UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

KELLY KARINA INACIO

Efeitos antitumorais da associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico em células de osteossarcoma murino

BAURU
2022

KELLY KARINA INACIO

Efeitos antitumorais da associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico em células de osteossarcoma murino

Dissertação constituída por artigo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Versão Corrigida

BAURU

2022

Inacio, Kelly Karina

Efeitos antitumorais da associação entre menadiona e o ácido protocatecuico em células de osteossarcoma murinho/ Kelly Karina Inacio – Bauru, 2021.

55 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Nota: A versão original desta dissertação 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 dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

ERRATA

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada e defendida por
KELLY KARINA INACIO
e aprovada pela Comissão Julgadora em
25 de fevereiro de 2022.

Prof.ª Dr.ª **FLÁVIA AMADEU DE OLIVEIRA**
HMS

Prof.ª Dr.ª **MARCELA RODRIGUES DE CAMARGO**

Prof.ª Dr.ª **MARIA APARECIDA DE ANDRADE MOREIRA MACHADO**
FOB-USP

Prof. Dr. **RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA**

Presidente da Banca

FOB - USP

Profª. Drª. **Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

A **Deus,** por me proporcionar sabedoria para realizar esse trabalho.

Ao meus pais, **Gislaine** e **Rildo**, a minha irmã, **Karen** e ao meu eterno namorado e companheiro de vida, **Vinicius**, por todo amor, apoio, cumplicidade e força, por sempre acreditarem nos meus sonhos e por me incentivarem a continuar lutando e acreditando neles.

E aos meus companheiros do grupo de pesquisa e do laboratório de Bioquímica, pelo acolhimento e ajuda durante todo o meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, sabedoria, força e saúde. Por ser possível conseguir concluir mais essa etapa da minha vida, que sempre foi um grande sonho meu.

Aos meus pais, por serem os melhores que eu poderia ter. Por todo apoio, por acreditarem em mim, pela força, por muitas vezes me ampararem nos momentos que eu mais precisei, seja emocionalmente ou financeiramente, e principalmente por toda a criação que tive, todo esse trabalho é para vocês. Amo vocês!

Ao meu companheiro de vida, esposo, e eterno namorado, Vinicius, por me dar força, amor, por estar sempre comigo, por ser maravilhoso, por dividir a vida comigo, por ser uma inspiração e principalmente, por aguentar as inúmeras crises de ansiedade durante todo o processo que foi executar esse trabalho. Obrigada meu amor, te amo demais.

A minha irmã, Karen, por me inspirar, ser um exemplo e apoiar os meus maiores sonhos mesmo longe.

Aos meus avós paternos, Maria e Lucírio, por todo apoio emocional, por incentivarem a sempre dar o melhor de mim e se orgulharem de cada passo que eu dou em busca dos meus sonhos, principalmente por eu ser a primeira da família a ter uma graduação e agora uma pós-graduação. Aos meus avós maternos, Benedita e Dorothildo (*in memorian*), por desde pequena incentivarem com que eu fizesse o que amava. Eu tenho sorte de pertencer a essa família, amo vocês, aonde estiverem.

Aos meus amigos e companheiros da cultura celular, Adriano, Cintia, Mari, Gabi, e aqueles que já não estão mais na cultura, mas que fizeram parte e me ajudaram nesse processo tão importante, Ana Lígia e Vanessa. Por sempre estarem ao meu lado, ajudando com os experimentos, nos caminhos ao qual seguir, pelas discussões em grupo, e principalmente, por sempre estarem disponível, sempre dispostos a ajudar. Não posso deixar de mencionar as risadas, conversas, dos doces, e momentos inesquecíveis que faziam o pior dos meus dias se tornar o melhor. Obrigada de coração por todo o crescimento profissional e pessoal que vocês me proporcionaram, os levarei para sempre. Um agradecimento especial para o Adriano

e para Cintia, que sempre, em qualquer momento, estavam dispostos a me ajudar, pela paciência, além dos conhecimentos que ambos têm e sempre passaram para mim, vocês são um exemplo, uma inspiração, obrigada de coração por absolutamente tudo.

Ao meu orientador, professor Rodrigo, pela orientação, por acreditar em mim e pelo incentivo. Agradeço os conhecimentos compartilhados, a atenção, paciência e compreensão de sempre. Por acreditar em mim e me dar a oportunidade de conseguir conquistar mais esse sonho que é tão importante. Obrigada por tudo, sou eternamente grata.

Ao meu grupo de pesquisa da iniciação científica, Marcela, Talita, professora Vanessa e professora Camila, por me darem a oportunidade de entrar no mundo da pesquisa, além de todos os conhecimentos compartilhados e a amizade eterna.

As amigas da vida, Rafaela, Clarissa e Vanessa, por serem as melhores amigas que eu poderia ter mesmo a distancias quilométricas, por me aguentarem nos momentos difíceis, por entender os momentos que sumi e por sempre me incentivarem e acreditarem que eu daria conta.

As amigas de faculdade, Giovana, Lilian e Gabi, por sonharem esse sonho comigo, cada uma em sua área, por sempre me apoiarem e por passarem por esse processo junto comigo.

A família Panciera Tagliavini, por me acolher como filha, por me incentivarem e por terem me dado o melhor dos presentes, o Vinicius.

A Thelma e a Larissa por toda o auxílio, ajuda, orientações e todos os conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Centro integrado de Pesquisa (CIP), Márcia, Rafaela e Marcelo, por todo o auxílio e ajuda durante a realização dos experimentos realizados.

Ao Professor Valdecir Farias Ximenes, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, pela colaboração, pela coorientação, pelo auxílio, e por clarear algumas dúvidas que aparecem ao longo do caminho

A secretária do Departamento Dalva Ribeiro de Oliveira, por estar sempre disposta a ajudar, por ser tão solícita em todos os momentos.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, deixo os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de pesquisa concedida, processo 88887.372145/2019-00, que foi indispensável para que esse projeto acontecesse.

Agradeço também a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP) por ter utilizado as dependências da instituição e todos os equipamentos para a realização deste projeto de mestrado.

"Palavras são, na minha humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de causar grande sofrimentos e também de remedia-los."

(J.K Rowling)

RESUMO

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno primário que acomete principalmente crianças, jovens predominantemente na segunda década de vida e idosos. Ele predomina em regiões de sustentação de peso dos ossos longos e na área metafisária das articulações do joelho. A progressão do osteossarcoma é rápida devido a defeitos na diferenciação de células-tronco mesenquimais, expressão anormal de oncogênese e supressores de tumor e desregulação de várias vias de sinalização, devido a isso, novas formas de terapias estão sendo investigadas para melhorar o tratamento do osteossarcoma. Assim, este estudo avaliou os efeitos citotóxicos e anticâncer da associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico (PCA), que possuem capacidade antitumorais, em células de osteossarcoma murino (UMR-106) após 48h de tratamento. As concentrações utilizadas foram 3,12 µM de menadiona isolada, 500 µM de PCA isolada e a associação entre essas concentrações. Os compostos foram avaliados, de forma isolada e associados, em relação a viabilidade celular, migração celular pelo método de fechamento de feridas, apoptose por citometria de fluxo, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), expressão de genes NOX por RT-qPCR e degradação das MMP-2 e 9 por zimografia. Os dados foram analisados por one-way ANOVA. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste post-hoc de Dunnett com $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que a associação foi mais eficaz em células de osteossarcoma do que os compostos isolados. A associação diminuiu a viabilidade celular, retardou o processo migratório das células, reduziu a produção de EROs e a expressão de NOX-2, além disso, apresentou uma leve tendência na diminuição da MMP-2 e no processo apoptótico. Em resumo, a associação é capaz de potencializar os efeitos antitumorais dos compostos, além de demostrar uma maior seletividade por células tumorais, possivelmente, causado pelo maior dano mitocondrial e propriedades antioxidantes.

Palavras-chave: Menadiona, ácido protocatecuico, osteossarcoma.

ABSTRACT

Antitumor effects of the association between menadione and protocatechuic acid in murine osteosarcoma cells

Osteosarcoma is a primary malignant bone tumor that mainly affects children, young people predominantly in the second decade of life, and the elderly. It predominates in the weight-bearing regions of the long bones and the metaphyseal area of the knee joints. Osteosarcoma progression is rapid due to defects in mesenchymal stem cell differentiation, abnormal expression of oncogenesis and tumor suppressors, and dysregulation of various signaling pathways, due to this, new forms of therapies are being investigated to improve the treatment of osteosarcoma. Thus, this study evaluated the cytotoxic and anticancer effects of the association between menadione and protocatechuic acid (PCA), which have the antitumor capacity, in murine osteosarcoma cells (UMR-106) after 48h of treatment. The concentrations used were 3.12 µM of isolated menadione, 500 µM of isolated PCA and the association between these same concentrations. These concentrations were evaluated in cell viability assays, cell migration by the wound-healing method, apoptosis by flow cytometry, production of reactive oxygen species (ROS), expression of NOX genes by RT-qPCR and degradation of MMP-2 and 9 by zymography. Data were analyzed by one-way ANOVA. Significant differences between groups were determined by Dunnett's post-hoc test with $p < 0.05$. The results showed that the association was more effective in osteosarcoma cells than the compounds alone. The association decreased cell viability, delayed the migratory process of cells, reduced the production of ROS and the expression of NOX-2, in addition, it showed a slight trend in the decrease of MMP-2 and in the apoptotic process. In summary, the association is capable of potentiating the antitumor effects of the compounds, in addition to demonstrating a greater selectivity for tumor cells, possibly caused by greater mitochondrial damage and antioxidant properties.

Keywords: Menadione, protocatechuic acid, osteosarcoma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 ARTIGO 19

3 DISCUSSÃO 44

4 REFERÊNCIAS 50

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é o maior problema de saúde pública no mundo e a segunda principal causa de morte nos Estados Unidos. Estima-se que por dia mais de 5.200 novos casos são diagnosticados e que ocorra mais 1.600 mortes apenas nos Estados Unidos (SIEGEL et al, 2021). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer “José Alencar Gomes da Silva” (INCA), no triênio de 2020-2022 estima-se a ocorrência de 625 mil novos casos para cada ano.

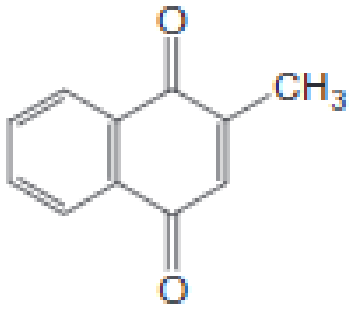
Sabemos que a formação de tumores é ocasionada devido a processos de múltiplos estágios e uma série de eventos como o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. O seu desenvolvimento ocorre por certas capacidades biológicas adquiridas pelas células como: proliferação, indução da angiogênese, resistência a morte e capacidade de invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011; CARMONA-FONTAINE et al., 2017). O microambiente tumoral também desempenha um papel importante no desenvolvimento do câncer, principalmente na progressão e metástase do tumor (ZHANG el al., 2016).

