

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PROPRIEDADES CITOTÓXICAS DA β LAPACHONA EM CÉLULAS
DE OSTEOSSARCOMA *IN VITRO***

Gabriela Hadler Gabriel
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA
2017



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Gabriela Hadler Gabriel

Título do trabalho: Propriedades citotóxicas da β lapachona em células de osteossarcoma *in vitro*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO¹**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Gabriela Hadler Gabriel
Assinatura do (a) autor(a) ²

Data: 09 / 04 / 2017

GABRIELA HADLER GABRIEL

**PROPRIEDADES CITOTÓXICAS DA β LAPACHONA EM CÉLULAS
DE OSTEOSSARCOMA *IN VITRO***

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal junto
à Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo – EVZ/UFG

Comitê de Orientação;

Prof. Dr. Cesario Bianchi – Brown University

GOIÂNIA
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Hadler Gabriel, Gabriela

Propriedades Citotóxicas da beta lapachona em células de osteossarcoma in vitro [manuscrito] / Gabriela Hadler Gabriel, Eugênio Gonçalves de Araújo, Leandro Lopes Nepomuceno. - 2017. 42 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo; co-orientador Dr. Cesário Bianchi Filho .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui fotografias, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. cultivo celular. 2. linhagem MG-63. 3. naftoquinona. 4. neoplasia óssea. I. Gonçalves de Araújo, Eugênio. II. Lopes Nepomuceno, Leandro. III. Gonçalves de Araújo, Eugênio, orient. IV. , Cesário Bianchi Filho, co-orient. V. Título.

CDU 577.2



1 ATA NÚMERO 467 DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
 2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
 3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às 08h30min do dia 09/03/2017, reuniu-se na sala
 4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra
 5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo
 6 (a) Pós-Graduando (a) **Gabriela Hadler Gabriel**, intitulada: "*Propriedades citotóxicas da Beta-*
 7 *Lapachona em células de osteossarcoma in vitro*", apresentado para obtenção do Título de Mestre
 8 em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia Animal**, desta
 9 Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo**,
 10 iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Gabriela Hadler Gabriel** para
 11 exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra,
 12 pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a),
 13 durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder
 14 aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a
 15 Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a)

16 **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

17 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo (Orientador (a)) Aprovada
 18 Profa. Dra. Vanessa de Souza Cruz Pimenta Aprovada
 19 Prof. Dr. Cairo Henrique Sousa de Oliveira Aprova

20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Gabriela Hadler**
 21 **Gabriel**, Habilitada [(**Habilitado(a)** ou não **Habilitado(a)**] pelo(s)

22 motivo(s) abaixo exposto(s):

23 A candidata expôs seu trabalho no tempo regulamen-
 24 tar e respondeu de forma satisfatória os questionamentos
 25 dos membros da Banca Examinadora.

26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33

34 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

35 *Não se aplica, mantido o título original*

36

37

38

39


40

41 Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo** lavrei a presente ata que,
42 após lida e achada conforme foi por todos assinada.

43 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

44 Profa. Dra. Vanessa de Souza Cruz Pimenta

45 Prof. Dr. Cairo Henrique Sousa de Oliveira



Dedico inteiramente este trabalho aos meus pais, Diva Maria Hadler e Luiz Claudio Gabriel, que me ensinaram a amar a vida e os estudos, me apoiam incondicionalmente e me enchem de amor.

AGRADECIMENTOS

A Andrea Hadler Gabriel, Diva Hadler e Luiz Gabriel. Obrigada família! Vocês são meu esteio, fonte de apoio e incentivo.

A minha avó, Nyria Gusmão Hadler, que mesmo não estando mais entre nós, será sempre minha maior fonte de inspiração e fé.

Ao Murilo de Paula Gomide, por todo carinho, dedicação e amor.

Ao Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, pela paciência, ensinamentos, confiança e orientação única.

A Vanessa de Sousa Cruz, pela coorientação, conselhos, parceria e amizade que me fizeram mais forte.

Ao MSc. Leandro Lopes Nepomuceno, pela amizade, troca de experiências, descontração e pela imensa contribuição em todas as etapas deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da banca enriquecendo o trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório Multiusuário de Cultivo Celular do PPGCA, Fernanda Almeida Rodrigues, Karla Márcia da Silva Braga e Nara Cristina Silva, pelo companheirismo, carinho, risadas, bons momentos e por todo auxílio a mim prestado.

Aos pequenos Biel, Juca e Tuia, por serem meus companheiros e fonte de carinho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos concedida.

A todos os pacientes que sofrem com essa triste doença que é o câncer.

A Deus, por ter me iluminado e me guiado, e por ter acolhido a todas as minhas preces.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. Biologia tumoral e Carcinogênese	1
2. Osteossarcoma.....	3
3. Quimioterápicos Utilizados na Terapia do Osteossarcoma.....	7
3.1. Doxorrubicina.....	7
3.2. Cisplatina.....	8
3.3. Metotrexato.....	8
3.4. Ifosfamida.....	9
4. Busca por novos agentes antineoplásicos	9
5. β Lapachona	11
6. Objetivos.....	13
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2 – β LAPACHONA REDUZ A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	19
RESUMO	19
β LAPACHONE REDUCES <i>IN VITRO</i> PROLIFERATION OF OSTEOSSARCOMA CELLS	19
ABSTRACT	19
Introdução.....	20
Materiais e métodos.....	20
Células e cultura	20
Avaliação da viabilidade celular (VC) pelo método de exclusão do azul de Tripán.....	21
Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio	21
Ensaio de sobrevivência celular	22
Resultados e Discussão.....	23
TABELA 3 - Ensaio de sobrevivência celular. Médias do número de células de osteossarcoma sobreviventes em relação a diferentes concentrações e tempos de exposição à β Lapachona (β LP).....	26
Conclusão	28
Referências	28
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	31

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 – Estruturas químicas dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento do osteossarcoma. A) Estrutura química da doxorubicina. B) Estrutura química da cisplatina. C) Estrutura química do metotrexato. D) Estrutura química da ifosfamida..... 7
- FIGURA 2 – Estrutura química da β lapachona..... 12
- FIGURA 3 – Ipês amarelos em um condomínio horizontal de Goiânia, Goiás 12

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 – Imagens representativas de duas amostras do ensaio de VC das células de OS após tratamento com β LP. A) Concentração 0,1 μ M, G₂₄; VC = 53,8%. Células viáveis não coradas (setas). B) Concentração 1,0 μ M, G₇₂; VC = 5,3%. As células não viáveis coradas (setas). Método de exclusão do Azul de Tripán. Contagem feita em contador celular automatizado LunaTM..... 234
- FIGURA 2 – Ensaio da VC pelo método de exclusão do Azul de Tripán. A) Média da VC de cada grupo por tempo de exposição à β LP e por concentração. B) CT de cada grupo por tempo de exposição à β LP e concentração. Análise realizada por contador de células automatizado LunaTM..... 245
- FIGURA 3 – Fração de sobrevivência das células após o tratamento com β lapachona. 38

LISTA DE QUADROS**CAPÍTULO 1**

QUADRO 1 - Principais oncogenes e neoplasias humanas associadas.	3
QUADRO 2 - Classificação do osteossarcoma e principais características histológicas.....	5

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2**

TABELA 1 – Viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) de cada grupo por concentração e tempo de exposição à β Lapachona (β LP) pelo método de exclusão do Azul de Tripán.	245
TABELA 2 - Resultados do F calculado para os grupos de tratamento com diferentes concentrações e tempo de exposição à β LP.	256
TABELA 3 - Ensaio de sobrevivência celular. Médias do número de células de osteossarcoma sobreviventes em relação a diferentes concentrações e tempos de exposição à β Lapachona (β LP).	267
TABELA 4 - Cálculo das variâncias e valores do F calculado para os grupos de tratamento com diferentes concentrações e tempo de exposição à β LP.	289

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
βLP	β lapachona
CCAT	Número de células contadas após o tratamento
CCGC	Número de células contadas no grupo controle após o tratamento
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Citotoxicidade
DMEM	Meio dulbeco modificado de Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FA	Fosfatase alcalina
FS	Frações de sobrevivência
G24	Grupo tratado por 24 horas
G48	Grupo tratado por 48 horas
G72	Grupo tratado por 72 horas
GC	Grupo controle
HCl	Ácido clorídrico
IC50	<i>Inhibitory concentration</i>
LDH	Desidrogenase láctica
MMP	Metaloproteinases de matriz
MTT	Tetrazólio (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphenyl-2H-tetrazólio
N	Normal, Equivalente grama
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina
OS	Osteossarcoma
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
rcf(g)	do inglês <i>Relative centrifugal force</i>
RMI	Ressonância magnética
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minutos
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SFB	Soro fetal bovino
TC	Tomografia computadorizada
UV	Ultravioleta
VC	Viabilidade celular

RESUMO

O osteossarcoma é o principal tumor ósseo primário, com prognóstico desfavorável, alta mortalidade e elevada incidência de metástases. O tratamento de escolha é remoção do tumor associada à quimioterapia combinada, cujos efeitos adversos aludem à necessidade crescente de desenvolver novos medicamentos. As plantas constituem grandes reservas naturais de compostos que possuem propriedades medicinais e terapêuticas, como o lapachol e seu derivado, a β lapachona. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos da β lapachona em células de osteossarcoma cultivadas *in vitro*. As células foram cultivadas e tratadas com a β lapachona em diferentes concentrações e tempos de exposição. Foram realizados os métodos de exclusão com azul de Tripán, redução do tetrazólio e ensaio de sobrevivência celular para avaliar os efeitos do composto sobre as células. As células tratadas com $0,1\mu\text{M}$ de β lapachona apresentaram menor citotoxicidade inicial, no tempo de 24h, enquanto aquelas submetidas a $1,0\mu\text{M}$ apresentaram menor viabilidade após 72h de tratamento. A citotoxicidade aumentou de acordo com o aumento da concentração e tempo de exposição. O menor IC_{50} ($0,148\mu\text{M}$) foi observado nas células tratadas por 72h. O crescimento celular após o tratamento foi menor grupo sob concentração de $1,0\mu\text{l}$ após 72h e o maior crescimento celular foi observado sob concentração de $0,1\mu\text{l}$ após 24h. Não houve diferença entre grupos quanto à proliferação celular após o tratamento tendo a fração de sobrevivência das células sido menor após 72h de exposição. Concluiu-se que β lapachona apresenta efeitos citotóxicos em células de osteossarcoma cultivadas *in vitro*.

Palavras-chave: cultivo celular, linhagem MG-63, naftoquinona, neoplasia óssea.

ABSTRACT

Osteosarcoma is the main primary bone tumor, with unfavorable prognosis, high mortality and high incidence of metastases. The treatment of choice is the removal of the tumor associated with combined chemotherapy, whose adverse effects allude to the increasing need to develop new drugs. The plants constitute a large natural reserve of compounds that have medicinal and therapeutic properties, such as lapachol and its derivative, β -lapachone. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effects of β -lapachone in osteosarcoma cells cultured in vitro. Cells were cultured and treated with β -lapachone at different concentrations and times of exposure. Tripan blue exclusion, tetrazolium reduction and cell survival assay methods were performed to evaluate the effects of the compound on the cells. Cells treated with 0,1 μ M β -lapachone showed lower initial cytotoxicity in the 24h time, whereas those submitted to 1,0 μ M showed less viability after 72h of treatment. Cytotoxicity increased as the concentration and time of exposure increased. The lowest IC₅₀ (0,148 μ M) was observed in treated cells for 72h. Cell growth after treatment was lower in the 1.0 μ l group after 72h and the highest cell growth was observed under a concentration of 0.1 μ l after 24h. There was no difference between groups for cell proliferation after treatment, and the cell survival fraction was lower after 72h of exposure. It was concluded that β -lapachone has cytotoxic effects on osteosarcoma cells cultured in vitro.

