

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

**Marília Maria Sitônio**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA  $\beta$ -  
LAPACHONA E DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DA  $\beta$ -LAPACHONA  
EM CICLODEXTRINA**

Recife - 2012

**MARILIA MARIA SITÔNIO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA  $\beta$ -  
LAPACHONA E DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DA  $\beta$ -LAPACHONA  
EM CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, na área de Desenvolvimento Pré-clínico de Produtos Bioativos, para a obtenção do título de mestre.

**Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva**  
**Orientadora**

**Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto**  
**Co-orientador**

Recife - 2012

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Sitônio, Marília Maria**

**Avaliação da atividade anti-inflamatória da  $\beta$ -lapachona e do complexo de inclusão da  $\beta$ -lapachona em ciclodextrina. / Marília Maria Sitônio- Recife: O Autor, 2012.**

**68 folhas: il., fig., tab.**

**Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva**

**Coorientador: Pedro José Rolim Neto**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2014.**

**Inclui referências**

**1. Agentes antiinflamatórios 2. Artrite 3. Naftaquinona I. Silva,  
Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Rolim Neto, Pedro José (coorient.)  
III. Título**

**615.1**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CB-2017- 409**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Recife, 28 de março de 2012

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA** em 28 de março de 2012, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva** (Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: \_\_\_\_\_

**SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima** (Departamento de Antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: \_\_\_\_\_

**EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão** (Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico esta dissertação a Deus, minha família, amigos e orientadores pelo apoio, força, incentivo e amizade. Sem eles este trabalho não seria possível.

## **Agradecimentos**

A Deus, pelas constantes oportunidades que me são dadas, pois todas são fontes de aprendizado e amadurecimento. Em todos os momentos Ele me dá força interior para superar as dificuldades, suprindo-me em todas as necessidades e me direcionando nos melhores caminhos.

À Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, orientadora desta dissertação, por todo empenho, compreensão e, acima de tudo, por sua competência, participação com discussões, correções, revisões e sugestões que fizeram com que este trabalho fosse elaborado.

Ao Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto, co-orientador desta dissertação, por sua ajuda, interesse e empenho.

Ao Prof. Dr. Alexandre José da Silva Góes por ter fornecido a  $\beta$ -lapachona utilizada neste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos (LBPF), que acompanharam meu trabalho desde o início, participando diretamente nos experimentos e me ajudando em todos os momentos.

À minha família, por terem me fornecido condições de chegar onde estou, além do amor, carinho, compreensão e apoio que me foram dados.

Ao CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

Não é no silêncio que os homens se fazem, mas na palavra,  
no trabalho, na ação-reflexão.