Quanto ao osteossarcoma, este é um tumor ósseo maligno primário que acomete principalmente crianças, jovens predominantemente na segunda década de vida e idosos (MOORE; LU, 2014; BIELACK et al., 2016; JAFARI et al., 2020). A sobrevida dos pacientes é de aproximadamente 5 anos e a maioria das mortes ocorre devido a metástase precoce e recorrência devido ao crescimento rápido do tumor (GAO et al., 2015). Seu tratamento convencional consiste na combinação de quimioterapia neoadjuvante, adjuvante e cirurgia (AMIRHOSSEIN et al., 2018). A ocorrência do osteossarcoma predomina em regiões de sustentação de peso dos ossos longos e na área metafisária das articulações do joelho (LAMOUREAUX et al., 2007). Este tipo de câncer tem sua origem em células mesenquimais ósseas sendo caracterizado pela proliferação de células neoplásicas que produzem diretamente osso imaturo ou osteóide (BASU-ROY; BASILICO; MANSUKHANI, 2013; ZOU; ZHANG; LI, 2017). A progressão do osteossarcoma é rápida devido a defeitos na diferenciação de células-tronco mesenquimais, expressão anormal de oncogênese e supressores de tumor e desregulação de várias vias de sinalização (DENDULURI el al., 2015).

Por ser um câncer agressivo, novas formas de terapias estão sendo investigadas para melhorar o tratamento do osteossarcoma. Foram estudados alvos moleculares que modelam ativamente processos celulares, tais como, o controle do ciclo celular, proliferação, metabolismo e apoptose, porém, o desenvolvimento de novas terapias eficazes continuam sendo um problema devido se tratar de uma doença heterogênea e complexa (SAMPSON et al, 2015).

Dentro deste contexto, vários fitoquímicos vem sendo testados e demonstraram eficácia considerável em uma variedade de tipos de tumores, como a interferência em vias de sinalização, que estão envolvidas na patogênese do osteossarcoma. O que mostra que compostos naturais representam uma alternativa promissora para o tratamento da doença (ANGULO et al., 2017).

As quinonas naturais ou seus análogos sintéticos possuem amplo espectro de atividades biológicas, como antifúngico, antibacteriano, antimalárico, antiviral e anticancerígeno. A menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona, ou MEN) ou vitamina K3 é uma classe química da quinona muito importante devido à sua atividade anticancerígena significativa (LAMSON et al., 2003; PRASAD et al., 2017).



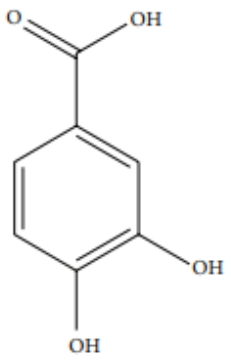
Fonte: HASSAN, 2013.

Figura 1. Estrutura molecular da menadiona

A menadiona apresenta resultados com o estresse oxidativo via ciclo redox de quinona para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), ocasionando danos no DNA e a apoptose das células (PRASAD et al., 2017). A contribuição das EROs no câncer ainda é complexa e provavelmente ocorre em vários níveis, podendo contribuir para instabilidade genônima induzindo danos oxidativos diretos para o DNA ou promovendo a peroxidação lipídica para gerar subprodutos mutagênicos, elas ainda são capazes de ativar ou inativar caminhos de sinalização celular que controlam a

proliferação, migração, diferenciação ou sobrevivência (LITTLE et al., 2017). Estudos recentes demonstraram que a menadiona foi capaz de afetar a funcionalidade de células tronco de câncer pancreáticas por meio da produção de EROs e da oxidação de proteínas mitocondriais (SANCRO et al., 2015). A menadiona ainda suprimiu a transição epitélio mesenquimal, migração e invasão em células de câncer de colo retal (KISHORE et al., 2019), além de ser eficaz contra uma ampla variedade de linhagens celulares de câncer, como leucemia (HUANG et al., 2018) e câncer de mama (YAMADA et al., 2015). Além disso, há um crescente número de estudos que associam a menadiona com quimioterápicos para potencializar seus os efeitos anticancerígenos, como o caso da associação com o bortezomibe (ASTAKHOVA et al., 2018). Além de fármacos, a menadiona também vem sendo associada com compostos orgânicos, como o ácido ascórbico. A sua associação causou morte celular em diversos tipos de câncer pelo estresse oxidativo (REN et al., 2019).

O ácido protocatecuico (PCA, do inglês, protocatechuic acid) é um fitoquímico polifenólico simples, com ampla distribuição. Ele pode ser encontrado em diversas nozes, legumes e frutas (MASELLA et a., 2012) que são comumente encontradas nas rotinas alimentares, além de ser um composto facilmente absorvido por humanos. (VITAGLIONE et al., 2007).



Fonte: KAKKAR; BAIS, 2014.

Figura 2. Estrutura molecular do ácido protocatecuico

O Ácido protocatecuico (PCA) possui capacidades antioxidantes, antibacteriana, anticâncer, antiulcerosa, antidiabética, antienvelhecimento, anticardíaca, antiviral, anti-inflamatória, entre diversas outras (KAKKAR; BAIS, 2014). Em estudos realizados com o PCA, este demostrou uma reação nas espécies reativas de oxigênio, desempenhando um papel fundamental como antioxidante e eliminador de peróxido de hidrogênio (VARI et al, 2011). Em outro estudo o PCA reduziu o estresse oxidativo, diminuiu a inflamação e induziu a apoptose (SEMAMING et al., 2015). Em relação ao câncer, o PCA demonstrou exibir efeitos pró-apoptóticos em células de leucemia, enquanto em células normais provocou efeitos anti-apoptóticos (ZAMBONIN et al., 2012), ele também diminuiu os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio em células de câncer de ovário, além de causar apoptose e autofagia dessas células (XIE et al.,2018). O PCA também já foi utilizado como quimioprotetor após a utilização de Metotrexato (MTX), que é um quimioterápico comumente utilizado em casos de leucemia linfoblástica, osteossarcoma, tumores de cabeça e pescoço e que causa diversos efeitos colaterais. Como quimioprotetor o PCA demonstrou modular a disfunção hepatorenal em ratos, apresentando atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (OWUMI et al., 2019).

Apesar dos resultados promissores sobre a menadiona e o ácido protocatecuico, principalmente sobre as suas atividades antitumorais, não se encontra na literatura estudos sobre a associação dos mesmos no estudo do câncer e principalmente em osteossarcoma. Sendo assim, o objetivo do presente estudo buscou avaliar os efeitos da associação da menadiona com o ácido protocatecuico em células de osteossarcoma murino a fim de elucidar sua citotoxicidade e seus mecanismos de ação.

2 ARTIGO

2 ARTIGO

O artigo apresentado nesta Dissertação foi redigido de acordo com as instruções e diretrizes da Chemico-Biologial Interactions para submissão de artigos.

Efeitos antitumorais da associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico em células de osteossarcoma murino

Kelly Karina Inacio[a], Adriano de Souza Pessoa[a], Cintia Kazuko Tokuhara[a], Ana Lígia Pagnan[a], Mariana Liessa Rovis Sanches[a], Vanessa Svizzero Fakhoury[a], Gabriela Silva Neubern de Oliveira[a], Valdecir Farias Ximenes[b], Rodrigo Cardoso de Oliveira[a]*

[a]Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Brasil.
[b]Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Bauru, Brasil.

*Autor Correspondente: Rodrigo Cardoso de Oliveira, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, Brasil.
Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, 17012-901, Bauru, São Paulo, Brasil.
Telefone Brasil: +55-14-32358247; Fax: +55-14-32271486
Endereço de e-mail: rodrigocardoso@usp.br

RESUMO

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno primário que acomete principalmente crianças, jovens predominantemente na segunda década de vida e idosos. Ele predomina em regiões de sustentação de peso dos ossos longos e na área metafisária das articulações do joelho. A progressão do osteossarcoma é rápida devido a defeitos na diferenciação de células-tronco mesenquimais, expressão anormal de oncogênese e supressores de tumor e desregulação de várias vias de sinalização, devido a isso, novas formas de terapias estão sendo investigadas para melhorar o tratamento do osteossarcoma. Assim, este estudo avaliou os efeitos citotóxicos e anticâncer da associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico (PCA), que possuem capacidade antitumorais, em células de osteossarcoma murino (UMR-106) após 48h de tratamento. As concentrações utilizadas foram 3,12 µM de menadiona isolada, 500 µM de PCA isolada e a associação entre essas concentrações. Os compostos foram avaliados, de forma isolada e associados, em relação a viabilidade celular, migração celular pelo método de fechamento de feridas, apoptose por citometria de fluxo, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), expressão de genes NOX por RT-qPCR e degradação das MMP-2 e 9 por zimografia. Os dados foram analisados por one-way ANOVA. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste post-hoc de Dunnett com $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que a associação foi mais eficaz em células de osteossarcoma do que os compostos isolados. A associação diminuiu a viabilidade celular, retardou o processo migratório das células, reduziu a produção de EROs e a expressão de NOX-2, além disso, apresentou uma leve tendência na diminuição da MMP-2 e no processo apoptótico. Em resumo, a associação é capaz de potencializar os efeitos antitumorais dos compostos, além de demostrar uma maior seletividade por células tumorais, possivelmente, causado pelo maior dano mitocondrial e propriedades antioxidantes.

Palavras-chave: Menadiona, ácido protocatecuico, osteossarcoma.

1. Introdução

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno primário que acomete principalmente crianças, jovens predominantemente na segunda década de vida e idosos [1-3]. Sua ocorrência predomina em regiões de sustentação de peso dos ossos longos e na área metafisária das articulações do joelho [4]. Devido a sua agressividade, novas formas de terapias estão sendo investigadas para melhorar o tratamento do osteossarcoma. Nesse sentido, foram estudados alvos moleculares que modelam ativamente processos celulares tais como: o controle do ciclo celular, proliferação, metabolismo e apoptose. Porém, o desenvolvimento de novas terapias eficazes continua sendo um desafio por se tratar de uma doença heterogênea e complexa [5].

Em adição, vários fitoquímicos vem sendo testados e demonstraram eficácia considerável em uma variedade de tipos de tumores, como a interferência em vias de sinalização que estão envolvidas na patogênese do osteossarcoma. O que sugere fortemente que compostos naturais representam uma alternativa promissora para o tratamento da doença [6].

Dentro desse contexto, a menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona, ou MEN) ou vitamina K3 é uma classe química da quinona muito importante devido à sua atividade anticancerígena significativa [7,8]. Estudos recentes demonstraram que a menadiona foi capaz de afetar a funcionalidade de células tronco de câncer pancreáticas por meio da produção de EROs e da oxidação de proteínas mitocondriais [9], suprimindo a transição epitélio mesenquimal, migração e invasão em células de câncer de colo retal [10]. Além de ser eficaz contra uma ampla variedade de linhagens celulares de câncer, como leucemia [11] e câncer de mama [12]. Também, há um crescente número de estudos que associam a menadiona com quimioterápicos para potencializar seus efeitos anticancerígenos, como é o caso da associação com o bortezomibe [13]. Além de fármacos, a menadiona também vem sendo associada com compostos orgânicos, como o ácido ascórbico. A sua associação causou morte celular em diversos tipos de câncer por meio do aumento de estresse oxidativo [14].

O ácido protocatecuico (PCA, do inglês, protocatechuic acid) é um fitoquímico polifenólico simples, com ampla distribuição [15]. O PCA possui capacidades antioxidantes, antibacteriana, anticâncer, antiulcerosa, antidiabética,

antienvelhecimento, anticardíaca, antiviral, anti-inflamatória, entre diversas outras [16]. Em relação ao câncer, demonstrou exibir efeitos pró-apoptóticos em células de leucemia, enquanto em células normais, provocou efeitos anti-apoptóticos [17], ele também diminuiu os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio em células de câncer de ovário, além de causar a apoptose e autofagia dessas células [18]. O PCA também já foi utilizado como quimioprotetor após a utilização de Metotrexato (MTX), que é um quimioterápico comumente utilizado em casos de leucemia linfoblástica, osteossarcoma, tumores de cabeça e pescoço, por conta dos seus efeitos colaterais. Como quimioprotetor o PCA demostrou modular a disfunção hepatorenal em ratos, apresentou atividades antioxidantes e anti-inflamatórias [19].

