3 Avaliação do potencial tumorigénico das sarcosferas

O potencial tumorigénico das sarcosferas foi avaliado através da sua capacidade em gerar tumores em ratinhos imunocomprometidos e comparado com o da linha celular parental MNNG/HOS. Foram utilizados ratinhos atímicos BALB/c com quatro

semanas de idade do sexo masculino. Os animais foram obtidos dos laboratórios *Charles River* e mantidos em condições de luz e temperatura controlados e alimentados *ad libitum* com água e dieta de laboratório. Este estudo foi realizado de acordo com as normas e regulamentos institucionais relativos à utilização de animais para fins experimentais.

As células aderentes MNNG/HOS e as sarcosferas, ambas em fase de crescimento exponencial, foram desagregadas com tripsina e acutase, respectivamente. Após a realização do estudo de viabilidade celular com azul de tripano e contagem das células no hematocítmetro, preparam-se suspensões celulares em PBS, as quais foram mantidas em gelo até serem inoculadas nos animais.

Para se induzir a formação dos tumores, os ratinhos imunocomprometidos foram inoculados por via subcutânea com 0,2 ml de cada suspensão celular em flancos opostos. As células derivadas das sarcosferas foram injectadas no flanco direito e as células MNNG/HOS no flanco esquerdo. Os animais foram inoculados com os seguintes números de células: 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$ e 5×10^5 .

O crescimento do tumor foi monitorizado semanalmente por inspecção visual. Mediram-se dois diâmetros tumorais com o uso de uma craveira e calculou-se o volume tumoral de acordo com a fórmula: $V = (a \times b^2)/2$, onde V é o volume tumoral, a é o maior diâmetro tumoral e b é o menor diâmetro tumoral .

Os animais foram sacrificados por deslocação cervical quando um dos tumores atingia um volume de 200 mm^3 .

3.5 Estudos de citotoxicidade

3.5.1 Agentes antineoplásicos

Avaliou-se a sensibilidade das linhas celulares aderentes MNNG/HOS e MNNG/SAR e das sarcosferas aos três principais agentes de quimioterapia recomendado pelo *Grupo de Estudos Europeu e Americano de Osteossarcoma* (EURAMOS) para o tratamento de osteossarcoma e que incluem a doxorrubicina (DOX), a cisplatina (CIS) e o metotrexato (MTX) (10). As soluções de DOX 2 mg/ml (DOXO-cell®), CIS 1mg/ml (Teveguard) e de MTX 25 mg/ml (Teva Pharma) foram fornecidas sob a forma de solução injectável. As soluções foram diluídas em PBS antes da sua utilização nos estudos de citotoxicidade.

3.5.2 Curvas de dose-resposta

O ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um ensaio colorimétrico muito utilizado para determinar a viabilidade celular e avaliar a atividade de agentes citotóxicos em células tumorais. O ensaio baseia-se na redução do sal de tetrazólio pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase que está activa nas células viáveis, dando origem a cristais de formazan insolúveis em água. Estes cristais depois de dissolvidos numa solução de HCl 0,04M em isopropanol dão origem a uma solução de cor azul cuja intensidade pode ser quantificada por espectrofotometria. A avaliação da citotoxicidade da DOX, da CIS e do MTX nas linhas celulares MNNG/HOS, MNNG/SAR e nas sarcosferas (colónias de CSCs), foi feita utilizando este ensaio.

As células aderentes MNNG/HOS e MNNG/SAR foram mantidas em meio de cultura RPMI contendo 10% de FBS até atingirem 60-70% de confluência. Após a remoção dos meios de cultura, as células foram lavadas com PBS e desagregadas com tripsina-EDTA. Avaliou-se a viabilidade celular com azul de tripano e contaram-se as células no hemocitómetro. Depois disso, as células foram transferidas para placas de 24 poços numa densidade de 3×10^4 células/poço em 0,5 ml de meio de cultura RPMI e incubadas a 37°C numa atmosfera humedecida com 5% de CO₂ e 95% de ar. As sarcosferas foram retiradas do meio de cultura N2/1% metilcelulose, lavadas duas vezes com PBS e dissociadas com a enzima acutase. Depois da contagem e do estudo da viabilidade celular com azul de tripano, as células foram colocadas em placas de 24 poços numa densidade 6×10^4 células/poço em 0,5 ml de meio de cultura e colocadas na incubadora. No dia seguinte, o meio foi removido e substituído por meio novo contendo DOX ou CIS ou MTX nas concentrações referidas na Tabela 2. As células foram colocadas na incubadora durante 48h.

Tabela 2. Doses de agentes de quimioterapia utilizados nos estudos de citotoxicidade.

Doxorrubicina (μM)	Cisplatina (μM)	Metotrexato (μM)
0,001	0,01	0,001
0,01	0,1	0,0025
0,1	0,5	0,005
0,5	1	0,0075
1	5	0,01
5	10	0,1
10	20	1
20	30	10
30	40	100
40	60	500
60	80	1000

Terminado o período de incubação, removeram-se os meios de cultura e adicionaram-se 200 μl de uma solução de MTT 5mg/ml (M2128, Sigma-Aldrich®) a cada poço e colocaram-se as placas na incubadora durante 4 horas para a formação dos cristais de formazan. Por fim, adicionaram-se 200 μl de uma solução de isopropanol ácido para dissolver os cristais de formazan e transferiram-se 300 μL de amostra de cada poço para uma placa de 96 poços (Sarstedt AG & Co., Germany). Por fim, efectuou-se a leitura de absorvância no leitor de microplacas Elisa (SLT Spectra II™ Austria) com filtro de referência a 620 nm e de leitura a 570 nm.

A percentagem da viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (1):

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Absorvância(amostra)}}{\text{Absorvância(controlo)}} \times 100 \quad (1)$$

Com os valores obtidos foram traçadas curvas de dose-resposta em coordenadas semilogaritmicas. Estas curvas foram depois ajustadas a uma função sigmoidal de acordo com a equação (2), tendo-se determinado a concentração de fármaco necessária para inibir a proliferação celular em 50% (IC_{50})

$$y = A1 + \frac{A1-A2}{1+10^{(\text{LOG}x_0-x)p}} \quad (2)$$

onde y é a resposta medida, $A1$ é o valor mínima de y , $A2$ é o valor máxima de y , x_0 é o IC_{50} e p o declive da curva ajustada. O procedimento de ajuste das curvas foi feito com software ORIGIN (versão 8, OriginLab Corporation).

3.6 Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular foi realizada às 48h após incubação das células MNNG/HOS e das sarcosferas com os diferentes agentes de quimioterapia por citometria de fluxo. As células foram colocadas em placas de 6 poços (1×10^5 /poço) e incubadas com concentrações variáveis de DOX (0– $1 \mu\text{M}$), de CIS (0– $5 \mu\text{M}$) e de MTX (0– $1 \mu\text{M}$) durante 48h a 37°C . Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, desagregadas por acção enzimática e fixadas com etanol 75% a 4°C durante 24h. Terminado o período de fixação, as amostras foram lavadas e incubadas com $10 \mu\text{g/ml}$ de iodeto de propídio (PI) na presença de $500 \mu\text{g/ml}$ de RNase A (R4875, Sigma-Aldrich) durante 75min no escuro e à temperatura ambiente. A leitura das amostras foi realizada no citómetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson). Para cada amostra foram adquiridos 1×10^4 eventos. A distribuição das células pelas várias fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M foi analisada com o programa WinMDI 2.9.

3.7 Análise estatística

Os resultados experimentais são apresentados como a média \pm desvio padrão (SD) do número de experiências indicado. Para o estudo comparativo entre as três linhas de celulares, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann Whitney. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi feita com o software de SPSS (versão 17, SPSS, Inc., Chicago, IL)

Capítulo 4

4. Resultados

4.1 Isolamento das CSCs a partir da linha celular humana de OS (MNNG/HOS)

O método de formação de esferas em meio sem soro e em superfícies não aderentes, foi o utilizado para isolar a população de CSCs a partir da linha celular aderente MNNG/HOS. Uma amostra de células MNNG/HOS (**Figura 1A**) foi transferida para placas de cultura previamente revestidas com uma solução poly-HEMA e cultivada em meio de cultura sem soro com 1% de metilcelulose. Estas condições de cultura previnem a reagregação das células e permite que elas cresçam em suspensão, formando colónias esféricas (sarcosferas) a partir de uma única célula. Após dois dias em cultura foram visíveis as primeiras colónias esféricas que continuaram a crescer até atingirem 50-100 μ M de diâmetro aos 7 dias (**Figura 1B**).