Paulo Freire

## Resumo

A inflamação é a resposta local de proteção à lesão tecidual. Os fenômenos agudos são transitórios, havendo posteriormente a regeneração ou cicatrização da área envolvida, ou cronicidade do processo se o agente agressor não for eliminado. A grande maioria dos medicamentos existentes no mercado para o tratamento de doenças inflamatórias apresenta sérios efeitos adversos, o que impulsiona o contínuo estudo e pesquisa em busca de novos e melhores fármacos. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória e anti-artrítica da  $\beta$ -lapachona (3,4-diidro-2,2-dimetil-2*H*-naftol[1,2-*b*]pirano-5,6-diona). Para avaliar o potencial anti-inflamatório da  $\beta$ -Lapachona foram realizados os ensaios de edema de pata, peritonite e artrite induzida por adjuvante completo de Freund. Para avaliar os efeitos sobre o sistema imune inato foram determinadas as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6 no exsudato inflamatório. A  $\beta$ -lapachona reduziu significativamente o edema de pata nas doses de 40 e 60 mg/kg. No teste da peritonite, a inibição da migração leucocitária foi de 59% e 78% para as doses de 40 e 60 mg/kg, respectivamente. A  $\beta$ -lapachona não reduziu significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  no exsudato, entretanto houve redução de IL-6 e NO. A dosagem de IL-6 indicou as seguintes concentrações: controle (492,2 pg/mL),  $\beta$ -lapachona - 40 mg/kg - (301,3 pg/mL),  $\beta$ - lapachona – 60 mg/kg – (55,8 pg/mL). A concentração de NO obtida dos exsudatos foi a seguinte: controle (18,0 pg/mL),  $\beta$ -lapachona - 40 mg/kg - (4,3 pg/mL) e  $\beta$ - lapachona – 60 mg/kg – (2,8 pg/mL). No ensaio da artrite, o percentual de inibição de formação do edema foi de 37,7%. A dosagem de NO plasmático apresentou uma concentração de 91,2  $\mu$ M para a  $\beta$ -lapachona na dose de 60 mg/kg e de 127,3  $\mu$ M para o metotrexato na dose de 0,1 mg/kg/dia. Em conclusão, a  $\beta$ -lapachona possui um potencial promissor como droga anti-inflamatória, e mais especificamente, como anti-artrítica. Porém, é necessário a continuidade dos estudos para verificar seu efeito tecidual na produção de colágeno e outras substâncias implicadas no desenvolvimento da artrite.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -lapachona, naftoquinona, artrite, (3,4-diidro-2,2-dimetil-2*H*-naftol[1,2-*b*]pirano-5,6-diona)

## Abstract

Inflammation is a protective local response to tissue injury. The acute phenomena are transient, with subsequent regeneration or healing of the area involved, or chronicity of the process if the offending agent is not eliminated. The vast majority of drugs on the market for the treatment of inflammatory diseases has serious adverse effects, which drives the continuous study and research to new and better drugs. Therefore, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory and anti-arthritic of  $\beta$ -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione). To evaluate the anti-inflammatory potential of  $\beta$ -lapachone assays were performed in paw edema, peritonitis and arthritis induced by complete Freund's adjuvant. To evaluate the effects on the innate immune system have been determined the concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the inflammatory exudate. The  $\beta$ -lapachone significantly reduced the paw edema at doses of 40 and 60 mg / kg. In the test of peritonitis, the inhibition of leukocyte migration was 59% and 78% at doses of 40 and 60 mg / kg, respectively. The  $\beta$ -lapachone did not significantly reduce the levels of TNF- $\alpha$  in the exudates, however there was a reduction of IL-6 and NO. The dosage of IL-6 showed the following concentrations: control (492.2 pg / mL),  $\beta$ -lapachone - 40 mg / kg - (301.3 pg / mL),  $\beta$ -lapachone - 60 mg / kg - (55.8 pg / mL). The concentration of NO was obtained from exudates as follows: control (18.0 pg / mL),  $\beta$ -lapachone - 40 mg / kg - (4.3 pg / mL) and  $\beta$ -lapachone - 60 mg / kg - (2.8 pg / mL). In the trial of arthritis, the percentage inhibition of edema formation was 37.7%. The dosage of plasma levels had a concentration of 91.2 mM for the  $\beta$ -lapachone at 60 mg / kg and 127.3 mM methotrexate to a dose of 0.1 mg / kg / day. In conclusion, the  $\beta$ -lapachone has a promising potential as anti-inflammatory drug, and more specifically, as anti-arthritic. However, it is a need for further studies to verify its effect on tissue production of collagen and other substances involved in the development of arthritis.

**Keywords:**  $\beta$ -lapachone, naphthoquinone, arthritis, (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione).