Considerando os resultados promissores sobre a menadiona e o ácido protocatecuico, principalmente sobre as suas atividades antitumorais, não se encontram na literatura estudos sobre a associação dos mesmos no estudo do câncer e principalmente em osteossarcoma. Sendo assim, o objetivo do presente estudo buscou avaliar os efeitos da associação da menadiona com o ácido protocatecuico em células de osteossarcoma murino a fim de elucidar sua citotoxicidade e seus mecanismos de ação.

2. Material e Métodos

2.1 – Cultura Celular

As linhagens utilizadas foram a UMR-106 (ATCC® - CRL-1661), proveniente de osteossarcoma de ratos, e a MC3T3-E1 (ATCC® - CRL-2593, subclone 4), proveniente de osteoblastos murinos normais. Ambas as linhagens foram adquiridas pelas American Type Culture Collection (ATCC – Rockville, Maryland, EUA).

O cultivo dessas células foi feito em meio de cultura Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) para a UMR-106 e em meio de cultura Minimun Essential Mediuam Eagle – Alpha Modification (α-MEM) (Gibco, Thermo-Scientific) para a MC3T3-E1. Os dois meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco) e 1% de penicilina 10.000 UI/ estreptomicina 0,060 g/L (Gibco) [20].

2.1.2 – Diferenciação da MC3T3-E1

A linhagem MC3T3-E1, utilizada como controle, é uma linhagem pré-osteoblástica murina. Para que ela se tornasse mais próxima da linhagem UMR-106, que é osteoblástica, para fins de comparação, foi necessário induzir uma diferenciação nessas células. A diferenciação foi realizada com meio osteogênico, composto por meio de cultura α-MEM, 10% de soro fetal bovino, 50 µg/mL de ácido ascórbico e 10 mM β-glicerofosfato. As células ficaram neste meio durante 4 dias [21], para então seguirem o mesmo protocolo realizado com a UMR-106 [22].

2.2 – Compostos

A Menadiona, sintetizada, foi cedida pelo Prof. Dr. Valdecir Faria Ximenes da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho (UNESP). O ácido protocatecuico foi obtido comercialmente pela Sigma-Aldrich. As amostras para a realização dos tratamentos foram preparadas em DMSO e depois adicionada a meio de cultura com 10% de SFB.

2.3 – Ensaios de Citotoxicidade – MTT

Os dados de viabilidade celular foram obtidos pela análise da atividade mitocondrial das células, realizado pelo método de redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimentiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich).

A UMR-106 foi plaqueada a $3x10^3$ células por poço, enquanto a MC3T3-E1 foi na densidade de $5x10^2$ células por poço, com seus respectivos meios de cultura com 10% de SFB em placa de 96 poços. Para as células MC3T3-E1 foi necessário 24h de adesão na placa, e então, passar pelo processo de diferenciação citado no item 2.1.2. Para UMR-106 o período de adesão foi 48h. Após o período de adesão e diferenciação, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos ao qual permaneceram em contato com a células nos períodos de 24, 48 e 72h.

Inicialmente os compostos foram testados de formas separadas, sendo utilizadas as concentrações de 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µM para menadiona e as 125, 250, 500, 1000 e 2000 µM para o ácido protocatecuico. Depois

da análise de dados, foi escolhida uma concentração fixa da menadiona (3,12 µM), devido à alta toxicidade celular que a menadiona apresenta, e então, foi realizada a associação com algumas concentrações de ácido protocatecuico, que foram 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µM.

O grupo controle continha 10% de SFB e 0,08% de DMSO para cada tipo celular e período. Foi adicionado DMSO no grupo controle devido os compostos serem diluídos em DMSO e o mesmo apresentar uma certa citotoxicidade. Esse processo foi realizado em todos os ensaios seguintes, assim como a realização em triplicata biológica.

Após cada período (24, 48 e 72h) o tratamento foi completamente removido e adicionado 100 µL da solução de MTT (0.5 mg/mL em meio de cultura) por poço, permanecendo incubado a 37ºC por 4 horas. A solução de MTT foi então substituída por dimetilsulfóxido (DMSO); Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) por 30 minutos. A absorbância foi determinada a 550 nm utilizando um leitor de microplaca (Synergy™ Mx monochromator multimode microplate reader, Biotek Instruments Inc, Winooski, Vermont, USA).

A absorbância de cada reação foi convertida para viabilidade celular em porcentagem utilizando o GraphPad Prism® software, que também foi utilizado para a plotagem dos gráficos.

2.4 – Ensaios de Citotoxicidade – Cristal Violeta

O ensaio de cristal violeta é responsável pela coloração dos ácidos nucleicos das células. A UMR-106 foi plaqueada a $3x10^3$ células por poço, enquanto a MC3T3-E1 foi na densidade de $5x10^2$ células por poço, com seus respectivos meios de cultura com 10% de SFB em placa de 96 poços. Para as células MC3T3-E1 foi necessário 24h de adesão na placa, e então, passar pelo processo de diferenciação citado no item 2.1.2. Para UMR-106 o período de adesão foi 48h. Após o período de adesão e diferenciação, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos ao qual permaneceram em contato com a células nos períodos de 48 e 72h. Para fins de comparação, as concentrações utilizadas foram 3,12 µM de menadiona e 500 µM de

ácido protocatecuico separadamente e então, essas mesmas concentrações foram associadas entre si.

Após os períodos de 48 e 72h, o tratamento foi removido e substituído por 50 µL da solução de cristal violeta na concentração de 0.5% e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. A placa foi lavada em água corrente da torneira até o cristal ser completamente removido, então, a mesma permaneceu aberta sobre a bancada em temperatura ambiente durante 16h para a secagem completa. Depois foi adicionado 200 µL de metanol em cada poço que foi incubado por 20min em temperatura ambiente sob uma mesa agitadora para dissolver os cristais. A absorbância foi determinada a 570 nm utilizando um leitor de microplaca (Synergy™ Mx monochromator multimode microplate reader, Biotek Instruments Inc, Winooski, Vermont, USA).

2.5 – Quantificação de Apoptose por Citometria de Fluxo

A linhagem de células UMR-106, foi plaqueada na densidade de $2x10^5$ células por poço em placas de 6 poços. Após as 48h de adesão, o meio de cultura foi retirado e substituído pelos tratamentos, sendo eles, a concentração de 3,12 µM de menadiona, 500 µM de ácido protocatecuico e a associação entre eles (3,12 µM de menadiona + 500 µM de ácido protocatecuico) e tendo também um grupo controle apenas com meio de cultura suplementado.

Após 48h de tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com PBS gelado e centrifugadas a 1200 rpm. Cerca de $5x10^5$ células foram então ressuspendidas em 250 µL 1x Anexina V Binding Buffer e incubadas com 5 µL de FITC Anexina V (Cat: 556419, BD Parmingen™) e 2,5 µL de DRAQ7™ (Cat: 564904, BD Pharmingen ™) no escuro por 10 minutos em temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência das células foi analisada pelo citômetro de fluxo BD FACSAria™ Fusion (BD Biosciences, San Jose, CA).

Os dados foram analisados no software FlowJo v10 (FlowJo LCC, Or, EUA) e as células foram quantificadas como vivas (AV-/ DRAQ7-; Q4), necrose (AV-/ DRAQ7+, Q1), apoptose inicial (AV+/ DRAQ7-; Q3) e apoptose tardia (AV+/ DRAQ7; Q2).

2.6 – Migração Celular (Wound healing assay)

O ensaio de migração celular foi baseado no modelo descrito por Andrade Carvalho et al. (2013) [23] com algumas adaptações [20]. As células UMR-106 foram plaqueadas na densidade de $5x10^5$ células por poço em placas de 6 poços e permanecerem em estufa úmida a 37ºC sob 5% de CO_2 por 48h para adesão e para atingirem a semiconfluência. Após, os poços foram tratados com 5 µg/mL de mitomicina C (Sigma-Aldrich) por 2 horas, para que não houvesse proliferação celular. Os poços então foram lavados com PBS 1X e foi realizado uma fenda no sentido vertical da monocamada com ponteira de 1000 µL. Os poços foram lavados três vezes com PBS 1X e completado com os tratamentos, que são a concentração de 3,12 µM de menadiona, 500 µM de ácido protocatecuico, associação entre eles (3,12 uM de menadiona + 500 µM de ácido protocatecuico) e o grupo controle contendo apenas meio de cultura com 10% de SFB.

As placas foram fotografadas nos períodos de 0, 24, 48 e 72h após o tratamento utilizando o microscópio e contraste de fase acoplada à câmera digital Olympus U-TV0.5XC-3, com objetiva de 4X. A porcentagem (%) da área da fenda foi calculada pelo Software Image J.

2.7 – Produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Após o crescimento, as células UMR-106 foram plaqueadas na densidade de $2x10^4$ células por poço em placas preta de 96 poços com fundo transparente e permaneceram em estufa úmida a 37ºC sob 5% de CO_2 por 24h para adesão. O meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com PBS 1X e incubados com 100 µL de DCFH-DA 12,5 µM em meio de cultura por 45 minutos em estufa a 37ºC sob 5% de CO_2. A solução de DCFH-DA foi substituída pelos tratamentos (3,12 µM de menadiona; 500 µM de ácido protocatecuido e a associação dos dois compostos nessas mesmas concentrações) e grupo controle (DMEM + 10% SFB), que foram adicionados em meio de cultura sem vermelho de fenol com 10% de SFB para não interferir na leitura.

A intensidade da fluorescência foi analisada em 0, 24 e 48h em espectrofotômetro com excitação de 495nm e emissão 530nm (Synergy™ Mx).

2.8 – Zimografia

A linhagem UMR-106 foi plaqueada em uma densidade de $2x10^6$ em placas de Petri (100X20mm) com meio de cultura DMEM com 10% de SFB e permaneceram em estufa a 37º C sob 5% CO_2 por 48h para adesão. Após, as placas foram tratadas com seus respectivos tratamentos, sendo, uma com 3,12 µM de menadiona, uma 500 µM de ácido protocatecuico, outra com a associação entre os compostos (3,12 µM de menadiona + 500 µM de ácido protocatecuico) e por fim um grupo controle com DMEM + 10% de SFB.

Após 48h de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados em full speed para remoção de possíveis debris celulares. Em seguida, foram transferidos para tubos Amicon Ultra 4 (UFC800324 – Merck Millipore Ltd, Cork Ireland) e concentrados para posterior quantificação das proteínas. O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e 50 µg de proteínas, assim como as recombinantes hrMMP-2 e hrMMP-9 (Calbiochem; Merck, Darmstadt, Alemanha), então, foram diluídas em Sample Buffer e H_2O ultrapura, aquecidas por 3 minutos à 100ºC em banho seco e transferidas para gel de poliacrilamida contendo 30% Bisacrilamina, 1,5M Tris HCl (pH 8,8), 10% Dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% QPS, 0.1% Temed e H_2O ultrapura (gel de largada). Primeiramente iniciou-se uma pré-corrida à 10mAmp/gel, 100 Volts por 15 minutos para alinhamento do gel e posteriormente 15mAmp/gel, 110 Volts por aproximadamente 1h30. Ao fim da corrida, os géis foram lavados, agitados e então incubados em solução de incubação (150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris-HCl e H_2O ultrapura) por 16 h à 37ºC. Após a incubação, os géis foram corados com Coomassie Blue 0.125% (0.125% Brilhant Blue R, 50% Metanol, 10% Ácido Acético Glacial e H_2O ultrapura) e depois descorados com solução descorante (50% Metanol, 10% Ácido Acético Glacial e H_2O ultrapura) e posteriormente transferidos em H_2O ultrapura [24, 25].

