The background of the entire page is a grayscale microscopic image of human osteosarcoma cells. The cells are elongated, spindle-shaped, and arranged in dense, overlapping clusters. They have a granular texture and some cells show prominent nuclei.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ADRIANA ARRUDA MATOS

**Avaliação do efeito antiproliferativo da apocinina e diapocinina em
células de osteossarcoma humano**

BAURU
2017

ADRIANA ARRUDA MATOS

**Avaliação do efeito antiproliferativo da apocinina e diapocinina em
células de osteossarcoma humano**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Versão corrigida

BAURU
2017

M428a Arruda Matos, Adriana
Avaliação do efeito antiproliferativo da apocinina
e diapocinina em células de osteossarcoma humano
/ Adriana Arruda Matos. – Bauru, 2017.
98 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de
Oliveira

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
CAAE nº: 68551917.8.0000.5417
Data: 16/08/2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pela vida que me deu. Por me dar força para superar todos os obstáculos e me fazer continuar.

Aos meus pais, Adão e Fátima

Por me darem um amor incondicional e me apoiarem nas minhas escolhas. Pelo amor, carinho e atenção. Por acreditar na minha capacidade de vencer e por fornecer meios para que eu seja uma pessoa melhor a cada dia.

As minhas irmãs, Angélica, Amanda e Andressa e meu irmão Bruno,

Por me ajudarem, me apoiarem e serem meus verdadeiros amigos.

Ao Marcelo,

Pelo amor, paciência e compreensão. Pelo companheirismo, por entender meus momentos de ausência, por estar nos momentos de fraqueza e me fazer acreditar que eu poderia vencer.

Aos meus cunhados Bruno e Diego.

À minha vó Rosa

E à minha sobrinha Liz!!!

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Flávia Amadeu de Oliveira, que desde a IC esteve comigo. Uma amiga que tenho para a vida toda. Uma pessoa que merece tudo de melhor que a vida pode dar. A admiro pela pessoa de bom coração que é e pelo esforço que tem. Nos momentos em que mais precisei sempre esteve presente. Obrigada por me ajudar a cumprir mais uma etapa de minha vida. Amo você!

À Cintia Tokuhara, uma das melhores pessoas que conheci. Me ajudou nos momentos que mais precisei. Generosa, amiga, especial, responsável, contagia à todos. Sem ela nosso grupo não seria o mesmo. Obrigada pelas conversas, desabafos, conselhos, risadas... Sem você eu não teria conseguido!

À todos meus amigos Mari Santesso, João, Mari Sanches, Gabi e Márcia. Obrigada pelas ajudas e por fazer dos meus dias mais fáceis! Vocês são maravilhosos! Somos uma EQUIPE!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, meu orientador, que deu a oportunidade de ter novas experiências e conhecimentos, sempre disposto a me ajudar. Obrigada pela confiança.

A Prof. Dra. Camila Peres Buzalaf, profissional maravilhosa, sempre me ajudou quando precisei. Obrigada pela orientação, paciência, disponibilidade e explicações.

À Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, pela oportunidade de fazer parte desta instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Agradeço ao prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes por nos ceder os compostos e pela parceria com o nosso grupo.

Ao prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa por nos ceder as células de osteossarcoma.

Ao prof. Dr. José Mauro Granjeiro por nos ceder os osteoblastos humanos e pela parceria com nosso grupo de pesquisa.

Agradeço a professora Dra Marilia Buzalaf pela oportunidade de conhecer e poder fazer parte do departamento de bioquímica.

À Pri, uma amiga sem igual que desde o mestrado esteve junto comigo. Obrigada por todo carinho!

Aos meus queridos amigos do CIP, Karen, Heliton, Pepe, Rafa, Nara, Nati. Obrigada pela ajuda e força.

Às técnicas do departamento de bioquímica, Aline, Larissa e Thelma pela ajuda nos experimentos laboratoriais.

Agradeço aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (CIP) Marcelo, Márcia, e Rafa.

Agradeço à Dalva Ribeiro de Oliveira, que esteve sempre disposta a nos ajudar.

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram nas minhas escolhas e sempre acreditaram na minha capacidade. Em especial aos meus amigos e familiares.

“Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

O osteossarcoma (OS) é o tumor maligno primário mais comum do tecido ósseo, caracterizado pela formação de osteócitos anormais. Apesar do avanço nas terapias convencionais (quimioterapia e retirada do tumor), essas não conseguem eliminar totalmente as células tumorais e impedir a progressão da doença. Recentemente, agentes derivados de fontes naturais ganharam considerável atenção por causa de sua segurança, eficácia e disponibilidade imediata. Nesse sentido, a apocinina, inibidor do complexo NADPH-oxidase, vem sendo estudada como agente antitumoral em alguns tipos de câncer como: pâncreas, próstata, pulmão e mama. Apocinina é um pró-fármaco e sua ação parece estar relacionada à sua conversão produzindo a diapocinina, a qual se mostrou mais efetiva do que a apocinina. Portanto, o objetivo desse estudo é avaliar, *in vitro*, o potencial antitumoral da apocinina e diapocinina em células de osteossarcoma humano. Para isso, foram utilizados osteoblastos humanos normais (HOb) e osteossarcoma humano imortalizadas (SaOS-2) tratados ou não com apocinina e diapocinina em diversas concentrações. Foram realizados os ensaios de viabilidade celular, alterações morfológicas, apoptose celular, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), formação de colônias, migração, invasão e expressão do fator indutor de hipóxia-1alfa (HIF-1 α). Também foram conduzidos ensaios para verificar a atividade de metaloproteinase de matriz (MMP) 2 e 9. Os resultados em SaOS-2 mostraram que o tratamento com apocinina nas concentrações de 1,5 e 3 mM; e diapocinina nas concentrações de 0,75 e 1,5 mM reduziram a viabilidade; aumentaram o número de células em apoptose e diminuíram a produção de EROs; sem causar danos às células HOb. Além disso, essas mesmas concentrações inibiram a migração e invasão celular; diminuíram a expressão de HIF-1 α ; e reduziram a atividade de MMP-2 em SaOS-2. Considerando os resultados obtidos, concluímos que a apocinina e diapocinina podem atuar como possíveis moduladores de células tumorais, sendo que a diapocinina mostrou ser mais efetiva nos parâmetros testados.

Palavras-chave: Apocinina. Diapocinina. Osteossarcoma. Osteoblastos. Antitumoral.

ABSTRACT

Evaluation of the antiproliferative effect of apocynin and diapocynin on human osteosarcoma cells

Osteosarcoma (OS) is the most common primary malignant tumor of bone tissue, characterized by the formation of abnormal osteocytes. Despite advances in conventional therapies (chemotherapy and surgery) they cannot completely eliminate tumor cells and prevent the progression of the disease. Recently, agents derived from natural sources have achieved considerable attention because of their safety, efficacy and immediate availability of therapies. In this way, apocynin, an inhibitor of the NADPH-oxidase complex, has been studied as an antitumor agent in some types of cancer, such as pancreas, prostate, lung and breast. Apocynin is a prodrug and its action indicate to be related to its conversion to diapocynin, which has been shown to be more efficient than apocynin itself. Thus, the aim of this study is to evaluate, *in vitro*, the antitumor potential of apocynin and diapocynin in human osteosarcoma cells. For this, normal human osteoblasts (HOb) and immortalized human osteosarcoma cells (SaOS-2) were treated or no-treated with apocynin and diapocynin in various concentrations. Cell viability assay, morphological alterations, cellular apoptosis, reactive oxygen species (ROS) production, colony formation, migration, invasion and expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) were performed. We also performed assays to verify the activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9. The results in SaOS-2 showed that treatment with apocynin at concentrations of 1,5 e 3 mM; and diapocynin at concentrations of 0,75 e 1,5 mM reduced cell viability; increased the number of cells in apoptosis and decreased the production of ROS; without damaging HOb cells. Moreover, these same concentrations inhibited cell migration and invasion; decreased HIF-1 α expression; and reduced MMP 2 activity in SaOS-2. Considering the results, we suggest that apocynin and diapocynin may act as possible modulators of tumor cells, and diapocynin has been shown to be more effective.

Keywords: Apocynin. Diapocynin. Osteosarcoma. Osteoblasts. Antitumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Ativação da NADPH oxidase (Nox2).....	25
Figura 2 - Fórmula estrutural da apocinina.....	27
Figura 3 - Mecanismo proposto para a oxidação da apocinina.....	27
Figura 4 - Mecanismo de inibição do complexo NADPH oxidase pela apocinina..	28
Figura 5 - Percentual de viabilidade de osteoblastos normais e osteossarcoma...	50
Figura 6 - Imagens representativas da morfologia de osteoblastos humanos.....	51
Figura 7 - Imagens representativas da morfologia de osteossarcoma humano.....	52
Figura 8 - Efeito da apocinina e diapocinina na apoptose celular de osteoblastos normais e tumorais.....	54
Figura 9 - Efeitos da apocinina e diapocinina na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em osteoblastos normais e de osteossarcoma.....	56
Figura 10 - Imagens macroscópicas e microscópicas da formação de colônias de SaOS-2.....	58
Figura 11 - Quantificação da formação de colônias em SaOS-2 tratados com apocinina e diapocinina.....	59
Figura 12 - Imagens representativas do ensaio de fechamento de fendas em células SaOS-2.....	60
Figura 13 - Quantificação em porcentagem da área fechada da fenda para avaliação da migração celular de SaOS-2.....	61
Figura 14 - Invasão celular de SaOS-2.....	62
Figura 15 - Imagens representativas da expressão de HIF-1 α em SaOS-2.....	63
Figura 16 - Análise da atividade de MMPs em SaOS-2.....	65

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Akt	Serina-treonina quinase
APS	Persulfato de amônio
BSA	Albumina bovina
CO ₂	Dióxido de Carbono (gás carbônico)
CYBB	Cadeia beta de citocromo B
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCFH	7'- diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DCFoxi	2',7'-diclorofluoresceína oxidada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Meio de Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
EMT	Transição de célula epitelial para mesenquimal
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAK	Quinase de adesão focal
FeSO ₄	Sulfato de ferro II
GTPase	Enzimas que hidrolisam guanosina trifosfato
GS	Glutathione radical
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase 3 beta
HBSS	Solução-tampão salina de Hank
HeLa	Câncer do colo de útero ou câncer cervical
HIF 1 α	Fator indutor de hipóxia 1 alfa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HepG2	Células de hepatocarcinoma
HO β	Osteoblastos humano normais
HOCl	Ácido hipocloroso
IFN- γ	Interferon gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IP	Iodeto de propídio

JNK	Quinase c-Jun N-terminal
$K_2S_2O_8$	Persulfato de potássio
LNCaP	Células de adenocarcinoma da próstata derivadas do linfonodo supraclavicular esquerdo
MAPK	Quinase ativada por mitogeno
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio
NADPH	Dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato
Nox	NADPH oxidase
$O_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido
1O_2	Oxigênio singlete
O_3	Ozônio
OD	Densidade óptica
$\bullet OH$	Radical hidroxila
OS	Osteossarcoma
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Phox	Oxidase de fagócitos
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
pKa	Constante de acidez
Rac	Substrato C3 da toxina botulínica relacionada à Ras
RFU	Unidade de fluorescência relativa
SaOS-2	Linhagem de osteossarcoma humano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SKOV3	Células de câncer de ovário
siRNA	Pequeno ácido ribonucleico de interferência
SOD	Superóxido dismutase
TGF	Fator de crescimento transformador
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
UVB	Raios ultravioleta B
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Osteossarcoma	21
2.2	Espécies reativas de oxigênio (EROs)	23
2.3	NADPH oxidase	24
2.4	Apocinina.....	26
2.5	Diapocinina	29
2.6	Uso da apocinina e diapocinina no câncer	29
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Cultura de célula normal e tumoral	37
4.2	Síntese dos compostos	37
4.3	Diluição da apocinina e diapocinina em meio de cultura para ensaios biológicos in vitro	38
4.4	Viabilidade celular.....	39
4.5	Observação morfológica.....	39
4.6	Ensaio de apoptose com anexina V e iodeto de propídio (IP).....	40
4.7	Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares	40
4.8	Formação de colônias.....	41
4.9	Migração celular (Wound healing assay)	41
4.10	Invasão celular (Transwell® assay).....	42
4.11	Imunofluorescência	43
4.12	Atividade de MMP 2 e 9	44
4.13	Análise estatística	44
5	RESULTADOS	49
5.1	Viabilidade e alteração morfológica celular	49
5.2	Apoptose celular	53
5.3	Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	55
5.4	Formação de Colônias	57
5.5	Migração celular	59
5.6	Invasão celular	61
5.7	Expressão de HIF-1 α	63
5.8	Atividade de MMP-2 e 9	64
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXOS.....	95

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OS) é o tumor maligno primário mais comum do tecido ósseo, manifestando-se principalmente em crianças e adolescentes, com um segundo pico de incidência em pessoas com mais de 50 anos. OS é caracterizado por células osteoblásticas morfolologicamente alteradas que produzem osteóides anormais (WHO, 2013). O tumor ocorre preferencialmente em regiões metafisárias de ossos longos (fêmur, tíbia e úmero), mas podem aparecer em outros ossos (vértebras, bacia e mandíbula) (CLARKE et al., 2008). Sua etiologia não é completamente conhecida devido aos mecanismos complexos envolvidos na gênese do osteossarcoma e à uma variedade de fatores de riscos, incluindo idade, sexo, genética e fatores familiares que contribuem para a progressão do osteossarcoma (SASAKI et al., 2011).