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio vascular	23
<b>Figura 2:</b> Esqueletos básicos dos núcleos das quinonas	27
<b>Figura 3:</b> <i>Tabebuia avellaneda</i>	29
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do lapachol e $\beta$ -lapachona	32
<b>Figura 5:</b> Inibição da topoisomerase I pela $\beta$ -lapachona	34
<b>Figura 6:</b> Efeito da $\beta$ -lapachona sobre a concentração de NO na peritonite induzida por carragenina	45
<b>Figura 7:</b> Efeito da $\beta$ -lapachona no desenvolvimento do edema de pata na artrite induzida por adjuvante completo de Freund	47
<b>Figura 8:</b> Edema da pata traseira direita de rato Wistar submetido ao teste da artrite induzida por adjuvante completo de Freund	48
<b>Figura 9:</b> Efeito da $\beta$ -lapachona sobre a concentração de NO na artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund	49

## Lista de tabelas

- Tabela 1:** Efeito da  $\beta$ -lapachona no desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina 42
- Tabela 2:** Número de polimorfonucleares (PMNL) e percentual de inibição da migração leucocitária pela  $\beta$ -lapachona no teste da peritonite induzida por carragenina. 44
- Tabela 3:** Efeito da  $\beta$ -lapachona sobre a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-6 no teste de peritonite induzida por carragenina. 45

## **Lista de siglas e abreviaturas**

5-HT	5-Hidroxitriptamina
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
COX	Ciclo-oxigenase
DMARDs	Drogas Anti-Reumáticas Modificadoras da Doença
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
iNOS	Óxido Nítrico Sintase indutível
LPS	Lipopolissacarídeo
MTX	Metotrexato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PBS	Solução tampão fosfato
PGE2	Prostaglandina E2
PMNL	Polimorfonuclear
SNC	Sistema nervoso Central
SOD	Superóxido Desmutase
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
Objetivo geral .....	18
Objetivos específicos .....	18
<b>1 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
1.1 Inflamação .....	20
1.2 Artrite reumatóide .....	25
1.3 Derivados quinônicos .....	27
1.4 Naftoquinonas .....	28
1.5 Lapachol .....	29
1.6 $\beta$ -Lapachona .....	31
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
2.1 Animais .....	37
2.2 Material de estudo .....	37
2.3 Metodologia .....	38
2.3.1 Formação do complexo de $\beta$ -Lapachona em $\beta$ -ciclodextrina ...	38
2.3.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina .....	38
2.3.3 Teste da peritonite induzida por carragenina .....	38
2.3.4 Teste da artrite induzida por adjuvante completo de Freund ....	39
2.3.5 Determinação de níveis de TNF- $\alpha$ e IL-6 .....	39
2.3.6 Quantificação de nitrito .....	40
2.4 Análise dos dados .....	40
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	53

<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

# **Introdução**

## INTRODUÇÃO

A inflamação pode ser classificada na dinâmica de sua resposta como aguda e crônica. Em estágios iniciais da inflamação o tipo celular predominante é o neutrófilo e, em fases mais tardias, células mononucleares tais como macrófagos, linfócitos e mastócitos são predominantes, amplificando o processo inflamatório (BILATE, 2007). O processo inflamatório também é caracterizado pela produção de prostaglandinas, leucotrienos, histamina, citocinas pró-inflamatórias, além de liberação de substâncias a partir de tecidos e células migratórias (CUZZOCREA et al, 2004).

A fase inicial da inflamação inclui mudanças no fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade vascular, exsudação e quimiotaxia de leucócitos ao local afetado, através de mediadores químicos. Posteriormente, patógenos e células inflamatórias precisam ser removidas e a integridade e funcionamento normal do tecido restaurado. No entanto, quando o equilíbrio entre inflamação e restauração tecidual é quebrado, ocasionará o desenvolvimento de desordens inflamatórias crônicas e autoimunes (SZÉLES et al, 2007).

A inflamação crônica se instala de forma lenta e insidiosa como, por exemplo, nas doenças reumatológicas, tais como a artrite reumatóide e o lúpus eritematoso sistêmico.