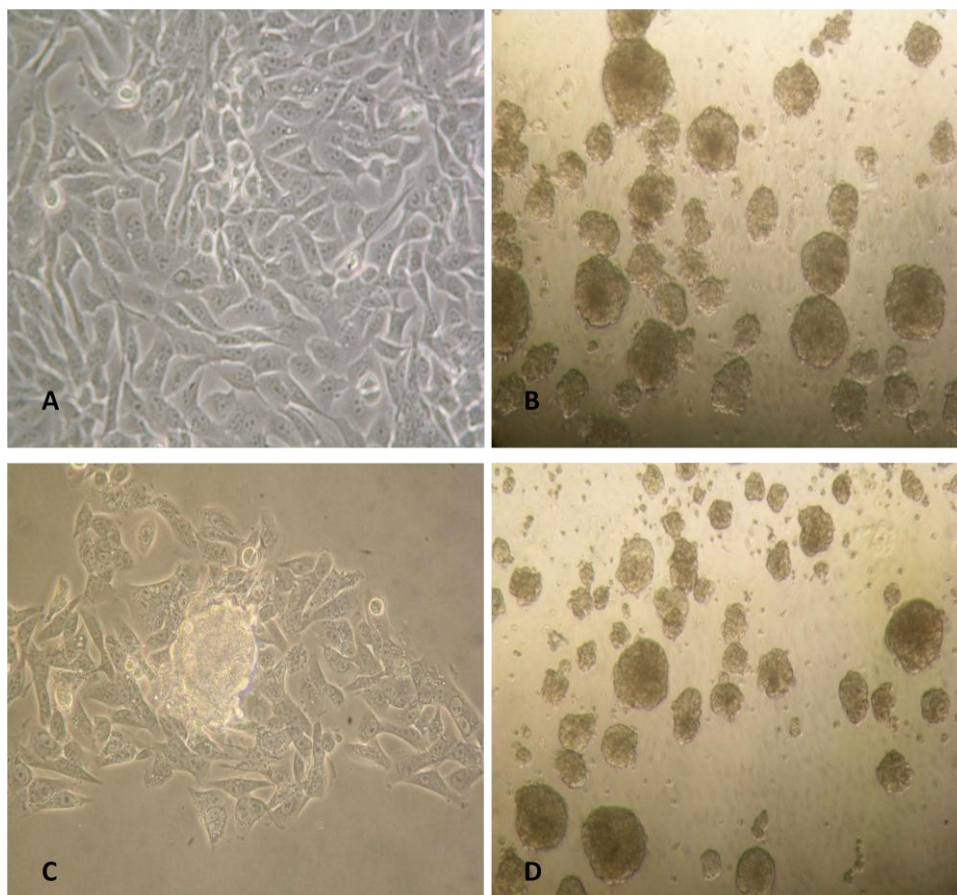


Figura 1. Sarcosferas isoladas a partir da linha celular MNNG/HOS. (A) Células aderentes MNNG/HOS; (B) Sarcosferas em suspensão derivadas de células MNNG/HOS (7 dias); (C) Adesão das células à superfície após transferência das sarcosferas para superfície aderente; (D) Formação de sarcosferas secundárias após transferência para superfície não aderente (7 dias). (Ampliação original: 200X)

Após transferência das sarcosferas para frascos aderentes em meio cultura RPMI com 10% de FBS, as células começaram a separar-se dos agregados esféricos e a aderir à superfície do frasco adquirindo um fenótipo semelhante ao da linha celular original MNNG/HOS (Figura 1C). Quando novamente transferidas para meio de cultura sem soro com 1% de metilcelulose, observou-se a formação de esferas secundárias com a mesma frequência com que se formaram aquando do primeiro isolamento (Figura 1D). Estes resultados verificaram-se novamente após um terceiro isolamento, o que demonstra capacidade de auto-renovação destas células. Nos estudos posteriores de caracterização e de citotoxicidade foram sempre utilizadas sarcosferas de terceira geração, e que passámos a referir como CSCs (*cancer stem cells*).

A propagação das sarcosferas provenientes da terceira fase de isolamento (sarcosferas terciárias) em meio RPMI com 10% FBS em frascos aderentes deu origem a

uma linha celular que denominámos de MNNG/SAR e que foi utilizada em estudos posteriores. Estas células às 3 semanas apresentavam uma morfologia semelhante à das células originais MNNG/HOS, com um formato fusiforme alongado, e semelhante taxa de duplicação de aproximadamente 24h.

Estes resultados mostram que a linha celular MNNG/HOS contém uma subpopulação celular capaz de gerar clones esféricos em suspensão e com capacidade de auto-renovação.

4.2 Caracterização das linhas celulares de OS e das sarcosferas

4.2.1 Análise da expressão dos marcadores das MSCs por citometria de fluxo

Sendo o osteossarcoma um tumor maligno de origem mesenquimatosa, as CSCs e as células aderentes MNNG/HOS e MNNG/SAR, foram analisadas em termos de expressão de marcadores de células estaminais mesenquimatosas de acordo com os critérios da Sociedade Internacional para Terapia do Cancro (29). Os resultados obtidos nas três linhas celulares mostraram que as células são positivas para o CD13, CD73 e CD90 (Figura 2), apresentam uma expressão moderada para o CD105 e são negativas para o CD11b, CD34, CD45 e HLA-DR, o que exclui a presença células progenitoras hematopoiéticas e de células endoteliais nestas células.

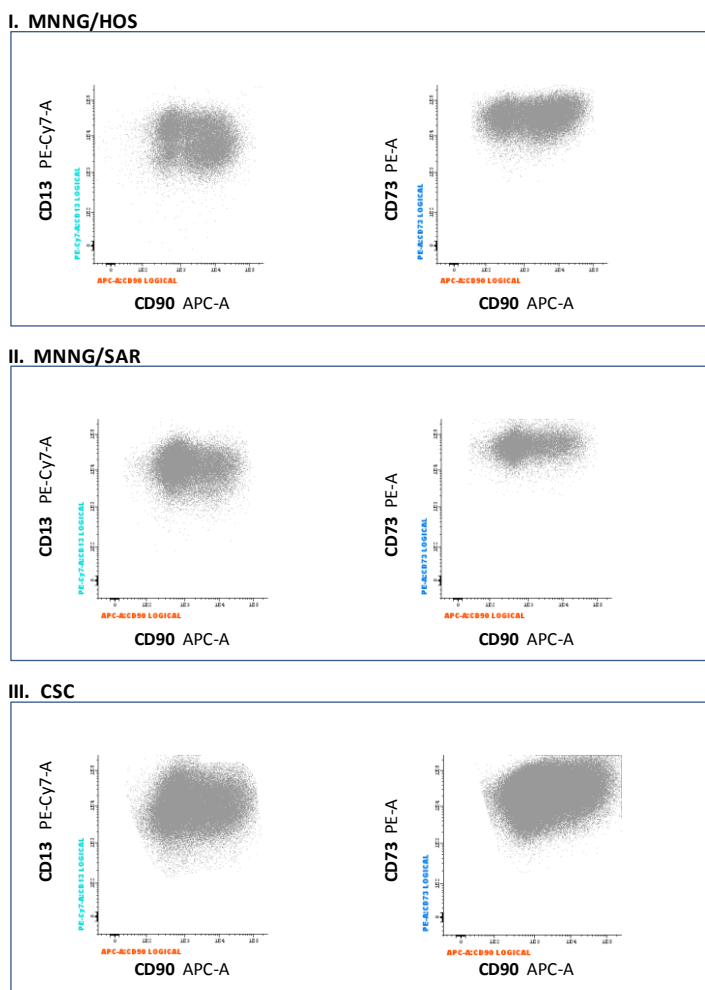


Figura 2. Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores das MSCs (CD13, CD73, CD90) nas linhas celulares aderentes MNNG/HOS (I), MNNG/SAR (II) e nas CSCs (III).