Os tratamentos incluem a utilização de agentes quimioterápicos (doxorubicina, cisplatina, ifosfamida e metotrexato) e a ressecção cirúrgica completa, apresentando aumento da taxa de sobrevida global em 60 - 70% (PICCI, 2007; JAFFE; GORLICK, 2008). Entretanto, cerca de 50% dos pacientes sem metástases durante o diagnóstico desenvolvem doença metastática devido ao desenvolvimento de resistência à terapia. Além disso, a intensificação dos regimes de quimioterapia não mostrou melhora no prognóstico destes doentes (TA; DASS, 2009), o que mostra que as terapias convencionais não conseguem eliminar totalmente as células tumorais e impedir a progressão da doença.

Em condições patológicas, nas quais a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) supera a defesa antioxidante endógena, o estresse oxidativo pode modificar irreversivelmente (oxidar) macromoléculas biológicas como o DNA, proteínas, hidratos de carbono e lipídios, favorecendo o desenvolvimento da carcinogênese (LI et al., 2002). As EROs induzem a morte celular por apoptose em diversos tipos de células, e a desregulação da apoptose pode provocar distúrbios clínicos (LI et al., 2002). Estudos revelaram que células neoplásicas com aumento de EROs endógeno, provavelmente são mais sensíveis à drogas antitumorais do que células normais (HUANG et al., 2000).

Recentemente, agentes derivados de fontes naturais ganharam considerável atenção de pesquisadores e clínicos por causa de sua segurança, eficácia e disponibilidade imediata (GUPTA et al., 2013). Nesse sentido, a apocinina,

composto isolado da raiz do *Picrorhiza kurroa*, foi amplamente estudada em várias doenças, incluindo asma, artrite, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008). A apocinina atua principalmente como inibidor do complexo NADPH-oxidase (dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato), enzima responsável pela geração de EROs (CASTOR et al., 2010). Seu mecanismo de inibição não é totalmente conhecido, mas envolve o comprometimento da translocação do componente citosólico p47^{phox} do complexo para a membrana (PETERS et al., 2001; BARBIERI et al., 2004).

Um estudo em hamster com câncer pancreático induzido mostrou redução significativa na incidência do tumor, diminuição do KI-67 (marcador de proliferação celular) e inativação das vias de sinalização de Akt-GSK3 β e ERK1/2 (vias envolvidas na atividade proliferativa) após o tratamento com apocinina (KATO et al., 2015). Além disso, na linhagem celular de câncer de próstata humano (LNCaP), a apocinina inibiu a produção EROs e bloqueou o crescimento celular (SUZUKI et al., 2013). Outro estudo mostrou que a apocinina diminuiu o potencial metastático *in vitro* de células de adenocarcinoma pulmonar humano por meio da inibição das vias de sinalização PI3K/Akt, que regula a migração celular (LIRDPRAPAMONGKOL et al., 2009).

A literatura sugere que a apocinina pode ser um pró-fármaco e sua ação parece estar relacionada à formação do dímero produzido durante a oxidação do fármaco (SIMONS et al., 1990; MORA-PALE et al., 2009), conhecido como diapocinina, e que este seja o responsável pela inibição da NADPH-oxidase (WORM et al., 2001). Outra suposição é de que o intermediário formado durante o processo de dimerização seja o composto ativo. Isso implica dizer que para se ter um efeito inibitório a reação de dimerização precisa ocorrer (SELEMIDIS et al., 2008). Segundo Klees e colaboradores (2006), derivados da apocinina inibiram a migração de células de câncer de mama, alteração no citoesqueleto, arredondamento das células e diminuição dos níveis da proteína Rac1, reguladora de muitos processos celulares, incluindo o ciclo celular, adesão célula-célula, motilidade. Jantaree e colaboradores (2017) demonstraram que a diapocinina foi mais efetiva na redução do potencial metastático de células tumorais de fígado em comparação a apocinina, pelas vias de sinalização FAK/PI3K/Akt.

Tendo em vista os pontos apresentados e o fato de que não há registros na literatura sobre os efeitos da apocinina e diapocinina em osteossarcoma, a

investigação do potencial antiproliferativo e antimetastático desses compostos, poderia contribuir sobremaneira para sua possível utilização como terapia alternativa em células tumorais.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Osteossarcoma

O osteossarcoma (OS) é o mais frequente tumor mesenquimal maligno de alto grau causado por alterações genéticas e epigenéticas que interrompem a diferenciação de osteoblastos provenientes de células tronco mesenquimais, com alto potencial de destruição local e metástase (WALKLEY et al., 2008; BENJAMIN, 2015). Geralmente localiza-se em regiões metafisárias de ossos longos como fêmur distal, tíbia proximal e menos frequentemente em úmero proximal, fêmur proximal, esqueleto axial e ossos craniofaciais (BIELACK et al., 2009). É o oitavo câncer de maior incidência, com 4,4 casos/milhão nos Estados Unidos. De acordo com Instituto Nacional do Câncer "*Surveillance, Epidemiology, and End Results*", aproximadamente 53% da incidência de osteossarcoma ocorre crianças e adolescentes (entre 0-24 anos), 28% em pessoas de meia-idade (entre 25- 59 anos) e 19% em idosos (entre 60-85 ou mais) (MIRABELLO et al., 2009). Além disso, é mais comum nos homens (5,4 casos/milhão/ano) do que nas mulheres (4 casos/milhão/ano) (OSBORNE; KHANNA, 2012).

Sua etiologia é pouco evidente devido às dificuldades de compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do tumor e aos numerosos rearranjos genômicos das células ósseas tumorais (MARTIN et al., 2012). Especula-se que as células-tronco tumorais podem estar presentes na formação de tumores ósseos (OSUNA; DE ALAVA, 2009; DI FIORE et al., 2013). Defeitos em genes envolvidos no reparo do DNA e nas vias de supressão de tumores, que ajudam a manter a integridade dos processos celulares críticos, também poderiam contribuir para a patogênese do osteossarcoma (MIRABELLO et al., 2011). Bem como a ativação excessiva de vias de transdução de sinais iniciados por vários fatores de crescimento, como fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento transformador (TGF) e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (RIKHOF et al., 2009; DONG et al., 2010; WANG et al., 2010).

Além disso, uma variedade de alterações genéticas e cromossômicas como o ganho de funções no cromossomo 1, perda de função no cromossomo 9 ou perda de heterozigosidade em vários cromossomos foram relatados no osteossarcoma (SAKAMOTO; IWAMOTO, 2008). Algumas síndromes de predisposição genética hereditária causadas por mutações nas vias de reparo do DNA são possíveis fatores de risco para o desenvolvimento do osteossarcoma

(CALVERT et al., 2012). Tais síndromes incluem retinoblastoma hereditário; displasias ósseas; síndrome de Li-Fraumeni; síndrome de Rothmund-Thomson; síndrome de Werner; síndrome de Bloom; síndrome de Rapadilino e anemia de Diamond Blackfan (MIRABELLO et al., 2011; CALVERT et al., 2012).

Os tratamentos incluem procedimentos cirúrgicos como retirada do tumor, artroplastia, amputação, metastasectomia e quimioterapia com altas doses (utilizando agentes como metotrexato, doxorrubicina, cisplatina, oxaliplatina, 5-fluorouracil, bleomicina, taxol e etoposido) (SONG et al., 2009; MACY et al., 2013; SPINA et al., 2013; LUETKE et al., 2014; ANDERSON, 2016). O tratamento ainda inclui quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante) e quimioterapia pós-operatória (adjuvante) (LUETKE et al., 2014).

Embora a combinação de cirurgia com quimioterapia tenha progredido, a incidência de óbitos relacionadas à essa doença não diminuiu, e a sobrevida de 5 anos não é maior do que 70-80% (ZHOU et al., 2015; SPINA et al., 2013; ANDERSON, 2016; KUNDU et al., 2014). Ainda, tratamentos únicos em altas doses podem não ser eficazes para muitos pacientes e estão associados à diversos efeitos colaterais (complicações renais e auditivas, náuseas, vômitos, desidratação, distúrbio eletrolítico, depressão entre outros) e à toxicidade (LUETKE et al., 2014; ANDERSON, 2016).

Em adição, o desenvolvimento da resistência a drogas torna-se um obstáculo contra o câncer (NESSA et al., 2011). A resistência inerente aos agentes quimioterápicos é vista em 35-45% dos pacientes com osteossarcoma (LUETKE et al., 2014), no qual as células criam vários mecanismos de proteção para escapar da morte celular (WUNDER et al., 2000; BRAMBILLA et al., 2012). Nesse contexto, medicamentos alternativos e/ou à base de plantas têm atraído a atenção nos últimos anos e alguns estão sendo gradualmente introduzidos como alternativas ou estão sendo usados em combinação com drogas químicas (DARAKHSHAN et al., 2015).

Diversas pesquisas com osteossarcoma utilizando terapias alternativas foram investigadas (MEYERS et al., 2008; PILZ et al., 2012; SPINA et al., 2013; LUETKE et al., 2014; KUNDU et al., 2014; ANDERSON, 2016). Como exemplo, foi demonstrado que interação de quimioterápicos (oxaliplatina, 5-fluorouracil) com tireoquinona, um composto isolado da planta *Nigella sativa* diminuiu a viabilidade e aumentou apoptose de células de osteossarcoma (SAEMAN et al., 2016). MA e colaboradores (2015) comprovaram que a Oleandrina, composto derivado das folhas

de *Nerium oleander*, inibiu a proliferação e a invasão de células de osteossarcoma *in vitro*. Portanto, acredita-se que a identificação de novos fármacos com citotoxicidade seletiva para osteossarcoma seja necessária (MA et al., 2015).

2.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) representam moléculas envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. São formadas a partir de processos de oxidação e redução (FRIDOVICH, 1997). A redução do oxigênio na presença de um elétron livre gera o ânion superóxido. Esse ânion é o precursor primário das EROs e divide-se em radicais livres de oxigênio (instáveis e de vida curta) como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxigênio singlete (1O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e não radiculares como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3) (BARBIOR, 1999; QUINN et al., 2006). O H_2O_2 é lipossolúvel, meia vida maior do que a do seu precursor e pode ser formado espontaneamente pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, mas esta reação também pode ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (FRIDOVICH, 1997; CHANNON; GUZIK, 2002).

Estudos mostraram que EROs são importantes mediadores na diferenciação e crescimento celular, agindo como segundos mensageiros em algumas vias de sinalização. As EROs podem ativar quinases associadas à MAP quinases, tais como ERK1/2, p42MAP quinase, JNK e ERK5, relacionadas ao crescimento, diferenciação celular, inflamação e apoptose (TORRES, 2003). A produção excessiva de EROs resulta no estresse oxidativo, processo que pode causar danos em estruturas celulares e constituintes, como lipídeos, membranas, proteínas e DNA (VALKO et al., 2007). Além disso, estão envolvidas em diversos processos patológicos, incluindo a hipertensão e a aterosclerose (GROTE, et al., 2006; CAVE, et al., 2005), artrite reumatóide, isquemia tecidual, doenças renais (EL-BENNA, et al., 2005) e câncer (VALKO et al., 2007).

A produção elevada de EROs no câncer mostrou induzir uma variedade de efeitos biológicos, incluindo aumento na proliferação celular, danos ao DNA e instabilidade genética, adaptação, lesão e morte celular, autofagia e resistência à drogas. O resultado depende do contexto genético do câncer e dos tipos, níveis e duração da exposição das EROs (MOLONEY; COTTER, 2017). Por exemplo, radicais hidroxil podem resultar em mutação pontual por meio da reação com guanina para produzir 8-hidroxi-2'-desoxiadenosina. Esta é uma das provas mais

importantes do envolvimento do estresse oxidativo no câncer (HALLIWELL, 2007). Em diversos tipos de tumores a administração exógena de EROs, especialmente H_2O_2 ou geração de EROs endógena mediada por oncogenes eleva a proliferação promovendo cascatas de sinalização pro-proliferativas, como a quinase ativada por mitogeno (MAPK)/quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A proliferação de tumores facilitada por EROs foi observada em vários tipos de câncer, como câncer de mama, câncer de pulmão e câncer de fígado (GLASAUER; CHANDEL, 2014).

Nas células endoteliais, a principal fonte de EROs é a NADPH oxidase e está envolvida no aumento da expressão do fator indutor de hipóxia 1 alfa (HIF 1 α). Estudos revelaram que o *knockdown* da NADPH oxidase 4 (NOX4) reduziu os níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator chave para a angiogênese, e de HIF 1 α em tumores ovarianos (KIZAKI et al., 2006). As EROs também podem afetar os componentes estruturais das células tumorais, como invadopodia (estrutura ricas em actina na membrana plasmática), envolvida na estimulação da metástase celular. Além disso, EROs também medeiam a ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) facilitando a metástase pela degradação da membrana celular (ISHIKAWA et al., 2008).