Artrite reumatóide é uma doença sistêmica inflamatória de origem autoimune, caracterizada por uma inflamação crônica nas articulações, simétrica e erosiva, afetando principalmente as pequenas articulações diartroidais dos pés e das mãos (BRENOL et al, 2007). Tem prevalência de 1% na população mundial e está associada a um significativo aumento da morbidade e mortalidade entre os pacientes afetados (DAYER; CHOY, 2010). Atualmente, quatro diferentes classes de substâncias são usadas clinicamente: drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), analgésicos, glicocorticóides e drogas antireumáticas modificadoras da doença (DMARDs - *disease-modifying antirheumatic drugs*) são usadas clinicamente. AINEs e analgésicos não alteram o curso da doença ou previnem a destruição das articulações, portanto não devem ser usadas como tratamento único. Graves efeitos colaterais decorrentes do uso prolongado de glicocorticóides orais são bem conhecidos e essas drogas devem ser usadas com cautela. As DMARDs

são uma classe heterogênea de compostos, incluindo sulfasalazina, antimaláricos, penicilamina, metotrexato (MTX), azatioprina, leflunomida e ciclofosfamida (BANSBACK et al, 2005), além das classes anteriormente citadas.

Fármacos que são capazes de bloquear as citocinas pró-inflamatórias envolvidas na fisiopatologia de desordens inflamatórias oferecem um caminho para o desenvolvimento de novos fármacos anti-artríticos (MCCHULLOCH et al, 2006).

A  $\beta$ -lapachona é uma naftoquinona obtida a partir do lapachol, composto isolado da madeira de várias espécies de Ipê (*Tabebuia* sp.). Tal qual o lapachol, a  $\beta$ -lapachona mostra uma diversificada ação farmacológica, tais como: tripanossomicida (FERREIRA et al, 2011), antineoplásica (MOON et al, 2010), antifúngica (MEDEIROS et al, 2010) e antibacteriana (GUIRAUD et al, 1994). Estudo realizado por Moon et al (2010) demonstrou uma possível atividade anti-inflamatória da  $\beta$ -lapachona através da inibição da produção, *in vitro*, de iNOS, PGE<sub>2</sub> e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) sobre células BV-2 da micróglia estimuladas por lipopolissacarídeo. Jackson et al. (2008) realizaram estudos *in vitro* com  $\beta$ -lapachona e observaram uma inibição do crescimento de sinoviócitos, diminuição da angiogênese e da expressão de collagenase.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a propriedade anti-inflamatória da  $\beta$ -Lapachona *in vivo*, contribuindo para a pesquisa de novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios e/ou antiartríticos.

# Objetivos

## OBJETIVOS

### Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e anti-artrítica da  $\beta$ -lapachona em vários modelos animais.

### Específicos

- Obtenção do complexo de inclusão da  $\beta$ -lapachona em  $\beta$ -ciclodextrina -  $\beta$ CD;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do complexo de inclusão no modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da  $\beta$ -lapachona no modelo de peritonite induzida por carragenina;
- Investigar o potencial antiartrítico da  $\beta$ -lapachona, utilizando o modelo de artrite induzida por Adjuvante completo de Freund;
- Determinar as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6 e NO nos animais submetidos ao tratamento com o composto em estudo.

# **Revisão da literatura**

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Inflamação

O termo inflamação provém do latim *enflamare*, que significa “atear fogo”. Este termo já era descrito em antigos papiros egípcios e em escritas encontradas na Mesopotâmia há mais de 2000 anos. No primeiro século depois de Cristo, Celsius definiu a presença de quatro sinais clínicos denominados de sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, dor e edema. A perda da função do local lesado foi adicionado por Galeno em 130-200 d.C. (CONE, 2001).

A inflamação pode ser definida como uma reação da microcirculação induzida por uma injúria aos tecidos e que tem por objetivo a proteção à lesão tecidual. A intensidade da resposta inflamatória irá depender da intensidade e do tempo de ação do estímulo agressor, ou seja, será diretamente proporcional à quantidade de tecido lesado (DANTAS; SIQUEIRA, 2000).