Key words: bone tumor, cell culture, MG-63 cell line, naphthoquinone.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Ainda que os sarcomas ósseos primários sejam raros, o osteossarcoma é o de maior prevalência¹, afetando principalmente crianças, adolescentes e jovens adultos^{1,2}. O tumor se caracteriza pela formação direta de osso imaturo ou tecido osteóide pelas células tumorais, com origem na metáfise dos ossos longos, como o fêmur³.

O tumor é maligno e bastante agressivo, resultando na morte 40 a 50% dos pacientes acometidos⁴ e causando metástases em 85% dos doentes, tendo o pulmão como principal alvo². O tratamento principal consiste na remoção cirúrgica do tumor primário e na associação de agentes antineoplásicos⁴. As drogas mais utilizadas são a doxorrubicina, cisplatina, metotrexato e ifosfamida⁵.

A incidência de reações adversas que ocorrem em decorrência do uso dos quimioterápicos justifica a busca por novos medicamentos. Nos últimos anos, houve um crescimento no número de pesquisas para a descoberta de novos agentes, utilizando-se muitas vezes plantas e outras fontes encontradas na natureza⁶. Destaca-se o Cerrado brasileiro, o qual abriga uma variedade de plantas com efeitos medicinais e com potencial para a atuação como agentes quimioterápicos, muitas delas tendo efeitos tranquilizantes, antibióticos, analgésicos e antineoplásicos⁷.

Em várias famílias de plantas podem ser encontrados compostos derivados das quinonas, as chamadas naftoquinonas, cujos derivados, assim como o lapachol, apresentam elevado potencial citotóxico e genotóxico, interagindo com biomoléculas e agindo na ação das enzimas envolvidas nos processos proliferativos das células^{8,9,10}.

O lapachol pode ser convertido em α e β lapachona, sendo esta segunda a de maior interesse para a oncologia¹¹. A β lapachona vem sendo cada vez mais objeto de pesquisa. Ela age aniquilando grupos sulfidríla de enzimas, promovendo apoptose de células e induzindo a formação de espécie reativas de oxigênio (ROS)¹². Ainda, possui uma importante ação de inibição da enzima topoisomerase I, fato que desperta o interesse de cientistas e pesquisadores para que sejam realizados estudos sobre sua ação antineoplásica em diversos tipos de tumores¹³.

1. Biologia tumoral e Carcinogênese

Um crescimento de forma rápida, agressiva e descontrolada ocorre no câncer, o qual se caracteriza pela perda do controle da divisão celular e capacidade invasiva em outras

estruturas, dando origem às metástases. A enfermidade surge a partir de mutações nas células que ocorrem pela ação de agentes carcinogênicos, ou alterações decorrentes de doenças no genoma, como as síndromes hereditárias¹⁴.

Os agentes carcinogênicos podem ser físicos, como no caso da radiação ionizante e UV, químicos, como os agrotóxicos e os hormônios, e também biológicos, como os vírus Epstein-Barr e papiloma vírus humano. Eles possuem a capacidade de promover mudanças genéticas na célula, atuando também nos oncogenes, e dando origem a células malignas¹⁵.

A oncogênese é composta por três etapas principais: iniciação, onde ocorre a ação dos agentes sobre os genes, promoção e progressão, que se caracteriza pela divisão descontrolada da célula, sendo o processo nesse último estágio considerado irreversível¹⁴.

Na formação dos tumores também atuam os oncogenes (Quadro 1), os quais possuem a capacidade de codificar proteínas e induzirem a multiplicação desordenada de células, dando origem às neoplasias. Nas células normais, os oncogenes participam de processos de reparo do DNA, apoptose e controle do ciclo celular¹⁶.

Os principais oncogenes envolvidos nos mecanismos de origem do osteossarcoma são os genes Rb, Sis e p53¹⁷. O gene Sis é derivado de um fator de crescimento ativado por plaquetas (PDGF), e a principal característica de uma célula transformada por esse gene é a secreção de PDGF¹⁸.

O osteossarcoma também abriga mutações na via do gene Rb, e cerca de 60% ou mais dos pacientes apresentam anormalidade associadas a esse oncogene. Normalmente, a proteína Rb atua no bloqueio da proliferação celular; porém, caso ocorram alterações nessa via, a célula se torna insensível aos fatores de crescimento que bloqueiam o ciclo celular, o que resulta em proliferação desordenada¹⁹.

Já a p53 se acumula no núcleo nos casos de agressão as células e é capaz de induzir a apoptose ou parada do ciclo celular²⁰. Ela é a principal reguladora da replicação celular. A frequência de mutações do gene associado à essa proteína no osteossarcoma humano varia de 15 a 50%. Quando ocorrem alterações na p53, a célula afetada é capaz de se replicar de forma incontrolada¹⁹ e sobreviver, já que a proteína mutante passa a exercer efeito protetor contrário, não permitindo que ocorra a apoptose da célula tumoral²⁰.

A p53 é a proteína mais comumente inativada nos casos de câncer humano, e indivíduos com a síndrome de Li-Fraumeni expressam p53 mutante com maior frequência, o que está relacionado a maior incidência de osteossarcoma nos portadores dessa doença²¹.

QUADRO 1 - Principais oncogenes e neoplasias humanas associadas.

PROTO-ONCOGENE	NEOPLASIAS ASSOCIADAS
Sis	Astrocitoma e osteossarcoma
erb-B2	Câncer de mama, ovário, estômago e pulmão
erb-B3	Câncer de mama
Fms	Leucemia
Ras	Câncer de pulmão, cólon e pâncreas
Rb	Retinoblastoma e osteossarcoma
p53	Síndrome de Li-Fraumeni, carcinomas de mama e sarcomas
APC	Carcinoma de cólon
WT-1	Tumor de Wilms
L-myc	Carcinoma de pequenas células do pulmão
Myc	Linfoma de Burkitt

Fonte: Adaptado de Lopes et al¹⁶.

2. Osteossarcoma

O osteossarcoma é um tumor de origem mesenquimal, onde as células neoplásicas produzem matriz osteóide. É a neoplasia óssea primária de maior ocorrência e acomete preferencialmente crianças e jovens adultos²². Representa cerca de 20% dos tumores ósseos e 5% dos tumores pediátricos²³. Mesmo sendo raro, é o terceiro tipo mais comum de câncer nos adolescentes, ficando atrás apenas dos linfomas e tumores cerebrais²⁴.

O tumor acomete as metáfises de ossos longos, como o fêmur distal (43%), tíbia proximal (23%) e úmero (10%)², e as crianças com menos de cinco anos são raramente afetadas. Após os cinco anos de idade a incidência aumenta, sendo que o pico ocorre dos 15 aos 17 anos nos meninos, e aos 13 anos nas meninas, correspondendo à idade de maior crescimento ósseo, chamada popularmente de “estirão”, que ocorre com a chegada da puberdade²⁵. A ocorrência também é maior no sexo masculino, com predominância de 60%²⁴.

A etiologia do tumor é desconhecida, mas acredita-se em uma origem viral e, embora nenhum vírus tenha sido isolado, essa hipótese não foi descartada, por já ter sido comprovada experimentalmente por meio da injeção de células neoplásicas em fetos de cães e ninhadas, sendo que a transmissão possa ter ocorrido pela presença do vírus no genoma

celular²⁶. Além disso, existe uma predisposição genética encontrada em pacientes com retinoblastoma, sendo que, nesses pacientes, o osteossarcoma ocorre com frequência 500 vezes maior do que no restante da população não portadora da doença. Cerca de 3 a 4% das crianças com osteossarcoma apresentam uma mutação na proteína p53 e, a maioria dos casos desse tipo de mutação ocorre em pacientes com histórico familiar sugestivo de Síndrome de Li-Fraumeni³.

Alguns fatores ambientais também podem estar associados ao aumento do risco de desenvolvimento do tumor, como a exposição à radiação, uso de teriparatida, que é uma forma recombinante do hormônio paratireoide, e também o consumo de água fluoretada durante a infância²².

Já a forma secundária do osteossarcoma, que ocorre também em idosos, o dano ao DNA pela ação da radiação ionizante é apontado como uma das causas principais. Também ocorre com maior frequência em pessoas portadoras da doença de Paget, mas a relação da doença com o osteossarcoma ainda é desconhecida²⁷.

O osteossarcoma convencional osteoblástico é o tipo histológico mais comum, e ocorre em 75% dos casos. É definido como uma massa com alto grau de malignidade formada por células osteoblásticas de origem mesenquimal, e que produzem osteóide, com capacidade de invasão em tecidos adjacentes, dando origem às metástases²⁸. Também pode ser classificado em condroblástico ou fibroblástico, com relação ao tipo celular predominante²² e em subtipos (Quadro 2), existindo o tumor teleangiectásico, central de baixo grau ou de células pequenas, além dos tumores justacorticais, que ocorrem em 4 a 10% dos casos, tais como o osteossarcoma intracortical, periosteal, parosteal e superficial de alto grau²⁹.

Devido à alta propensão em ir para outros órgãos e dar origem a metástases, o osteossarcoma é considerado uma das mais frequentes causas de morte por câncer³⁰. Aproximadamente 20 a 25% dos pacientes desenvolvem metástases²⁵ e 10 a 20% apresenta evidência macroscópica de doença metastática, que ocorre com maior frequência nos pulmões (90%)²⁴.

A dor é o sinal clínico mais comum e se torna contínua e severa com o passar do tempo. Em alguns pacientes, é possível palpar a massa tumoral e observar inchaço nos locais adjacentes. Fraturas patológicas podem ocorrer espontaneamente, ou como resultado de trauma mínimo. Sintomas respiratórios podem aparecer na ocorrência de metástases pulmonares, mas são raros²⁵.

O diagnóstico do osteossarcoma é geralmente feito por meio de técnicas radiográficas e análise da aparência e localização do tumor, bem como avaliação do seu

tamanho. O diagnóstico laboratorial clínico não é conclusivo, mas altos níveis de fosfatase alcalina (FA) e lactato-desidrogenase (LDH) são indicadores de prognóstico desfavorável²⁷. A FA e o LDH estão relacionados ao volume do tumor, sendo usados como biomarcadores²².

QUADRO 2 - Classificação do osteossarcoma e principais características histológicas.

SUBTIPO	OCORRÊNCIA	SEXO MAIS ACOMETIDO	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
Convencional	75%	Masculino	Lesões líticas e escleróticas, pleomórfico, com produção de matriz osteóide
Teleangiectásico	2-7%	Masculino	Áreas líticas extensas, expansão assimétrica e padrão de crescimento agressivo
.	1-4%	-	Lesões líticas e escleróticas com consistente produção de osteóide
Central de baixo grau	Incomum	-	Áreas de esclerose e lesões líticas extensas
Parosteal	65% dos TJ	Feminino	Massa ossificada justacortical, com área ossificada central
Periosteal	25% dos TJ	Masculino	Massa justacortical envolvendo 50% da circunferência do osso
Superficial de alto grau	10% dos TJ	Masculino	Massa justacortical que envolve a circunferência do osso em sua totalidade
Intracortical	Raro	Masculino	Massa intracortical com osteóide mineralizado

TJ: tumores justacorticais. Fonte: Adaptado de Janu et al²⁹.