2.3 NADPH oxidase

A NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) foi inicialmente descrita em neutrófilos e posteriormente identificada em outros tipos celulares. É formada por proteínas citosólicas como p47^{phox} (*phagocyte oxidase*), p67^{phox}, p40^{phox} e uma GTPase (Rac1 ou Rac2) (EL-BENNA et al., 2005; GROEMPING; RITTINGER, 2005), e proteínas transmembrana (p22^{phox} e gp91^{phox}/NOX2; esta última codificada pelo gene CYBB), formando o flavocitocromo b₅₅₈ e são formadoras do sítio catalítico da enzima. O flavocitocromo b₅₅₈ é ancorado à membrana celular por segmentos hidrofóbicos transmembrana e possui uma flavina e dois grupamentos heme (JOHNSON et al., 2002). Atualmente, existem sete isoformas de NADPH oxidase: Nox1 (encontrado em células epiteliais); Nox2 (células fagocíticas); Nox3 (células fetais e do tecido auricular); Nox4 (células renais, vasculares, osteoclastos, fibroblastos, queratinócitos, hepatócitos e neurônios); Nox5 (células do tecido linfóide, testículos, próstata, ovários e pâncreas); Duox1 e Duox2 (tireóide, células endoteliais do sistema respiratório) (WANG et al., 2013).

O processo de ativação do complexo consiste no transporte de GTPase

Rac, p47^{phox} e p67^{phox} para a membrana plasmática, onde p67^{phox} interage, por meio de seu domínio de ativação, com as subunidades ligadas à membrana. Esta interação é requerida para a ativação da oxidase e facilita a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio (BRANDES et al., 2005) (Figura 1).

Figura 1. Ativação da NADPH oxidase (Nox2) (PARACATU, 2016 – Adaptado MCCANN; ROULSTON, Brain Sci., 2013).

Estudos recentes descreveram o aumento da expressão de Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5 em muitas linhagens células de câncer e em tumores humanos no estágio inicial e tardio, indicando sua importância na progressão do câncer (JUHASZ et al., 2010; MEITZLER et al., 2014; HÖLL et al., 2016). Também foi demonstrado que a perda da expressão de Duox1 em células de câncer de pulmão está fortemente associada com a perda do marcador epitelial E-caderina e que o silenciamento do Duox1 promove a transição de célula epitelial para mesenquimal (EMT), uma importante característica do câncer metastático (LITTLE et al., 2016).

Estudos de tumores e tecidos adjacentes de 123 pacientes com câncer gástrico (adenocarcinoma) mostrou que em 47,2% dos casos, o nível Nox2 era maior nos tumores em comparação aos tecidos adjacentes (WANG et al., 2015). Em outro estudo, Wu e colaboradores (2016) mostraram que a alta expressão de Duox2 mediada por interferon gama (IFN- γ) resultou na regulação positiva de HIF-1 α e VEGF associada a ERK, em células de câncer de pâncreas. Outro estudo relatou que a inibição de Nox por pequenos RNAs de interferência (siRNA) ou um inibidor

farmacológico reduziu significativamente a formação do câncer de pulmão *in vivo* e a invasão das células do mesmo câncer *in vitro* (HAN et al., 2016). O papel da Nox5 é menos compreendido do que Nox1, 2 e 4, mas também foi relatado em desempenhar uma função significativa no câncer. Seu silenciamento resultou na diminuição da proliferação e aumento da apoptose causada pela atividade das caspases 3 e 7 em células de câncer de próstata (HÖLL et al., 2016).

Está claro de que as conexões entre a atividade de Nox e proliferação, invasão, metástase e angiogênese de tumores envolvem caminhos e interações complexas de sinalização. Considerando seus efeitos, inibidores do complexo Nox têm se destacado, como por exemplo a apocinina (MORA-PALE et al., 2012; ZHANG et al., 2016).

2.4 Apocinina

A apocinina ou acetovanillone (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) é um composto com peso molecular de 166,17 g/mol (Figura 2) sendo muito solúvel em água e em solventes orgânicos (éter, álcool, clorofórmio, DMSO, benzeno) (WORM et al., 2001). Foi descrita pela primeira vez em 1883, sendo encontrada em raiz de uma planta têxtil canadense *Apocynum Cannabinum*. Em 1971 foi encontrada e isolada das raízes da *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae), uma planta nativa das montanhas da Índia, Nepal, Tibet e Paquistão, sendo utilizada na medicina popular desses países (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008), mas foi em 1990 que descreveram sua ação sobre o complexo NADPH oxidase e suas propriedades anti-inflamatórias (ALDIERI et al., 2008). Desde então, é amplamente utilizada em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* como potente e não tóxico inibidor da geração de EROs produzidas pela ativação do complexo multienzimático NADPH oxidase em fagócitos e não fagócitos (MUIJERS et al., 2000; WORM et al., 2001).

Figura 2. Fórmula estrutural da apocinina

Como a produção de EROs está envolvida em diversas patologias, surgiu o interesse em estudar a apocinina para o uso terapêutico em doenças hepáticas, gastrointestinais (BANERJEE et al., 2008), patologias associadas ao trato respiratório (WANG et al., 2008), artrite, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

Seu mecanismo de ação ainda não está claramente definido. Estudos sugerem que antes de agir a apocinina seja convertida no seu dímero, chamado de diapocinina, e que este último impediria a agregação e translocação dos componentes do complexo NADPH oxidase (BARBIERI et al., 2004). Supõe-se também que o intermediário formado durante o processo de dimerização seja o composto ativo (Figura 3) (SELEMIDIS et al., 2008).

Figura 3. Mecanismo proposto para a oxidação da apocinina (XIMENES et al., 2007).

A apocinina impede o deslocamento da subunidade citosólica p47^{phox} para ligar-se a componentes que ficam na membrana (gp91^{phox} + p22^{phox}). Este bloqueio interfere no processo normal para a ativação de todo o complexo enzimático NADPH oxidase (Figura 4) (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

Figura 4. Mecanismo de inibição do complexo NADPH oxidase pela apocinina (STEFANSKA; PAWLICZAK, 2008).

Estudos revelaram que a enzima mieloperoxidase (MPO) é um fator chave para a ação inibitória da apocinina (XIMENES et al., 2007; ALMEIDA et al., 2012). O mecanismo baseia-se na formação radicalar da apocinina a partir da reação com MPO e H₂O₂, seguido pela formação da glutatona radicalar (GS), podendo comprometer a subunidade p47^{phox} e promover o evento inibitório (XIMENES et al., 2007).

Do ponto de vista farmacocinético, a apocinina liga-se à albumina e não provoca alterações nas estruturas secundárias e terciárias; portanto, isso poderia representar um caminho para sua distribuição no corpo (PETRÔNIO ET AL., 2013). Além disso, a apocinina tem sido relatada como uma substância com ação pró-oxidante (BARBIERI et al., 2004; VEJRASKA et al., 2005; RIGANTI et al., 2006; CASTOR et al., 2010). Como exemplo, o radical da apocinina é capaz de oxidar diretamente GSH e induzir a formação de peróxido de hidrogênio (XIMENES et al., 2007).

2.5 Diapocinina

A diapocinina não é encontrada em produtos naturais e ganhou maior importância quando Johnson e colaboradores (2002) demonstraram que a capacidade inibitória da apocinina estava relacionada com a sua prévia oxidação mediada pela peroxidase, resultando na formação do dímero. Nesse contexto, a diapocinina é formada pela oxidação da apocinina, com a utilização do persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e de sulfato de ferro II ($FeSO_4$) (LUCHEFELD et al., 2008; SMITH et al., 2008). Além disso, estudos mostraram que a bioconversão da apocinina para a diapocinina não se limita à inibição da atividade enzimática, mas também a outros efeitos biológicos como a expressão de mRNA de gp91^{phox} e a produção de citocinas (KANEKAE et al., 2010).

De acordo com Luchtefeld e colaboradores (2008) possui baixa solubilidade em água deionizada, mas é solúvel em soluções aquosas alcalinas em dimetilsulfóxido (DMSO). Além disso, a diapocinina é 13 vezes mais lipofílica que a apocinina, embora ambos os compostos tenham o mesmo pKa de 7.4.

Neste cenário, recomenda-se que abordagens sobre atividades biológicas causadas pela apocinina devem, se possível, considerar a avaliação da diapocinina em paralelo, uma vez que o efeito desta pode ser maior em relação a substância de origem (HEUMÜLLER et al., 2008).

2.6 Uso da apocinina e diapocinina no câncer

Recentemente, estudos relataram que a apocinina foi capaz de reduzir a formação de câncer de pele induzida por UVB por meio da atenuação das vias de sinalização envolvidas na inflamação da pele e na carcinogênese (BYUN et al., 2016), e diminuiu a progressão do câncer de próstata, regulando a proliferação celular pela proteína *clusterin* (associada à remoção de debris celulares e apoptose) e das vias MEK-ERK1/2 (SUZUKI et al., 2013a, 2013b).

A Apocinina ainda demonstrou redução da fosforilação das vias AKT, GSK3 β Ser9 e ERK1/2, reprimindo a proliferação celular e inibindo o câncer de pâncreas induzido em hamster, sem apresentar sinais de toxicidade tecidual (KATO et al., 2015).

Pedroso e colaboradores (2013) revelaram que o uso da apocinina ou a associação dela com tamoxifeno (agente sintético, comumente prescrito no tratamento do câncer de mama) causaram efeito citotóxico em células de leucemia

mielóide crônica humana (K562). Outro estudo evidenciou que células de câncer do colo de útero ou câncer cervical (HeLa) tiveram redução no crescimento celular, na produção EROs e na expressão de HIF-1 α após o tratamento com apocinina (CHENG et al., 2012). Em concordância com o anteriormente descrito, em células de câncer de ovário (SKOV3), além de reduzir a geração de EROs a apocinina foi capaz de reduzir fosforilação de Akt (SAUNDERS et al., 2010).

Klees e colaboradores (2006) mostraram que derivados da apocinina também foram capazes de inibir a migração de células tumorais do câncer de mama, causar rearranjo significativo do citoesqueleto de actina, arredondamentos de células e diminuição dos níveis de Rac1. Nesse sentido, apocinina e diapocinina foram capazes de inibir as vias de sinalização FAK/PI3K/Akt mediadores dos efeitos anti-invasivos e anti migratórios em células de câncer de fígado (HepG2), sendo que a diapocinina se mostrou mais efetiva (JANTAREE et al., 2017).

Embora estudos anteriores tenham demonstrado um possível potencial da apocinina e diapocinina para vários tipos de câncer, seu papel no osteossarcoma humano não foi investigado anteriormente.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo é de contribuir para o entendimento dos mecanismos pelos quais a apocinina e diapocinina interagem com células de osteossarcoma humano, visando auxiliar a compreensão da biologia óssea e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças ósseas.

Portanto, o objetivo geral do trabalho é avaliar, *in vitro*, o potencial antitumoral da apocinina e diapocinina em células de osteossarcoma humano, tendo os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar a capacidade citotóxica da apocinina e diapocinina, em diferentes concentrações, em células normais (HOb) e tumorais (SaOS-2);
2. Observar as possíveis alterações morfológicas nas células HOb e SaOS-2 causadas pelos compostos apocinina e diapocinina;
3. Avaliar a quantidade de células HOb e SaOS-2 em estágio de apoptose após o tratamento com os compostos;
4. Analisar o efeito dos compostos na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular em HOb e SaOS-2;
5. Avaliar a capacidade de formação de colônias por células de osteossarcoma após o tratamento com apocinina e diapocinina;
6. O efeito da apocinina e seu dímero na migração e invasão celular de SaOS-2;
7. Analisar em SaOS-2, a expressão do fator indutor de hipóxia-1 alfa (HIF - 1 α), após o tratamento com os compostos;
8. Avaliar os efeitos dos compostos na atividade das metaloproteinases de matriz 2 e 9 em SaOS-2.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de célula normal e tumoral

Foram utilizados osteoblastos humanos normais (HOb) doados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, aprovados pelo do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense-UFF (CEP CMM/HUAP nº232/08) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-FOB/USP (CAAE: 68551917.8.0000.5417) (**Anexo A**). As células foram coletadas no Hospital Universitário Antônio Pedro-UFF a partir de explantes ósseos obtidos em cirurgias ortopédicas (artroplastias). Os explantes foram tratados em colagenase 0,25% por 2 horas e depois acondicionados em frascos plásticos de 25 cm² em meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, *Gibco, Thermo-Scientific, Carlsbad, CA, USA*) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB, *Gibco*). As células (na primeira cultura) obtiveram a monocamada após aproximadamente 30 dias e foram mantidas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ (LOMELINO et al., 2012).