Por fim, os géis foram escaneados usando um instrumento Loccus Biotecnologia DS-600, seguido do Lab Image 1D software. As densidades relativas de degradação

do gel foram determinadas por análise de densitometria usando o software Image J (National Institutes of Health, NIH Image) e posteriormente no programa GraphPad Prisma 5 [26, 25].

2.9 – Real Time qRT-PCR

A linhagem celular UMR-106 foi plaqueada na densidade de $2x10^5$ células por poço em placas de 6 poços. Após 48h de adesão, o meio de cultura foi removido, sendo substituído pelos tratamentos 3,12 µM de menadiona, 500 µM de ácido protocatecuico, a associação entre eles (3,12 uM de menadiona + 500 µM de ácido protocatecuico) e grupo controle. Em seguida, depois das 48h de tratamento, o RNA total das células foi isolado pelo método de extração em coluna, utilizando o mini-kit RNeasy 74106 e DNase 79254 (QIagen), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram ressuspendidas em água DEPC e quantificadas por Nanodrop. A quantidade de 1,0 µg de RNA foi transcrita reversamente e o equivalente a 0,04 µg de cDNA foi usado para as reações de PCR por Sensi mix hi Rox SYBR Green (Bioline). Os resultados foram expressos como tempos de aumento no qRT-PCR e normalizados pelo gene de referência (β-actina). A amplificação por PCR foi realizada usando os seguintes conjuntos de iniciadores: NOX-1: 5'ACCTATTTAACTTCGAACGC-3 (forward), 5'CATCACTGTCATGTTTGGAG-3 (reverse), CYBB (NOX-2), 5'CTCTTTGTGATCTTCATCG-3 '(forward), 5'TCCATTTCCAAGTCATAGGAG-3' (reverse); NOX-4: 5'-ACAACCTCTTCTTTGTCTTC-3 '(forward), 5'GTCTGCTATGG ACATATTCTG-3' (reverse); β-actina: 5'ATTGAACACGGCATTCTCACC-3 '(forward), 5' GGTCATCTTTTCACGGTTGGC-3' (reverse). A expressão da β-actina foi usada como controle.

2.10 – Análise Estatística

Os dados foram apresentados em média e desvio padrão (DP). Os parâmetros foram analisados por ANOVA unilateral acoplada ao teste post-hoc de Tukey e Dunnett; para todas as análises, valores de $P<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados são apresentados como médias ± DP de

2-3 experimentos independentes com 5-8 poços de células por condição de tratamento por ensaio. Todos os testes estatísticos foram realizados usando GraphPadInStat e Prism (GraphPad, San Diego, CA).

3. Resultados

3.1 – Ensaios de Viabilidade – MTT e Cristal Violeta – demonstram que a associação é mais eficiente do que os compostos separados.

No ensaio de redução de MTT, várias concentrações foram testadas, tanto para os compostos isolados quanto na associação entre eles.

Para a associação, optamos por fixar uma dosagem de menadiona em 3,12 µM devido o composto não ter efeito sobre os osteoblastos normais e pouco efeito sobre a célula tumoral quando aplicada de forma isolada. As concentrações de ácido protocatecuico variaram entre 31,2 µM e 4000 µM. A concentração da associação escolhida se aproxima de 50% de morte celular. Não foi efetuado o cálculo do IC50 para os ensaios devido a variação presente na associação dos compostos.

Conforme observado na Figura 3, tanto na redução de MTT quanto no Cristal Violeta, a associação entre as concentrações de menadiona e ácido protocatecuico foi mais eficaz em reduzir a viabilidade das células tumorais do que quando os compostos são utilizados de forma separadas durante 48h de tratamento quando comparado ao controle. Além disso, as células cancerosas possuem maior sensibilidade aos compostos do que o osteoblasto normal, deixando claro a seletividade do composto com o câncer. É possível observar também que o composto teve mais efetividade na interferência mitocondrial, observados pelo ensaio de MTT, do que dano ao DNA, no caso do Cristal Violeta.

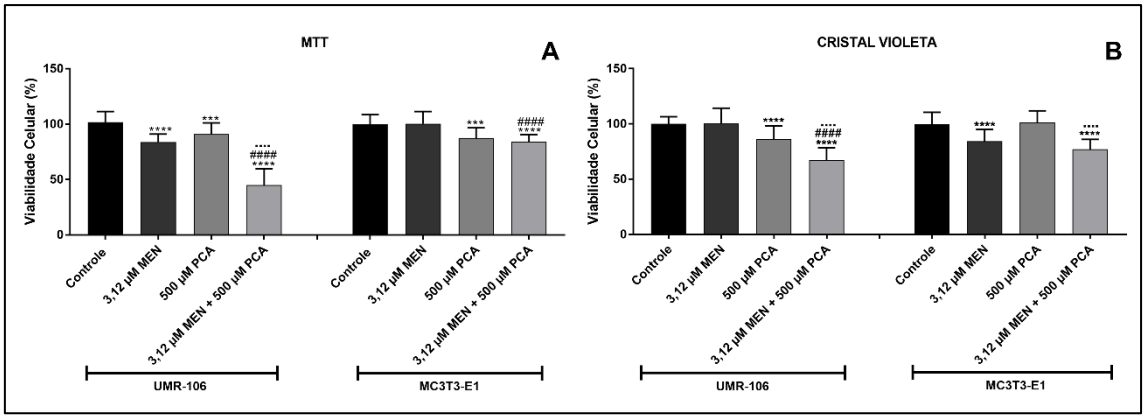


Figura 3. Viabilidade celular. Gráfico comparativo da ação dos compostos de forma separadas e associado entre eles em células de osteossarcoma (UMR-106) e osteoblastos (MC3T3-E1) pelo período de 48h pelos ensaios de degradação de MTT **(A)** e Cristal Violeta **(B)**. **3,12 µM** de Menadiona, **500 µM** de Ácido Protocatecuido (PCA) e **3,12 µM de menadiona + 500 µm PCA** associados entre si. Cada grupo celular foi comparado estatisticamente apenas entre si, ou seja UMR-106 apenas com UMR-106 e MCT3T-E1 com MCT3T-E1. Valores expressos em média e desvio padrão em porcentagem de três ensaios independentes. *** P< 0,001, ****P<0,0001 representam diferenças estatísticas quando comparadas ao controle. ####P<0,0001 representam diferenças estatísticas quando comparados a menadiona. ···· P<0,0001 representam diferenças estatísticas quando comparados ao PCA.

3.3 – A associação entre a Menadiona e o Ácido Protocatecuico promove atraso no processo de migração celular

Como o compostos demonstraram a sua especificidade e maior ação sobre as células tumorais, os demais ensaios foram realizados apenas com a linhagem tumoral (UMR-106). As células foram tratadas com 3,12 µM de menadiona de forma isolada, 500 µM de ácido protocatecuico isolado e a associação entre essas duas concentrações, além de ter um grupo controle com meio de cultura com 10% de SFB e 0,08% de DMSO. As imagens das feridas foram obtidas nos períodos de 0, 24, 48 e 72h. Para o período de incubação de 24 horas, o fechamento da ferida foi de 25,93% para o controle, 19,74% para a menadiona, 20,90% para o ácido protocatecuico e 12,24% para a associação entre os compostos. Em 48 horas o fechamento da ferida foi de 63,40%, 56,66%, 46,41% e 29,36% respectivamente. No último período (72h) o fechamento da ferida foi de 94,63%, 86,43%, 76,75% e 53,20% respectivamente. Todas as concentrações foram comparadas com o grupo controle sempre no mesmo período, ou seja, o período de 24h com menadiona, ácido protocatecuido e a

associação foram comparados com o controle também no período de 24h, isso se repetiu para todos os períodos.

Podemos notar o quanto a associação consegue atrasar o processo migratório das células cancerosas em comparação com o controle e os compostos de forma isolada.

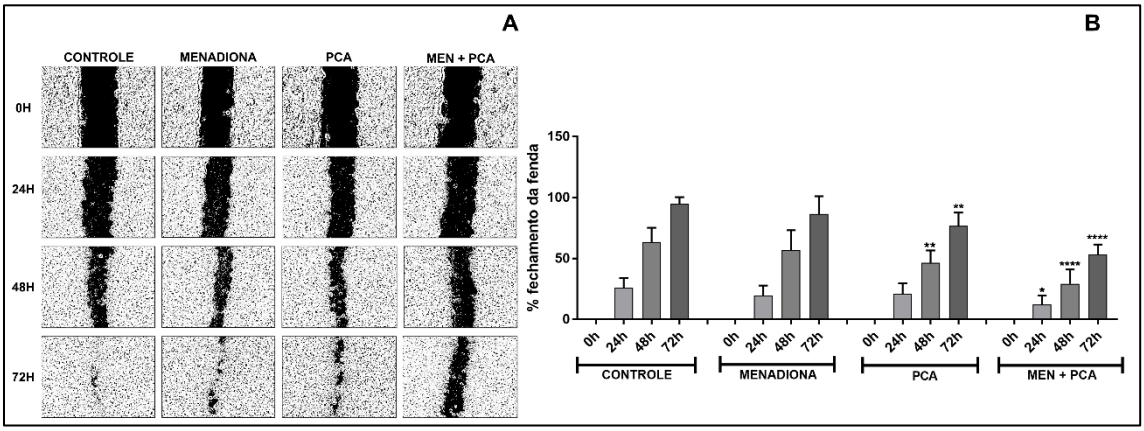


Figura 4. Migração celular – Ensaio de Migração celular pelo método de feridas em células de osteossarcoma (UMR-106) observados nos periodos de 0, 24, 48 e 72h de tratamento com menadiona isolada (3,12 µM), ácido protocatecuico isolado (500 µM) e a associaçao entre eles (3,12 µM + 500 µM). (A) Valores expressos em média e desvio padrão de três experimentos independentes. (B) * P<0,05, ** P< 0,01, *** P<0,001, **** P<0,0001 representam diferenças estatísticas quando comparado ao controle.

3.4 – Quantificação de Apoptose

As células tumorais foram testadas com as concentrações determinadas e utilizadas nos ensaios anteriores. O perfil apoptótico das células foi determinado por citometria de fluxo após 48h de exposição aos tratamentos conforme mostrado na figura 5. As células foram marcadas com Anexiva V-FITC e DRAQ7 para determinar células viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Podemos observar que estatísticamente houve uma diminuição no número de celulas do grupo controle (86,84%) para o do grupo dos compostos associados (78,15%), também é nítida a maior presença de células em apoptose inicial e tardia no grupo tratado com a associação, porém não houve diferença estatística se comparada com grupo controle.