4.2.2 Indução de diferenciação das CSCs em osteoblastos

A indução da diferenciação das CSCs em osteoblastos foi feita, utilizando o Kit de diferenciação Osteogénica da STEMPRO®. Após um período de incubação de 21 dias com meio de diferenciação osteogénica e fixação com uma solução de formaldeído 4% durante 30 minutos, as células foram lavados com água destilada e incubados com uma solução 2% de Alizarin Red S (pH 4,2) durante 3 minutos. Este corante é utilizado em muitos ensaios bioquímicos para determinar a presença de depósitos de cálcio em linhas celulares osteogénicas. A deposição de sais de cálcio é um indicador da capacidade de diferenciação de células mesenquimatosas em osteoblastos.

A coloração com Alizarin Red S revelou a deposição de sais de cálcio na matriz extracelular como ilustrado na Figura 3 o que demonstra o potencial de diferenciação osteogénico das CSCs.

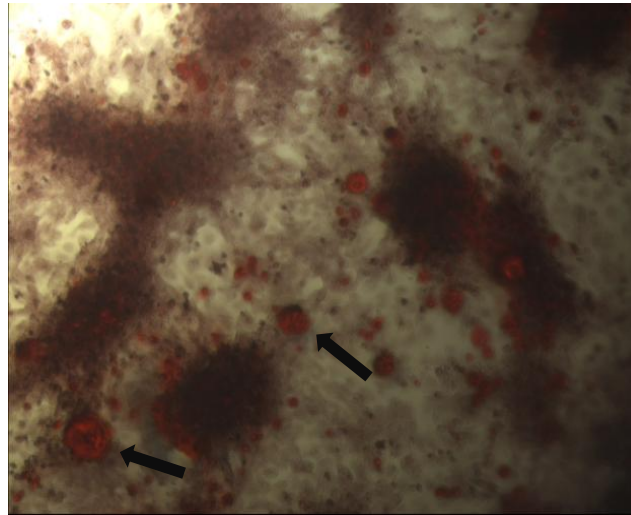


Figura 3. Coloração com Alizarin Red S das CSCs após 21 dias em meio de diferenciação osteogénico. São visíveis depósitos de sais de cálcio na matriz extracelular mineralizada indicados pelas setas.

4.2.3 Potencial tumorigénico das CSCs

Para se verificar o potencial tumorigénico das CSCs, avaliou-se a capacidade destas células em formar tumores em ratinhos atímicos BALB/c. Os animais foram inoculados por via subcutânea com suspensões celulares (0,2ml) de CSCs no flanco direito e de células MNNG/HOS no flanco oposto. Foi utilizado o mesmo número de células de cada linha celular em cada animal afim de se comparar o potencial tumorigénico entre elas. Os animais foram inoculados com os seguintes números de células: 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$ e 5×10^5 . O crescimento dos tumores foi monitorizado semanalmente por inspeção visual tendo-se calculado o volume tumoral através da medição dos diâmetros tumorais com uma craveira. Em todos os animais foi observada a formação de tumores. No entanto, os tumores resultantes da inoculação das CSCs desenvolveram-se primeiro e cresceram mais rapidamente do que os tumores derivados das células MNNG/HOS. Por exemplo, às quatro semanas após inoculação de 1×10^5 células, o volume tumoral das CSCs era de aproximadamente 200mm^3 , enquanto que os tumores MNNG/HOS mediam apenas 23mm^3 (Tabela 3 e Figura 4). Nos animais

injectados com maior número de células o desenvolvimento dos tumores foi mais rápido tendo atingido volumes próximos dos 200mm³ às 2 e 3 semanas, após inoculação de 5x10⁵ e 2,5x10⁵ células, respectivamente. Em todos os casos os volumes dos tumores MNNG/HOS foram sempre inferiores ao dos tumores CSC, independentemente do número de células inoculado (Tabela 3). Estes resultados demonstram assim o potencial tumorigénico das CSCs isoladas da linha celular MNNG/HOS.

Tabela 3. Volumes dos tumores em ratinhos inoculados com CSCs e com células MNNG/HOS.

Tumores	Volumes tumorais (mm ³)		
	Grupo I* (n=2) 1x10 ⁵ cel	Grupo II** (n=2) 2,5x10 ⁵ cel	Grupo III*** (n=2) 5x10 ⁵ cel
Flanco dto (CSC)	198,3±2,2	187±2,3	178±23,1
Flanco esq (MNNG/HOS)	22,8±9,3	27,6±4,6	56,5±13,8

O volume tumoral foi calculado através da formula $V=(axb^2)/2$, onde **a** é o maior diâmetro tumoral e **b** o menor diâmetro tumoral

*volumes tumorais calculados às 4 semanas após inoculação

**volumes tumorais calculados às 3 semanas após inoculação

***vol. calculado às 2 semanas após inoculação

Os valores representam a média±SD de numero de casos indicados

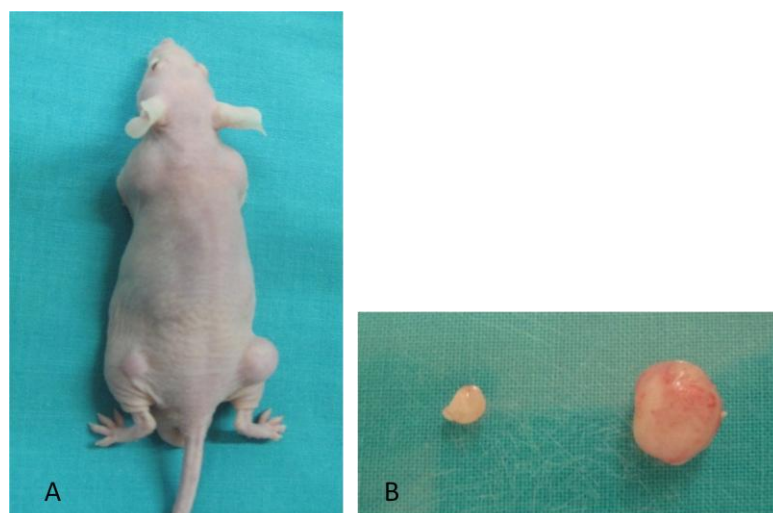


Figura 4. A. Imagem representativa da formação de tumores às 4 semanas após injeção subcutânea de 1x10⁵ de CSCs no flanco direito e de igual número de células MNNG/HOS no flanco esquerdo. A injeção de CSCs induziu a formação de tumores com um volume 9 vezes superior ao induzido pelas células MNNG/HOS. **B.** Fotografias dos tumores excisados.

4.3 Quimiosensibilidade das células aderentes MNNG/HOS, MNNG/SAR e das CSCs

A doxorubicina, a cisplatina e o metotrexato são os três principais citostáticos utilizados nos protocolos terapêuticos da EURAMOS para o tratamento dos casos de OS. A citotoxicidade destes agentes nas linhas celulares aderentes de osteossarcoma (MNNG/HOS e MNNG/SAR) e nas CSCs, foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT após um período de incubação de 48 horas com concentrações variáveis dos referidos agentes. As concentrações utilizadas foram as seguintes: DOX (0 – 60 μM), CIS (0 – 80 μM) e MTX (0 – 1000 μM).

Com os resultados obtidos no ensaio colorimétrico de MTT, foram traçadas curvas de dose-resposta da percentagem de células viáveis em função do logaritmo da concentração de citostático utilizado. A citotoxicidade foi determinada tomando em consideração o valor concentração do citostático que inibe a proliferação celular em 50% (IC_{50}), o qual foi calculado a partir do ajuste das curvas de dose-resposta que foram ajustadas a uma função sigmoideal de acordo com a equação apresentada na secção dos materiais e métodos.