O presente estudo também utilizou a linhagem imortalizada de osteossarcoma humano (SaOS-2), adquiridos comercialmente pela empresa *American Type Culture Collection (ATCC, HTB-85 – Rockville, Maryland, USA)*. As células foram cultivadas em meio *McCoy's 5A Medium Modified (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)* suplementadas com 15% SFB e mantidas nas mesmas condições do HOb.

Para a expansão, as células foram subcultivadas utilizando-se a enzima tripsina (0,25% tripsina, 1mM EDTA - *Sigma-Aldrich*), e a contagem celular foi feita através do protocolo de azul de *tripan*, corante responsável por corar as células inviáveis. Posteriormente, as células HOb e SaOS-2 foram utilizadas nos ensaios experimentais na passagem 10 e passagens 7-15, respectivamente.

4.2 Síntese dos compostos

A apocinina foi obtida comercialmente pela *Sigma-Aldrich* e a diapocinina foi sintetizada no Laboratório de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) de Bauru e cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes. Em resumo, a apocinina (1 g, 6mmol) foi dissolvida em 200 mL de água quente. Em seguida, foi adicionado sulfato ferroso de amônio hexahidratado

(118 mg, 0.3 mmol) e persulfato de potássio (811 mg, 3 mmol) e agitado por 30 minutos. O precipitado foi lavado e filtrado com água fria e redissolvido com hidróxido de sódio (50 mL, 4M) e filtrado novamente. A solução marrom foi acidificada com ácido clorídrico (50 mL, 4M); e o precipitado foi filtrado e lavado com água fria. O produto foi seco à vácuo produzindo 0,65 g de um sólido amarelo. A pureza foi analisada com HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) (*Jasco, Tokyo, Japan*) e os espectros de massa foram obtidos usando um espectrômetro de massa triplo quadrupolo com ionização por electrospray (ESI) (*AB Sciex 4500, MA, USA*) (VENTURINI et al., 2015). Sua pureza foi acima de 98%; e espectros de absorção e coeficientes de absorção molar da diapocinina em tampão de fosfato 50 mM com pH 7,0 foi de 270 nm ($2,35 \pm 0,02 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 303 nm ($1,91 \pm 0,01 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para mais detalhes sobre os dados analíticos consultar Venturini e colaboradores (2015).

4.3 Diluição da apocinina e diapocinina em meio de cultura para ensaios biológicos *in vitro*

Segundo a ISO 10.993-5 (ISO, 2009), para testes *in vitro* com compostos químicos comercializados ou sintetizados, é indicado a utilização de diferentes concentrações, por esse motivo inicialmente foram usadas as concentrações de 0,6; 1,5; 3 e 6 mM para a apocinina e 0,3; 0,75; 1,5 e 3 mM para diapocinina. A concentração máxima de diapocinina utilizada ao longo do estudo foi 3 mM devido à sua solubilidade limitada em meio de cultura. Partindo-se da maior concentração, os compostos foram diluídos em meio de cultura 10% de SFB e 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma-Aldrich*), permanecendo na estufa de CO₂ a 37°C por 24 horas. Os meios contendo os compostos foram filtrados em filtro com porosidade de 0,22 µm e em seguida foram realizadas as diluições para obter as demais concentrações. Também foi preparado o controle, no qual as células foram mantidas em meio de cultura com 10% de SFB e 0,5% de DMSO, sem a adição dos compostos.

Primeiramente foram realizados os ensaios de viabilidade celular e observação morfológica com as concentrações de 0,6 – 6 mM da apocinina e 0,3 – 3 mM da diapocinina. Após a análise dos resultados desses ensaios, foram estabelecidas as concentrações que apresentaram diferenças significantes quando comparadas ao controle de SaOS-2 e que não causaram alterações na viabilidade e

morfologia de HOb. Com as concentrações selecionadas foram realizados os demais ensaios *in vitro*.

4.4 Viabilidade celular

Foram plaqueadas 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços em meio DMEM 10% SFB (HOb) e McCoy's 5A 10% SFB (SaOS-2). Após 48 horas de adesão as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e cultivadas em meio de cultura contendo ou não apocinina e diapocinina nas concentrações de 0,6 – 6 mM e 0,3 – 3 mM, respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas de tratamento com os compostos, pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio) (*Sigma-Aldrich*). O teste se baseia na quantificação da conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, foi solubilizado em DMSO (*Labsynth*, São Paulo, Brasil) e sua concentração foi determinada pela densidade óptica (OD) em espectrofotômetro com filtro de 550nm (*Synergy™ Mx Monochromator-Based Multi-mode Microplate Reader, Biotek Instruments Inc, Winooski, Vermont, USA*) (MOSSMAN, 1983). Os ensaios foram realizados com quatro réplicas para cada grupo em três experimentos independentes (n=12). Os resultados foram calculados em porcentagem (%) de viabilidade de celular em relação ao controle, utilizando a fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{[\text{OD das células tratadas}]}{[\text{OD do controle}]} \times 100$$

4.5 Observação morfológica

Para a observação morfológica, as células foram plaqueadas a 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços e após 48 horas de adesão o meio de cultura foi substituído com meio DMEM 10% SFB (HOb) e McCoy's 5A 10% SFB (SaOS-2) contendo o controle; apocinina (0,6 – 6 mM) e diapocinina (0,3 – 3 mM). Após 72 horas de incubação a morfologia das células foi analisada usando microscópio de contraste de fase acoplado à câmera digital *Olympus U-TV0.5XC-3* (*Olympus, Tokyo, Japan*) com objetiva de 10X. As imagens correspondentes aos diferentes tratamentos foram capturadas.

4.6 Ensaio de apoptose com anexina V e iodeto de propídio (IP)

A externalização de fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática é um dos primeiros eventos que ocorre na superfície de uma célula em processo de apoptose, sendo que esta perda de simetria do fosfolípido de membrana contribui para facilitar o reconhecimento por proteínas dependente de íons cálcio, como a anexina V. O procedimento de detecção de apoptose consiste na ligação da anexina V - FITC (isotiocianato de fluoresceína) à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico e na ligação do IP ao DNA das células no processo final de apoptose.

Para isso foi utilizado o Kit *BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, foram plaqueadas 3×10^5 células de HOb e SaOS-2 em placas de 6 poços e tratadas ou não com apocinina e diapocinina. Após 72 horas do tratamento as células foram lavadas com PBS 1X, tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 8 minutos a 24 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi lavado com PBS 1X. Novamente as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 4 °C e ao *pellet* celular foi adicionado o 100 µL do tampão de ligação (kit). Em seguida as células foram incubadas com 1 µL de Anexina V e IP, em temperatura ambiente por 10 minutos, sob o abrigo da luz. Por fim, os dados foram adquiridos por citometria de fluxo (*FACSCalibur™*, BD Biosciences) e analisados usando o programa *Flowing Software 2.5.1*. Foram realizados três replicas amostrais em dois experimentos independentes (n=6).

4.7 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares

O ensaio baseia-se na introdução da sonda não-fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), composto estável lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) desacetilam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual devido a sua polaridade fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCFoxi). A fluorescência produzida pela formação de DCFoxi é proporcional à capacidade oxidativa da célula. Desta forma, a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células (LU et al., 2016). Para tanto, as células HOb e SaOS-2 foram cultivadas em

placas de 12 poços (5×10^4 células/poço) e submetidas a incubação por 72 horas após o início do tratamento ou não com apocinina e diapocinina. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com solução-tampão salina de Hank (HBSS 1X) e incubadas com 10 µg/mL de DCFH-DA (*Sigma-Aldrich*) diluído em HBSS 1X por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas novamente e a intensidade da fluorescência foi medida em espectrofotômetro com excitação de 485nm e emissão 535nm (*Synergy™ Mx*). Realizou-se triplicata biológica e experimental (n=9). Os dados obtidos, expressos em unidade de fluorescência relativa (RFU), foram convertidos para porcentagem (%) de produção de EROs por meio da fórmula:

$$\% \text{ Produção de EROs} = \frac{(\text{RFU das células tratadas})}{(\text{RFU do controle})} \times 100$$

4.8 Formação de colônias

A fim de verificar, os efeitos dos compostos apocinina e diapocinina em células de osteossarcoma humano realizou-se o ensaio de formação de colônias. Cada colônia origina-se de uma única célula progenitora, por isso a denominação de unidade formadora de colônia e exibe um amplo potencial de crescimento. As células SaOS-2 foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade de 2×10^3 células/poço e após a adesão celular foram tratadas ou não com apocinina e diapocinina durante 10 dias, sendo o meio de cultura contendo com os compostos substituído a cada 2-3 dias. Após 10 dias, as colônias foram fixadas com metanol 100% e coradas com 0,2% de cristal violeta (ZHAO et al., 2017). As placas foram fotografadas e o número de colônias (acima de 50 células) foi contado utilizando o *software ImageJ (Research Services Branch, National Institute Of Health Image - NHI, Bethesda, Maryland, USA)*. As células foram plaqueadas com duplicata em três experimentos independentes (n=6).

4.9 Migração celular (Wound healing assay)

A migração celular é um fenômeno essencial para os processos de invasão e metástase. Quando realizado uma fenda na monocamada de células na placa, as células com alta capacidade migratória ultrapassam essa linha, tornando

possível o estudo de drogas que possam interferir nesse mecanismo (BRITO et al., 2005).

O ensaio de migração celular foi baseado no modelo descrito por Carvalho e colaboradores (2013), com adaptações. As células SaOS-2 foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 12 poços. As células foram mantidas em estufa por 72 horas para adquirir a confluência total. Em seguida os poços foram tratados com $5 \mu\text{g/mL}$ de mitomicina C (*Sigma-Aldrich*) por 15 minutos. O pré-tratamento com mitomicina C garante que as células estejam migrando e não proliferando. Os poços foram lavados com PBS 1X e foi realizada uma fenda no sentido vertical da monocamada com ponteira de $200 \mu\text{L}$. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1X, acrescentado meio de cultura suplementado com 10% SFB, contendo apocinina e diapocinina. Meio sem adição dos compostos foi usado como controle. Após 0 horas (imediatamente após a realização da fenda) e 72 horas de exposição aos compostos as placas foram fotografadas usando microscópio de contraste de fase acoplado à câmera digital *Olympus U-TV0.5XC-3*, com objetiva de 5X. O ensaio foi realizado em triplicata biológica e duplicata experimental ($n=6$). A porcentagem (%) de área da fenda foi calculada pelo *Software ImageJ* e a porcentagem (%) da área fechada da fenda foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ Área fechada da fenda} = \frac{(\%A_0 - \%A_{72})}{\%A_0} \times 100$$

Onde $\%A_0$ é a porcentagem da área da fenda no tempo 0 horas e $\%A_{72}$ é a porcentagem da área da fenda no tempo 72 horas.

4.10 Invasão celular (*Transwell*® assay)

Complementando o estudo de migração, avaliamos se os compostos têm capacidade de inibir a invasão celular, relacionado com a atividade metastática das células. Para isso, placas de 24 poços do tipo *transwell*® contendo insertos com membranas de $8 \mu\text{m}$ de porosidade (*Corning, Bedford, MA, USA*) foram recobertos com $300 \mu\text{g/mL}$ *Matrigel*® *Matrix Basement Membrane* (*Corning*), seguindo as recomendações do fabricante. Esse revestimento mimetiza *in vitro* a membrana basal e impede a passagem de células não invasivas pelos poros da membrana. As células SaOS-2, na densidade de 5×10^4 células/poço, foram adicionadas no compartimento superior e mantidas com meio McCoy's 5A 0% SFB contendo ou não

apocinina e diapocinina. No compartimento inferior foi adicionado meio McCoy's 5A 10% SFB, utilizado como atrativo. Após 72 horas de incubação, as células que não degradaram o matrigel (matriz extracelular) foram removidas com uma haste flexível com algodões nas pontas e as células invasoras, ou seja, as que degradaram o matrigel e alcançaram a superfície inferior da membrana foram fixadas usando metanol 100% por 10 minutos e coradas com 0,2% de cristal violeta por 5 minutos (GUO et al., 2017). Foi realizado um experimento em triplicata (n=3). As células foram visualizadas e fotografados quatro campos em microscópio invertido acoplado à câmera digital, objetiva de 10X (*Leica/DM IRBE, Leica microsystems, Wetzlar, Germany*), sendo posteriormente quantificadas, em porcentagem, as áreas de invasão celular pelo *Software ImageJ*.