Muitos mecanismos eficazes podem proteger o indivíduo de infecções por microrganismos patogênicos, impedindo a ação destes. A primeira linha de defesa contra microrganismos invasores é denominada imunidade inata, a qual está relacionada a um grande número de determinantes. Estes podem ser físicos ou químicos, tais como: pele, mucosas e substâncias com capacidade antimicrobiana. Aliado à imunidade inata, há determinantes específicos do hospedeiro, tais como: nutrição, variação hormonal e idade, que são fatores marcantes na variação da resistência. Se o agente infeccioso burla esta defesa inata não-induzida, uma segunda via de resposta será deflagrada – a resposta inflamatória aguda. Esta é uma reação local e de curta duração que envolve complexos eventos fisiológicos, visando à proteção aos tecidos e restringindo os danos ao local da infecção ou injúria.

Durante a resposta inflamatória aguda, há um aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, exsudação, adesão, migração leucocitária e quimiotaxia. O aumento do fluxo sanguíneo deve-se à vasodilatação ocorrida, inicialmente, nas arteríolas com conseqüente hiperemia. Esta vasodilatação é conseqüência da

liberação de aminas vasoativas como a histamina e serotonina (DANTAS; SIQUEIRA, 2000).

A histamina é sintetizada a partir do aminoácido histidina sob ação da L-histidina descarboxilase e pode ser encontrada especialmente em mastócitos, basófilos, plaquetas e linfócitos (MAINTZ; NOVAK, 2007). Sua liberação pode ocorrer devido a agentes desgranuladores, como citocinas e neuropeptídeos (IDZKO et al, 2002). A ação da histamina é mediada por quatro receptores farmacologicamente distintos: H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>. Dentre estes, o receptor H<sub>1</sub>, expresso em células musculares lisas, endoteliais e cérebro, é o responsável pela contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular (ASHMAWI et al, 2009). A ligação da histamina a este receptor leva ao aumento de extravasamento de proteínas plasmáticas por meio da abertura de lacunas endoteliais (GREGA et al, 1981). O receptor H<sub>4</sub> apresenta uma elevada expressão na medula óssea, células hematopoiéticas periféricas, neutrófilos, eosinófilos e células T; expressão moderada no baço, timo, pulmão, intestino delgado, cólon e coração, de modo que sua ativação pela histamina promove o acúmulo de células inflamatórias, em particular eosinófilos e mastócitos, na área inflamada (NAKAMURA et al, 2000).

A serotonina é uma amina vasoativa oriunda da hidroxilação e descarboxilação do aminoácido triptofano, sendo sintetizada majoritariamente nas células enterocromafins da mucosa intestinal (GYERMEK, 1996). Este mediador vasoativo é um dos mais importantes por aumentar a permeabilidade vascular, através de uma vasoconstrição das veias e consequente dilatação capilar. A maior parte da serotonina é armazenada no trato gastrintestinal e SNC (SIKANDER et al, 2009). O sistema serotoninérgico tem uma variedade de subtipos de receptores. Estudos revelam que não existe um receptor específico para a 5-HT, mas uma superfamília de 14 receptores, com funções e localizações específicas nas áreas pré e pós-sinápticas. Em doenças inflamatórias, esse mediador é liberado pelas plaquetas e mastócitos de murinos (evidências indicam que os mastócitos humanos não possuem serotonina em seus grânulos). Quando injetado na pata de ratos, induz hiperalgesia (TAIWO; LEVINE, 1992).

Devido ao aumento da permeabilidade vascular, ocorre a saída de fluido dos vasos sanguíneos para os tecidos, fenômeno conhecido por exsudação. Exsudato é um fluido extravascular de origem inflamatória que contém altas concentrações de proteínas e detritos celulares. Tem a função de destruir o agente agressor, degradar