4.3.1 Sensibilidade das células MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs à doxorubicina

As curvas de dose-resposta e os valores do IC_{50} para a DOX, nas três linhas celulares acima referidas, estão apresentadas na Figura 5 e na Tabela 4, respectivamente. Os resultados mostram que as células MNNG/HOS são sensíveis aos efeitos citotóxicos da DOX, tendo-se observado uma diminuição na percentagem de células viáveis com o aumento da concentração da DOX. O mesmo efeito de dose-resposta foi observado nas células MNNG/SAR, pois o perfil de sensibilidade destas células à DOX foi semelhante ao verificado na linha celular MNNG/HOS. De facto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos valores de IC_{50} calculados para as MNNG/HOS ($\text{IC}_{50} = 0,30 \pm 0,07 \mu\text{M}$) e as MNNG/SAR ($\text{IC}_{50} = 0,26 \pm 0,04 \mu\text{M}$) (Tabela 4).

Contrariamente, as CSC revelaram ser mais resistentes à DOX. Embora se tenha observado um efeito de dose-resposta, a percentagem de células viáveis, foi superior à observada nas células aderentes MNNG/HOS e MNNG/SAR no intervalo de concentrações de DOX utilizado. De facto, o valor médio de IC_{50} da DOX nas CSCs foi de $0,80 \pm 0,22 \mu M$, cerca de 2,6 vezes superior ao calculado nas células MNNG/HOS ($IC_{50}=0,30 \pm 0,07 \mu M$) e MNNG/SAR ($IC_{50}=0,26 \pm 0,04 \mu M$). (Tabela 4).

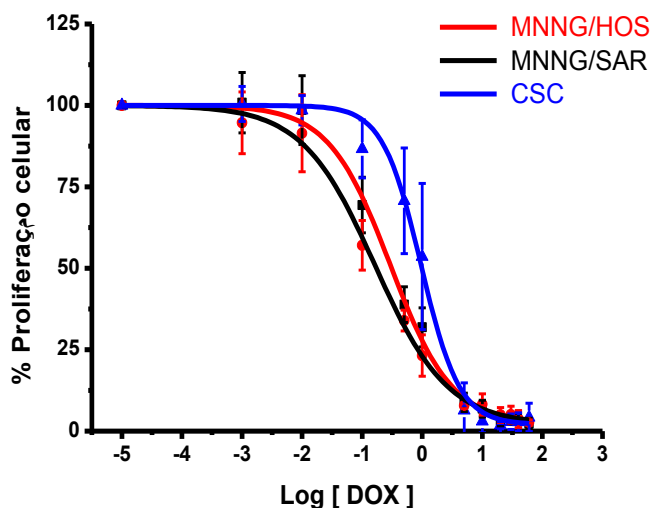


Figura 5. Curvas de dose-resposta da DOX nas linhas celulares MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs. Os pontos correspondem a média \pm desvio padrão de cinco ensaios independente realizados em duplicado.

4.3.2 Sensibilidade das células MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs à cisplatina

As curvas de dose-reposta e os valores do IC_{50} da CIS, nas três linhas celulares, estão apresentadas na Figura 6 e na Tabela 4, respectivamente. As células MNNG/HOS e MNNG/SAR exibiram um perfil de sensibilidade semelhante à CIS, tendo-se observado uma diminuição na viabilidade celular com o aumento da concentração das doses de CIS. À semelhança do que foi verificado para a DOX, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos valores de IC_{50} entre as células MNNG/HOS ($IC_{50}=6,61 \pm 1,24 \mu M$) e as MNNG/SAR ($IC_{50}=7,96 \pm 2,88 \mu M$), após a incubação com a CIS (Tabela 4).

Nas CSCs observou-se igualmente um efeito de dose-resposta com uma redução na proliferação celular com o aumento da concentração de CIS, embora a concentração requerida para inibir a proliferação celular em 50% tenha sido significativamente

superior ($IC_{50}=14,71 \pm 1,68 \mu\text{M}$, $p<0,05$) à observada nas células MNNG/HOS e MNNG/SAR (Tabela 4).

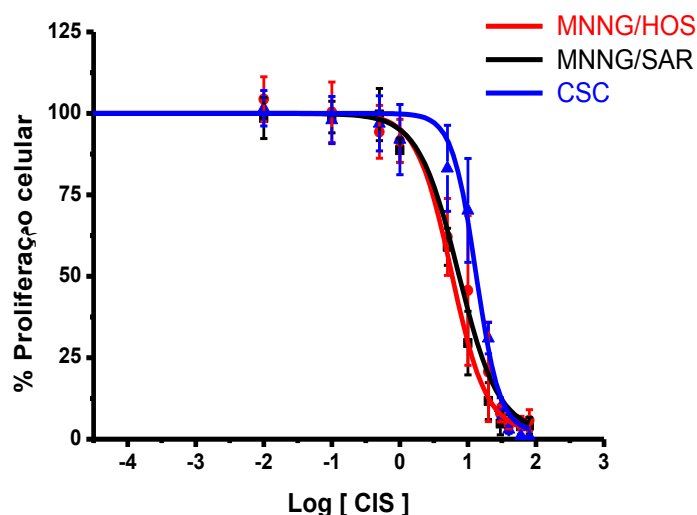


Figura 6. Curvas de dose-resposta da CIS nas linhas celulares MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs. Os pontos correspondem a média \pm desvio padrão de cinco ensaios independente realizados em duplicado.

4.3.3 Sensibilidade da células MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs ao Metotrexato

As curvas de dose-resposta e os valores do IC_{50} para o MTX, nas três linhas celulares acima referidas, estão apresentadas na Figura 7 e na tabela 4, respectivamente. As células MNNG/HOS e as MNNG/SAR apresentaram igual sensibilidade ao MTX, não se tendo observado diferenças nos valores de IC_{50} calculados para as MNNG/HOS ($IC_{50}=0,006 \pm 0,001 \mu\text{M}$) e as MNNG/SAR ($IC_{50}=0,006 \pm 0,001 \mu\text{M}$), após a incubação com MTX (Tabela 4).

Mas uma vez e à semelhança do que foi observado com a DOX e a CIS, nas CSCs, a redução na proliferação celular pela acção do MTX, foi muito menos acentuada do que nas células MNNG/HOS e MNNG/SAR, o que indica que as CSCs são também mais resistentes a este citostático. De facto, o valor médio do IC_{50} nas CSCs ($IC_{50}=0,05 \pm 0,02 \mu\text{M}$), foi cerca de dez vezes superior aos verificados nas células MNNG/HOS e MNNG/SAR, após tratamento com o mesmo agente quimioterapêutico (Tabela 4).

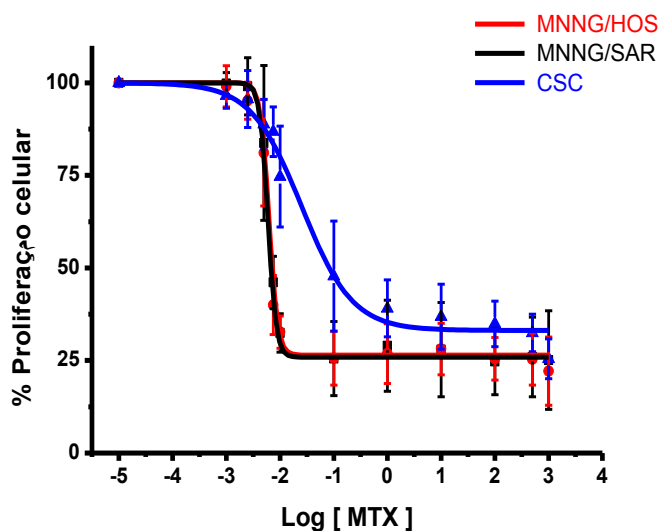


Figura 7. Curvas de dose-resposta do MTX nas linhas celulares MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs. Os pontos correspondem a média \pm desvio padrão de cinco ensaios independente realizados em duplicado.

Tabela 4. Efeitos citotóxicos dos agentes quimioterapêuticos nas linhas celulares aderentes MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs.