Métodos avançados de imagem, como a ressonância magnética (RMI) e a tomografia computadorizada (TC) são capazes de demonstrar a extensão do tumor, verificar a presença de metástases e também o grau de invasão na região medular do osso. Quando existe suspeita de malignidade, pode ser realizada uma biópsia do tecido para a confirmação e diferenciação do tumor. A biópsia pode ser feita usando-se uma agulha oca, guiada por ultrassom ou TC²⁷.

A tomografia por emissão de pósitrons, ou PET *Scan* é um método de diagnóstico superior, e que possui a capacidade de rastrear a progressão do câncer ósseo. Além disso, a

combinação entre a PET e a TC no diagnóstico do osteossarcoma pode ajudar no cálculo da taxa de sobrevivência do paciente, grau de comprometimento e verificar a extensão da necrose tumoral, sendo um método mais eficiente²² e menos invasivo em comparação à biópsia²⁷.

O tratamento de escolha para o osteossarcoma é a remoção cirúrgica do tumor primário². A cirurgia é realizada aproximadamente 15 semanas após o início da quimioterapia³⁰. A intenção é de que seja feita a remoção do tumor, com preservação dos tecidos adjacentes não envolvidos, mas em alguns casos é necessário proceder a amputação do membro afetado. A cirurgia conservadora apresenta uma maior taxa de recorrência local em comparação à amputação, com recidivas que acometem cerca de 5 a 7% dos pacientes²⁴.

A cirurgia é feita em conjunto à quimioterapia combinada, que se baseia na associação de agentes antineoplásicos⁴. Com a descoberta de novos quimioterápicos, foi possível elevar a taxa de cura dos doentes até 75%, sendo que, antes de 1960, a taxa era considerada inferior a 10%³². As drogas mais utilizadas na quimioterapia dos pacientes com osteossarcoma são a doxorrubicina, cisplatina, metotrexato e ifosfamida⁵.

A associação entre a cirurgia e a terapia quimioterápica mudou o cenário do tratamento do osteossarcoma, mas trouxe inúmeras consequências negativas aos pacientes, como a limitação funcional, problemas emocionais e, ainda, distúrbios de infertilidade, que podem ocorrer com o uso de alguns antineoplásicos¹.

O uso de protocolos quimioterápicos com associação de três drogas apresentou resultados melhores do que os obtidos na utilização de duas drogas associadas, porém, essa intensificação no tratamento aumentou ainda mais a toxicidade e os efeitos adversos nos pacientes e, embora a mortalidade dos pacientes tenha diminuído, não houve melhora significativa nas taxas de cura nos últimos 30 anos, o que torna necessário o desenvolvimento de pesquisas sobre novas drogas e tratamentos alternativos para melhorar os resultados, a expectativa de vida dos pacientes e diminuir os efeitos adversos⁴.

O prognóstico dos pacientes varia de acordo com o local do tumor, tamanho, presença ou ausência de metástases e grau de necrose após o tratamento quimioterápico²⁵, que pode ser avaliado após a cirurgia, pelo critério de Huvos, que identifica o grau de necrose tumoral após o tratamento³³.

Tumores primários do esqueleto axial, como os da pélvis e coluna, estão associados a um prognóstico ruim, pela dificuldade em se realizar uma completa ressecção cirúrgica. Já os tumores localizados na tíbia proximal possuem melhor prognóstico em

comparação aos tumores localizados na parte distal do fêmur. Da mesma forma, tumores maiores estão associados com um prognóstico ruim, assim como os tumores metastáticos²⁵.

3. Quimioterápicos Utilizados na Terapia do Osteossarcoma

A descoberta de agentes quimioterápicos com potencial de atuação nas células de osteossarcoma ocorreu no ano de 1960, e o tratamento baseia-se na administração de agentes antineoplásicos, os quais exercem efeitos citotóxicos nas células tumorais³².

A maioria dos antineoplásicos possui atuação inespecífica, promovendo lesão tanto nos tecidos normais quanto nas células tumorais³⁴. As terapias padrão para o tratamento do osteossarcoma incluem a doxorrubicina, cisplatina, metotrexato, e ifosfamida (Figura 1). A associação entre três drogas atingiu resultados melhores do que os protocolos utilizando apenas uma ou duas drogas combinadas⁴.

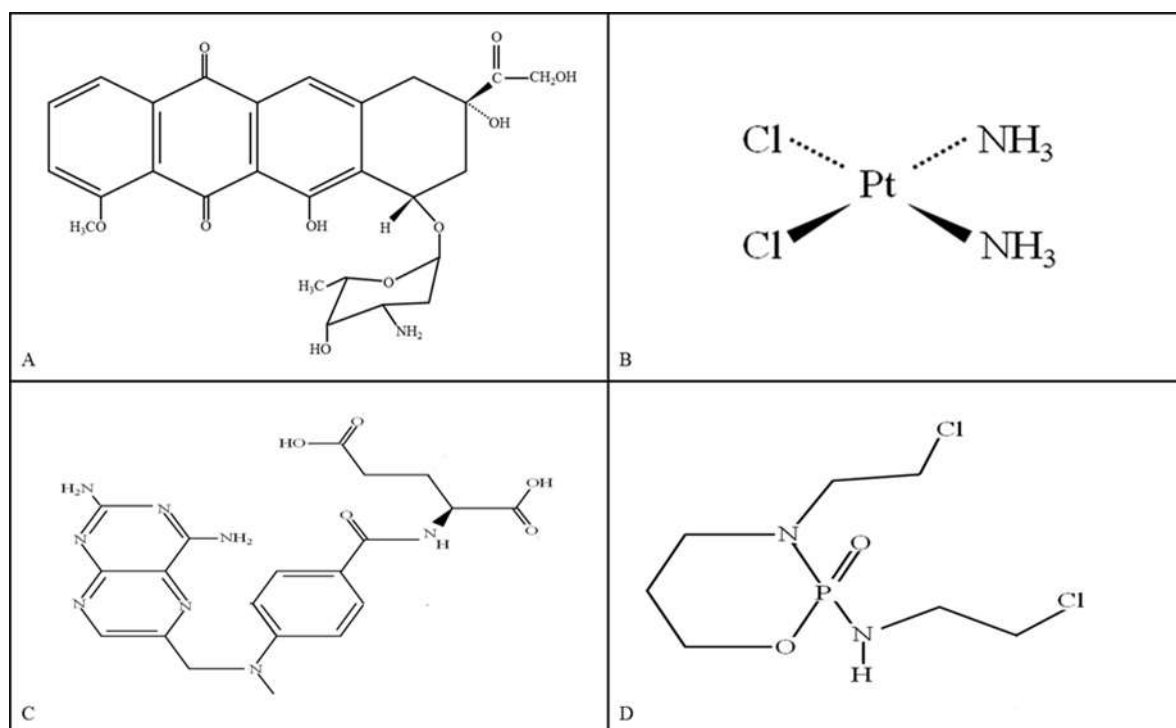


FIGURA 1 – Estruturas químicas dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento do osteossarcoma. A) Estrutura química da doxorrubicina. B) Estrutura química da cisplatina. C) Estrutura química do metotrexato. D) Estrutura química da ifosfamida.

3.1. Doxorrubicina

A doxorrubicina teve sua eficácia no tratamento do osteossarcoma comprovada na década de 60. É uma das drogas mais utilizadas nos protocolos quimioterápicos e associações de medicamentos³².

É um antibiótico e age por meio da inibição da enzima topoisomerase II. Causa ruptura dos filamentos simples e duplos da fita de DNA⁹, intercalando-se com as moléculas, impedindo a liberação da fita dupla hélice, causando inibição da replicação e promovendo efeitos citotóxicos³⁶.

Pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros fármacos, normalmente utilizada em doses que variam de 60 a 90mg/m². Possui resultados eficazes em pacientes com diferentes tipos de câncer, incluindo pacientes com metástases pulmonares. Além disso, potencializa a ação da radioterapia³⁷.

Como efeitos adversos desse agente antineoplásico, ocorre perda capilar, náuseas, vômitos, disfunção hepática e cardiotoxicidade³⁸, podendo causar falência cardíaca³².

Outro problema enfrentado no tratamento quimioterápico com a doxorrubicina é a resistência do tumor ao medicamento. Para evitar que isso ocorra, são feitas as combinações entre drogas, como é o caso da combinação entre a doxorrubicina e o tamoxifeno, que melhora a capacidade de matar as células neoplásicas e reduz a resistência tumoral³⁷. Já a combinação entre a carboplatina e a doxorrubicina possui atividade antitumoral inferior nos pacientes com osteossarcoma, especialmente naqueles com início de metástase pulmonar³⁸.

3.2. Cisplatina

A cisplatina começou a ser usada no tratamento do osteossarcoma na década de 70 e age promovendo efeitos citotóxicos por meio da platinação do DNA³². Por ser um agente platinante, impede que haja síntese de novas cópias de DNA e causa bloqueio no processo de transcrição⁴⁰.

O principal efeito adverso da terapia com cisplatina é a nefrotoxicidade, causando lesões nos túbulos renais⁴¹.

A combinação desse fármaco com o adenovírus oncolítico $\Delta 24$ -RGD exerce uma potente ação na morte das células de osteossarcoma⁴². Além disso, a associação entre a cisplatina e a metformina também possui efeitos positivos para os pacientes, já que a metformina inibe o crescimento da célula tumoral e amplifica o efeito da cisplatina⁴³.

3.3. Metotrexato

O metotrexato é um fármaco da classe dos antimetabólitos, utilizado para o tratamento do osteossarcoma em altas dosagens. É também utilizado no tratamento de doenças autoimunes, e atua na inibição da enzima dihidrofolato-redutase⁴⁴. Os efeitos adversos

de seu uso incluem a insuficiência renal aguda, lesões cutâneas, vômitos, lesão hepática e efusão pleural⁴⁵.

Também é um dos componentes de uma das associações mais utilizadas no tratamento quimioterápico de pacientes com osteossarcoma, composta também pela doxorrubicina e cisplatina, formando uma combinação chamada de MAP⁵. Foi descoberto na década de 40, e foi um agente importante na cura de crianças com linfoma e leucemia. Ele age privando a célula de folatos, que são essenciais na formação do DNA³².

Em crianças com osteossarcoma, a exposição ao metotrexato aumentou a incidência de efeitos adversos, mas melhorou o tratamento e a taxa de sobrevivência dos pacientes⁴⁶.

3.4. Ifosfamida

É um composto alquilante, que atua na inibição da replicação celular por meio da inserção de um grupo alquila no DNA. Sua utilização causa supressão medular, com diminuição do número de plaquetas e neurotoxicidade⁴⁷.

Em pacientes com osteossarcoma não metastático de extremidade foi feito um estudo utilizando metotrexato, cisplatina e doxorrubicina como quimioterapia neoadjuvante, acrescidas ou não de ifosfamida na associação, objetivando melhorar a resposta dos pacientes onde foi utilizada a combinação dos quatro agentes. Nos pacientes em que foi utilizado o protocolo contendo a ifosfamida, não houve melhora na taxa de resposta, e houve ainda um aumento na toxicidade hematológica⁵.

4. Busca por novos agentes antineoplásicos

Embora a ciência e a tecnologia venham se desenvolvendo ao longo dos anos, vários tipos de câncer ainda continuam sendo considerados doenças sem cura, causando medo nos pacientes. Além disso, muitos sofrem com os efeitos adversos de alguns quimioterápicos, o que justifica essa busca por formas alternativas de tratamento. Vários são os relatos e pesquisas envolvendo compostos naturais e plantas que atuam em diferentes vias de sinalização do câncer, e que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou como precursores de fármacos³⁴.