e remover o tecido necrosado (PAULINO et al, 2009) Dependendo do local, da intensidade da reação e do agente injuriante, o exsudato pode ter diferentes características. De acordo com a quantidade de proteínas ou células, o exsudato pode ser classificado em: seroso - o líquido extravasado tem alto teor aquoso, apresentando pouca quantidade de moléculas protéicas; fibrinoso – o fluido que escapa dos vasos é rico em fibrinogênio formando uma rede de fibrina no território inflamado. Pode ocorrer na cavidade pericárdica em certas doenças reumáticas, ficando o espaço pericárdico preenchido por uma massa de fibrina e, por último, exsudato purulento – ocorre em inflamação severa e é ocasionado por agente etiológico infeccioso. O exsudato purulento é formado pelo acúmulo de grande quantidade de neutrófilos, que liberam enzimas proteolíticas e radicais livres, principais responsáveis pela lise tecidual (DANTAS; SIQUEIRA, 2000).

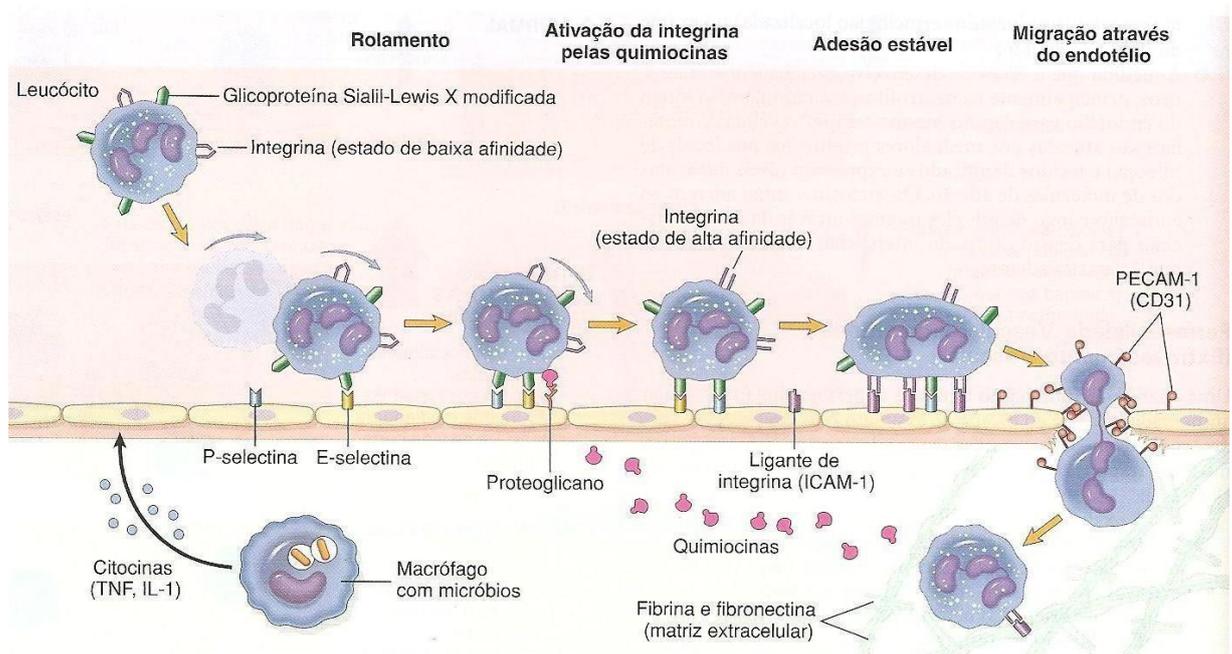
Durante a resposta inflamatória, o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  estimula a expressão seqüencial de diferentes moléculas de adesão no endotélio, envolvidas no recrutamento de leucócitos do sangue para o espaço intersticial (CAMUSSI et al, 1991). A redução do fluxo sanguíneo também permite o deslocamento dos leucócitos para a periferia dos vasos, alinhando-os próximos ao revestimento endotelial. Os neutrófilos polimorfonucleares são as primeiras células que chegam ao local agredido, sendo usualmente encontrados no centro dos vasos sanguíneos, onde o fluxo é mais rápido (REAVES et al, 2005).