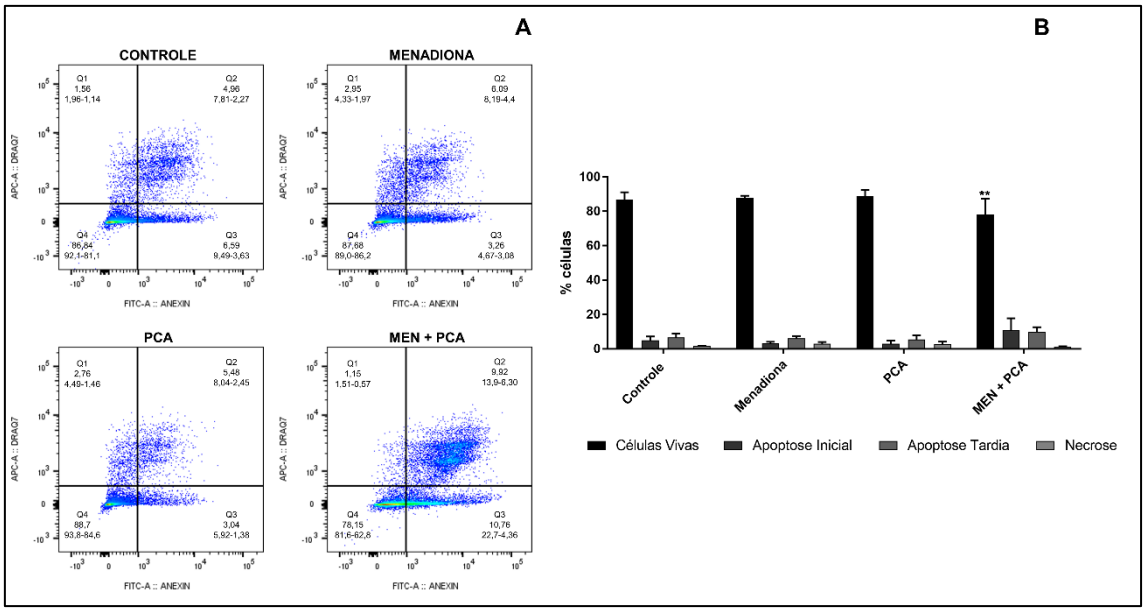


Figura 5. Apoptose – Análise por citometria de Fluxo (A) e análise estatística (B) das células de osteossarcoma (UMR-106) tratadas com menadiona, ácido protocatecuico e a associação entre eles no período de 48h. Legenda dos quadrantes: células vivas (AV-/ DRAQ7-; Q4), necrose (AV-/ DRAQ7+, Q1), apoptose inicial (AV+/ DRAQ7-; Q3) e apoptose tardia (AV+/ DRAQ7; Q2). Valores expressos em média e desvio padrão de dois experimentos independentes com n=3. ** P< 0,01 representa a diferença estatística quando comparado ao controle.

3.5 – A associação entre Menadiona e o Ácido Protocatecuico demonstrou uma modulação na produção de EROs

Os níveis EROS da células UMR-106 tratadas com menadiona, ácido protocatecuico e a associação entre eles foram analizados pelo ensaio de DCFH-DA (Figura 6). No período de 24h e 48h após os tratamentos todos os compostos apresentam diferença na produção de EROs quando comparados ao grupo controle. A menadiona isolada, mesmo em baixa concentração, produz grandes quantidades de EROs por ser uma característica do composto. O que podemos observar é que a associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico reduz drasticamente a produção de EROs nas células cancerosas se comparado a menadiona. Porém, apresenta uma produção grande se comparada ao controle (aproximadamente 2x) . Em ambos os casos, tanto a comparação entre controle e comparação com a menadiona apresentam diferenças estatísticas.

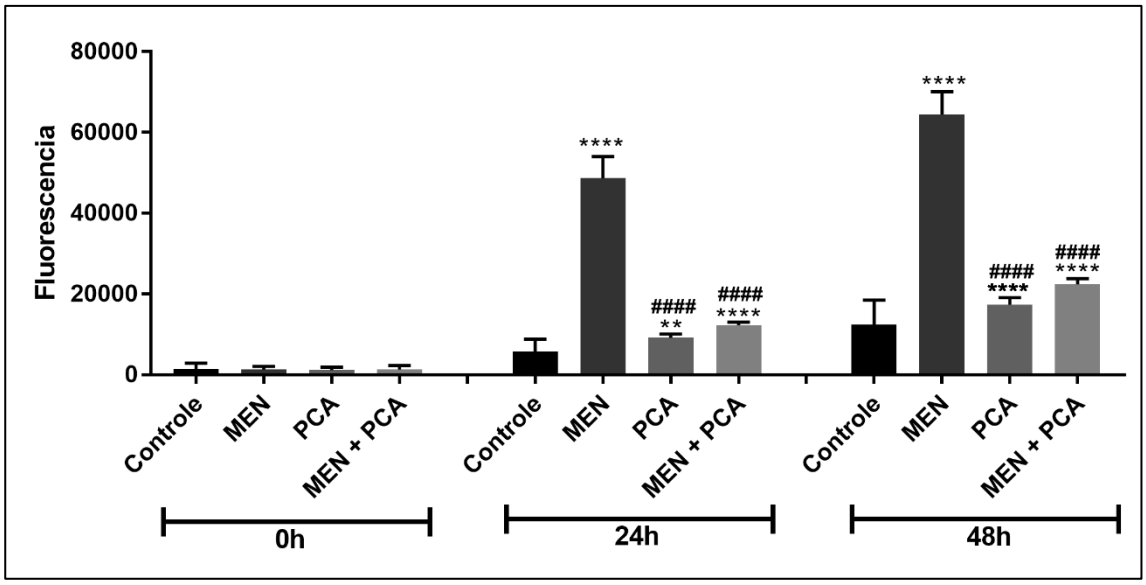


Figura 6. Espécies reativas de Oxigênio – Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após exposição aos tratamentos de menadiona, ácido protocatecuico e a associação entre eles no período de 0, 24 e 48h. Os níveis intracelulares de EROs foram medidos pela sonda DCFH-DA. Valores expressos em média e desvio padrão de três experimentos independentes. ** P< 0,01, *** P<0,001, **** P<0,0001 representam diferenças estatísticas quando comparado ao controle. #### P<0,0001 representam diferenças estatísticas quando comparado a menadiona.

3.5 – Atividade da MMP-2 e MMP-9

A linhagem tumoral foi avaliada sobre os efeitos dos tratamentos na atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 por zimografia. Quanto maior a área de degradação do gel, maior a atividade da metaloproteinase. É possível observar que a associação entre os compostos (menadiona e ácido protocatecuico) apresentou uma mínima tendencia de inibição da atividade da MMP-2 (Figura 7), porém sem significância estatística, já em relação a MMP-9 não se observa qualquer diferença.

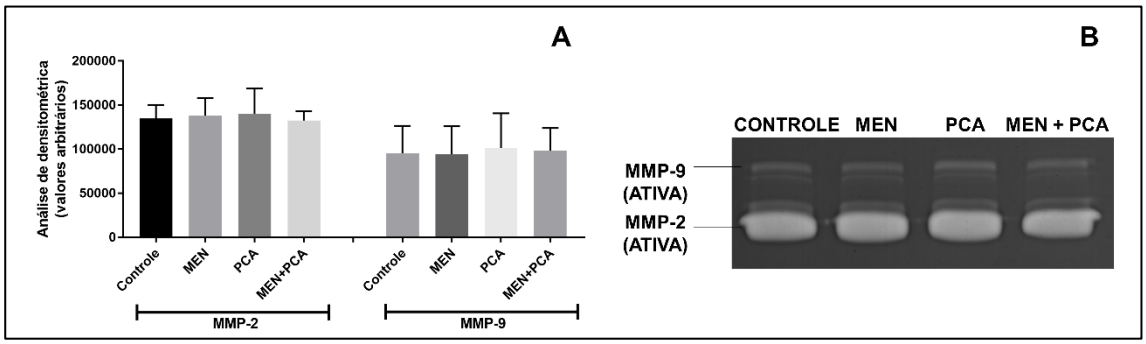


Figura 7. MMP-2 e MMP-9 – Análise densitométrica contendo número arbitrário relacionado a MMP-2 e MMP-9 ativas (A) e Gel representativo demonstrado pelo ensaio de zimografia em 48h (B). Os dados mostrados são de três experimentos independentes.

3.6 – RT-qPCR

O efeito da associação dos compostos, assim como as dosagens separadas, na NADPH oxidase foram avaliados com expressão relativa do mRNA de NOX-1, CYBB (NOX-2) e NOX-4 em relação a β-actina como gene de referência (Figura 6) nas células tumorais. Nenhuma das concentrações tiveram grande efeito na NOX-1 e na NOX-4, apenas a menadiona isolada apresentou uma superexpressão na NOX-1. Na NOX-2 tanto a menadiona quanto a associação diminuiram a sua expressão, tendo a associação uma diminuição mais acentuada.

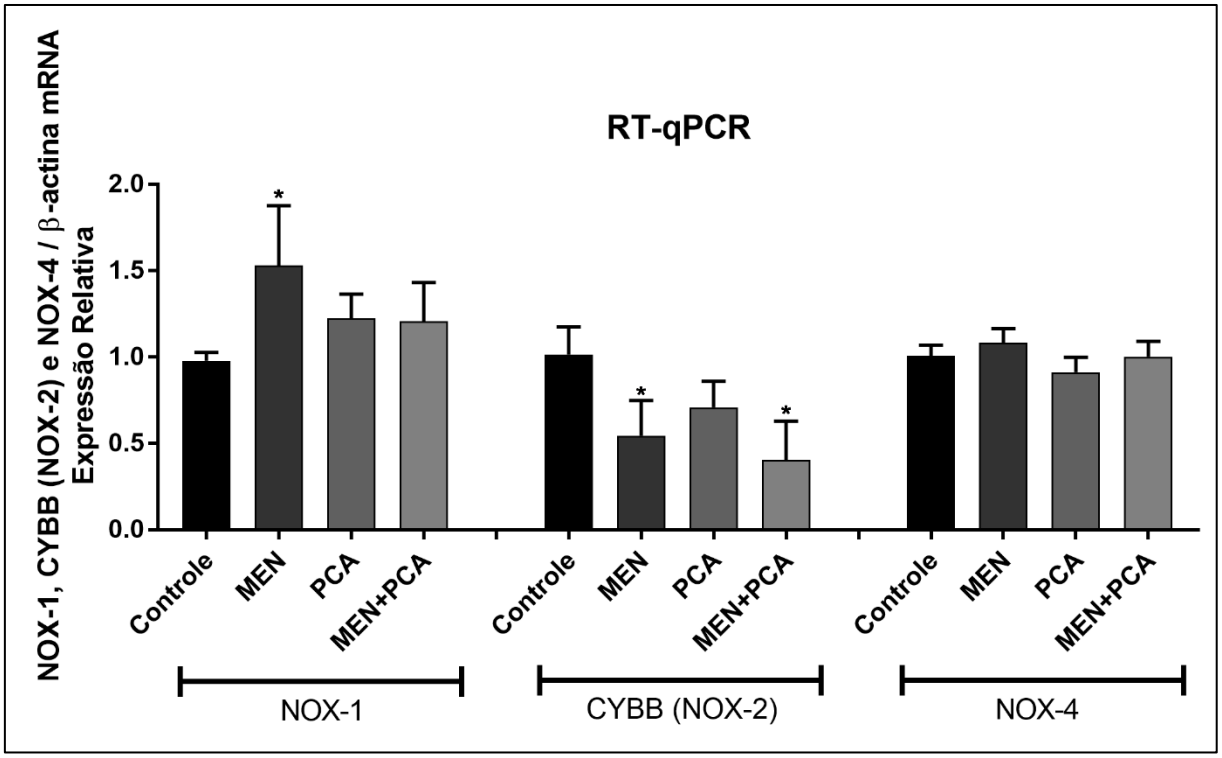


Figura 8. RT-qPCR – Níveis de expressão gênica de NOX-1, CYBB (NOX-2) e NOX-4 em células de osteossarcoma após o tratamento com menadiona, ácido protocatecuico e a associação entre eles no período de 48h. Valores expressos em média e desvio padrão. *P<0,05 representa diferença estatística quando comparado ao controle.

4. Discussão

Compostos naturais vêm demonstrando resultados promissores em diversos tipos de câncer, principalmente no papel de elucidação de mecanismos de ação [6]. Em osteossarcoma, compostos como curcumina, genisteína, resveratrol e beberina aumentaram a apoptose e inibiram migração e invasão de células tumorais [27]. O

CAPE (ester fenetil do ácido cafeico) também demonstrou resultados promissores no tratamento do osteossarcoma com diminuição da viabilidade de células tumorais, migração e produção de EROs [20].