A *Dipsacus asperoides* é uma flor chinesa, e de sua raiz pode ser extraído um polissacarídeo alcalino, que inibe a proliferação das células de osteossarcoma e induz a apoptose das células malignas, por meio da produção de ROS e disfunção mitocondrial⁴⁸.

O resveratrol é uma fitoalexina produzida por um número limitado de espécies de plantas, tais como as uvas vermelhas e as nozes. Na saúde humana possui efeitos cardioprotetores e neuroprotetores, além de agir na supressão de células tumorais. No osteossarcoma, age inibindo a proliferação e apoptose das células tumorais⁴⁹.

O lupeol é um composto triterpeno encontrado em vegetais como o repolho, pimentão e pepino, em frutas, como o tomate, figo, manga, morangos, uvas vermelhas e em plantas medicinais, como *American ginseng*, *Tamarindus indica*, *Leptadenia hastata*, entre outras. Pode ser encontrado na América do Norte, América Latina, Japão, China, África e ilhas caribenhas. Possui atividade anti-inflamatória potente e vem sendo cada vez mais estudado como tratamento alternativo do câncer, com bons resultados em experimentos com câncer de pâncreas, neuroblastoma e adenocarcinoma pulmonar⁵⁰. Em células de osteossarcoma humano da linhagem MG-63, o lupeol demonstrou induzir apoptose das células e inibição do ciclo celular na fase G0/G1⁵¹.

A *Anemone altaica* é uma flor asiática com potencial anti-inflamatório e analgésico, sendo utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento da epilepsia, neurastenia e artrite. Além disso, o extrato do rizoma da *A. altaica* age na redução da viabilidade das células de osteossarcoma, promovendo a apoptose das células tumorais por meio da ativação de um gene pró-apoptótico⁵².

A *Phyllostachys edulis*, ou bambu-chinês, é uma planta nativa do Sul da China, que pode ser encontrada em todo o mundo. Suas diferentes partes podem ser utilizadas na alimentação e também com finalidade medicinal. As folhas do bambu são utilizadas pelos chineses para o tratamento da inflamação e febre. Já o extrato das folhas possui atividade antioxidante e anti-inflamatória. O extrato do bambu também possui capacidade de induzir apoptose das células de osteossarcoma por meio da ativação de uma enzima proteína quinase ativada por adenosina monofosfato, ou AMPK⁵³.

A oximatrina é um alcaloide quinolizidínico presente nas raízes da *Sophora flavescens*, uma planta da medicina tradicional chinesa. Possui ação de inibição do crescimento das células de osteossarcoma da linhagem MG-63, além de induzir a apoptose das células *in vitro*⁵⁴.

A piperina é um composto orgânico e alcalóide presente na pimenta preta, derivado da piperidina. Possui capacidade de inibir a proliferação das células de osteossarcoma por meio do bloqueio do ciclo celular entre as fases G2 e M, além de agir na supressão da metástase por meio da inibição da atividade das metaloproteinases de matriz

(MMP), demonstrando que a piperina possui ação terapêutica e pode ser considerada uma opção para o tratamento do osteossarcoma⁵⁵.

5. β Lapachona

As quinonas são metabólitos de distribuição natural, que podem ser divididos em benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas. Possuem a capacidade de agir em vírus, tripanosomas, tumores, além de atuarem em sistemas reparadores e terem ação microbicida. Dentre essas, destacam-se as naftoquinonas, que vem despertando o interesse da química e farmacologia⁵⁶.

As quinonas atuam por meio de um ciclo chamado de ciclo redox, onde o substrato quinonoídico é reduzido e catalisado por enzimas como a NADPH. São geradas ROS e, posteriormente, os intermediários bioalquilantes, que causam peroxidação lipídica, dano às proteínas e fragmentação do DNA. Além disso, as quinonas atuam nas topoisomerases, sendo consideradas citotóxicas para as células⁵⁷.

Existem várias naftoquinonas biologicamente ativas, mas o lapachol é um dos compostos mais pesquisados. Foi isolado pela primeira vez em 1882 por Paterno, a partir de uma árvore da família das Bignoniaceae, a *Tabebuia avellanadae*. No Brasil, é também conhecida como “pau d’arco”, e a casca da árvore é utilizada como analgésico, anti-inflamatório, diurético e anti-neoplásico⁵⁸.

O lapachol é um composto que pode ser extraído a partir da serragem da madeira das árvores da família das *Tabebuia*, os chamados ipês. Existem, no Brasil, 46 tipos conhecidos de ipês⁵⁷, como, por exemplo, o ipê amarelo (Figura 2).

O lapachol pode ser convertido em α e β lapachona⁵⁶. A β lapachona (Figura 3) pode ser obtida através da ciclização ácida do lapachol, e já foi objeto de estudo em diversas neoplasias, como o câncer de próstata, tumores mamários e neoplasias de cólon e útero⁵⁹.

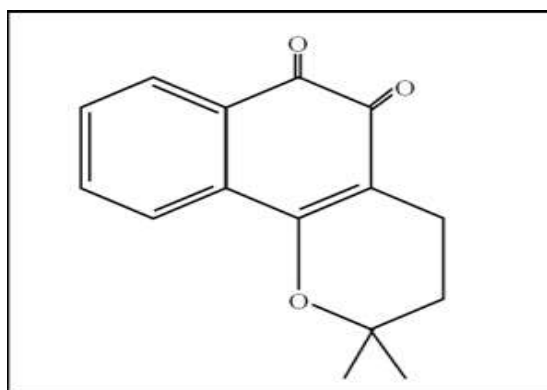


FIGURA 2 – Estrutura química da β lapachona.

Diversos são os efeitos da β lapachona, a qual possui capacidade de ação direta nas DNA topoisomerasas, inibindo sua atividade, o que resulta em citotoxicidade. Também possui atividade anti-inflamatória, uma vez que inibe a expressão de óxido nítrico nos macrófagos alveolares e atenua a expressão de citocinas pró-inflamatórias⁵⁸. Além disso, a β lapachona atua na indução da apoptose e promove danos ao DNA, causando morte celular por necrose⁵⁸.



FIGURA 3 – Ipês amarelos em um condomínio horizontal de Goiânia, Goiás.

O lapachol pode ser convertido em α e β lapachona⁵⁶. A β lapachona (Figura 3) pode ser obtida através da ciclização ácida do lapachol, e já foi objeto de estudo em diversas neoplasias, como o câncer de próstata, tumores mamários e neoplasias de cólon e útero⁵⁹.

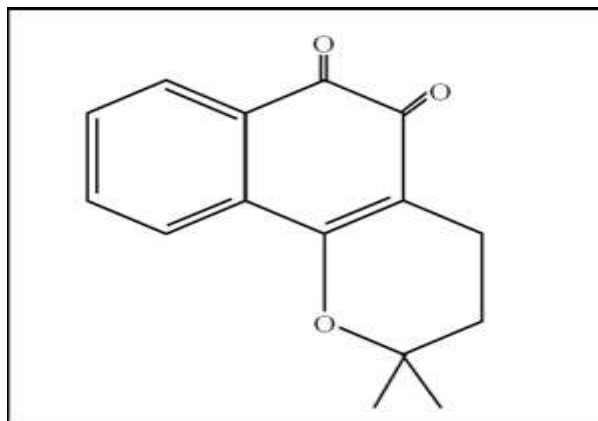


FIGURA 4 – Estrutura química da β lapachona.

Diversos são os efeitos da β lapachona, a qual possui capacidade de ação direta nas DNA topoisomerasas, inibindo sua atividade, o que resulta em citotoxicidade. Também possui atividade anti-inflamatória, uma vez que inibe a expressão de óxido nítrico nos macrófagos alveolares e atenua a expressão de citocinas pró-inflamatórias⁵⁸. Além disso, a β lapachona atua na indução da apoptose e promove danos ao DNA, causando morte celular por necrose⁵⁸.

Em células de carcinoma gástrico, a β lapachona causou dissipação do potencial transmembrana mitocondrial e promoveu a apoptose das células por meio da ativação vias apoptóticas intrínseca e extrínseca⁶⁰. Também causou morte celular apoptótica em células de câncer de pulmão, demonstrando que pode ser um potencial agente antiproliferativo⁶¹. O mesmo foi observado em células de câncer coloretal, onde ocorreu indução da apoptose e bloqueio do ciclo celular⁶².

A β lapachona age como um ativador de pontos de checagem de danos no DNA, e causa bloqueio do ciclo celular entre as fases G1 e S. Também causa morte celular seletiva em células cancerígenas que possuem expressão elevada de NADPH, tais como as células de câncer pancreático⁶³.

6. Objetivos

Com este estudo, objetivou-se verificar os efeitos citotóxicos da β lapachona sobre as células de osteossarcoma cultivadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

1. Fauske L, Bondevik H, Bruland S, Ozakinci G. Negative and positive consequences of cancer treatment experienced by long-term osteosarcoma survivors: a qualitative study. *Anticancer Res.* 2015;35(11):6081-90.
2. Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):3019-35.
3. Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orph Jour of Rare Dis.* 2007;2(6):1-4. doi:10.1186/1750-1172-2-6.
4. Hattinger CM, Fanelli M, Tavanti E, Vella S, Ferrari S, Picci P, Serra M. Advancer in emerging drugs for osteosarcoma. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2015;20(3):495-514.
5. Ferrari S, Ruggieri P, Cefalo G, Tamburini A, Capanna R, Faglioli F, Comandone A, Bertulli R, Bisogno G, Palmerini E, Alberghini M, Parafioriti A, Linari A, Picci P, Bacci G. Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, and doxorubicin

- with or without ifosfamide in nonmetastatic osteosarcoma of the extremity: an Italian sarcoma group trial ISG/OS-1. *J Clin Oncol.* 2012;30(17):2112-8.
6. Zhang Y, Song L, Cai L, Wei R, Hu H, Jin W. Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Food and Chemical Toxicology.* 2013;53:325-33.
 7. Souza CD, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botânica Brasileira.* 2006;20:135-42.
 8. Castro SL, Emery FS, Júnior ENS. Synthesis of quinoidal molecules: Strategies towards bioactive compounds with and emphasis on lapachones. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2013;69:678-00.
 9. De Moura KCG, Emery FS, Pinto CN, Pinto MCFR, Dantas AP, Salomão K, De Castro SL, Pinto AV. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from tabebuia and some heterocyclic derivatives: A review 131 from an interdisciplinary study. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 2001;12(3):325-38.
 10. Pérez-Sacau E, Estévez-Braum A, Ravelo AG, Ferro EA, Tokuda H, Mukainaka T, Nishino H. Inhibitory effects of lapachol derivatives on Epstein-Barr virus activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2003;11:483-88.
 11. Silva RSF, Leitão GG, Brum TB, Lobato APG, Pinto MCFR, Pinto AV. Applications of counter-current chromatography in organic synthesis purification of heterocyclic derivatives of lapachol. *Journal of Chromatography A.* 2007;1151:197-202.
 12. Pardee AB, Li YZ, Li CJ. Cancer therapy with beta-lapachone. *Current Cancer Drug Targets.* 2002;2:227-42.
 13. Kung HN, Weng TY, Liu YL, Lu KS, Chau YP. Sulindac compounds facilitate the cytotoxicity of lapachone by up-regulation of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase in human lung cancer cells. *Plos One.* 2014;9:1-15.
 14. ABC do cancer: abordagens básicas para o controle do câncer/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: CEDC; 2011. 128p.
 15. Lopes AA, Oliveira AM, Prado CBC. Principais genes que participam da formação de tumores. *Revista de Biologia e Ciências da Terra.* 2002;2:1-7.
 16. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: CEDC; 2008. 628p.
 17. Liu Y, Sun J, Zhao M. ONGene: a literature-based database for human oncogenes. *Journal of Genetics and Genomics.* 2017;16:1-620.
 18. Levine RA. Overexpression of the *Sis* Oncogene in a Canine Osteosarcoma Cell Line. *Vet Pathol.* 39;3:411-412.
 19. Mueller F, Fuchs B, Kaser-Hortz B. Comparative Biology of a Human and Canine Osteosarcoma. *Anticancer Research.* 2007;27:155-164.