Linhas celulares	IC ₅₀ (μM)		
	DOX	CIS	MTX
MNNG/HOS	0,30 \pm 0,07	6,61 \pm 1,24	0,006 \pm 0,001
MNNH/SAR	0,26 \pm 0,04	7,96 \pm 2,88	0,006 \pm 0,001
CSC	0,80 \pm 0,22*	14,71 \pm 1,68*	0,050 \pm 0,020*

*p<0,05 quando comparado com as células MNNG/HOS e MNNG/SAR.

Abreviaturas: IC₅₀, concentração de fármaco que inibe a proliferação celular em 50%; DOX, doxorubicina; CIS, cisplatina; MTX, metotrexato. As células foram incubadas com concentrações crescentes de DOX (0 – 60 μM), CIS (0 – 80 μM) e MTX (0 – 1000 μM) durante 48 horas. A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT. O IC₅₀ calculado a partir do ajuste das curvas de dose-resposta a uma função do tipo sigmoidal. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão de cinco ensaios independentes realizados em duplicado.

4.4 Análise do ciclo celular das MNNG/HOS e CSC

Os resultados dos estudos de quimiosensibilidade das linhas celulares aderentes de osteossarcoma e das CSCs com os três principais agentes de quimioterapia (DOX, CIS e MTX), mostraram que as linhas celulares MNNG/HOS e MNNG/SAR apresentavam o mesmo perfil de sensibilidade a todos os citotóxicos (ver curvas dose-resposta e valores

de IC_{50}). Por esta razão, a análise do ciclo celular foi feita apenas com as células MNNG/HOS e CSC.

Para tal, após a incubação das células durante 48h a 37°C com concentrações variáveis de DOX (0–1 μ M), CIS (0–5 μ M) e MTX (0–1 μ M), as células foram desagregadas e fixadas com etanol 75% a 4°C durante 24h. Depois disso, as células foram lavadas e incubadas com uma solução contendo 10 μ g/ml de PI e 500 μ g/ml de RNase A durante 75min no escuro e à temperatura ambiente. Por fim, a leitura das amostras foi realizada por citometria de fluxo e a distribuição das células pelas várias fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M foi analisada com o programa WinMDI 2.9.

Os resultados da análise do ciclo celular estão apresentados nas Figuras 8 e 9. Observou-se nas células MNNG/HOS, que a DOX e CIS (concentrações 1 μ M e 5 μ M, respectivamente), induziram uma paragem do ciclo celular na fase G2/M e que esta paragem é dependente da concentração (Figura 8a, 8b). Com o aumento das concentrações de ambos os agentes citotóxicos, houve um aumento da percentagens de células na fase G2/M, que foi acompanhado de um decréscimo proporcional da percentagem de células na fase G1 (Figura 8a, 8b) e (Figura 9A, 9B)

Nas células MNNG/HOS incubadas com MTX, observou-se uma diminuição das células em G1 e um aumento da percentagem de células na fase S para concentrações até 0,075 μ M. Para concentrações mais elevadas, parece existir alterações no ciclo celular, estando as células distribuídas pelas fases G0/G1 e S (Figura 8c) e (Figura 9C)

Para as CSC, não foram observadas alterações significativas na distribuição das células pelas várias fases do ciclo celular. O perfil dos histogramas para as várias concentrações dos três agentes de quimioterapia, são semelhantes aos histogramas das células controlo (na ausência de citotóxico) (Figura 8a, b e c) e (Figura 9A, B e C).

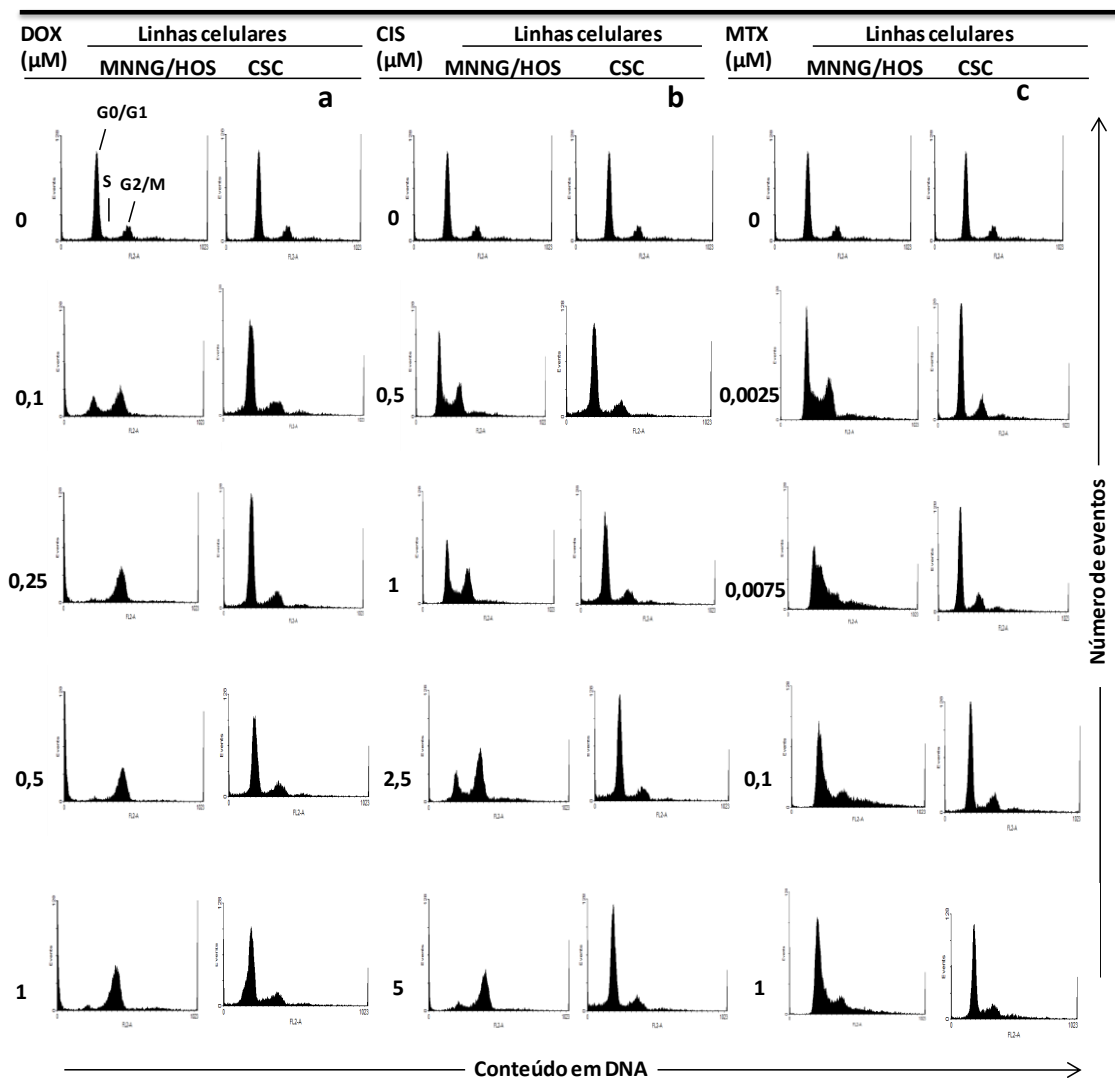
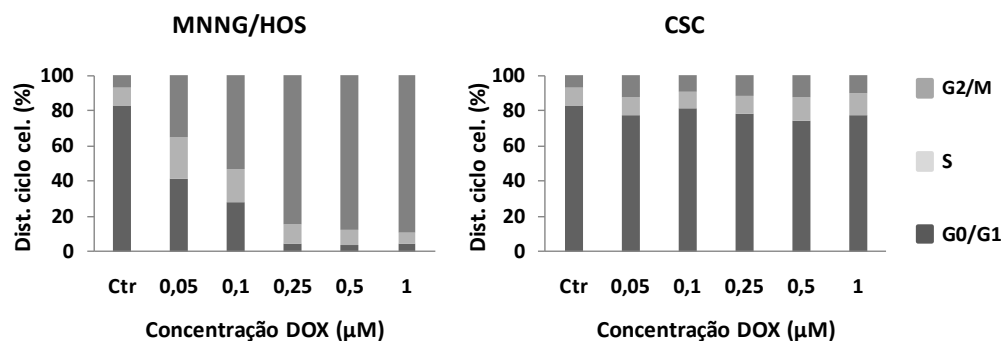
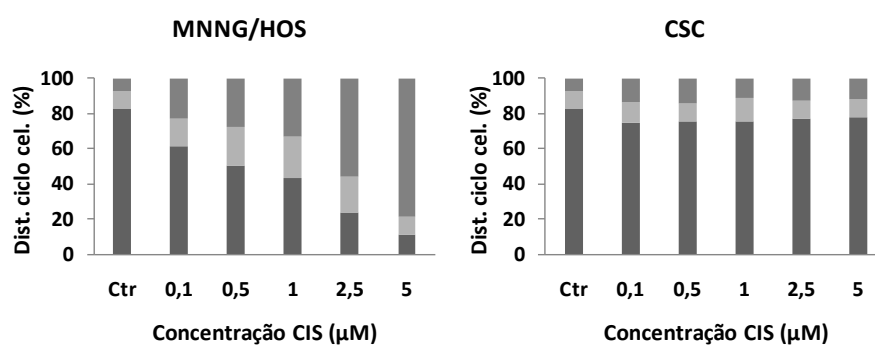