As etapas da migração celular ocorrem geralmente nas vênulas pós-capilares e consiste de um contato inicial de leucócitos com a parede do vaso, rolamento destes ao longo do endotélio, seguido de uma adesão firme e migração transendotelial. O termo recrutamento de leucócitos abrange todos os eventos que mobilizam a saída de leucócitos circulantes para o tecido inflamado (PICCIO et al, 2002).

O mecanismo de rolamento é mediado por uma família de moléculas de adesão, glicoproteínas conhecidas como selectinas (P-selectina, E-selectina e L-selectina), que promovem uma fraca ligação inicial dos leucócitos às vênulas nos sítios de inflamação (KERFOOT; KUBES, 2002). Após um primeiro contato com a parede do vaso, os leucócitos diminuem sua velocidade e começam a rolar ao longo da superfície endotelial, o que favorece as interações entre leucócitos e endotélio (KUBES; KERFOOT, 2001). Posteriormente, os leucócitos podem ser ativados através de mudança conformacional de integrinas, moléculas presentes em sua

superfície celular e, conseqüentemente, podem aderir de forma estável ao endotélio via membros da superfamília das imunoglobulinas (SIMON; GREEN, 2005).

A última etapa é a migração dos leucócitos através de espaços inter- endoteliais para o tecido extravascular, o que requer uma reorganização do citoesqueleto, com formação e retração de pseudópodes. Moléculas presentes em junções intercelulares do endotélio também estão envolvidas na migração. Uma vez no tecido conectivo, os leucócitos aderem à matriz extracelular via integrinas (KERFOOT; KUBES, 2002; KUBES, 2002). Este mecanismo está ilustrado na figura 1.



**Figura 1:** Mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio vascular (ROBBINS et al, 2006).

Na continuidade do processo, ocorre, no tecido lesado, a infiltração de granulócitos, monócitos e linfócitos, através da ação de mediadores químicos da inflamação, tais como: interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8), leucotrieno B<sub>4</sub>, fator ativador de plaquetas (PAF) e produtos bacterianos. Após a diapedese, os leucócitos migram em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia, com o objetivo de eliminar o agente causal e restabelecer a integridade do tecido lesado (PRESIBELLA et al, 2003). Os leucócitos possuem receptores para agentes quimiotáticos na membrana citoplasmática e a ocupação destes promove uma cascata de ativação intracelular, via fosfolipase C, onde há a liberação de Ca<sup>+2</sup> de vesículas intracelulares. O aumento da concentração de Ca<sup>+2</sup> ativa a actina e

miosona, responsáveis pelo movimento celular. A quimiotaxia é eficaz em um raio de 100  $\mu\text{m}$  do tecido inflamado, pois nenhuma área tecidual localiza-se a distância maior que este raio, facilitando a atração de fagócitos para o local inflamado (DANTAS; SIQUEIRA, 2000). Deste modo, o objetivo da inflamação aguda é servir como aporte de defesa para o organismo, para assim eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados (KIRVESKARI et al, 2003). Porém, quando a resposta inflamatória escapa aos mecanismos de controle, o processo passa a possuir características sistêmicas e provoca a disfunção de órgãos e sistemas (GILROY, 2010). As causas da inflamação crônica são, principalmente: infecções persistentes; exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, endógenos ou exógenos; auto-imunidade, dentre outras. A resposta inflamatória crônica é de natureza proliferativa, devido à presença de fibroblastos e angioblastos em estado de proliferação (GEPDIREMEN et al, 2004).

O processo inflamatório crônico pode ter longa duração se o agente agressor persistir e pode variar de semanas a meses, na qual há inflamação ativa, destruição tecidual, além de tentativas de reparo, ocorrendo simultaneamente, o que acarretará proliferação de fibroblastos e formação de granulomas (GILROY, 2010).