20. Pimenta VSC, Prado YCL, Silva DR, Machado PA, Araújo EG. Papel da proteína p53 na proliferação neoplásica. *Enciclopédia Biosfera*. 2013;9:1-16.
21. Martin JW, Squire JÁ, Zielenska M. The genetics of osteossarcoma. *Hindawi Pub Corp Sarcoma*. 2012: 11p.
22. Lindsey BA, Markel JE, Kleinerman ES. Osteosarcoma overview. *Rheumatol Ther*. 2016:1-19.
23. Tang N, Luo J. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466:2114-2130.
24. Luetke A, Meyers PA, Lewis I, Juergens H. Osteosarcoma treatment – where do we stand? A state of the art review. 2013:1-10.
25. Williams RF, Fernandez-Pineda I, Gosain A. Pediatric sarcomas. *Surg Clin N Am*. 2016;96:1107-1125.
26. Daleck CR, Fonseca CS, Canola JL. Osteossarcoma canino revisão. *Revista Educação Continuada CRMV – SP*. 2002;5(3):233-42.
27. Durfee RA, Mohammed M, Luu HH. Review of osteosarcoma and current management. *Rheumatol Ther*. 2016;3:221-243.
28. Hattinger CM, Fanelli M, Tavanti E, Vella S, Riganti C, Picci P, Serra M. Doxorubicin-resistant osteosarcoma: novel therapeutic approaches in sight? *Future Oncol*. 2017;13:1-5 [acesso 10 fev 2014]. Disponível em: <http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fon-2016-0519>. ISSN 1479-6694.
29. Janu A, Jain N, Juvekar S, Gulia A. Radiological review of extremity osteossarcoma. *Journal of Bone and Soft Tissue Tumors*. 2016;2:13-18.
30. Botter SM, Neri D, Fuchs B. Recent advances in osteosarcoma. *Current opinion in Pharmacology*. 2014;16:15-23.
31. Majó J, Cubedo R, Pardo N. Treatment of osteosarcoma. *Rev esp cir ortop traumatol*. 2010;54:329-336.
32. Jaffe N, Puri A, Gelderblom H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms. *Hindawi Pub Corp*. 2013;2013:1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/203531>.
33. Jidão FRS, Lima LS, Lopes JAS, Ribeiro MB. Avaliação dos fatores prognósticos e sobrevida de pacientes com osteossarcoma atendidos em um hospital filantrópico de Teresina (PI), Brasil. *Rev Bras Ortop*. 2013;48(1):87-91.
34. Angulo P, Kaushik G, Subramaniam D, Dandawate P, Neville K, Chastain K, Anant S. Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):10.
35. Zhang Z, Zhang Y, Wang J, Lv J. The surviving suppressant YM155 reverses doxorubicin resistance in osteosarcoma. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(10):18032-40.

36. Rathore K, Cekanova M. A novel derivative of doxorubicin, AD198, inhibits canine transitional cell carcinoma and osteosarcoma cells in vitro. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:5323-35.
37. Ouyang ZX, Li XA. Inhibitory effects of tamoxifen and doxorubicin, alone and in combination, on the proliferation of the MG63 human osteosarcoma cell line. *Oncol Lett.* 2013;6(4):970-976.
38. Choeryprasert W, Natesirinilkul R, Charoenkwan P, Sittipreechacharn S. Carboplatin and doxorubicin in treatment of pediatric osteosarcoma: a 9-year single institute experience in the Northern Region of Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(2):1101-6.
39. Yan L, Hu R, Tu S, Cheng WJ, Zheng Q, Wang JW, Kan WS, Ren YJ. Emodin mitigates the oxidative stress induced by cisplatin in osteosarcoma MG-63 cells. *Oncol Lett.* 2016;12(3):1981-1985.
40. Wagner MJ, Livingston JA, Patel SR, Benjamin RS. Chemotherapy for bone sarcoma in adults. *J Oncol Pract.* 2016;12(3):208-16.
41. Peres LAB, Júnior ADC. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: mecanismos moleculares. *J Bras Nefrol.* 2013;5(4):332-340.
42. Velez M, Xipell E, Jaurequi P, Zalacain M, Marrodan L, Zandueta C, Vera B, Urquiza L, Sierrasesumaga L, Julian MS, Toledo G, Fueyo J, Gomez C, Torre W, Lecanda F, Garcia A, Alonso MM. The oncolytic adenovirus $\Delta 24$ -RGD in combination with cisplatin exerts a potent anti-osteosarcoma activity. *J Bone Miner Res.* 2014;29(10):2287-96.
43. Quattrini I, Conti A, Novello C, Pazzaglia L, Picci P, Benassi MS. Metformin inhibits growth and sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin through cell cycle modulation. *Oncol Rep.* 2014;31(1):370-5.
44. Begas E, Papandreou C, Tsakalof A, Daliani D, Papatsibas G, Asproдини E. Simple and reliable HPLC method for the monitoring of methotrexate in osteosarcoma patients. *J Chromatogr Sci.* 2014;52(7):590-5.
45. Mitrovic D, Touw DJ, Tissing W. Treatment of high dose methotrexate with glucarpidase. *J Clin Toxicol.* 2016;6(2):1-4.
46. Hegyi M, Gulácsi A, Cságoly E, Csordás K, Eipel OT, Erdélyi DJ, Müller J, Nemes K, Lautner-Csorba O, Kovács GT. Clinical relations of methotrexate pharmacokinetics in the treatment for pediatric osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(10):1697-702.
47. Almeida GFG, Castro G, Snitcovsky IML, Siqueira SA, Akaishi EH, Camargo OP, Oliveira CRG, Frederico MHH. Dose densa de doxorubicina e ifosfamida em pacientes com sarcomas de partes moles e análise de ezrina como fator prognóstico. *Rev Bras de Onc Clin.* 2011;11:29-35.

48. Chen J, Yao D, Yuan H, Zhang S, Tian J, Guo W, Liang W, Zhang Y. *Dipsacus asperoides* polysaccharide induces apoptosis in osteosarcoma cells by modulating the PI3K/Akt pathway. Elsevier. 2013;95:780-784.
49. Li Y, Backesjo CM, Haldósen LA, Lindgreen U. Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. Eur J of Pharm. 2009;609:13-18.
50. Saleem M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. Cancer Lett. 2009;285(2):109-115.
51. Liu Y, Bi T, Wang G, Dai W, Wu G, Qian L, Gao Q, Shen G. Lupeol inhibits proliferation and induces apoptosis of human pancreatic cancer PCNA-1 cells through AKT/ERK pathways. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2015;388(3):295-304.
52. Chang C, Chiang TI, Lo C, Lai YH, Yue CH, Liu JY, Hsu LS, Lee CJ. *Anemone altaica* induces apoptosis in human osteosarcoma cells. The Am J of Chin Med. 2015;43(5):1-12.
53. Chou CW, Cheng YW, Tsai CH. *Phyllostachys edulis* extract induces apoptosis signaling in osteosarcoma cells, associated with AMPK activation. Drug, Design, Development and Therapy. 2014;8:1577-1584.
54. Wei J, Zhu Y, Xu G, Yang F, Guan Z, Wang M, Fang Y. Oxymatrine extracted from *Sophora flavescens* inhibited cell growth and induced apoptosis in human osteosarcoma MG-63 cells in vitro. Cell Biochem Biophys. 2014;70:1439-1444.
55. Zhang J, Zhu X, Li H, Li B, Sun L, Xie T, Zhu T, Zhou H, Ye Z. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. Int immunopharm. 2015;24:50-58.
56. Silva AMP, Paiva SR, Figueiredo MR, Kaplan MAC. Atividade biológica de naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae. Rev Fitos. 2012;7(4):207-15.
57. Ferreira SB, Gonzaga DTG, Santos WC, Araújo KGL, Ferreira VF. β -lapachona: Sua Importância em Química Medicinal e Modificações Estruturais. Rev Virtual de Quim. 2009;2(2):140-160.
58. Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, Miana GA, Green IR. Lapachol: an overview. Special Issue Reviews and Accounts. 2007;2:145-171.
59. Cunha-Filho MSS, Gonçalves CAT, Soares PRS, Barreto LCLS, Pacheco R, Landin M. Validação da metodologia analítica e desenvolvimento do teste de dissolução para o antineoplásico beta-lapachona. Latin Amer J of Pharm. 2009;28(6):805-11.
60. Yu HY, Kim SO, Jin CY, Kim GY, Kim WJ, Yoo YH, Choi YH. Beta lapachone-induced apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K Akt pathway. Biomol Ther. 2014;22(3):184-192.
61. Jeon YJ, Bang W, Choi YH, Shim JH, Chae J. Beta-lapachone suppresses non-small cell lung cancer proliferation through the regulation of specificity protein 1. Biol Parhm Bull. 2015;38:1302-1308.

62. Kee J, Han Y, Park J, Kim D, Mun J, Ahn KS, Kim H, Um J, Hong S. Beta-lapachone inhibits lung metastasis of colorectal cancer by inducing apoptosis of CT26 cells. *Integ Canc Ther.* 2016;1:1-12.
63. Middleton G, Ghaneh P, Costello E, Greenhalf W, Neoptolemos JP. New treatment options for advanced pancreatic cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2008;2(5):673-696.

CAPÍTULO 2 – β LAPACHONA REDUZ A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA CULTIVADAS *IN VITRO*

RESUMO

O osteossarcoma é um tumor maligno com alta incidência em crianças e jovens. Existe uma crescente demanda por novos medicamentos com ação no tumor, mas que causem menos efeitos nocivos ao paciente. As pesquisas envolvendo compostos extraídos de plantas são promissoras, uma vez que alguns deles como a β lapachona são encontrados em abundância e possuem propriedades medicinais e terapêuticas. O objetivo desse estudo foi verificar os efeitos citotóxicos da β lapachona sobre as células de osteossarcoma cultivadas. A citotoxicidade foi medida pelo método de exclusão do azul de Tripán e o melhor resultado foi do grupo tratado com 1,0 μ M por 72 horas. O IC₅₀ foi calculado pelo método de redução do tetrazólio, e o menor IC₅₀ foi encontrado no período de 72 horas (0,148 μ M). A viabilidade celular foi reduzida à medida que houve aumento da concentração e tempo de exposição ao tratamento. O crescimento celular após o período de tratamento foi menor nos grupos tratados por 72 horas e não houve diferença estatística entre as concentrações para a sobrevivência celular após o referido período. A β lapachona foi citotóxica para as células de osteossarcoma.

Palavras-chave: Extratos de plantas, neoplasias, *Tabebuia sp.*

β LAPACHONE REDUCES *IN VITRO* PROLIFERATION OF OSTEOSARCOMA CELLS

ABSTRACT

Osteosarcoma is a malignant tumor with high incidence in children and young adults. The response to some chemotherapeutics is low, patients may develop resistance and the treatment causes many adverse effects. Investigations involving plant extracts have shown promising results, since some of them, such as β lapachone, are found in abundance and have medicinal and therapeutic properties, arousing the interest of science. The aim of this study was to check the cytotoxic effects of β -lapachone on cultured osteosarcoma cells. Cytotoxicity was measured by Tripán blue exclusion method, and the highest result was from the 1,0 μ M group treated for 72 hours. The IC₅₀ was calculated by the tetrazolium reduction method, and the lowest IC₅₀ was found in the period of 72 hours (0,148 μ M). Cell viability was reduced as the concentration and time of exposure to treatment increased. Cellular growth was lower in the groups treated for 72 hours, and there was no statistical difference between the concentrations for cell survival after treatment with β -lapachone. The treatment proved toxic to osteosarcoma cells.