Figura 8. Histogramas do ciclo celular das MNNG/HOS e CSCs após incubação com diferentes concentrações de DOX (**a**), CIS (**b**) e MTX (**c**) durante 48 horas. Análise feita por citometria de fluxo com iodeto de propídeo.

A. DOX



B. CIS



C. MTX

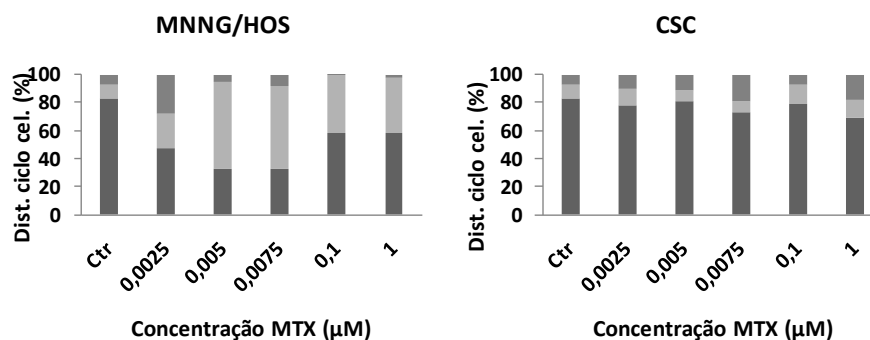


Figura 9. Análise quantitativa da distribuição das células MNNG/HOS e CSCs pelas fases do ciclo celular, após incubação com concentrações variáveis de DOX (A), CIS (B) e MTX (C) durante 48 horas. Ctr (controlo, sem agente citotóxico).

Capítulo 5

5. Discussão

Este trabalho teve como objectivo principal o isolamento e caracterização de uma subpopulação de CSCs a partir da linha celular humana de osteossarcoma MNNG/HOS e explorar o seu papel na carcinogénese do OS e no desenvolvimento de resistência à quimioterapia.

Utilizando o método de formação de esfera em meio de cultura sem FBS (30, 31), isolamos e propagamos uma subpopulação de CSCs a partir da linha celular humana de osteossarcoma MNNG/HOS.

As células isoladas foram posteriormente caracterizadas em termos de expressão de marcadores de superfície específicos das MSCs por citometria de fluxo. Outras características avaliadas, foram a sua capacidade de diferenciação em osteoblastos e a de induzir a formação de tumores em ratinhos imunocomprometidos.

Para a avaliação da sensibilidade das células aos agentes de quimioterapia (DOX, CIS e MTX) foi utilizado o método colorimétrico de MTT após um período de incubação de 48h. Além disso, foram avaliadas as alterações no ciclo celular induzidas pelos referidos agentes de quimioterapia por citometria de fluxo com iodeto de propídeo.

O método de formação de esferas em meio sem soro e em placas de cultura não aderentes tem sido utilizado com sucesso no isolamento de células estaminais tumorais (31). Nestas condições de cultura (ausência de soro, incapacidade de aderência), apenas células com características de estaminais conseguem sobreviver em detrimento de outras subpopulações celulares mais diferenciadas. Por isso, as células da linha celular

humana de osteossarcoma MNNG/HOS foram submetidas à estas condições de cultura. Estas células aderentes mostraram conter uma subpopulação de células com propriedades de células estaminais, que tinham a capacidade de crescer em suspensão e formar colónias esféricas (sarcosferas) a partir de uma única célula, que chamamos de células estaminais cancerígenas (CSCs). Esta capacidade de formação de agregados esféricos pelas células MNNG/HOS foi observada após transferências sucessivas das sarcosferas para condições de cultura em monocamada seguida de nova transferência para condições de cultura em suspensão, o que demonstra a capacidade de auto-renovação destas células. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Wilson H. et al., que isolaram uma subpopulação de células capazes de formar colónias esféricas a partir de células de cultura primária de osteossarcoma canino e humano (31).

Posteriormente, avaliamos se as sarcosferas isoladas eram capazes de readquirir a morfologia característica das células aderentes originais MNNG/HOS, como forma de avaliar a sua capacidade de diferenciação. Quando as sarcosferas de terceira geração foram cultivadas em meio RPMI com 10% FBS (meio de cultura das células MNNG/HOS) em frascos de cultura aderentes as colónias esféricas começaram a desagregar-se e as células a aderir à superfície dos frascos adquirindo uma morfologia semelhante à das células aderentes originais MNNG/HOS. Ao fim de duas semanas em cultura as células já apresentavam uma capacidade proliferativa semelhante à das células parentais, com um tempo de duplicação de aproximadamente 24h. Estas células aderentes, derivadas das sarcosferas foram mantidas em cultura e denominadas de células MNNG/SAR e foram utilizadas em estudos comparativos com as células aderentes MNNG/HOS originais.

As MSCs embrionárias dão origem a um folheto embrionário intermédio denominado de mesoderme, que retém parte da multipotencialidade das MSCs, o que faz com que as células desta camada sejam capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (32). Tendo em conta o facto de que o osteossarcoma é um tumor que se origina a partir de alterações genéticas e epigenéticas nas MSCs multipotentes (1), e pelo facto de não existirem marcadores de superfície específicos para as CSCs, caracterizamos as CSCs utilizando marcadores das MSCs. Tanto as células aderentes como as CSCs mostraram ser positivas para os marcadores das MSCs, na análise feita por citometria de fluxo. Estas células revelaram ser positivas para os marcadores de superfície das MSCs CD13, CD73, CD90 e CD105, e

foram negativas para os marcadores de superfície hematopoiéticos, o que está de acordo com o critério proposto pela International Society for Cellular Therapy (29, 33). Além disso, as CSCs isoladas também demonstraram ter a capacidade de diferenciação em osteoblastos, quando foram cultivadas em meio de diferenciação osteogénico, o que é uma das primeiras evidências de que as CSCs isoladas têm origem mesenquimatosa.

As CSCs inoculadas em ratinhos imunocomprometidos, induziram a formação de massas tumorais que foram detectadas macroscopicamente três semanas após a injeção subcutânea das células, o que demonstrou que as CSCs têm capacidade tumorigénica. Estas observações, associadas ao facto de que as CSCs têm propriedades de células estaminais como acima descrito, demonstram que a linha celular humana de osteossarcoma MNNG/HOS contém uma subpopulação de células cancerígenas com características semelhantes às encontradas nas células estaminais e que são altamente tumorigénicas, o que está em concordância com o modelo das CSCs (34). Além disso, verificámos que o potencial tumorigénico das CSCs é superior ao das células MNNG/HOS, pois o volume dos tumores resultantes da inoculação de igual número de células MNNG/HOS foi cerca de 9 vezes inferior ao dos tumores derivados de CSCs.

A sensibilidade das células MNNG/HOS, MNNH/SAR e CSCs aos três principais agentes de quimioterapias recomendados pela EURAMOS, DOX, CIS e MTX (10) foi avaliada utilizando o método colorimétrico de MTT.