A menadiona já é estudada em vários tipos de canceres, aos quais, demostrou ser eficaz principalmente devido a produção de EROs, apoptose celular e dano mitocondrial [28]. Além disso, a menadiona vem sendo associada a outros medicamentos como o bortezomibe [13] e o ácido ascórbico [29] para potencializar seus efeitos antitumorais.

Outro composto promissor para tratamento do câncer é o ácido protocatecuico, um composto natural com característica antioxidantes, devido ter apresentado efeitos antitumorais correlacionados a produção de EROs, proliferação e apoptose [30]. Porém estudos sobre a associação do ácido protocatecuico com outros medicamentos e compostos ainda é escassa.

Não se encontram na literatura estudos realizados entre a associação da menadiona e ácido protocatecuico em relação ao câncer. Ibitoye & Ajiboye (2018) [31] foram os únicos a associarem a menadiona e o ácido protocatecuico como forma de proteção ao fígado, sem relação com câncer, já que a toxicidade da menadiona é alta e causa grandes efeitos colaterais.

O presente estudo demostrou que a associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico potencializou as propriedades antitumorais dos compostos em células de osteossarcoma (UMR-106) no período de 48 horas, sendo mais eficaz na diminuição de viabilidade celular, o que apresentou um perfil dose-dependente, migração celular e EROs se comparado com os compostos isolados. Além disso, a menadiona associada com o ácido protocatecuico apresentou seletividade para as células tumorais apresentando aproximadamente 45,04% de viabilidade celular para a UMR-106, enquanto, que nas células normais, a MC3T3-E1, a viabilidade foi de aproximadamente 84,35% no ensaio de MTT. Essa mesma seletividade permanece no ensaio colorimétrico de cristal violeta, porém em menor escala, tendo 67,40% de viabilidade celular nas células tumorais e 77,13% em células normais. Essa diferença se dá devido as células tumorais, mesmo depois de mortas, permanecerem aderidas a placa por causa do processo de morte celular [22]. Outra hipótese para essa diferença entre os ensaios de viabilidade seria que a associação causa um maior dano

mitocondrial do que no DNA. Semkova e colaboradores (2020) [29] demonstraram que a associação da menadiona ao ácido ascórbico teve a formação de superóxido mitocondrial e diminuição do potencial da membrana mitocondrial, o que acarretou mais morte celular em três tipos de células cancerígenas se comparado as células normais do mesmo tecido. A formação do superóxido mitocondrial causada pela associação de menadiona e ácido ascórbico pode ser também o fator que induz a seletividade apenas em células tumorais, já que essa produção não foi encontrada em células normais tratadas com os compostos [32].

O maior problema na terapia dos cânceres são as metástases tumorais, no caso do osteossarcoma, ele se infiltra no tecido circundante e se prolifera no pulmão. Mesmo com os avanços na medicina, após a metástase pulmonar, a chance de sobrevivência de 5 anos dos pacientes com osteossarcoma permanecem entre 20-30% [33-35]. O processo migratório das células é o principal na disseminação das metástases, assim, o ensaio de migração pelo método de feridas foi analisado com a ação da associação sobre as células de osteossarcoma. A associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico se mostrou muito mais eficiente na diminuição do processo migratório em relação aos compostos isolados e ao grupo controle. No período de 72h a associação retardou o processo migratório em 46,80% se comparado com o grupo controle. Se compararmos com a menadiona isolada, a associação foi 33,23% mais lenta no fechamento da ferida e 20,55% se comparado com o ácido protocatecuico isolado, demonstrando assim que a associação potencializou a redução do processo migratório. A menadiona isolada já havia demonstrado interferir no processo migratório em células de câncer colorretal [10], assim como o ácido protocatecuico em carcinoma gástrico [36], porém as dosagens utilizadas eram bem maiores do que a deste estudo, o que reforça que a associação é um caminho interessante a se seguir, principalmente devido a toxicidade da menadiona causada pela alta produção de EROs.

Cada vez fica mais evidente que as EROs possuem um papel vital na biologia do câncer. O aumento da produção de EROs contribuem para a sobrevivência e proliferação celular, danos ao DNA, instabilidade genética, adaptações metabólicas, resistência a drogas e morte celular [37]. As EROs são geradas, principalmente, pela NADPH oxidase (NOXs), que é uma família de complexos enzimáticos que geram EROs como produto primário da atividade enzimática [38,39].

Sabemos que a menadiona é conhecida pelo efeito no aumento da produção de EROs, mesmo em pequenas quantidades, assim como as células tumorais. A análise da produção de EROs neste estudo demostrou que a associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico regulou a produção de EROs exagerada da menadiona isolada, podendo ter uma relação direta na morte celular e diminuição da migração que a associação já apresentou em ensaios anteriores. Além disso, a associação demostrou apresentar um perfil pró-oxidante ao invés de antioxidante. Acquaviva e colaboradores (2021) [40] também perceberam isso quando utilizaram o ácido protocatecuico isolado em células de câncer de cólon, onde o composto exibiu um perfil pró-oxidante em concentrações acima de 250 µM devido a uma perturbação na homeostase do ciclo celular redox. Possivelmente, a associação com a menadiona, que já é um composto pró-oxidante, fez com que essa característica também ficasse mais acentuada, porém ainda assim, a associação realizou uma modulação na EROs sendo bem menor do que a produção efetuada pela menadiona de forma isolada. Outro ponto que pode confirmar essa correlação é a diminuição da expressão da NOX-2 causada pela associação dos dois compostos. As NOXs são as grandes responsáveis pelo aumento de proliferação, metástases e danos ao DNA em células de câncer em vitro [41].

A apoptose, o processo de morte programada das células, desempenha papel importante na luta contra o câncer, principalmente por conseguir controlar a proliferação descontrola, causar danos ao DNA, descolamento de matriz das células, entre outras [42]. Quando avaliamos o processo de apoptose pela citometria de fluxo, a associação demonstrou uma menor viabilidade de células, além de ter uma tendência maior na apoptose inicial, porém não se obteve significância estatística.

O mesmo aconteceu na avaliação das MMP-2 e MMP-9, onde não houve relevância na degradação em nenhuma delas, apenas uma pequena tendência na MMP-2 efetuada pela associação. As MMPs desempenham papéis importantes no processo de metástase e progressão tumoral, por isso é um alvo importante, principalmente para terapias alternativas [43].

Em resumo, este é o primeiro estudo a avaliar a associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico em osteossarcoma, sendo a associação muito mais eficaz no tratamento do mesmo *in vitro* se comparado com os compostos isolados. A

associação dos compostos potencializa os efeitos antitumorais, uma vez que, possui seletividade pelas células tumorais, inibe a migração tumoral, além de diminuir a viabilidade celular e a expressão de NOX-2. Além disso, a associação apresentou aumento significativo na produção de EROs quando comparada ao controle, possivelmente como resultado de um aumento no dano mitocondrial causado pelos compostos associados. Ainda assim, estudos são necessários para melhor entendimento dos processos de regulação das vias de geração de espécies reativas de oxigênio, além de encontrar novas achados e aprimorar as propriedades anticâncer.

Esse estudo pode apresentar algumas limitações devido ao número de células utilizadas para cada ensaio ser diferente, consequentemente, as concentrações sofreram ajustes para cada ensaio, podendo assim, afetar o desemprenho das concentrações.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Este estudo foi baseado na tese apresentada pelo primeiro autor à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas. Gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro.

Referências

[1] D. D Moore, H.H Luu. Osteosarcoma. Cancer Treat Res. 162 (2014) 65-92.

[2] S. Bielack, D. Carrlee, P.G Casali, ESMO Guidelines Working Group. Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 20 (4) (2009) 137-9.

[3] F. Jafari, S. Javdansirat, S. Sanaia, A. Naseri, A. Shamekh, D. Rostamzadeh, S. Dolati. Osteosarcoma: A comprehensive review of management and treatment strategies. Ann Diagn Patrol. 49 (2020) 151654.

[4] F. Lamoureux, V. Trichet, C. Chipoy, F. Blanchard, F. Gouin, F. Redini. Recent Advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies. Expert Rev Anticancer Ther. 7 (2) (2007) 169-81.

[5] V. B. Sampson, S. Yoo, A. Kumar, N. S. Vetter, A. Kolb. MicroRNAs and Potential Targets in Osteosarcoma: Review. Front Pediatr. 24 (3) (2015) 69.

[6] P. Angulo, G. Kaushik, D. Subramaniam, P. Dandawate, K. Neville, K. Chastain, S. Anant. Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. J Hematol Oncol. 10 (1) (2017) 10.

[7] D. W. Lamson, S. M. Plaza. The Anticancer Effects of Vitamin K. Altern Med Rev. 8 (3) (2003) 303-18.

[8] C. V. Prasad, V. L. Nayak, S. Ramakrishna, U. V. Mallavadhani. Novel menadione hybrids: Synthesis, anticancer activity, and cell-based studies. Chem Biol Drug Des. 91 (1) (2017) 220-233.

[9] P. Sancro, E. Burgos-Ramos, A. Tavera, T. B. Kheir, P. Jagust, M. Schoenhals, D. Barneda, K. Sellers, R. Campos-Olivas, O. Graña, C. R. Viera, M. Yuneva, B. Sainz Jr, C. Heeschen. MYC/PGC-1α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. Cell Metab. 22 (4) (2015) 590-605.

[10] C. Kishore, S. Sudaram, D. Karunagaran. Vitamin K3 (menadione) suppresses epithelial-mesenchymal-transition and Wnt signaling pathway in human colorectal cancer cells. Chem Biol Interact. 309 (2019) 108725.

[11] J. Huang, Z. Lu, Y. Xiao, B. He, C. Pan, X. Zhou, N. Xu, X. Liu. . Inhibition of Siah2 Ubiquitin Ligase by Vitamin K3 Attenuates Chronic Myeloid Leukemia Chemo-Resistance in Hypoxic Microenvironment. Med Sci Monit. 24 (2018) 727-735.

[12] A. Yamada, S. Osada, T. Tanahashi, S. Matsui, Y. Sasaki, Y. Tanaka, N. Okumura, N. Matsuhashi, T. Takahashi, K. Yamaguchi, K. Yoshida. Novel therapy for locally advanced triple-negative breast cancer. Int J Oncol. 47 (4) (2015) 1266-72.

[13] T. M. Astakhova, A. V. Morozov, P. A. Erokhov, M. I. Mikhailovskaya, S. B. Akopov, N. I. Chupikova, R. R. Safarov, N. P, Sharova. Combined effect of bortezomib and menadione sodium bisulfite on proteasomes of tumor cells: the dramatic decrease of bortezomib toxicity in a preclinical trial. Cancers. 10 (10) (2018) 351.

[14] X. Ren, S. M. Santhosh, L. Coppo, F. T. Ogata, J. Lu, A. Holmgren. The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. Free Radic Biol Med. 134 (2019) 350-358.

[15] R. Masella, C. Santangelo, M. D'Archivio, G. L. Volti, C. Giovannini, F. Galvano. Protocatechuic acid and human disease prevention: biological activities and molecular mechanisms. Curr Med Chem. 19 (18) (2012) 2901-17.

[16] S. Kakkar, S. Bais. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential**.** ISRN Pharmacol. 26 (2014) 952943.