Keywords: Neoplasms, plant extracts, *Tabebuia sp.*

Introdução

O osteossarcoma é um tumor maligno derivado de células mesenquimais responsáveis pela formação do osso primário. Esta neoplasia surge a partir de uma irregularidade na formação do osso imaturo, com conseqüente malignidade na produção de osteóide¹. O tumor possui alta malignidade, e a ocorrência de metástases pulmonares é alta, levando muitos pacientes ao óbito².

A remoção do tumor é o tratamento de escolha, associada ao tratamento com quimioterápicos³, particularmente a doxorrubicina, cisplatina, metotrexato e ifosfamida⁴. No entanto, a incidência de reações em decorrência do tratamento aumenta a necessidade de que sejam desenvolvidos novos medicamentos com ação antitumoral que apresentem menores efeitos adversos⁵.

Muitas plantas podem ser encontradas em abundância, e abrigam inúmeras propriedades medicinais, muitas já testadas. Os compostos agem em diferentes vias de sinalização dos tumores, e que podem ser utilizadas como precursores de medicamentos, que surgem como uma opção aos quimioterápicos⁶.

As quinonas são encontradas nas árvores da família das Bignoniaceae, dentre elas o ipê (*Tabebuia sp*), comum no cerrado brasileiro. São moléculas que atuam por meio da geração de ROS e ação nas enzimas topoisomerasas, tendo ação citotóxica para as células⁷. Dentre as quinonas, o lapachol se destaca por apresentar ação analgésica, anti-inflamatória, diurética e anti-neoplásica⁸. A β lapachona, proveniente do lapachol, já foi testada em vários tumores, e possui capacidade de ação na enzima topoisomerase I⁷ além de agir na indução da apoptose e bloqueio do ciclo celular⁹.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos da β -lapachona sobre as células de osteossarcoma cultivadas *in vitro*, para verificar possível ação antineoplásica, na expectativa de estabelecer uma alternativa aos tratamentos quimioterápicos hoje utilizados.

Materiais e métodos

Células e cultura

As células de OS (MG-63, BCRJ 0173, Lote 000888, Passagem 104) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ – Rio de Janeiro, Brasil) provenientes da ATCC (*American Type Culture Collection* – Manassas, VA, USA). Foram mantidas em incubadora umidificada à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. O cultivo foi realizado em meio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM), e foi feito o

acréscimo de 20% de soro fetal bovino, anfotericina B e L glutamina (todos advindos da Cultilab, Campinas, Brasil), de acordo com o método de Yu et al¹⁰.

A β LP foi adquirida do Laboratório Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology – Dallas, Texas, USA). Os compostos teste foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Cultilab) e as soluções de estoque foram preparadas com 1M, depois armazenadas sob temperatura de -20°C.

Avaliação da viabilidade celular (VC) pelo método de exclusão do azul de Tripán

A avaliação da VC foi feita por meio de adaptação do método descrito por Mosmann et al¹¹. As placas com 96 poços foram usadas para cultivar as células de OS na concentração de 1×10^4 células/poço, num período de 24 horas, em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As soluções de tratamento com β LP foram preparadas nas dosagens de 0,1 μ M, 0,3 μ M e 1,0 μ M, além de um grupo controle (GC) negativo tratado com dimetilsulfóxido isento de β LP, por três períodos diferentes para cada concentração: 24 h (G₂₄), 48h (G₄₈) e 72h (G₇₂). O meio foi descartado e a lavagem de cada poço feita com salina fosfato tamponada (PBS, Cultilab, Campinas, Brasil). As células foram suspensas com 50 μ l de tripsina (Cultilab, Campinas, Brasil), que foi posteriormente inativada por meio do acréscimo de 100 μ l de DMEM acrescido de 20% de soro fetal bovino. O material foi centrifugado a 130rcf(g) durante 10 minutos e o meio novamente descartado. Foram adicionados 100 μ l de DMEM fresco para ressuspender as células e o volume de 10 μ l de cada poço foi transferido para *ependorfs* que continham 40 μ l de azul de Tripán (*Trypan Blue* – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). O volume de 10 μ l dessa mistura foi colocado em lâmina para leitura específica do equipamento *Luna Automated Cell Counter* para determinar a viabilidade celular. A citotoxicidade (CT) foi calculada por meio da equação:

$$\%CT = 100 - [(abs \text{ do tratamento} / abs \text{ do controle negativo}) \times 100] \quad (\text{equação 1})$$

onde CT é a citotoxicidade e abs é a absorbância.

Os valores de cada grupo foram averiguados pelo teste F e comparados ao F tabelado 5% (8,8). Para o ensaio, foram realizados três experimentos em triplicata.

Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio

O ensaio foi realizado por meio de adaptação do método descrito por Yu et al¹⁰. As células foram cultivadas por um período de 24h em placas contendo 96 poços, à concentração de 1×10^4 células/poço, em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Os tratamentos com o composto β LP foram feitos nas dosagens de 0,1 μ M, 0,3 μ M e

1,0 μ M, além de um GC negativo, tratado com dimetilsulfóxido isento de β LP, nos períodos de 24h (G₂₄), 48h (G₄₈) e 72h (G₇₂). Ao final do tratamento, o meio foi descartado e 10 μ l de tetrazólio (MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphenyl-2H-tetrazólio) foi acrescentado em cada poço. As placas de 96 poços foram incubadas por um período de três horas. Para interromper a reação, acrescentaram-se 50 μ l por poço de sódio dodecil sulfato (SDS – Vivantis Biochemical) a 10% diluído em HCl 0,01N e mantiveram-se as placas por mais 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, foi realizada a quantificação da densidade óptica a 425nm em espectrofotômetro (Awareness Technology Ine/Stat Fax 2100). A concentração que inibe 50% da viabilidade celular, ou IC₅₀ (em μ M), foi determinada por meio de programa estatístico (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para o ensaio, foram realizados três experimentos em triplicata.

Ensaio de sobrevivência celular

A técnica foi adaptada de Park et al¹² e Cao et al¹³. As células foram cultivadas durante 24h em placas de seis poços, na concentração de 1x10⁶ células/poço, mantidas em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Os tratamentos com o composto β LP foram feitos nas dosagens de 1,0 μ M, 0,3 μ M e 0,1 μ M, além de um GC negativo, durante três períodos diferentes para cada concentração, 24h (G₂₄), 48h (G₄₈) e 72h (G₇₂). Após cada período de tratamento, o meio de cada poço foi descartado, as células suspensas com 500 μ l de tripsina e colocadas em incubadora por cinco minutos. Em seguida, a tripsina foi inativada com 1ml de DMEM e as células centrifugadas a 1400rpm por 10 minutos. O meio foi então descartado, as células ressuspensas em 1ml de DMEM fresco e cultivadas em placas de seis poços, também em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Após um período de 10 dias, o meio foi descartado, os poços lavados com PBS, as células ressuspensas em 500 μ l de tripsina por poço e colocadas na incubadora por cinco minutos. Em seguida, a tripsina foi inativada com 1ml de meio DMEM e o conteúdo de cada poço centrifugado a 1400rpm por 10 minutos. O meio foi então descartado e as células ressuspensas em 1ml de meio fresco. O volume de 10 μ l de cada poço foi transferido para *ependorfs* contendo 40 μ l de azul de Tripán (*Trypan Blue* – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Foi instilada uma gota dessa mistura sob a lamínula na câmara de Neubauer, e foi feita a contagem das células não marcadas pelo corante em microscópio invertido. O cálculo das frações de sobrevivência foi realizado pela seguinte equação:

$$\% \text{ FS} = (\text{número de CCAT/número de CCGC}) \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

onde FS é a fração de sobrevivência; CCAT é o número de células contadas após o tratamento e CCGC é o número de células contadas no grupo controle.

Os dados foram interpretados e representados por meio de gráficos. A análise estatística foi realizada pelo uso do teste F. Para o ensaio, foram realizados três experimentos em triplicata.

Resultados e Discussão

O cálculo da citotoxicidade foi realizado por meio do ensaio da viabilidade celular, ou método de exclusão do azul de Tripán, onde as células viáveis não foram coradas, pelo fato de possuírem membranas celulares íntegras, e, desta forma, não foi possível a penetração do corante (Figura 1A). Já o contrário ocorreu com as células mortas, as quais foram coradas de azul, pois suas membranas, já danificadas, não impediram a passagem do corante (Figura 1B).

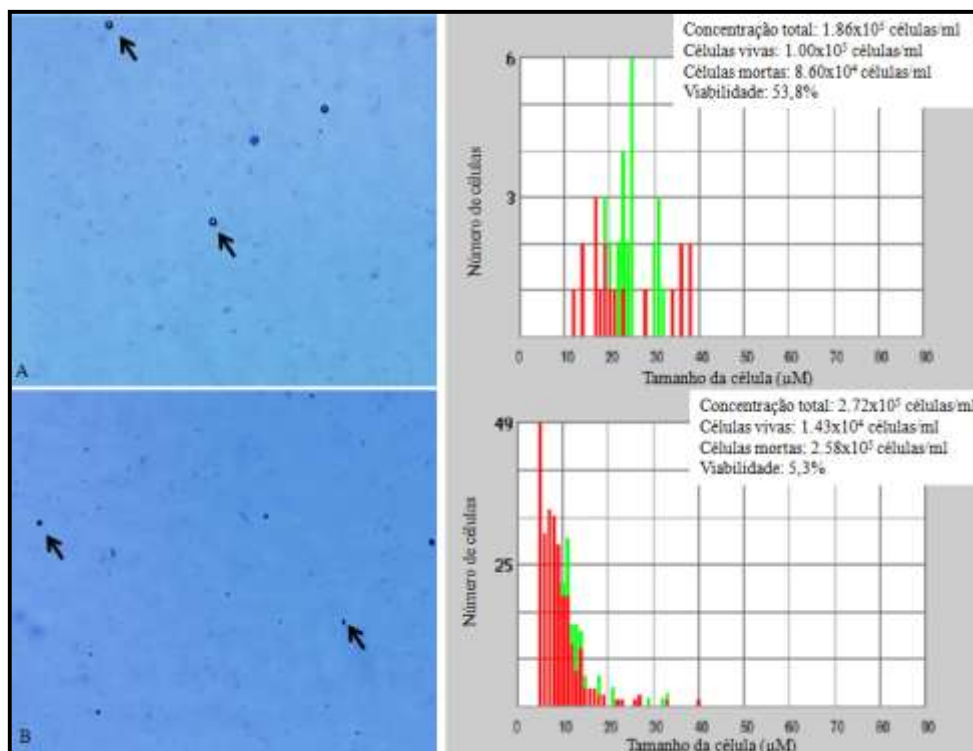


FIGURA 1 – Imagens representativas de duas amostras do ensaio de VC das células de OS após tratamento com β LP. A) Concentração $0,1\mu\text{M}$, G_{24} ; VC = 53,8%. Células viáveis não coradas (setas). B) Concentração $1,0\mu\text{M}$, G_{72} ; VC = 5,3%. As células não viáveis coradas (setas). Método de exclusão do azul de Tripán. Contagem feita em contador celular automatizado LunaTM.

Após a obtenção dos resultados, foi calculada a média da VC e a porcentagem de CT de cada grupo (Tabela 1 e Figura 2), distribuídos por concentração e tempo de exposição à β LP.