4.11 Imunofluorescência

O fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) ativa a transcrição de muitos genes que codificam proteínas que estão envolvidas na angiogênese, metabolismo da glicose, proliferação, sobrevivência, invasão e metástase, fazendo-se assim necessário seu estudo (MASOUD; LI, 2015). Para isso SaOS-2 foram plaqueadas na densidade de 3×10^4 células sob lamínulas de plástico (*Sarstedt, Inc. Newton, NC, USA*) em placas de 24 poços e após 48 horas de adesão, as células foram tratadas ou não com apocinina e diapocinina por 72 horas. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com formalina 10% durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente com PBS 1X e lavadas três vezes com PBS 1X - Tween 0,1% por 5 minutos cada. As células foram permeabilizadas com solução de triton X-100 0,05%, seguido de três lavagens com PBS 1X - Tween 0,1%. O bloqueio foi realizado com albumina bovina (BSA) 3% por 30 minutos e a marcação foi feita *overnight* com o anticorpo primário policlonal HIF - 1 α (sc-10790, *Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA*) em BSA 1% diluído em 1:50. Após esse período, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X - Tween 0,1% durante 10 minutos e bloqueadas com BSA 1% durante 15 minutos. Por fim as células foram incubadas com anticorpo secundário mouse anti-rabbit IgG-PE (sc-3753, *Santa Cruz*) diluído (1:200) em BSA 1% durante 1 hora à temperatura ambiente, protegido da luz e lavadas com PBS 1X - Tween 0,1%. O corante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, *Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA*), na diluição de 1:500, foi usado para a marcação do núcleo celular. As células

foram fotografadas em microscópio de fluorescência acoplado à câmera digital, objetiva de 40X (*Leica/DM IRBE*) e análise foi feita de forma qualitativa, comparando a intensidade os tratamentos com o controle. O ensaio foi realizado em triplicata biológica (n=3).

4.12 Atividade de MMP 2 e 9

O estudo da atividade das MMPs 2 e 9 em meio contendo apocinina e diapocinina foi realizado por meio de técnica de zimografia. As células SaOS-2 foram plaqueadas na densidade de 2×10^5 células em placas de 6 poços, permaneceram na estufa por 48 horas e posteriormente receberam ou não o tratamento com apocinina e diapocinina. Após 72 horas dos tratamentos, os sobrenadantes foram coletados (*pool* de três poços) (OLIVEIRA et al., 2016). A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Foi preparado o gel de separação a 10%, utilizando solução de acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8%, tampão do gel de separação (Tris-HCl, pH 8,8); dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; gelatina, persulfato de amônio (APS) 10% e temed. Após completa polimerização do gel de separação na placa de zimografia, foi preparado o gel de largada 4%, utilizando as mesmas soluções do gel de separação, somente substituindo o tampão do gel de separação pelo tampão do gel de largada (Tris Cl, pH 6,8). Após a extração e quantificação das amostras, as mesmas foram preparadas e aplicadas no gel. Os géis foram corados com Coomassie blue e a atividade enzimática foi demonstrada pela ausência de coloração (faixas brancas) nas áreas onde o substrato (gelatina) foi degradado (OLIVEIRA et al., 2016). As imagens foram capturas pelo escaner *Loccus* Biotecnologia DS-600 e análise densitométrica da degradação dos géis foi realizada por meio do programa do *software ImageJ*. Foram realizados três géis de experimentos independentes (n=3).

4.13 Análise estatística

Os dados foram apresentados em média e desvio-padrão. Análises entre três ou mais grupos experimentais foram submetidos ao teste estatístico *one-way* ANOVA complementado pelo teste de *Tukey*, e teste de *Kruskal-Wallis* complementado pelo teste de *Dunn*, quando obedecerem à distribuição normal ou não-normal, respectivamente. Para todas as análises os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos foram

realizados por meio do programa *GraphPad Prism* (Graphpad, San Diego, CA, USA).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade e alteração morfológica celular

Por meio do ensaio colorimétrico de redução do MTT, foi possível estabelecer um índice quantitativo de viabilidade celular de osteoblastos normais (HOb) e tumorais (SaOS-2) após 72 horas de tratamento com apocinina e diapocinina nas concentrações de 0,6 – 6 mM e 0,3 – 3 mM, respectivamente (Figuras 5A e 5B).

O percentual de viabilidade de HOb apresentou diminuição estatisticamente significativa somente no tratamento com apocinina na concentração de 6 mM em comparação ao controle e à concentração de 0,6 mM (Figura 5A). De forma interessante, observamos que as células SaOS-2 em contato com apocinina nas concentrações de 1,5 – 6 mM apresentaram diferenças em relação ao controle e à concentração de 0,6 mM e diapocinina nas concentrações de 0,75 – 3 mM apresentaram redução significativa na viabilidade em relação às células não tratadas (controle) e à concentração de 0,3 mM (Figura 5B)

Na análise morfológica de HOb (Figura 6) observamos que apocinina (0,6 – 3 mM) e diapocinina (0,3 – 1,5 mM) não promoveram alterações celulares, enquanto que os compostos na concentração de 6 mM (apocinina) e 3 mM (diapocinina) (Figuras 6E e 6I) modificaram as células, apresentando citoplasma mais fino e alongado em comparação às células não tratadas (Figura 6A). Por sua vez, as células SaOS-2 (Figura 7), sofreram alterações morfológicas após o tratamento com a apocinina 3 e 6 mM (Figuras 7 D e E) e com a diapocinina 0,75 – 3 mM, apresentando-se mais arredondadas e redução do número de células (Figuras 7G – 7I).

A partir dos resultados obtidos com os ensaios de viabilidade celular e análise morfológica, optou-se por utilizar as concentrações de **1,5 e 3 mM para a apocinina; e 0,75 e 1,5 mM para a diapocinina**, pois essas apresentaram melhores efeitos inibitórios em SaOS-2 e não promoveram alterações nas células HOb.

Figura 5. Percentual de viabilidade de (A) osteoblastos normais (HOb) e (B) de osteossarcoma (SaOS-2) na presença de diferentes concentrações de apocinina (0,6 – 6 mM) e diapocinina (0,3 – 3 mM) ou sem tratamento (Controle) por 72 horas. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ representam diferenças estatísticas quando comparado ao controle e os tratados entre si.

Figura 6. Imagens representativas da morfologia de osteoblastos humanos (HOb) (A) sem tratamento, e tratados com apocinina (B, C, D e E) e diapocinina (F, G, H e I) nas concentrações de 0,6 – 6 mM e 0,3 – 3 mM, respectivamente, no período de 72 horas. Barras de escala de 100 µm.

Figura 7. Imagens representativas da morfologia de osteossarcoma humano (SaOS-2) (A) sem tratamento, e tratados com apocinina (B, C, D e E) e diapocinina (F, G, H e I) nas concentrações de 0,6 mM – 6 mM e 0,3 mM – 3 mM, respectivamente, no período de 72 horas. Barras de escala de 100 µm.

5.2 Apoptose celular

Os ensaios de apoptose celular, por meio da citometria de fluxo, foram apresentados em apoptose total, no qual foi considerado a porcentagem de células em apoptose inicial (positivas somente para anexina V) e tardia (positivas para anexina V e iodeto de propídio). Os resultados revelaram que as células HOb tratadas tanto com apocinina (1,5 e 3 mM) quanto com diapocinina (0,75 e 1,5 mM) não apresentaram diferenças significantes em relação ao controle (Figura 8A).

Por outro lado, as células SaOS-2 apresentaram aumento significativo na porcentagem de células em apoptose quando tratadas com apocinina 1,5 e 3 mM; e diapocinina 1,5 mM em relação ao controle. Além disso, as concentrações de apocinina apresentaram diferenças entre si (Figura 8B).

Figura 8. Efeito da apocinina (1,5 e 3 mM) e diapocinina (0,75 e 1,5 mM) na apoptose celular de (A) osteoblastos normais (HOb) e (B) tumorais (SaOS-2) tratados por 72 horas. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ representam diferenças estatísticas quando comparado ao controle e os grupos tratados entre si.

5.3 *Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)*

Para explorar o papel das EROs no mecanismo de ação da apocinina e diapocinina em HOb e SaOS-2 foi utilizado a sonda DCFH-DA. Apocinina (1,5 e 3 mM) e diapocinina (0,75 e 1,5 mM) não alteraram a produção de EROs em osteoblastos normais, como mostra a figura 9A. Por outro lado, em SaOS-2 a apocinina (3 mM) e diapocinina (1,5 mM) inibiram em aproximadamente 50% a produção de EROs (Figura 9B). Outro dado encontrado foi que as concentrações estudadas, para ambos compostos, apresentaram diferenças entre si. Os resultados evidenciam que a diapocinina foi mais efetiva nesse processo, pois promoveu redução na EROs com a metade da concentração da apocinina.

Figura 9. Efeitos da apocinina (1,5 e 3 mM) e diapocinina (0,75 e 1,5 mM) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em (A) osteoblastos normais (HOB) e (B) osteossarcoma (SaOS-2), após 72 horas de tratamento. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. *** $P < 0,001$ representa diferenças estatísticas quando comparado ao controle e os grupos tratados entre si.

Após comprovar que não houve inibição na viabilidade celular, alterações morfológicas, aumento da apoptose celular e redução da produção de espécies reativas (EROs) em células normais (HOb) tratadas com apocinina e diapocinina nas concentrações acima descritas, foram realizados estudos *in vitro* característicos da progressão de células tumorais. Portanto, os ensaios seguintes são referentes somente às células de osteossarcoma humano (SaOS-2).

5.4 Formação de Colônias

A linhagem de osteossarcoma (SaOS-2) foi analisada em relação à sua capacidade de formação de colônias, com o objetivo de avaliar os efeitos da apocinina e diapocinina à longo prazo.

No presente ensaio foram apresentados dados qualitativos (Figura 10) e quantitativos (Figura 11) da formação de colônias. Imagens macroscópicas (Figuras 10A, 10C, 10E, 10G e 10I) e microscópicas (Figuras 10B, 10D, 10F, 10H e 10J) evidenciaram alterações no número de células coradas com cristal violeta e na morfologia, respectivamente, após 10 dias de tratamento com os compostos.

Os resultados quantitativos (Figura 11) mostraram que as células tratadas com concentrações de 1,5 e 3 mM para apocinina; e 0,75 e 1,5 mM para diapocinina reduziram significativamente o número de colônias em comparação às células não tratadas (controle). Ainda, os dados mostraram que as concentrações utilizadas foram diferentes entre si para ambos compostos. Nossos achados também demonstraram que a metade da concentração de diapocinina (1,5mM) foi suficiente para causar o mesmo efeito que a apocinina (3 mM).

Figura 10. Imagens macroscópicas (A, C, E, G e I) e microscópicas (B, D, F, H e J) da formação de colônias de SaOS-2 coradas com cristal violeta em células não tratadas (controle), e tratadas com apocinina (1,5 e 3 mM) e diapocinina (0,75 e 1,5 mM) durante 10 dias. Barras de escala de 100 µm.

Figura 11. Quantificação da formação de colônias em SaOS-2 tratados com apocinina (1,5 e 3 mM) e diapocinina (0,75 e 1,5 mM) durante 10 dias. Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. *** $P < 0,001$ representa diferenças estatísticas quando comparado ao controle e os grupos tratados entre si.

5.5 Migração celular

Com o objetivo de avaliar se apocinina e diapocinina possuem atividade sobre a capacidade migratória, nas condições escolhidas, foi realizado o ensaio por meio da formação de uma fenda na monocamada celular.

Nesse ensaio observamos, pela análise qualitativa (Figura 12) e quantitativa (Figura 13), que as células não tratadas (Figuras 12A e 12B) apresentaram maior capacidade migratória em relação aos grupos tratados (Figuras 12C - 12J), ou seja, ambos compostos inibiram significativamente a motilidade de SaOS-2 após 72 horas de incubação. Além disso, a diapocinina parece ser mais efetiva do que a apocinina (Figura 13).

Foi possível essa comparação, pois as condições foram as mesmas para todos os grupos. Também é possível afirmar que não houve proliferação celular que pudesse interferir no fechamento da fenda, pois as células foram previamente tratadas com mitomicina C (antiproliferativo).

Figura 12. Imagens representativas do ensaio de fechamento de fendas em células SaOS-2 não tratadas (A e B), tratadas com 1,5 e 3 mM de apocinina (C-F); e 0,75 e 1,5 mM de diapocinina (G-J) no momento da produção da fenda (0h - A, C, E, G e I) e após 72 horas de tratamento (B, D, F, H e J). Barras de escala de 100 μm.

Figura 13. Quantificação em porcentagem (%) da área fechada da fenda para avaliação da migração celular de SaOS-2 tratadas com apocinina (1,5 e 3 mM) e diapocinina (0,75 e 1,5 mM) durante 72 horas. Os valores foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão. ***P<0,001 representa diferenças estatísticas quando comparado ao controle e os grupos tratados entre si.

5.6 Invasão celular

De forma a elucidar os efeitos dos compostos na invasão celular de SaOS-2, foram utilizadas placas do tipo *transwell* revestidas com matrigel, substância rica em proteínas que mimetiza a matriz extracelular. Imagens representativas (Figuras 14A - 14E) e análise quantitativa (Figura 14F) demonstraram que a apocinina (1,5 e 3 mM) e diapocinina (0,75 e 1,5 mM) foram capazes de inibir significativamente o processo de invasão celular quando comparadas ao controle, no período de 72 horas. Os dados também revelaram que ambas concentrações de apocinina e diapocinina apresentaram diferenças entre si. Foi necessário o dobro da concentração de apocinina (3 mM) para que a diapocinina (1,5 mM) exercesse quase o mesmo efeito, sugerindo que a diapocinina possui maior propriedade anti-invasiva.