[17] L. Zambonin, C. Caliceti, F. V. D. Sega, D. Fiorentini, S. Hrelia, L. Landi, C. Prata. Dietary phenolic acids act as effective antioxidants in membrane models and in cultured cells, exhibiting proapoptotic effects in leukaemia cells. Oxid Med Cell Longev. (2012) 839298.

[18] Z. Xie, Z. Guo, Y. Wang, J. Lei, J. Yu. Protocatechuic acid inhibits the growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. Phytother Res. 32 (11) (2018) 2256-2263.

[19] S. E. Owumi, S. E. Ochaoga, O. A. Odunola, E. O. Farombi. Protocatechuic acid inhibits testicular and epididymal toxicity associated with methotrexate in rats. Andrologia. 51 (9) (2019) 13350.

[20] A. L. Pagnan, A. S. Pessoa, C. K. Tokuhara, V. S. Fakhoury, G. S. N. Oliveira, M. L. R. Sanches, K. K. Inacio, V. F. Ximenes, R. C. Oliveira. Anti-tumour potential and selectivity of caffeic acid phenethyl ester in osteosarcoma cells. Tissue Cell. 74 (2021) 101705.

[21] L. D. Quarles, D. A. Yohay, L. W. Lever, R. Caton, R. J. Wensturp. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. J Bone Miner Res. 7 (6) (1992) 683-92.

[22] V. S. Fakhoury, A. S. Pessoa, C. K. Tokuhara, A. L. Pagnan, G. S. N. Oliveira, M. R. S. Liessa, K. K. Inacio, F. P. S. R. Melo, A. L. Dokkedal, R. C. Oliveira, L. L. Saldanha. Evaluation of Myrcia bella in murine osteosarcoma cell: Effect of the extract and enriched fractions of tannins and flavonoids. Nat Prod Res. (2021) 1-5.

[23] A. A. Carvalho, P. M. Costa, L. G. S. Souza, T. L. G. Lemos, A. P. N. N. Alves, C. Pessoa, M. O. Moraes. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by biflorin. Life Sci*. 93* (2013) 201–207.

[24] S. S. Matsuda, T. L. Silva, M. A. Buzalaf, A. C. Rodrigues, R. C. Oliveira. Differential effects of fluoride during osteoblasts mineralization in C57BL/6J and C3H/HeJ inbred strains of mice. Biol Trace Elem Res. 161 (1) (2014) 123-9.

[25] A. A. Matos, F. A. Oliveira, A. C. Machado, L. L. Saldanha, C. K. Tokuhara, L, P. Souza, W. Vilegas, T. J. Dionísio, C. Santos, C. Peres-Buzalaf, A. L. Dokkedal, R. Oliveira. An extract from *Myracrodruon urundeuva* inhibits matrix mineralization in human osteoblastos. 237 (2019) 192-201.

[26] F. A. Oliveira, A. A. Matos, M. R. Santesso, C. K. Tokuhara, A. L. Leite, V. S. Bagnato, M. A. A. M. Machado, C. Peres-Buzalaf, R. C. Oliveira. Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. J Photochem Photobiol B. 163 (2016) 14-21.

[27] M. Tobeiha, A. Rajabi, A. Raisi, M. Mohajeri, S. M. Yazdi, A. Davoodvandi, F. Aslanbeigi, M. S. Vaziri, M. R. Hamblin, H. Mirzaei. Potential of natural products in osteosarcoma treatment: Focus on molecular mechanisms. Biomed Pharmacother. 144 (2021) 112257.

[28] K. D. Badave, A. A Khan, S. Y, Rane. Anticancer Vitamin K3 Analogs: A Review. Anticancer Agents Med Chem. 16 (8) (2016) 1017-1030.

[29] S. Semkova, Z. Zhelev, T. Miller, K. Sugaya, I. Aoki, T. Higashi, R. Bakalova. Menadione/Ascorbate Induces Overproduction of Mitochondrial Superoxide and Impairs Mitochondrial Function in Cancer: Comparative Study on Cancer and Normal Cells of the Same Origin. Anticancer Res. 40 (4) (2020) 1963-1972.

[30] S. Zhang, Z. Gai, T. Gui, J. Chen, Q. Chen, Y. Li. Antioxidant Effects of Protocatechuic Acid and Protocatechuic Aldehyde: Old Wine in a New Bottle. Evid Based Complement Alternat Med. (2021) 6139308.

[31] O. B. Ibitoye, T. O. Ajiboye. Protocatechuic acid protects against menadione-induced liver damage by up-regulating nuclear erythroid-related factor 2. Drug Chem Toxical. 43 (6) (2020) 567-573.

[32] R. Bakalova, S. Semkova, D. Ivanova, Z. Zhelev, T. Miller, T. Takeshima, S. Shibata, D. Lazarova, I. Aoki, T. Higashi. Selective Targeting of Cancerous Mitochondria and Suppression of Tumor Growth Using Redox-Active Treatment Adjuvant. Oxid Med Cell Longev. (2020) 6212935.

[33] L. Mirabello, R. J. Troisi, S. A. Savage. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data
from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer. 115 (7) (2009) 1531-43.

[34] M. Ehnaman, W. Chaabane, F. Haglund, P. Tsagkozis. . The Tumor Microenvironment of Pediatric Sarcoma:
Mesenchymal Mechanisms Regulating Cell Migration and Metastasis. Curr. Oncol. Rep. 21 (10) (2019) 90.

[35] C. Yang, Y. Tian, F. Zhao, Z. Chen, P. Su, Y. Li, A. Qian. Bone Microenvironment and Osteosarcoma Metastasis. Int J Mol Sci. 21 (19) (2020) 6985.

[36] H. Lin, J. Chen, F. Chou, C. Wang. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-kB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. British Journal of Pharmacololy. 162 (2011) 237-254.

[37] J. N. Moloney, T. G. Cotter. ROS Signalling in the biology of cancer. Semin Cell Dev Biol. 82 (2018) 50-64.

[38] J. D. Lambeth, A.S. Neish. Nox Enzymes and New thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited. Annu Rev Pathol. 9 (2014) 119-45.

[39] A. C. Little, A. Sulovari, K. Danyal, D. E. Heppner, D. J. Seward, A. Van der Vliet. Paradoxical roles of dual oxidases in cancer biology. **Free Radic Biol Med**. 110 (2017) 117–132.

[40] R. Acquaviva, B. Tomasello, C. Giacomo, R. Santangelo, A. La Mantia, I. Naletova, M. G. Sarpietro, F. Castelli, G. A. Malfa. Protocatechuic Acid, a Simple Plant Secondary Metabolite Induced Apoptosis by Promoting Oxidative Stress through HO-1 Downregulation and p21 Upregulation in Colon Cancer Cells. Biomolecules. 11 (10) (2021) 1485.

[41] K. Roy, Y. Wu, J. L. Meitzler, A. Juhasz, H. Liu, G. Jiang, J. Lu, S. Antony, J. H. Doroshow. NADPH oxidases and cancer. Clin Sci. 128 (12) (2015) 863-75.

[42] J. Lopez, S. W. G. Tait. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. Br J Cancer. 112 (6) (2015) 957-62.

[43] C. K. Tokuhara, M. R. Santesso, G. S. N. Oliveira, T. M. S. Ventura, J. T. Doyama, W. F. Zambuzzi, R. C. Oliveira. Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases. **J** Appl Oral Sci. 27 (2019) 20180596.

3 DISCUSSÃO

3 DISCUSSÃO

Compostos naturais vêm demonstrando resultados promissores em diversos tipos de câncer, principalmente no papel de elucidação de mecanismos de ação (ANGULO et al., 2017). Em osteossarcoma, compostos como curcumina, genisteína, resveratrol e beberina aumentaram a apoptose e inibiram migração e invasão de células tumorais (TOBEIHA et al., 2021). O CAPE (ester fenetil do ácido cafeico) também demonstrou resultados promissores no tratamento do osteossarcoma com diminuição da viabilidade de células tumorais, migração e produção de EROs (PAGNAN et al, 2022).

A menadiona já é estudada em vários tipos de canceres, aos quais, demostrou ser eficaz principalmente devido a produção de EROs, apoptose celular e dano mitocondrial (BADAVE et al., 2016). Além disso, a menadiona vem sendo associada a outros medicamentos como o bortezomibe (ASTAKHOVA et al., 2018) e o ácido ascórbico (SEMKOVA et al., 2020) para potencializar seus efeitos antitumorais.

Outro composto promissor para tratamento do câncer é o ácido protocatecuico, um composto natural com característica antioxidantes, devido ter apresentado efeitos antitumorais correlacionados a produção de EROs, proliferação e apoptose (ZHANG et al., 2021). Porém estudos sobre a associação do ácido protocatecuico com outros medicamentos e compostos ainda é escassa.

Não se encontram na literatura estudos realizados entre a associação da menadiona e ácido protocatecuico em relação ao câncer. Ibitoye & Ajiboye (2018) foram os únicos a associarem a menadiona e o ácido protocatecuico como forma de proteção ao fígado, sem relação com câncer, já que a toxicidade da menadiona é alta e causa grandes efeitos colaterais.

O presente estudo demostrou que a associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico potencializou as propriedades antitumorais dos compostos em células de osteossarcoma (UMR-106) no período de 48 horas, sendo mais eficaz na diminuição de viabilidade celular, o que apresentou um perfil dose-dependente, migração celular e EROs se comparado com os compostos isolados. Além disso, a menadiona associada com o ácido protocatecuico apresentou seletividade para as células tumorais apresentando aproximadamente 45,04% de viabilidade celular para

a UMR-106, enquanto, que nas células normais, a MC3T3-E1, a viabilidade foi de aproximadamente 84,35% no ensaio de MTT. Essa mesma seletividade permanece no ensaio colorimétrico de cristal violeta, porém em menor escala, tendo 67,40% de viabilidade celular nas células tumorais e 77,13% em células normais. Essa diferença se dá devido as células tumorais, mesmo depois de mortas, permanecerem aderidas a placa por causa do processo de morte celular (FAKHOURY et al., 2021). Outra hipótese para essa diferença entre os ensaios de viabilidade seria que a associação causa um maior dano mitocondrial do que no DNA. Semkova e colaboradores (2020) demonstraram que a associação da menadiona ao ácido ascórbico teve a formação de superóxido mitocondrial e diminuição do potencial da membrana mitocondrial, o que acarretou mais morte celular em três tipos de células cancerígenas se comparado as células normais do mesmo tecido. A formação do superóxido mitocondrial causada pela associação de menadiona e ácido ascórbico pode ser também o fator que induz a seletividade apenas em células tumorais, já que essa produção não foi encontrada em células normais tratadas com os compostos (BAKALOVA et al., 2020).

O maior problema na terapia dos cânceres são as metástases tumorais, no caso do osteossarcoma, ele se infiltra no tecido circundante e se prolifera no pulmão. Mesmo com os avanços na medicina, após a metástase pulmonar, a chance de sobrevivência de 5 anos dos pacientes com osteossarcoma permanecem entre 20-30% (MIRABELO et al., 2009; EHNMAN et al., 2019; YANG et al., 2020). O processo migratório das células é o principal na disseminação das metástases, assim, o ensaio de migração pelo método de feridas foi analisado com a ação da associação sobre as células de osteossarcoma. A associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico se mostrou muito mais eficiente na diminuição do processo migratório em relação aos compostos isolados e ao grupo controle. No período de 72h a associação retardou o processo migratório em 46,80% se comparado com o grupo controle. Se compararmos com a menadiona isolada, a associação foi 33,23% mais lenta no fechamento da ferida e 20,55% se comparado com o ácido protocatecuico isolado, demonstrando assim que a associação potencializou a redução do processo migratório. A menadiona isolada já havia demonstrado interferir no processo migratório em células de câncer colorretal (KISHORE et al., 2019), assim como o ácido protocatecuico em carcinoma gástrico (LIN et al., 2011), porém as dosagens utilizadas eram bem maiores do que a deste estudo, o que reforça que a associação é um

caminho interessante a se seguir, principalmente devido a toxicidade da menadiona causada pela alta produção de EROs.