TABELA 1 – Viabilidade celular (VC) e citotoxicidade (CT) de cada grupo por concentração e tempo de exposição à β Lapachona (β LP) pelo método de exclusão do Azul de Tripán.

Concentração de β LP	Tempo de Exposição à β LP					
	24 horas		48 horas		72 horas	
	% VC	% CT	% VC	% CT	% VC	% CT
0,1 μ M	77,8	22,1	46,08	53,92	21,11	78,89
0,3 μ M	40,95	59,05	31,12	68,88	12,11	87,89
1,0 μ M	38,12	61,88	13,95	86,05	8,56	91,44
Controle	85,76	-	82,68	-	89,1	-

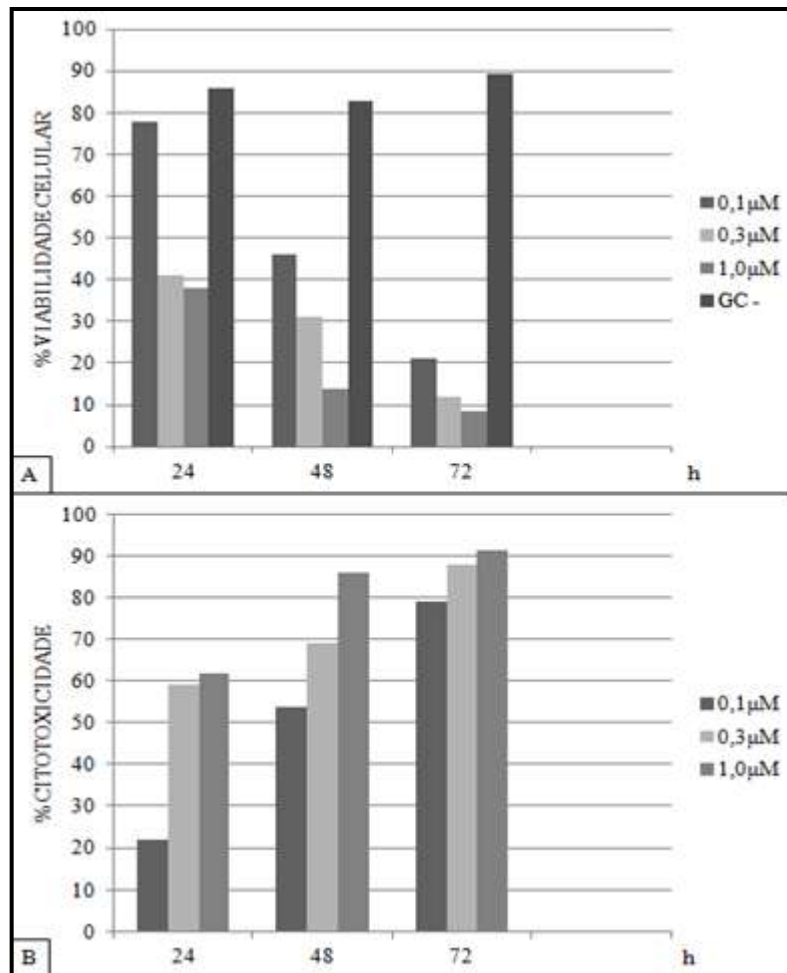


FIGURA 2 – Representação gráfica dos resultados do ensaio da viabilidade celular (VC) pelo método de exclusão do azul de Tripán. A) Média da VC de cada grupo por tempo de exposição à β LP e por concentração. B) Citotoxicidade de cada grupo por tempo de exposição à β LP e concentração. Análise realizada por meio de contador de células automatizado LunaTM.

O G₇₂ com tratamento de 1,0µM apresentou menor VC. Já o G₂₄ com tratamento de 0,1µM apresentou maior VC. Em todos os grupos nota-se que houve citotoxicidade, o que significa que a βLP exerce efeito citotóxico sobre as células de OS. O mesmo ocorreu em células de tumor pancreático, as quais foram submetidas ao tratamento com a βLP em três diferentes concentrações, de 2,5, 5,0 e 10µM, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. O composto induziu citotoxicidade dose-dependente nas células, com redução de 80% da VC no tratamento com 2,5µM, e redução de 85% da VC quando usada a concentração de 10µM¹⁴. Essa ação citotóxica também foi observada em células de tumor de próstata¹⁵ e células leucêmicas¹⁶ o que demonstra que a βLP possui atividade citotóxica em diversas células de tumores humanos¹⁷. Em células endoteliais da retina, todavia, o uso da βLP em concentrações que variavam de 0,1 a 5,0µM, durante 48 horas de exposição não causou redução da viabilidade celular avaliada pelo uso do azul de Tripán¹⁸.

A redução da VC ocorreu de forma progressiva em relação ao tempo de exposição e às concentrações de βLP. O mesmo foi observado em células de OS da linhagem MG-63 tratadas com lupeol, triterpeno presente em frutas e plantas medicinais, adicionado em diferentes concentrações que variaram de 0 a 120µM, nos períodos de 24, 48 e 72 h¹⁹. O mesmo padrão de redução ocorreu em células de OS tratadas com piperina, um alcalóide presente na pimenta preta, em concentrações que variaram de 25 a 200µM, nos mesmos intervalos de tempo²⁰.

Os resultados do cálculo da citotoxicidade foram analisados pelo teste F, foram comparados ao F tabelado 5% (8,8), e apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Resultados do F calculado para os grupos de tratamento com diferentes concentrações e tempo de exposição à βLP.

Tempo de Exposição	Concentração (µM)	Média (%)	s	s ²	F calculado		
					0,1-0,3	0,3-1,0	0,1-1,0
24h	0,1	22,10	5,96	35,57			
	0,3	59,05	5,58	31,18	1,14	0,53	0,60
	1,0	61,88	7,68	59,01			
48h	0,1	53,92	8,11	65,83			
	0,3	68,88	4,78	22,83	2,88	4,05	11,69
	1,0	86,05	2,37	5,63			
72h	0,1	78,89	5,39	29,09			
	0,3	87,89	3,21	10,34	2,81	1,77	4,99
	1,0	91,44	2,41	5,83			

F tabelado 5% (8,8) = 3,44. S = desvio padrão. S² = variância.

Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre as concentrações no período de 24h de exposição. No período de 48h, a concentração de $1,0\mu\text{M}$ foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) das outras concentrações, o que sugere que a concentração capaz de induzir uma maior citotoxicidade para esse período de exposição esteja no intervalo entre $0,3\mu\text{M}$ e $1,0\mu\text{M}$. Já no período de 72 h, a concentração de $1,0\mu\text{M}$ foi diferente estatisticamente ($p<0,05$) da concentração de $0,1\mu\text{M}$, e foi estatisticamente igual ($p>0,05$) à concentração de $0,3\mu\text{M}$, o que sugere que a melhor dosagem de citotoxicidade esteja entre as concentrações de $0,1\mu\text{M}$ e $0,3\mu\text{M}$. Esse resultado indica a possibilidade de diminuição da dose efetiva da substância com o aumento do tempo de exposição.

A concentração necessária para inibir 50% das células *in vitro* foi medida por meio do cálculo do IC_{50} , pelo uso do programa estatístico GraphPad Prism. Os resultados foram de $0,841\mu\text{M}$ para o G_{24} , de $0,443\mu\text{M}$ para o G_{48} e de $0,148\mu\text{M}$ para o G_{72} .

As baixas concentrações encontradas no cálculo do IC_{50} sugerem que a βLP poderia causar menores efeitos adversos a pacientes com osteossarcoma, visto que a dose de $0,841\mu\text{M}$ calculada para o G_{24} é significativamente menor que as concentrações utilizadas para o tratamento com lupeol, onde o menor IC_{50} encontrado foi de $36,8\mu\text{M}$ ¹⁹. Já nas células de OS tratadas com piperina, o menor IC_{50} encontrado foi de $72\mu\text{M}$ ²⁰.

É importante ressaltar que os resultados do cálculo do IC_{50} corroboram os resultados estatísticos encontrados na análise da citotoxicidade pelo ensaio da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Tripán. O IC_{50} do G_{48} encontra-se na faixa sugerida de melhor concentração para a citotoxicidade, da mesma forma como ocorreu com G_{72} em ambos os ensaios.

Para o ensaio de sobrevivência celular, após o período de incubação, foi realizado o cálculo da média do número de células de OS, além do cálculo das frações de sobrevivência. Os valores são dispostos na Tabela 3.

TABELA 3 - Ensaio de sobrevivência celular. Médias do número de células de osteossarcoma sobreviventes em relação a diferentes concentrações e tempos de exposição à β Lapachona (βLP).

Concentração de βLP (μM)	Tempo de Exposição à βLP		
	24h	48h	72h
0 (Controle)	48,5	44,5	54,3
0,1	16,55	10,77	6,5
0,3	13	7,3	7,3
1,0	9,11	4,88	1,44

Para o G_{24} e G_{48} a redução no número de células foi dose dependente, pois a sobrevivência celular diminuiu à medida que a concentração do tratamento foi aumentada. Além disso, foi possível perceber que no GC o crescimento celular demonstrou a ausência de resposta ao tratamento, sendo que a média de células contadas foi maior do que nos grupos tratados.

Os resultados do cálculo da fração de sobrevivência são representados por meio de um gráfico (Figura 3). Observa-se que o crescimento celular após o tratamento foi menor no G_{72} sob concentração de $1,0\mu\text{M}$, e o maior crescimento celular foi observado nas concentrações de $0,1\mu\text{M}$ no G_{24} .

Nota-se que o tempo de exposição de 72 horas está relacionado a uma maior redução na fração de sobrevivência nas três concentrações utilizadas, o que pode ser interpretado como um resultado promissor no que se diz respeito à redução da ocorrência de recidivas após a exposição das células a βLP . Além disso, o padrão de redução foi similar nos três grupos, pois quanto maior foi a concentração e o tempo de tratamento, menor foi a sobrevivência celular. Resultado similar foi obtido em células de mieloma múltiplo humano cultivadas *in vitro* e resistentes à doxorrubicina, onde o tratamento reduziu a sobrevivência celular, com bons resultados na utilização da dose de $10\mu\text{M}$ de βLP ²¹.

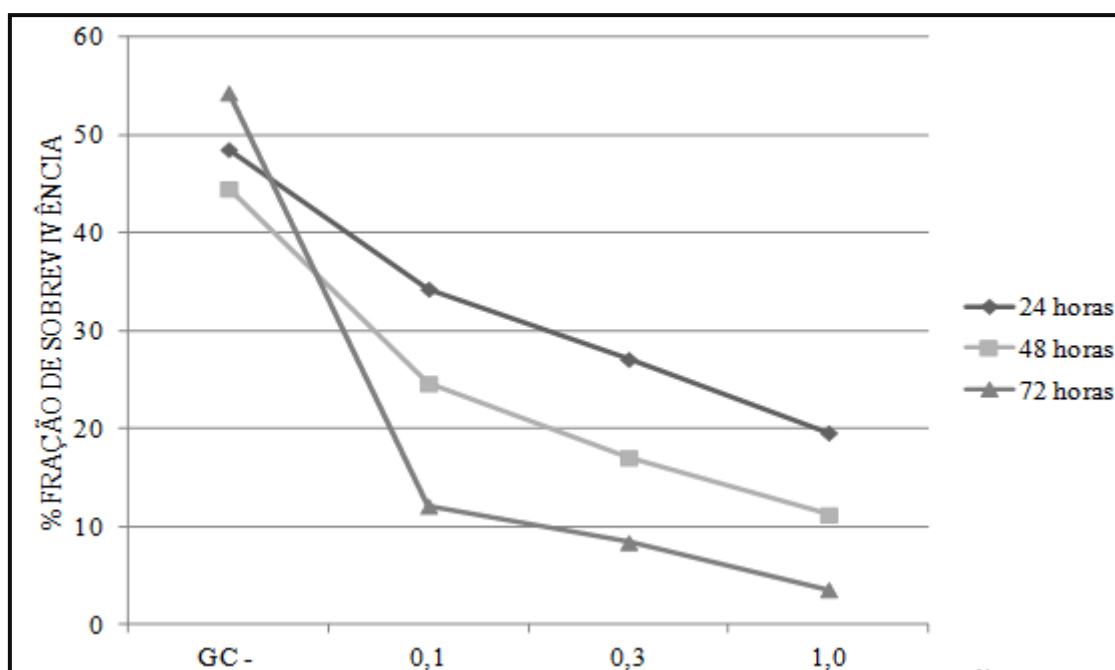


FIGURA 3 – Fração de sobrevivência das células após o tratamento com β lapachona.