Figura 14. Invasão celular de SaOS-2 em *Transwell*[®] recoberto com matrigel. Imagens representativas das células coradas com cristal violeta, no controle (A), tratadas com 1,5 e 3 mM de apocinina (B-C) e 0,75 e 1,5 mM de diapocinina (D-E), após 72 horas de tratamento. Barras de escala de 100µm. (F) Quantificação da porcentagem (%) de invasão celular analisados pelo *software ImageJ*. Valores apresentados em média $\pm$ desvio padrão. *P<0,05 e ***P<0,001 representam diferenças estatísticas quando comparado ao controle e os grupos tratados entre si.

5.7 Expressão de HIF-1 α

A análise qualitativa da expressão de HIF-1 α em SaOS-2, pelo ensaio de imunofluorescência, mostrou que a apocinina (Figuras 15E-15H) e diapocinina (Figuras 15K e 15N) diminuíram a intensidade de fluorescência da marcação com anticorpo específico. Ou seja, é possível afirmar que os tratamentos reduziram a expressão de HIF-1 α , em comparação ao controle.

Figura 15. Imagens representativas da expressão de HIF-1 α em células SaOS-2 tratadas ou não com apocinina (1,5 e 3 mM) e diapocinina (0,75 e 1,5 mM). (A, D, G, J e M) células com núcleos marcados com DAPI, (B, E, H, K e N) marcação com anticorpo específico para HIF-1 α (C, F, I, L e O) sobreposição das imagens com as duas marcações. Barras de escala de 25 μ m.

5.8 Atividade de MMP-2 e 9

Uma forma de avaliar o papel da apocinina e diapocinina nos processos de metástase foi pelo ensaio da atividade de metaloproteínases de matriz (MMPs)-2 e 9 por meio da técnica de zimografia (Figura 16).

De maneira geral, os resultados mostraram que os tratamentos com apocinina (1,5 e 3 mM) e diapocinina (0,75 e 1,5 mM) inibiram significativamente a atividade de MMP-2 em SaOS-2 em relação ao controle (não tratado). Além do mais, assim como nos ensaios descritos anteriormente, a diapocinina parece ser mais efetiva, uma vez que as suas concentrações avaliadas são a metade das concentrações de apocinina (Figura 16B).. Entretanto não houve alterações na atividade de MMP-9 (Figura 16C).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O osteossarcoma causa muitas mortes devido à sua complexa patogênese e resistência aos tratamentos convencionais (CAI et al., 2012). Embora a combinação da cirurgia com quimioterapia tenha melhorado o prognóstico dos pacientes, a aplicação de fármacos antitumorais ainda está associada à aquisição de fenótipos resistentes à fármacos e reações adversas (LUETKE et al., 2014), além do risco de recaída local da doença (HU et al., 2012). Assim, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras vem sendo perseguido (MEYERS et al., 2008; PILZ et al., 2012; SPINA et al., 2013; LUETKE et al., 2014; KUNDU et al., 2014; ANDERSON, 2016). No entanto, ainda é necessária identificação de fármacos com citotoxicidade seletiva para o osteossarcoma, reduzindo assim efeitos colaterais/indesejados (MA et al., 2017).

Produtos naturais apresentam uma fonte potencialmente rica para novos medicamentos antitumorais. Plantas, em particular, são repositórios de biodiversidade e, portanto, representam uma fonte para muitos medicamentos. Vários tratamentos terapêuticos contra o câncer foram derivados de compostos encontrados em plantas (por exemplo, taxol, paclitaxel, álcool perilílico) (MARTIN, 1993; CROWELL, 1999).

A apocinina, obtida a partir das raízes da *Picrorhiza kurroa*, é considerada um potencial composto antitumoral. Estudos mostraram que seus rizomas foram usados na medicina tradicional oriental há milhares de anos, tratando diversas doenças do fígado e pulmão (RAM, 2001). A apocinina é um eficiente inibidor do complexo NADPH oxidase, enzima responsável pela formação de EROs (CASTOR et al., 2010). Seu mecanismo de ação parece estar relacionado com a sua oxidação (SIMONS et al., 1990; MORA-PALE et al., 2009), produzindo a diapocinina, e que este seja mais efetivo na inibição do complexo (JOHNSON et al., 2002).

Os eventos de sinalização mediada pelo estresse oxidativo têm sido relatados como afetando os traços característicos das células tumorais (BONEKAMP et al., 2009; STORZ, 2005). Por exemplo, as EROS em câncer estão envolvidas na progressão do ciclo celular e proliferação, sobrevivência celular e apoptose, metabolismo energético, morfologia celular, adesão célula-célula, motilidade celular, angiogênese e manutenção do tumor. Diante disso, o presente estudo avaliou, *in vitro*, os efeitos da apocinina e diapocina em células de osteoblastos humano

normais (HOb) e de osteossarcoma humano (SaOS-2) comparativamente. O principal motivo para também utilizar células normais foi de garantir que as concentrações usadas não afetassem a integridade das mesmas, garantido assim citotoxicidade seletiva/específica para células tumorais (MA et al., 2017).

Umas das características principais de células tumorais é o crescimento descontrolado, sendo assim, a análise da proliferação celular é uma importante ferramenta para a compreensão da carcinogênese e da progressão tumoral (WOOD et al., 2015). Nesse sentido, nosso estudo avaliou a viabilidade e apoptose celular, bem como as alterações morfológicas em SaOS-2 tratadas com apocinina e diapocinina.

Os resultados apresentaram redução dose-dependente da viabilidade celular, uma vez que conforme a concentração aumentou a viabilidade diminuiu. Além disso, em osteoblastos normais somente a concentração mais alta da apocinina (6 mM) foi suficiente para causar inibição da viabilidade. Nossos dados estão em concordância com relatos da literatura, no qual Kato e colaboradores (2015) também demonstraram que o tratamento com apocinina inibiu a viabilidade de células de câncer pancreático.

A análise morfológica em SaOS-2 mostrou que os compostos foram capazes de promover alterações da membrana relacionado às mudanças do citoesqueleto, além de diminuir o tamanho e número de células em comparação às células não tratadas. Por outro lado, avaliando-se as células normais, apenas as concentrações de 6 mM para apocinina e 3 mM para diapocinina mudaram a forma das células, apresentando o citoplasma mais fino e alongado.

A análise da apoptose celular em SaOS-2 revelou que a apocinina (1,5 e 3 mM), e diapocinina (1,5 mM) tiveram seus níveis aumentados. Nossa hipótese é de que níveis elevados de EROs estejam envolvidos na morte de SaOS-2 pelo mecanismo de apoptose. Estudos ilustraram que EROs têm sido associadas à diferentes tipos de células tumorais (PANIERI; SANTORO, 2016) e que estão associadas ao crescimento celular anormal, metástase, resistência à apoptose e angiogênese (SABHARWAL; SCHUMACKER, 2014; MOLONEY et al., 2017).

Nesse contexto, vários produtos naturais exibiram efeitos antitumorais inibindo EROs por meio de atividades pró-oxidativas (LI-WEBER, 2013). A apocinina, inibidor da NADPH-oxidase e conseqüentemente da produção de EROs,

também tem sido estudada como pró-oxidante (CASTOR et al., 2009). A geração de EROs é elevada em quase todos os tipos de câncer e contribuem para manter o fenótipo oncogênico e a progressão do tumor (LIOU; STORZ, 2010). Além disso, as EROS são conhecidas como fatores importantes para a carcinogênese e a progressão do tumor (WU, 2006; KLAUNIG et al., 2010). Portanto, nós hipotetizamos que a alta produção de EROS poderia contribuir para a carcinogênese, e investigamos a produção de EROS em SaOS-2 tratados ou não (controle) com apocinina e diapocinina, medidos usando a sonda fluorescente, diacetato de diclorofluorescina (DCF-DA). Os resultados revelaram que tanto a apocinina nas concentrações de 1,5 e 3mM, quanto a diapocinina 0,75 e 1,5 mM, foram capazes de reduzir significativamente a geração de EROs em SaOS-2 de forma dose-dependente. Em adição, ficou evidente que a diapocinina foi mais efetiva, pois metade da sua concentração foi suficiente para produzir os mesmos efeitos da apocinina.

Terapias seletivas para neoplasias representam um grande obstáculo no manejo do tratamento eficiente contra o câncer (HOPKINS, 2008). Este requer a modulação de alvos concretos, que podem ser comprometidos pelos mecanismos compensatórios e/ou mutações (STELLING et al., 2004; KITANO, 2007). A solução para esses problemas exige, muitas vezes, altas doses de fármacos que podem, por outro lado, promover efeitos deletérios em tecidos não tumorais (KASSOUF et al., 2005). Nosso estudo mostrou que em concentrações baixas e intermediárias (0,6 - 3mM para apocinina) e (0,3 – 1,5 mM para diapocinina) não promoveram danos às células normais, sugerindo, portanto, que os compostos poderiam ter maior afinidade/especificidade por células tumorais ou que as células tumorais sejam mais sensíveis aos compostos estudados.

A característica de uma única célula se dividir e proliferar indefinidamente para formar colônias é definida como clonogênica e é prova de que a célula possui capacidade de reprodução e sobrevivência (MUNSHI et al., 2005). No presente estudo demonstramos que os compostos apocinina e diapocinina conseguiram, de forma dose-dependente, impedir essa habilidade das células SaOS-2. Aqui também a diapocinina se mostrou mais efetiva do que a apocinina.

Outra vertente das células tumorais é a capacidade migratória e de invadir os tecidos circundantes que pode ser determinada *in vitro*, eventos fundamentais

para o processo de metástase (KRAMER et al., 2013). A adesão e migração celular dependem da ligação da integrina à matriz extracelular (ECM). As integrinas elevam os níveis de oxidantes, principalmente pelo aumento da ciclooxigenase-2 (COX-2) (BROOM et al., 2006), mas também através de 5-lipoxigenases (5-LOX) e mitocôndrias (CHIARUGI; FIASCHI, 2007; SVINENG et al., 2008). Neste contexto, um aumento no EROS mitocondrial foi associado a um primeiro contato celular com ECM, e o aumento de EROS citosólicos contribuíram para remodelação do citoesqueleto e formação de filamentos de actina durante uma fase posterior do processo (CHIARUGI; FIASCHI, 2007; TADDEI et al., 2007).

A mobilidade pode ser avaliada por meio da formação de fenda na monocamada celular e é uma metodologia comumente usada por ser econômica e de maior reprodutibilidade em relação aos ensaios *in vivo* (LIANG et al., 2007; KRAMER et al., 2013). A migração celular também é parte necessária do processo de invasão e pode ser analisada, *in vitro*, por meio da degradação da ECM revestida na superfície da placa do tipo *transwell*, permitindo que as células tumorais atravessem o outro lado da membrana (LIRDPRAPAMONGKOL et al., 2003). Nossos resultados mostraram que os compostos inibiram, de forma dose-dependente, a capacidade migratória e invasiva de células de osteossarcoma. Esses dados estão em concordância com os relatos da literatura, no qual Klees e colaboradores (2005) comprovaram a inibição da migração de células de câncer de mama expostas ao tratamento com derivados da apocinina. Os mesmos autores sugerem que a apocinina poderia inibir a migração de células tumorais mediada pela Rac1, proteína presente no complexo NADPH oxidase e responsável por regular o citoesqueleto de actina durante o processo de migração (KLEES et al., 2005). Outro estudo provou que a apocinina e diapocinina regularam a invasão de células de hepatocarcinoma humano por meio da inibição da fosforilação de FAK e Akt (JANTAREE et al., 2017). Além disso, a diapocinina exibiu maior potencial inibidor, assim como demonstrado em nosso estudo.

Estudos forneceram evidências de forte correlação entre os níveis elevados de fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) e processos metastáticos e angiogênicos, bem como à resistência tumoral (SEMENZA, 2001). Foi observado que a hipóxia (baixos níveis de O₂) é uma característica comum em muitos tipos de tumores e como resposta adaptativa ao estresse hipóxico, as células tumorais

ativam várias vias de sobrevivência para realizar seus processos biológicos essenciais (DENKO, 2008). Pela análise qualitativa, utilizando anticorpo específico para HIF-1 α , mostramos que células tratadas com apocinina e diapocinina exibiram menor intensidade de marcação em relação às células não tratadas. Sugerindo como hipótese de que os compostos também poderiam atuar por essa via inibindo a metástase e angiogênese, eventos importantes para a progressão do tumor.