Cada vez fica mais evidente que as EROs possuem um papel vital na biologia do câncer. O aumento da produção de EROs contribuem para a sobrevivência e proliferação celular, danos ao DNA, instabilidade genética, adaptações metabólicas, resistência a drogas e morte celular (MOLONEY; COTTER, 2018). As EROs são geradas, principalmente, pela NADPH oxidase (NOXs), que é uma família de complexos enzimáticos que geram EROs como produto primário da atividade enzimática (LAMBETH; NEISH, 2014; LITTLE et al., 2017).

Sabemos que a menadiona é conhecida pelo efeito no aumento da produção de EROs, mesmo em pequenas quantidades, assim como as células tumorais. A análise da produção de EROs neste estudo demostrou que a associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico regulou a produção de EROs exagerada da menadiona isolada, podendo ter uma relação direta na morte celular e diminuição da migração que a associação já apresentou em ensaios anteriores. Além disso, a associação demostrou apresentar um perfil pró-oxidante ao invés de antioxidante. Acquaviva e colaboradores (2021) também perceberam isso quando utilizaram o ácido protocatecuico isolado em células de câncer de cólon, onde o composto exibiu um perfil pró-oxidante em concentrações acima de 250 µM devido a uma perturbação na homeostase do ciclo celular redox. Possivelmente, a associação com a menadiona, que já é um composto pró-oxidante, fez com que essa característica também ficasse mais acentuada, porém ainda assim, a associação realizou uma modulação na EROs sendo bem menor do que a produção efetuada pela menadiona de forma isolada. Outro ponto que pode confirmar essa correlação é a diminuição da expressão da NOX-2 causada pela associação dos dois compostos. As NOXs são as grandes responsáveis pelo aumento de proliferação, metástases e danos ao DNA em células de câncer em vitro (ROY et al., 2015).

A apoptose, o processo de morte programada das células, desempenha papel importante na luta contra o câncer, principalmente por conseguir controlar a proliferação descontrola, causar danos ao DNA, descolamento de matriz das células, entre outras (LOPEZ; TAIT, 2015). Quando avaliamos o processo de apoptose pela citometria de fluxo, a associação demonstrou uma menor viabilidade de células, além

de ter uma tendência maior na apoptose inicial, porém não se obteve significância estatística.

O mesmo aconteceu na avaliação das MMP-2 e MMP-9, onde não houve relevância na degradação em nenhuma delas, apenas uma pequena tendência na MMP-2 efetuada pela associação. As MMPs desempenham papéis importantes no processo de metástase e progressão tumoral, por isso é um alvo importante, principalmente para terapias alternativas (TOKURAHA et al., 2019.

Em resumo, este é o primeiro estudo a avaliar a associação entre a menadiona e o ácido protocatecuico em osteossarcoma, sendo a associação muito mais eficaz no tratamento do mesmo *in vitro* se comparado com os compostos isolados. A associação dos compostos potencializa os efeitos antitumorais, uma vez que, possui seletividade pelas células tumorais, inibe a migração tumoral, além de diminuir a viabilidade celular e a expressão de NOX-2. Além disso, a associação apresentou aumento significativo na produção de EROs quando comparada ao controle, possivelmente como resultado de um aumento no dano mitocondrial causado pelos compostos associados. Ainda assim, estudos são necessários para melhor entendimento dos processos de regulação das vias de geração de espécies reativas de oxigênio, além de encontrar novas achados e aprimorar as propriedades anticâncer.

Esse estudo pode apresentar algumas limitações devido ao número de células utilizadas para cada ensaio ser diferente, consequentemente, as concentrações sofreram ajustes para cada ensaio, podendo assim, afetar o desemprenho das concentrações.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACQUAVIVA, R. et al. Protocatechuic Acid, a Simple Plant Secondary Metabolite Induced Apoptosis by Promoting Oxidative Stress through HO-1 Downregulation and p21 Upregulation in Colon Cancer Cells. **Biomolecules**. v. 11, 1485, 2021.

AMIRHOSSEIN M, et al. Osteosarcoma: a comprehensive review. **SICOT-J**. v. 4, p. 12, 2018.

ANGULO, P. et al. Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. **Journal of Hematology and Oncology**. v. 10, n.1, Jan. 2017.

ASTAKHOVA, T. et al. Combined effect of bortezomib and menadione sodium bisulfite on proteasomes of tumor cells: the dramatic decrease of bortezomib toxicity in a preclinical trial. **Cancers**. v. 10, n. 351, 2018.

BADAVE, K.D. et al. Anticancer Vitamin K3 Analogs: A Review**. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 1017-1030.

BAKALOVA, R. et al. Selective Targeting of Cancerous Mitochondria and Suppression of Tumor Growth Using Redox-Active Treatment Adjuvant. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 6212935, 2020.

BASU-ROY, U.; BASILICO, C.; MANSUKHANI, A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. **Cancer Letters**. v. 338, p. 158–167, 2013.

BIELACK, S.; CARRLE, D.; CASALI, P. G. Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 20, n. SUPPL. 4, p. 137–140, 2009.

CARMONA-FONTAINE, C. et al. Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 11, p. 2934–2939, 2017.

DENDULURI, S. K. et al. Molecular pathogenesis and therapeutic strategies of human osteosarcoma. **Journal of Biomedical Research.** v. 30, n.1, p. 5- 18, 2015.

EHNMAN, M. et al. The Tumor Microenvironment of Pediatric Sarcoma: Mesenchymal Mechanisms Regulating Cell Migration and Metastasis**. Current Oncology.** Report. v. 21, 2019.

FAKHOURY, V, S. et al. Evaluation of Myrcia bella in murine osteosarcoma cell: Effect of the extract and enriched fractions of tannins and flavonoids. **Natural Products Research**. p. 1-5, 2021.

GAO Y. et al. CD44 is a direct target of miR-199a-3p and contributes to aggressive progression in osteosarcoma. **Scientific Reports**. v. 5, p. 11365, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HASSAN, G. S. Menadione. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**. v. 38, p. 228-303, 2013.

HUANG, J. et al. Inhibition of Siah2 Ubiquitin Ligase by Vitamin K3 Attenuates Chronic Myeloid Leukemia Chemo-Resistance in Hypoxic Microenvironment**.** **Medical Science Monitor**. v. 24, p. 727-735, 2018.

IBITOYE, O.B; AJIBOYE, T.O. Protocatechuic acid protects against menadione-induced liver damage by up-regulating nuclear erythroid-related factor 2. **Drug and Chemical Toxicology**. 1523187, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva**. 2019. Disponível em: < https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf > Acesso em: 25/11/2021

JAFARI, F. et al. A comprehensive review of management and treatment strategies. **Annals of Diagnostic Pathology**. v. 49, p. 151654, 2020.

KAKKAR, S; BAIS, S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential**. ISRN Pharmacology**. p. 952943, 2014.

KISHORE, C; SUNDARAM, S; KARUNAGARAN, D. Vitamin K3 (menadione) suppresses epithelial-mesenchymal-transition and Wnt signaling pathway in human colorectal cancer cells. **Chemico-Biological Interactions.** v. 309, 108725, 2019.

LAMBETH, J.D; NEISH, A.S. Nox Enzymes and New thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. v. 9, p. 119-145, 2014.

LAMOUREUX, F. et al. Recent advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies. **Expert Review Anticancer Therapy**, v. 7, p. 169–181, 2007.

LANSON, D.W; PLAZA, S.M. The Anticancer Effects of Vitamin K. **Alternative Medicine Revies**. v. 8, n. 3, p. 303-318, 2003.

LIN, H. et al. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-kB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. **British Journal of Pharmacololy**. v. 162, p. 237-254, 2011.

LITTLE, A. C. et al. Paradoxical roles of dual oxidases in cancer biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 110, n. 1, p. 117–132, 2017.

LOPES, J; TAIT, S.W.G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within**. British Journal of Cancer**. v. 112, p. 957-962, 2015.

MASELLA, R. et al. Protocatechuic acid and human disease prevention: biological activities and molecular mechanisms. **Currenty Medical Chemistry**. v. 19, p. 2901-2917, 2012.

MIRABELLO, L. et al. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer**. v. 115, p. 1531-1543, 2009.

MOLENEY, J.N; COTTER, T.G. ROS Signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology.** v. 80, p. 50-64, 2018.

MOORE, D. D.; LUU, H. H. Osteosarcoma. **Cancer Treatment and Research**. v. 162, p. 65-92, 2014

OWUMI, S, E. et al. Protocatechuic acid inhibits testicular and epididymal toxicity associated with methotrexate in rats. **Andrologia.** v. 51, p. 13350, 2019.

PRASAD, C. V. et al. Novel menadione hybrids: Synthesis, anticancer activity, and cell-based studies. **Chemical Biology and Drug Desing.** v. 91, p. 220-14, 2017.

REN, X. et al. The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 134, p. 350-358, 2019.

ROY, K. et al. NADPH oxidases and cancer. **Clinical Science**, v. 128, n. 12, p. 863–875, 2015.

SAMPSON, V.B. et al. MicroRNAs and Potential Targets in Osteosarcoma: Review. **Frontiers Pediatrics**. v. 3, n. 69, 2015.

SANCRO, P. et al. MYC/PGC-1α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. **Cell Metabolism.** v. 22, p. 590-605, 2015.
SEMAMING, Y. et al. Pharmacological properties of protocatechuic acid and its potential roles as complementary medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 593–602, 2015.

SEMKOVA, S. et al. Menadione/Ascorbate Induces Overproduction of Mitochondrial Superoxide and Impairs Mitochondrial Function in Cancer: Comparative Study on Cancer and Normal Cells of the Same Origin. **Anticancer Research**. v. 20, p. 1963-1972, 2020.

SIEGEL, R.L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 71, n. 1, p. 7-33, 2021.

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

TOKUHARA, C.K. et al. Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases. **Journal of Applied Oral Science.** v. 27, p. 20180596, 2019.

VARI, R. et al. Protocatechuic acid induces antioxidant/detoxifying enzyme expression through JNK-mediated Nrf2 activation in murine macrophages. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 22, p. 409-417, 2011.

VITAGLIONE, P. et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides**. Journal of Nutrition**. v. 137, p. 2043-2048, 2007.

XIE, Z. et al. Protocatechuic acid inhibits the growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. **Phytotherapy Research.** v. 32, p. 2256-2263, 2018.

YAMADA, A. et al. Novel therapy for locally advanced triple-negative breast cancer. **International Journal of Oncology**. v. 47, p. 1266-1272, 2015.

YANG, C. et al. Bone Microenvironment and Osteosarcoma Metastasis**. International Journal of Molecular Sciences**. v. 21, 6985, 2020.

ZAMBONIN, L. et al. Dietary phenolic acids act as effective antioxidants in membrane models and in cultured cells, exhibiting proapoptotic effects in leukaemia cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** p. 1–12, 2012.

ZHANG, S. et al. Antioxidant Effects of Protocatechuic Acid and Protocatechuic Aldehyde: Old Wine in a New Bottle. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 6139308. 2021.

ZOU, J. ; ZHANG, W. ; LI, X.L. Effects of SOST Gene Silencing on Proliferation, Apoptosis, Invasion, and Migration of Human Osteosarcoma Cells Through the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway. **Calcified Tissue International**. v. 6, p. 551-564, 2017.