Os resultados obtidos no cálculo da fração de sobrevivência foram avaliados estatisticamente pelo teste de F (Tabela 4).

TABELA 4 - Cálculo das variâncias e valores do F calculado para os grupos de tratamento com diferentes concentrações e tempo de exposição à β LP.

Tempo de Exposição	Concentração	Média (%)	S	S ²	F Calculado		
					0,1-0,3	0,3-1,0	0,1-1,0
24 h	0,1 μ M	34,30	5,71	32,57			
	0,3 μ M	27,13	3,96	15,69	2,07	0,51	1,07
	1,0 μ M	19,62	5,50	30,32			
48 h	0,1 μ M	24,62	5,63	31,76			
	0,3 μ M	17,08	5,91	35,03	0,90	1,22	1,11
	1,0 μ M	11,24	5,34	11,24			
72 h	0,1 μ M	12,15	1,36	1,85			
	0,3 μ M	8,44	1,73	3,02	0,61	0,30	0,18
	1,0 μ M	3,62	3,16	9,99			

F tabelado 5% (8,8) = 3,44. S = desvio padrão. S² = variância.

De acordo com os resultados, não houve diferença estatística significativa para os grupos tratados. Isso pode significar que ocorreu redução do crescimento celular e da fração de sobrevivência nos grupos tratados com a β LP nas diferentes concentrações e períodos de exposição ao tratamento.

Em suma, o composto β LP apresenta atividade citotóxica nas células de OS *in vitro*, além de exercer efeito redutor na viabilidade e sobrevivência das células após o tratamento. Também foram obtidos os resultados esperados utilizando-se baixas dosagens do tratamento, o que pode estar associado a uma menor incidência de efeitos adversos, sendo a β LP uma possível alternativa aos quimioterápicos hoje utilizados.

Conclusão

A β lapachona apresenta efeitos citotóxicos em células de osteossarcoma cultivadas *in vitro*.

Referências

1. Faisham WI, Saad AZM, Alsaigh LN, Azman MZN, Imran MK, Biswal BM, Bhavaraju VMK, Salzihan MS, Hasnan J, Ezane AM, Ariffin N, Norsarwany M, Ziyadi MG, Azman WSW, Halim AS, Zulmi W. Prognostic factors and survival rate of osteosarcoma. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2015; 1-7.
2. Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):3019-35.

3. Hattinger CM, Fanelli M, Tavanti E, Vella S, Ferrari S, Picci P, Serra M. Advancer in emerging drugs for osteosarcoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2015;20(3):495-514.
4. Ferrari S, Ruggieri P, Cefalo G, Tamburini A, Capanna R, Faglioli F, Comandone A, Bertulli R, Bisogno G, Palmerini E, Alberghini M, Parafioriti A, Linari A, Picci P, Bacci G. Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, and doxorubicin with or without ifosfamide in nonmetastatic osteosarcoma of the extremity: an Italian sarcoma group trial ISG/OS-1. *J Clin Oncol*. 2012;30(17):2112-8.
5. Zhang Y, Song L, Cai L, Wei R, Hu H, Jin W. Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;53:325-33.
6. Angulo P, Kaushik G, Subramaniam D, Dandawate P, Neville K, Chastain K, Anant S. Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):10.
7. Ferreira SB, Gonzaga DTG, Santos WC, Araújo KGL, Ferreira VF. β -lapachona: Sua Importância em Química Medicinal e Modificações Estruturais. *Rev Virtual de Quim*. 2009;2(2):140-160.
8. Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, Miana GA, Green IR. Lapachol: an overview. *Special Issue Reviews and Accounts*. 2007;2:145-171.
9. Middleton G, Ghaneh P, Costello E, Greenhalf W, Neoptolemos JP. New treatment options for advanced pancreatic cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2008;2(5):673-696.
10. Yu HY, Kim SOK, Jin CY, Kim GY, Kim WJ, Yoo YH, Choi YH. b-lapachone-induced apoptosis of human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K/Akt pathway. *Biomol Ther*. 2014;22(3):184-92.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
12. Park EJ, Min KJ, Lee TJ, Yoo YH, Kim YS, Kwon TK. b-Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. *Cell Death and Disease*. 2014;5:1230.
13. Cao L, Li LS, Spruell C, Xiao L, Chakrabarti G, Bey EA, Reinicke KE, Srougi MC, Moore Z, Dong Y, Vo P, Kabbani W, Bornmann, Yordy JS, Boothman DA. Tumor-selective, futile redox cycle-induced bystander effects elicited by NQO1 bioactivatable radiosensitizing drugs in triple-negative breast cancers. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;21(2):237-50.
14. Ough M, Lewis A, Bey EA, Gao J, Ritchie JM, Bornmann W, Boothman DA, Oberley LW, Cullen JJ. Efficacy of beta-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. *Cancer Biol Ther*. 2015;4(1):95-102.
15. Costa MP, Feitosa ACS, Oliveira FCE, Cavalcanti BC, Silva EN, Dias GG, Sales FAM, Sousa BL, Neto ILB, Pessoa C, Caetano EWS, Fiore SD, Fischer R, Ladeira LO, Freire VN. Controlled release of nor-beta-lapachone by PLGA microparticles: a strategy for improving cytotoxicity against prostate cancer cells. *Molecules*. 2016;21:1-12.

16. Moon DO, Kang CH, Kim MO, Jeon YJ, Lee JD, Choi YH, Kim GY. Beta lapachone decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. *J of Med Food*. 2010;13(3):481-488.
17. Jeon YJ, Bang W, Shin JC, Park SM, Cho JJ, Choi YH, Seo KS, Choi NJ, Shim JH, Chae JI. Downregulation of Sp1 is involved in beta-lapachone-induced cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Intern J of Oncol*. 2015;46:2606-26012.
18. Park SW, Kim JH, Kim KE, Jeong MH, Park H, Park B, Suh YG, Park WJ, Kim JH. Beta-lapachone inhibits pathological retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy via regulation of HIF-1- α . *J Cell Mol Med*. 2014;18(5):875-884.
19. Liu Y, Bi T, Dai W, Wang G, Qian L, Shen G, Gao Q. Lupeol induces apoptosis and cell cycle arrest of human osteosarcoma cells through PI3K/AKT/mTOR pathway. *Tech in Canc Res & Treat*. 2016;15(6):NP16-NP24.
20. Zhang J, Zhu X, Li H, Li B, Sun L, Xie T, Zhu T, Zhou H, Ye Z. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. *Int immunopharm*. 2015;24:50-58.
21. Li Y, Li C, Yu D, Pardee A. Potent induction of apoptosis by beta-lapachone in human multiple myeloma cell lines. *Mol Med*. 2015;6(12):1008-1015.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude da alta incidência de reações adversas provocadas pelos quimioterápicos, existe uma necessidade crescente para que sejam desenvolvidos novos medicamentos que tenham ação sobre as células de osteossarcoma, sem causar efeitos adversos em excesso ao paciente.

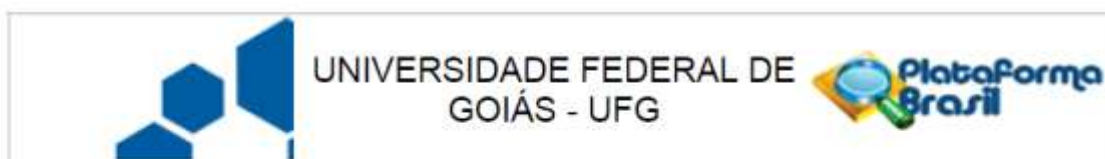
Neste contexto, foi investigado o efeito citotóxico da β lapachona sobre as células de osteossarcoma da linhagem MG-63, uma vez que já foi demonstrado previamente que essa substância apresenta efeito antineoplásico em diversos tipos de tumores. Após os ensaios, concluiu-se que a β lapachona promoveu redução na viabilidade celular, foi capaz de induzir citotoxicidade e, após o tratamento, a sobrevivência celular também foi reduzida.

O mesmo grupo de pesquisa envolvido neste experimento conduziu anteriormente estudos que empregaram outra linhagem de células de osteossarcoma, a D-17, de origem canina. As células da linhagem MG-63 demonstraram maiores necessidades metabólicas, o que exigiu um aumento de sua suplementação. Isso pode estar associado ao fato de o número de passagens das células estar acima de 100, podendo estas estarem senescentes.

Mesmo se tratando de células com maiores exigências, a β lapachona foi capaz de induzir citotoxicidade e reduzir a viabilidade celular, o que nos leva a acreditar que o composto possa surgir como uma alternativa aos tratamentos hoje utilizados na quimioterapia do osteossarcoma.

A prática terapêutica de associação de antineoplásicos, visando uma amplificação no tratamento do osteossarcoma, provocou aumento na incidência de efeitos adversos, fato este que também se relaciona às altas dosagens utilizadas. Em contraste, o tratamento das células tumorais com a β lapachona realizado nesta pesquisa, as dosagens utilizadas foram baixas e a eficiência elevada, o que permite vislumbrar a possibilidade do emprego desta substância minimizar efeitos adversos em pacientes.

Espera-se que a pesquisa contribua para que sejam feitos novos experimentos envolvendo a β lapachona, principalmente no que diz respeito às vias de transdução de sinal envolvidas em sua ação sobre as células de osteossarcoma. Outro aspecto relevante é a perspectiva que seu efeito citotóxico seja testado em outros tumores, bem como seja ampliado o interesse da comunidade científica para uma exploração adequada dos recursos naturais, especialmente do bioma Cerrado, para que novas plantas com propriedades medicinais e terapêuticas sejam descobertas, permitindo avanços na área da oncologia.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PROPRIEDADES CITOTÓXICAS DA β LAPACHONA EM CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA IN VITRO

Pesquisador: GABRIELA HADLER GABRIEL

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 57940416.9.0000.5083

Instituição Proponente: Escola de Veterinária e Zootecnia

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.724.748

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_689389.pdf	19/07/2016 09:28:15		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto2.pdf	19/07/2016 09:25:43	GABRIELA HADLER GABRIEL	Aceito
Outros	cartacep.pdf	14/07/2016 20:01:05	GABRIELA HADLER GABRIEL	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodecompromisso.pdf	14/07/2016 10:58:06	GABRIELA HADLER GABRIEL	Aceito
Outros	carta.pdf	14/07/2016 10:57:27	GABRIELA HADLER GABRIEL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_gabriela.docx	07/07/2016 21:45:20	GABRIELA HADLER GABRIEL	Aceito
Declaração do Patrocinador	financiamento.docx	31/03/2016 08:49:16	GABRIELA HADLER GABRIEL	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não