As células normais requerem uma ancoragem à ECM para executar o processo mitótico. Neste, as EROS atuam como segundos mensageiros facilitando a mitose adequada (CHIARUGI; FIASCHI, 2007; CHIARUGI, 2008). Uma sinergia de sinalização entre os fatores de crescimento e as integrinas leva à uma explosão oxidativa através do aumento dependente de Rac-1 na EROS mitocondrial (BAE et al., 2000; WERNER; WERB, 2002). Isso leva à inibição oxidativa de proteína tirosina-fosfato, ativação de proteína proto-oncogene tirosina-quinase (Src) ou proteínas estruturais, com o efeito de aumentar a adesão celular à ECM, disseminação celular e proliferação. A perda de adesão celular à matriz em células normais desencadeia um tipo específico de apoptose. Em contraste, as células tumorais são protegidas deste processo e mostram aumento da proliferação celular e independência de ancoragem. Essa resistência à apoptose permite que as células tumorais sobrevivam fora do ambiente "normal", sofram metástase e formem novas colônias em locais distantes. (LIOU; STORZ, 2010)

Antes das células tumorais migrem para locais distantes, elas são submetidas à transição mesenquimatosa epitelial (EMT) para libertar-se da contenção da membrana basal (LIOU; STORZ, 2010). Durante este processo, as metaloproteínases de matriz (MMPs) desempenham um papel importante na invasão e na metástase do tumor, não só controlando a degradação da matriz extracelular, mas também o processo de angiogênese, que afeta a função das moléculas de adesão celular e regula o crescimento de células tumorais (KÖHRMANN et al., 2009). Um estudo mostrou que fármacos também podem ser usados para inibir o crescimento de células tumorais por meio da redução da atividade de MMP-2 e MMP-9 (ROOMI et al., 2009). Além disso, a degradação da matriz extracelular (ECM) é complexa, uma vez que envolve muitos fatores, e as MMPs e inibidores (TIMPs) podem desempenhar funções importantes. Por exemplo, enquanto as MMPs degradam a ECM, as TIMPs podem inibir a degradação da ECM

pela redução da atividade das MMPs, para proteger as células normais (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010). A formação da cavidade intravascular depende do equilíbrio entre MMPs e TIMPs, a introdução de inibidores exógenos pode alterar o equilíbrio de MMPs e TIMPs, inibindo os processos de angiogênese, invasão e metástase de células tumorais (CAO et al., 2017). Pela técnica de zimografia, nossos achados mostraram que nas células de osteossarcoma os tratamentos com apocinina e diapocinina também foram efetivos na inibição da atividade de MMP-2, de forma dose-dependente. Além disso, assim como nas análises descritas anteriormente, a diapocinina ilustrou maior potencial na redução da degradação. Entretanto, os compostos não conseguiram causar os mesmos efeitos na atividade de MMP-9, permanecendo semelhantes às células não tratadas. Uma possível explicação seja o balanço entre MMP-9 e TIMPs, tenha sido decisivo na sua atividade.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, concluímos que a apocinina e diapocinina apresentam maior especificidade em células de osteossarcoma ou que as células sejam mais sensíveis aos compostos. Além disso, foram capazes de modular, de maneira dose-dependente, os processos de viabilidade celular, apoptose, migração e invasão; e diapocinina revelou ser mais efetiva do que a apocinina, na concentração de 1,5 mM. Sugerimos, portanto, que os compostos poderiam contribuir sobremaneira para sua possível utilização como terapia coadjuvante em células tumorais.

Referências

REFERÊNCIAS

- Aldieri E, Riganti C, Polimeni M, Gazzano E, Lussiana C, Campia I, Ghigo D. Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific. *Curr Drug Metab.* 2008;9(8):686-96.
- Anderson ME. Update on Survival in Osteosarcoma. *Orthop Clin North Am.* 2016;47(1):283-92.
- Andrade Carvalho A, da Costa PM, Da Silva Souza LG, Lemos TL, Alves AP, Pessoa C, et al. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. *Life Sci.* 2013;93(5-6):201-7.
- Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, Rhee SG. Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2000;275(14):10527-31.
- Banerjee A, Kunwar A, Mishra B, Priyadarsini KI. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chem Biol Interact.* 2008;174(2):134-9.
- Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, Brambilla M, Caiani A, Tremoli E, et al. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(2):156-65.
- Benjamin RS. Osteosarcoma: better treatment through better trial design. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):12-3.
- Bielack S, Carrie D, Casali PG. Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2009;20(4):137-9.
- Biermann JS, Adkins DR, Agulnik M, Benjamin RS, Brigman B, Butrynski JE, et al. Bone cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013;11(6):688-723.
- Bonekamp NA, Völkl A, Fahimi HD, Schrader M. Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *Biofactors.* 2009;35(4):346-55.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 2010;20:161–8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Brambilla D, Zamboni S, Federici C, Lugini L, Lozupone F, De Milito A, et al. P-glycoprotein binds to ezrin at amino acid residues 149-242 in the FERM domain and plays a key role in the multidrug resistance of human osteosarcoma. *Int J Cancer.* 2012;130(12):2824-34.

Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res.* 2005;65(1):16-27.

Broom OJ, Massoumi R, Sjolander A. Alpha-2 beta-1 integrin signalling enhances cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol.* 2006;209(3):950-8.

Byun S, Lee E, Jang YJ, Kim Y, Lee KW. The NADPH oxidase inhibitor apocynin inhibits UVB-induced skin carcinogenesis. *Exp Dermatol.* 2016;25(6):489-91.

Cai CK, Zhao GY, Tian LY, Liu L, Yan K, Ma YL, et al. miR-15a and miR-16-1 downregulate CCND1 and induce apoptosis and cell cycle arrest in osteosarcoma. *Oncol Rep.* 2012;28(5):1764-70.

Calvert GT, Randall RL, Jones KB, Cannon-Albright L, Lessnick S, Schiffman JD. At-risk populations for osteosarcoma: the syndromes and beyond. *Sarcoma.* 2012;2012:152382.

Cao L, Chen J, Ou B, Liu C, Zou Y, Chen Q. GAS5 knockdown reduces the chemosensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell to cisplatin (DDP) through regulating miR-21/PTEN axis. *Biomed Pharmacother.* 2017;93: 570–9.

Castor LRG, Locatelli KA, Ximenes VF. Prooxidant activity of apocynin radical. *Free Radical Biology and Medicine.* 2010;48(12):1636–43.

Cave A, Grieve D, Johar S, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360(1464):2327-34.

Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide peroduction in hyman blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factor. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(4):515-24.

Cheng YX, Hu M, Chen L, Huang JL, Xia LB, Li BS, et al. The mechanism of lipid raft mediating chemoresistance of cervical cancer. *Saudi Med J*. 2012;33(5):508-14.

Chiarugi P. From anchorage dependent proliferation to survival: lessons from redox signalling. *IUBMB Life*. 2008;60(5):301-7.

Chiarugi P, Fiaschi T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal*. 2007;19(4):672-82.

Clarke JD, Dashwood RH, Ho E. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett*. 2008;269(2):291-304.

Crowell PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of Nutrition*. 1999;129(3):775S-8S.

Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res*. 2015;95-96:138-58.

de Almeida AC, Dos Santos Vilela MM, Condino-Neto A, Ximenes VF. The importance of myeloperoxidase in apocynin-mediated NADPH oxidase inhibition. *ISRN Inflamm*. 2012;2012:260453.

Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(9):705-13.

Di Fiore R, Fanale D, Drago-Ferrante R, Chiaradonna F, Giuliano M, De Blasio A, et al. Genetic and molecular characterization of the human osteosarcoma 3AB-OS cancer stem cell line: a possible model for studying osteosarcoma origin and stemness. *J Cell Physiol*. 2013;228(6):1189-201.

Dong J, Demarest SJ, Sereno A, Tamraz S, Langley E, Doern A, et al. Combination of two insulin-like growth factor-I receptor inhibitory antibodies targeting distinct epitopes leads to an enhanced antitumor response. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(9):2593-604.

El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005;53(3):199-206.

Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutase, and related matters. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18515-7.

Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2014;92(1):90-101.

Grote K, Ortmann M, Salguero G, Doerries C, Landmesser U, Luchtefeld M, et al. Critical role for p47phox in renin-angiotensin system activation and blood pressure regulation. *Cardiovasc Res.* 2006;71(3):596-605.

Guo H, Luo H, Yuan H, Xia Y, Shu P, Huang X, et al. Litchi seed extracts diminish prostate cancer progression via induction of apoptosis and attenuation of EMT through Akt/GSK-3beta signaling. *Sci Rep.* 2017;7:41656.

Gupta SC, Prasad S, Sethumadhavan DR, Nair MS, Mo YY, Aggarwal BB. Nimbolide, a limonoid triterpene, inhibits growth of human colorectal cancer xenografts by suppressing the proinflammatory microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2013;19(16):4465-76.

Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.* 2007;401(1):1-11.

Han M, Zhang T, Yang L, Wang Z, Ruan J, Chang X. Association between NADPH oxidase (NOX) and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Thorac Dis.* 2016;8(7):1704-11.

Heumüller S, Wind S, Barbosa E, Schimdt HHHW, Busse R, SchöDer K, et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension.* 2008;51:211-7.

Holl M, Koziel R, Schafer G, Pircher H, Pauck A, Hermann M, et al. ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells. *Mol Carcinog.* 2016;55(1):27-39.

Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol.* 2008;4(11):682-90.

Hu H, Zhang Y, Cai XH, Huang JF, Cai L. Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts. *Oncol Lett.* 2012;4(5):1037-42.

Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature.* 2000;407(6802):390-5.

Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, et al.

ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*. 2008;320(5876):661-4.

Jaffe N, Gorlick R. High-dose methotrexate in osteosarcoma: let the questions surcease--time for final acceptance. *J Clin Oncol*. 2008;26(27):4365-6.

Jantaree P, Lirdprapamongkol K, Kaewsri W, Thongsornkleeb C, Choowongkamon K, Atjanasuppat K, et al. Homodimers of Vanillin and Apocynin Decrease the Metastatic Potential of Human Cancer Cells by Inhibiting the FAK/PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Agric Food Chem*. 2017;65(11):2299-306.

Johnson DK, Schillinger KJ, Kwait DM, Hughes CV, McNamara EJ, Ishmael F, et al. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium*. 2002;9(3):191-203.

Juhasz A, Ge Y, Markel S, Chiu A, Matsumoto L, van Balgooy J, et al. Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues. *Free Radic Res*. 2009;43(6):523-32.

Kanegae MP, Condino-Neto A, Pedroza LA, de Almeida AC, Rehder J, da Fonseca LM, et al. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(3):551-4.

Kassouf W, Dinney CP, Brown G, McConkey DJ, Diehl AJ, Bar-Eli M, et al. Uncoupling between epidermal growth factor receptor and downstream signals defines resistance to the antiproliferative effect of Gefitinib in bladder cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65:10524-35

Kato A, Naiki-Ito A, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K, et al. Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3beta and ERK1/2. *Oncotarget*. 2015;6(40):42963-75.

Kitano H. A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(3):202-10.

Kizaki M, Xian M, Sagawa M, Ikeda Y. Induction of apoptosis via the modulation of reactive oxygen species (ROS) production in the treatment of myeloid leukemia. *Curr Pharm Biotechnol*. 2006;7(5):323-9.

Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 2010;38:96-109.

Klees RF, De Marco PC, Salaszyk RM, Ahuja D, Hogg M, Antoniotti S, et al. Apocynin derivatives interrupt intracellular signaling resulting in decreased migration in breast cancer cells. *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006(2):87246.

Kohrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer.* 2009;9:188.

Kundu J, Chun KS, Aruoma OI, Kundu JK. Mechanistic perspectives on cancer chemoprevention/chemotherapeutic effects of thymoquinone. *Mutat Res.* 2014;768:22-34.

Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension.* 2002;40(4):477-84.

Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010;44:479-96.

Lirdprapamongkol K, Mahidol C, Thongnest S, Prawat H, Ruchirawat S, Srisomsap C, et al. Antimetastatic effects of aqueous extract of *Helixanthera parasitica*. *J Ethnopharmacol.* 2003;86:253-6.

Lirdprapamongkol K, Kramb JP, Suthiphongchai T, Surarit R, Srisomsap C, Dannhardt G, et al. Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells through PI3K inhibition and decreases angiogenesis in vivo. *J Agric Food Chem.* 2009;57(8):3055-63.

Little AC, Sham D, Hristova M, Danyal K, Heppner DE, Bauer RA, et al. DUOX1 silencing in lung cancer promotes EMT, cancer stem cell characteristics and invasive properties. *Oncogenesis.* 2016;5(10):e261.

Li-Weber M. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Lett.* 2013;332(2):304-12.

Lomelino R de O, Castro S, II, Linhares AB, Alves GG, Santos SR, Gameiro VS, et al. The association of human primary bone cells with biphasic calcium phosphate (betaTCP/HA 70:30) granules increases bone repair. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(3):781-8.

Lu Y, Shen T, Yang H, Gu W. Ruthenium Complexes Induce HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Apoptosis and Inhibit Cell Migration and Invasion through Regulation of the Nrf2 Pathway. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5).

Luchtefeld R, Luo R, Stine K, Alt ML, Chernovitz PA, Smith RE. Dose formulation and analysis of diapocynin. *J Agric Food Chem*. 2008;56(2):301-6.

Luetke A, Meyers PA, Lewis I, Juergens H. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat Rev*. 2014;40:523-32.

Ma Y, Zhu B, Liu X, Yu H, Yong L, Liu X, et al. Inhibition of oleandrin on the proliferation show and invasion of osteosarcoma cells in vitro by suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:115.

Macy ME, Duncan T, Whitlock J, Hunger SP, Boklan J, Narendren A, et al. A multi-center phase Ib study of oxaliplatin (NSC#266046) in combination with fluorouracil and leucovorin in pediatric patients with advanced solid tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(2):230-6.