Os resultados da análise de citotoxicidade da DOX nas linhas celulares MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs, dadas pelas respectivas curvas de dose-resposta (Figura 5), mostraram que as CSCs foram as mais resistentes a este citostático. Embora se tenha observado um efeito de dose-resposta para as três linhas celulares, a percentagem de CSCs viáveis, foi superior à observada para as células aderentes MNNG/HOS e MNNG/SAR no intervalo de concentrações de DOX utilizado. Consequentemente, o valor médio de IC_{50} da DOX nas CSCs foi de $0,80 \pm 0,22 \mu\text{M}$, cerca de 2,6 vezes superior ao calculado nas células MNNG/HOS ($IC_{50}=0,30 \pm 0,07 \mu\text{M}$) e MNNG/SAR ($IC_{50}=0,26 \pm 0,04 \mu\text{M}$). (Tabela 4).

A DOX é um agente antineoplásico que pertence à família das antraciclina, o mecanismo de acção deste citotóxico está relacionada com a sua ligação ao DNA e a inibição da síntese do ácido nucleico, ligação à membrana lipídica celular e interacção com a topoisomerase II formando complexos de DNA passíveis de clivagem (11). É também um substrato de transporte da glicoproteína-P e da MRP1, membros da

superfamília dos transportadores ABC (22), que funcionam como bombas de efluxo evitando a sua acumulação no interior das células tumorais resistentes. Como a DOX é um dos substratos de transporte da glicoproteína-P, a sobre-expressão deste transportador constitui um mecanismo de resistência por diminuir a acumulação intracelular da DOX. Hadnagy et al., demonstraram num estudo que este transportador está sobre-expresso nas CSCs isoladas de vários tipos de tumores (24). Outra característica das CSCs e que as pode tornar mais resistentes aos agentes de quimioterapia convencionais é a capacidade que têm de entrarem numa fase de quiescência sem perder o seu potencial proliferativo. Esta propriedade tem sido referida como um mecanismo de defesa intrínseco das CSCs contra os agentes de quimioterapia que têm como alvo células com elevada actividade proliferativa.

Portanto a sobre-expressão da glicoproteína-P, a capacidade de se manterem 'silenciosas' sem contudo perder o seu potencial proliferativo assim como a existência de mecanismos intrínsecos de reparação de danos no DNA causados pela DOX, podem estar na base da citotoxicidade limitada da DOX nas CSCs. Nesta fase não podemos afirmar categoricamente que a maior resistência da CSCs à DOX se deva a estes factores, pois não foram feitos ensaios para comprovarem estas hipóteses.

Os resultados dos estudos de citotoxicidade da CIS foram semelhantes aos da DOX. As CSCs revelaram ser mais resistentes à CIS do que as células aderentes MNNG/HOS e MNNG/SAR que exibiram um padrão de sensibilidade semelhante.

De facto, os valores de IC_{50} extraídos das curvas de dose-resposta das CSCs ($IC_{50}=14,71 \pm 1,68 \mu M$, $p<0,05$) foram significativamente superiores aos obtidos nas células MNNG/HOS ($IC_{50}=6,61 \pm 1,24 \mu M$) e MNNG/SAR ($IC_{50}=7,96 \pm 2,88 \mu M$) (tabela 4).

A CIS é um potente indutor da morte celular por apoptose e altamente eficaz no tratamento de vários tipos de cancros. Este fármaco actua através de formação de aductos estáveis com o DNA que bloqueiam ou inibem a transcrição de DNA (13, 14, 35). Apesar da sua elevada citotoxicidade, as células tumorais conseguem desenvolver mecanismos de resistências à CIS. A redução na acumulação intracelular da CIS é considerada a principal causa de resistência à CIS (36). Embora essa redução esteja na sua maioria associada a anomalias no processo de captação, alguns estudos sugerem que é resultante de um aumento de efluxo da CIS mediada por transportadores ABC, mais especificamente pela MRP2, o segundo membro da famílias MRP (37, 38). Vários estudos realizados em linhas celulares demonstraram existir uma correlação significativa entre a resistência à CIS e a expressão do transportador MRP2 (39). Koike et al.

reverteram a sensibilidade das células hepáticas à CIS através da transfecção de células com um vector contendo o cDNA antisense da MRP2 (40). Também neste caso não podemos excluir a hipótese do estado de quiescência das CSCs ter contribuído para a maior resistência das CSCs à CIS uma vez que este citostático tem maior efeito citotóxico nas células com maior actividade proliferativa.

No que diz respeito ao MTX, verificamos que as células MNNG/HOS e as MNNG/SAR apresentaram igual sensibilidade ao MTX, não se tendo observado diferenças nos valores de IC_{50} calculados para as MNNG/HOS ($IC_{50}=0,006 \pm 0,001 \mu M$) e as MNNG/SAR ($IC_{50}=0,006 \pm 0,001 \mu M$), após a incubação com MTX (Tabela 4). Mas uma vez e à semelhança do que foi observado com a DOX e a CIS, nas CSCs, os efeitos citotóxicos do MTX, foram muito menos acentuados do que nas células MNNG/HOS e MNNG/SAR, o que indica que as CSCs são também mais resistentes a este citostático. O valor médio do IC_{50} nas CSCs ($IC_{50}=0,05 \pm 0,02 \mu M$), foi cerca de dez vezes superior aos verificados nas células MNNG/HOS e MNNG/SAR (Tabela 4).

O metotrexato (MTX) inibe competitivamente a enzima di-hidrofolato redutase (DHFR) que é responsável pela conversão do ácido fólico em tetra-hidrofolato (THF) (12). O THF é um co-factor necessário para a transferência de carbono de muitas reacções metabólicas, incluindo a síntese de bases azotadas. Este fármaco actua impedindo a síntese de purinas e pirimidinas, o que leva à paragem da síntese de DNA e RNA, e consequentemente ao bloqueio da replicação celular. Alguns estudos, sugerem que a resistência ao MTX pode ser mediada por bombas de efluxo dependentes de ATP (22). Volk et al., verificaram que o gene ABCG2 que codifica a BCRP foi detectado em várias linhas celulares de OS (41). A BCRP é também um dos transportadores ABC que está sobre-expresso em CSCs, servindo até para identificar subpopulações de CSCs (*side-population*) com base na exclusão do corante Hoechst 33342 por citometria de fluxo. A maior resistência das CSCs ao MTX pode assim estar relacionada com a sobreexpressão deste transportador. A BCRP ao reconhecer o MTX como substrato, bombeia-o para o meio extracelular diminuindo a sua eficácia terapêutica. Contudo, estudos posteriores são necessários para confirmar esta hipóteses.

A análise ao ciclo celular das células MNNG/HOS, MNNG/SAR e CSCs foi feita após a incubação das células durante 48h a 37°C com concentrações variáveis de DOX (0–1 μM), CIS (0–5 μM) e MTX (0–1 μM). Os resultados mostraram que as alterações induzidas por estes agentes de quimioterapia no ciclo celular das células MNNG/HOS e

MNNG/SAR foram mais significativas do que as observadas nas CSCs. Nas células MNNG/HOS, a DOX e a CIS induziram uma paragem do ciclo celular na fase G2/M e esta paragem foi dependente da concentração (Figuras 8 e 9). Com o aumento das concentrações de ambos os agentes citotóxicos, houve um aumento da percentagem de células na fase G2/M, o qual foi acompanhado de um decréscimo proporcional da percentagem de células na fase G1.

Nas células MNNG/HOS incubadas com MTX, observou-se uma diminuição das células em G1 e um aumento da percentagem de células na fase S para concentrações até 0,075 μM . Para concentrações mais elevadas, não há alterações do ciclo celular, estando as células distribuídas pelas fases G0/G1 e S.

Para as CSCs, não foram observadas alterações significativas na distribuição das células pelas várias fases do ciclo celular. O perfil dos histogramas para as várias concentrações dos três agentes de quimioterapia, são semelhantes aos histogramas das células controlo (na ausência de citotóxico) (Figuras 8 e 9). Estes resultados estão de acordo com os estudos de quimiosensibilidade e sugerem que as CSCs devem ter mecanismos de reparação de DNA mais activos do que as células tumorais parentais, o que as torna mais resistentes aos efeitos citotóxicos dos agentes de quimioterapia.