Martin JW, Squire JA, Zielenska M. The genetics of osteosarcoma. *Sarcoma*. 2012;2012:627254.

Martin V. Overview of paclitaxel (TAXOL). *Semin Oncol Nurs*. 1993;9(4 Suppl 2):2-5.

Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):378-89.

Meitzler JL, Antony S, Wu Y, Juhasz A, Liu H, Jiang G, et al. NADPH oxidases: a perspective on reactive oxygen species production in tumor biology. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(17):2873-89.

Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, Healey JH, Bernstein ML, Betcher D, et al. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival-a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008;26:633-8.

Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009;115(7):1531-43.

Mirabello L, Yu K, Berndt SI, Burdett L, Wang Z, Chowdhury S, et al. A comprehensive candidate gene approach identifies genetic variation associated with osteosarcoma. *BMC Cancer*. 2011;11:209.

Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2017.

Moloney JN, Stanicka J, Cotter TG. Subcellular localization of the FLT3-IT Doncogene plays a significant role in the production of NOX- and p22phox-derived reactive oxygen species in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2017;52:34–42.

Mora-Pale M, Weiwer M, Yu J, Linhardt RJ, Dordick JS. Inhibition of human vascular NADPH oxidase by apocynin derived oligophenols. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(14):5146-52.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.

Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med.* 2005;110:21-8.

Nessa MU, Beale P, Chan C, Yu JQ, Huq F. Synergism from combinations of cisplatin and oxaliplatin with quercetin and thymoquinone in human ovarian tumour models. *Anticancer Res.* 2011;31(11):3789-97.

Oliveira FA, Matos AA, Santesso MR, Tokuhara CK, Leite AL, Bagnato VS, et al. Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. *J Photochem Photobiol B.* 2016;163:14-21.

Osborne TS, Khanna C. A review of the association between osteosarcoma metastasis and protein translation. *J Comp Pathol.* 2012;146(2-3):132-42.

Osuna D, de Alava E. Molecular pathology of sarcomas. *Rev Recent Clin Trials.* 2009;4(1):12-26.

Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016;7(6):e2253.

Pedroso LS, Favero GM, de Camargo LE, Mainardes RM, Khalil NM. Effect of the o-methyl catechols apocynin, curcumin and vanillin on the cytotoxicity activity of tamoxifen. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013;28(4):734-40.

Peters EA, Hiltermann JT, Stolk J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1442-7.

Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:6.

Pilz M, Holinka J, Vavken P, Marian B, Krepler P. Taurine chloramine induces apoptosis in human osteosarcoma cell lines. *J Orthop Res*. 2012;30(12):2046-51.

Ram VJ. Herbal preparations as a source of hepatoprotective agents. *Drug News & Perspectives*. 2001;14(6):353–63.

Riganti C, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;212(3):179-87.

Rikhof B, de Jong S, Suurmeijer AJ, Meijer C, van der Graaf WT. The insulin-like growth factor system and sarcomas. *J Pathol*. 2009;217(4):469-82.

Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2009;21(5):1323-33.

Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*. 2014;14 (11):709–21.

Sakamoto A, Iwamoto Y. Current status and perspectives regarding the treatment of osteosarcoma: chemotherapy. *Rev Recent Clin Trials*. 2008;3:228–31.

Sarman H, Bayram R, Benek SB. Anticancer drugs with chemotherapeutic interactions with thymoquinone in osteosarcoma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(7):1263-70.

Sasaki K, Hitora T, Nakamura O, Kono R, Yamamoto T. The role of MAPK pathway in bone and soft tissue tumors. *Anticancer Res*. 2011;31(2):549-53.

Saunders JA, Rogers LC, Klomsiri C, Poole LB, Daniel LW. Reactive oxygen species mediate lysophosphatidic acid induced signaling in ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(12):2058-67.

Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther*. 2008;120(3):254-91.

Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(2):167-71.

Simons JM, Hart BA, Ip Vai Ching TR, Van Dijk H, Labadie RP. Metabolic activation

of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med*. 1990;8(3):251-8.

Sluga M, Windhager R, Pfeiffer M, Ofner P, Lang S, Dominkus M, et al. [Osteosarcoma and Ewing's sarcoma--The most frequent malignant bone tumors in children--therapy and outcome]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 2002;140(6):652-5.

Song B, Wang Y, Xi Y, Kudo K, Bruheim S, Botchkina GI, et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene*. 2009;28(46):4065-74.

Spina A, Sorvillo L, Chiosi E, Esposito A, Di Maiolo F, Sapio L, et al. Synergistic cytotoxic effects of inorganic phosphate and chemotherapeutic drugs on human osteosarcoma cells. *Oncol Rep*. 2013;29(5):1689-96.

Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:106507.

Stelling J, Sauer U, Szallasi Z, Doyle FJ, 3rd, Doyle J. Robustness of cellular functions. *Cell*. 2004;118(6):675-85.

Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*. 2005;10:1881-96.

Suzuki S, Pitchakarn P, Sato S, Shirai T, Takahashi S. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses progression of prostate cancer via Rac1 dephosphorylation. *Exp Toxicol Pathol*. 2013;65(7-8):1035-41.

Suzuki S, Shiraga K, Sato S, Punfa W, Naiki-Ito A, Yamashita Y, et al. Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2013;104(12):1711-7.

Svineng G, Ravuri C, Rikardsen O, Huseby NE, Winberg JO. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connect Tissue Res*. 2008;49(3):197-202.

Ta HT, Dass CR, Choong PF, Dunstan DE. Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(1-2):247-63.

Taddei ML, Parri M, Mello T, Catalano A, Levine AD, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. Integrin-mediated cell adhesion and spreading engage different sources of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(4):469-81.

Torres M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front Biosci.* 2003;8:d369-91.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.

Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk H. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *Eur J Pharmacol.* 2001;433(2-3):225-30.

Vejrazka M, Micek R, Stipek S. Apocynin inhibits NADPHoxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1722(2):143–7.

Ximenes VF, Kanegae MPP, Rissato SR, Galhiane MS. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch Biochem Biophys.* 2007;457:134–141.

Walkley CR, Qudsi R, Sankaran VG, Perry JA, Gostissa M, Roth SI, et al. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes Dev.* 2008;22(12):1662-76.

Wang H, Albadawi H, Siddiquee Z, Stone JM, Panchenko MP, Watkins MT, et al. Altered vascular activation due to deficiency of the NADPH oxidase component p22phox. *Cardiovasc Pathol.* 2014;23(1):35-42.

Wang P, Shi Q, Deng WH, Yu J, Zuo T, Mei FC, et al. Relationship between expression of NADPH oxidase 2 and invasion and prognosis of human gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2015;21(20):6271-9.

Wang YH, Xiong J, Wang SF, Yu Y, Wang B, Chen YX, et al. Lentivirus-mediated shRNA targeting insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) enhances chemosensitivity of osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Mol Cell Biochem.* 2010;341(1-2):225-33.

Werner E, Werb Z. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *J Cell Biol.* 2002;158(2):357-68.

Wood CE, Hukkanen RR, Sura R, Jacobson-Kram D, Nolte T, Odin M, et al. Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) Review: Interpretation and Use of Cell Proliferation Data in Cancer Risk Assessment. *Toxicol Pathol.*

2015;43(6):760-75.

Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:695-705.

Wu Y, Meitzler JL, Antony S, Juhasz A, Lu J, Jiang G, et al. Dual oxidase 2 and pancreatic adenocarcinoma: IFN-gamma-mediated dual oxidase 2 overexpression results in H₂O₂-induced, ERK associated up-regulation of HIF-1 α and VEGF-A. *Oncotarget.* 2016;7(42):68412-33.

Wunder JS, Bull SB, Aneliunas V, Lee PD, Davis AM, Beauchamp CP, et al. MDR1 gene expression and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *J Clin Oncol.* 2000;18(14):2685-94.

Zhao Z, Jia Q, Wu MS, Xie X, Wang Y, Song G, et al. Degalactotigonin, a natural compound from *Solanum nigrum* L., inhibits growth and metastasis of osteosarcoma through GSK3 β inactivation-mediated repression of the Hedgehog/Gli1 pathway. *Clin Cancer Res.* 2017.

Zhou X, Shi X, Ren K, Fan GT, Wu SJ, Zhao JN. Celecoxib inhibits cell growth and modulates the expression of matrix metalloproteinases in human osteosarcoma MG-63 cell line. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(21):4087-97.

Zimmerman MC, Dunlay RP, Lazartigues E, Zhang Y, Sharma RV, Engelhardt JF, et al. Requirement for Rac1-dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. *Circ Res.* 2004;95(5):532-9.

Anexos

ANEXOS

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito antiproliferativo da apocinina e diapocinina em células de osteossarcoma humano

Pesquisador: ADRIANA ARRUDA MATOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68551917.8.0000.5417

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.223.188

Apresentação do Projeto:

Osteoblastos provenientes de osteossarcoma (SaOS-2) e osteoblastos humanos normais (HOb) serão cultivados e mantidos em condições apropriadas para o estudo *in vitro*. Será avaliado o efeito dos compostos apocinina e diapocinina na citotoxicidade, proliferação, apoptose, produção de espécies reativas de oxigênio, alterações morfológicas, capacidade migratória e invasão celular, formação de colônias, atividade das metaloproteinases de matriz; além da análise de proteínas envolvidas na progressão do osteossarcoma humano.

Objetivo da Pesquisa:

avaliar o efeito antitumoral da apocinina e diapocinina em células de osteossarcoma humano. Para isso, osteoblastos provenientes de osteossarcoma (SaOS-2) e osteoblastos humanos normais (HOb) serão cultivados e mantidos em condições apropriadas para o estudo *in vitro*. Será avaliado o efeito dos compostos apocinina e diapocinina na citotoxicidade, proliferação, apoptose, produção de espécies reativas de oxigênio, alterações morfológicas, capacidade migratória e invasão celular, formação de colônias, atividade das metaloproteinases de matriz; além da análise de proteínas envolvidas na progressão do osteossarcoma humano por meio da técnica de espectrometria de massas.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA CEP: 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

Continuação do Parecer: 2.203.168

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O projeto não oferece riscos para o paciente uma vez que os fragmentos ósseos, descartados ao final da cirurgia, já foram coletados e armazenados no Banco de Material Biológico da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital Antônio Pedro (HUAP-UFF).

Benefícios:

A utilização de células ósseas humanas in vitro é importante para aproximar, ainda mais, os testes da situação encontrada no corpo humano, promovendo maior eficiência e confiabilidade aos testes utilizados em terapias ósseas em humanos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com o parecerista anterior deste CEP havia a necessidade de documento cedendo as células de osteossarcoma, e os autores não mais usarão as células doadas, mas a compra de uma linhagem laboratorial, conforme adequadamente descrito no projeto.

O cronograma foi corrigido e atualizado.

Não foi inserido o valor da compra das células da linhagem dos osteoblastos no orçamento financeiro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequadamente apresentados.

Recomendações:

Inserir a informação dos valores da linhagem de células de osteossarcoma a serem compradas no orçamento financeiro.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Após a inserção da informação solicitada o projeto pode ser aprovado e liberado para o início da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 09.08.2017, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. No entanto solicita-se ao pesquisador responsável o envio de notificação com o orçamento reformulado, com os valores da linhagem de células de osteossarcoma a serem compradas.

Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**

Continuação do Parecer: 2.025.188

parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_867357.pdf	23/06/2017 18:55:16		Aceito
Outros	SaOS2_Datasheet.pdf	23/06/2017 18:54:23	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Outros	SaOS2_ATCC.doc	23/06/2017 18:53:44	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_doutorado_CEP_Versao2.doc	23/06/2017 18:52:52	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Outros	OFICIO_CEP.pdf	23/06/2017 18:52:11	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Outros	email_prof_Gutemberg.png	18/05/2017 23:55:34	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Outros	TCLE_UFF.pdf	18/05/2017 23:45:21	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Outros	TermoDoacaoCelulasHumanas.pdf	18/05/2017 23:42:03	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Outros	Questionario_Tecnico_Pesquisador_Adriana.doc	18/05/2017 23:37:10	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Outros	carta_de_encaminhamento_termo_de_aquiescencia.pdf	18/05/2017 23:33:06	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Outros	Aprovacao_do_comite_de_etica_UFF.pdf	18/05/2017 23:30:51	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacao_de_dispenza_do_TCLE.pdf	18/05/2017 23:26:24	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	09/05/2017 14:50:40	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_de_compromisso_do_pesquisador.pdf	09/05/2017 14:48:51	ADRIANA ARRUDA MATOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRIGOLLA 75 QUADRA 2

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA CEP: 17.012-901

UF: SP Município: BAURU

Telefone: (14)3235-3356

Fax: (14)3235-3356

E-mail: cep@fob.usp.br

Plataforma Brasil

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA USP

Continuação do Parecer: 3.225.168

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BAURU, 16 de Agosto de 2017

Assinado por:
Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8358 Fax: (14)3235-8358 E-mail: dep@fob.usp.br