Capítulo 6

6. Conclusões

O objectivo principal deste trabalho foi o de identificar uma população de CSCs a partir de uma linha celular humana de osteossarcoma MNNG/HOS e avaliar a suas implicações na resposta à quimioterapia.

Os resultados obtidos forneceram evidências para a existência de uma subpopulação de células com propriedades de células estaminais no osteossarcoma. Estas células revelaram ser resistentes à quimioterapia. A capacidade de auto-renovação, de diferenciação em osteoblastos em conjunto com a expressão dos marcadores das MSCs, constitui uma prova coerente de que as células isoladas representam MSCs que sofreram mutações genéticas e alterações epigenéticas, confirmando que o osteossarcoma é um tumor com origem nestas células. A capacidade destas células em formar tumores em ratinhos imunocomprometidos confirmou o seu potencial tumorigénico .

A maior resistência das CSCs aos três principais agentes de quimioterapia, apoia a ideia de que as CSCs possuem mecanismos internos de resistência à quimioterapia, o que lhes permite sobreviver e por conseguinte terem a capacidade de reiniciar o crescimento tumoral após os tratamentos. A ausência de alteração no ciclo celular das CSCs após tratamento com os agentes de quimioterapia, confirma esta hipótese.

Em conjunto, estes resultados sugerem que as CSCs são as células progenitoras de osteossarcoma e que são resistentes às terapias convencionais, abrindo caminho a novas abordagens terapêuticas tendo como alvo específico estas células.

Capítulo 7

7. Trabalhos futuros

Estudos posteriores serão necessários para completar a caracterização das CSCs isoladas a partir da linha celular humana de osteossarcoma MNNG/HOS. Nomeadamente, avaliar a capacidade de diferenciação das CSCs em adipócitos e condroblastos, reforçando a nossa hipótese de que as CSCs são de origem mesenquimatosa.

A resistência das CSCs à quimioterapia pode ser atribuída a vários mecanismos. Uma análise comparativa, por *Western blot*, dos níveis de expressão de transportadores ABC nestas células e nas MNNG/HOS assim como a identificação de proteínas implicadas na reparação de lesões no DNA será necessária para melhor compreender o perfil de quimioresistência exibida pelas CSCs e assim contribuir para o planeamento de estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento do OS.

Bibliografia

- (1) Ta T, Dass C. Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer Metastasis* 2009,**28**, 247-263.
- (2) Bielack S, Kempf-Bielack B, Delling G. Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *Journal of Clinical Oncology* 2002,**20**, 776-790.
- (3) Bastos MM, Serafini OA, Barrios CE, et al. Osteossarcoma: tratamento e factores prognósticos. *Revista Brasileira de Ortopedia* 1999,**34**, 59-61.
- (4) Jaffe N, Gorlick R. High-Dose Methotrexate in Osteosarcoma: Let the Questions Surcease-Time for Final Acceptance. *Journal of Clinical Oncology* 2008,**28**, 4365-4366.
- (5) Picci P. Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma). *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2007, 2-6.
- (6) Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved question. *Nature Reviews* 2008,**8**, 755-768.
- (7) Suva ML, Riggi N, Sthele JC, Baumer K, et al. Identification of Cancer Stem Cells in Ewing's Sarcoma. *Cancer Res* 2009,**69**, 1777-1781.
- (8) Clark MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer Stem Cells - Perspective on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 2006,**66**, 9339-9344.
- (9) Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. *The Oncologist* 2004,**9**, 422-441.
- (10) Página Web de EURAMOS <<http://www.ctu.mrc.ac.uk/euramos/>>. 2010.
- (11) Rodrigues SR. Efeito de um período de exercício agudo e do tratamento com doxorubicina na bioenergética mitocondrial hepática. Faculdade de Desporto - Universidade de Porto; 2010.
- (12) Gomes CF. Avaliação Funcional do Desenvolvimento de Resistência a Múltiplos Fármacos em Tumores Sólidos: modelos in vitro e in vivo Faculdade de medicina - Universidade de Coimbra; 2008.

- (13) Jaffe N, Knapp J, Vincent P, et al. Osteossarcoma: Intra-arterial Treatment of the Primary Tumor with Cis-Diammine-Dichloroplatinun II (CDP). *Cancer* 1983,**51**, 402-407.
- (14) Página Web da Faculdade de Farmácia da Universidade de Porto <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias>>. 2010.
- (15) Carvalho A, Carvalho C, Ferrand F, Madeira V, Nobre A, Pires E. *Biologia Funcional*. Coimbra, Livraria Almedina, 1984.
- (16) Loureiro J, Santos C. Aplicação da Citometria de fluxo ao estudo do Genoma Vegetal. 2010, 18-29.
- (17) Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J App Genet* 2008,**49**, 193-199.
- (18) Woodward W, Sulman EP. Cancer stem cells: markers or biomarkers? *Cancer Metastasis* 2008,**27**, 459-470.
- (19) Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997,**3**, 730-737.
- (20) Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise Review: Cancer/Testis Antigens, Stem Cells, and Cancer. *Stem Cell* 2007,**25**, 707-711.
- (21) Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, et al. Cancer stem cell markers in common cancer - therapeutic implications. *Cell Press* 2008,**14**, 450-460.
- (22) Gomes CM, van Paassen H, Romeo S, Welling MW, et al. Multidrug resistance mediated by ABC transporters in osteosarcoma cell lines: mRNA analysis and functional radiotracer studies. *Nuclear Medicine and Biology* 2006,**33**, 831-840.
- (23) Komuro H, Saihara R, Shinya M, Takita J, et al. Identification of side population cells (stem-like population) in pediatric solid tumor cell line. *Journal of Pediatric Surgery* 2007,**42**, 2040-2045.
- (24) Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki.D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Experimental Cell Research* 2006,**312**, 3701-3710.
- (25) Baldini MD, Katia Scotland MS, Giovanni Barbanti-Bròdano MD, et al. Expression of P-Glycoprotein in High-Grade Osteosarcomas in Relation to Clinical Outcome. *The New England Journal of Medicine* 1995,**333**, 1380-1385.
- (26) Al-Hajj M, Wicha M.S., Benito_Hernandes A, Morrison S.J., Clark MF. Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003,**100**, 3983-3988.
- (27) Bao S, Wu Q, McLendon RE, HAo Y, Shi Q. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006,**444**, 756-760.

- (28) Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumor-initiating cells. *Nature* 2006,**444**, 761-765.
- (29) Dominici M, Le Blanc K, Muller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006,**8**, 315-317.
- (30) Singh S, Clarke I, Terasaki M, Bonn V, Hawkins C, et al. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumor. *Cancer Res* 2003,**63**, 5821-5828.
- (31) Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young MK, Friedrichs K, Argyle JD. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *The Veterinary Journal* 2008,**175**, 69-75.
- (32) Tang N, Song W-X, Lou J, Haydon R, He T-C. Osteosarcoma Development and Stem Cell Differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 2008,**446**, 2114-2130.
- (33) Jones E, McGonale D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology* 2008,**47**, 126-131.
- (34) Sanchez-Garcia I, Vicente_Deunas C, Cobaleda C. The theoretical basis of cancer-stem-cell-based therapeutic of cancer: can it be put into practice? *BioEssays* 2007,**29**, 1269-1280.
- (35) Norton de Matos M. Complexos Metálicos na Terapêutica do Cancro. 1987, 61-67.
- (36) Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003,**22**, 7265-7279.
- (37) Chuman Y, Chen ZS, Sumizawa T, FuruKawa T, et al. Characterization of the ATP-dependent LTC4 transporter in cisplatin-resistant human KB cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996,**226**, 158-165.
- (38) Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell line. *Cancer Res* 1997,**57**, 3537-3547.
- (39) Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, et al. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 1996,**56**, 4124-4129.
- (40) Koike K, Kawabe T, Tanaka T, Toh S, et al. A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res* 1997,**57**, 5475-5459.
- (41) Volk EL, Schneider E. Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* 2003,**63**, 5538-5543.