A destruição tecidual é uma das características mais marcantes da inflamação crônica. As próprias células necróticas do tecido inflamado podem iniciar a cascata inflamatória, ativando o sistema das cininas, coagulação, sistema fibrinolítico e liberação de mediadores pelos leucócitos responsivos ao tecido necrótico (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Paralelamente ao processo de destruição celular, ocorre a estimulação de fibroblastos, que passam a produzir colágeno. Isto resulta na formação de fibrose que, dependendo da quantidade formada, pode acarretar sequelas aos tecidos, como a perda da função (DANTAS, SIQUEIRA, 2000).

Portanto, quando o equilíbrio entre inflamação e restauração tecidual é quebrado, ocasionará o desenvolvimento de desordens inflamatórias crônicas e autoimunes, tais como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (SZÉLES et al, 2007).

## 1.2 Artrite reumatóide

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória sistêmica de etiologia auto-imune, com prevalência de, aproximadamente, 1% da população mundial e predominante no sexo feminino, com tendência a surgir após a quarta década de vida. A artrite é uma doença comum das articulações caracterizada por inflamação e fibrose da membrana sinovial, destruição do osso e da cartilagem. É associada com a dor, imobilidade, rigidez e diminuição da capacidade funcional da articulação (KUMAR et al, 2010). O diagnóstico realiza-se por uma combinação de quadro clínico, laboratorial e radiológico, levando-se em conta tanto a apresentação inicial quanto a evolução característica (MARTINEZ et al, 2008).

O evento inicial da doença é o processo inflamatório na membrana sinovial com infiltrado de linfócitos e macrófagos. A hiperplasia das células sinoviais, o infiltrado linfocítico e a neoangiogênese levam à formação do “pannus” (tecido sinovial proliferado), que atinge o osso subcondral e, em seguida, a cartilagem articular, com destruição progressiva. As perdas focais de osso marginal e subcondral contribuem para a morbidade da doença. Há uma complexa variedade de células envolvidas, tais como: neutrófilos, macrófagos, células mononucleares e diversas moléculas inflamatórias, tais como o óxido nítrico (NO), citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e quimiocinas (CUZZOCREA et al, 2005). Apesar da identificação de inúmeros tipos diferentes de citocinas e outros fatores envolvidos na patogênese da artrite reumatóide, o TNF- $\alpha$  continua ocupando lugar de destaque na doença erosiva da articulação por meio da ativação dos osteoclastos (BRENOL, 2007).

Baseado no conceito de que doenças inflamatórias podem ser causadas ou agravadas por macrófagos ativados, muitas intervenções terapêuticas para distúrbios inflamatórios concentraram-se em suprimir ou neutralizar um ou mais produtos pró-inflamatórios liberados por esses macrófagos. Exemplos de tais terapêuticas incluem agentes que reduzem os níveis de TNF- $\alpha$  (por exemplo, etanercept, infliximab, adalimumab), IL-1 (anakinra), e IL-6 (tocilizumab, atlizumab) (TAYLOR; FELDMANN, 2009)

. Alternativamente, o metotrexato (MTX) possui uma longa história de uso no tratamento de doenças reumáticas, e continua a ser o mais prescrito

na medicina. Como um conhecido antifolato, o MTX inibe múltiplas enzimas folato-dependentes envolvidas na biossíntese de purinas / timidilato e vários aminoácidos (FRASER et al, 2002).

Embora o preciso mecanismo anti-inflamatório de atuação do MTX seja incerto, suas atividades terapêuticas podem incluir a supressão da proliferação de células do sistema imunológico responsável pela indução da inflamação, da apoptose das células T, e alterações no recrutamento de células e produção de citocinas. Comparado com a maioria das drogas anti-reumáticas modificadoras da doença, o MTX é geralmente bem tolerado, e as pessoas as quais são prescritas permanecem com esta medicação por muitos anos. No entanto, devido à toxicidade relacionada com a droga e / ou respostas insatisfatórias, muitos pacientes seguem um tratamento combinado com agentes biológicos, como, por exemplo, inibidores dos receptores das citocinas IL-1 e TNF (LU et al, 2011).

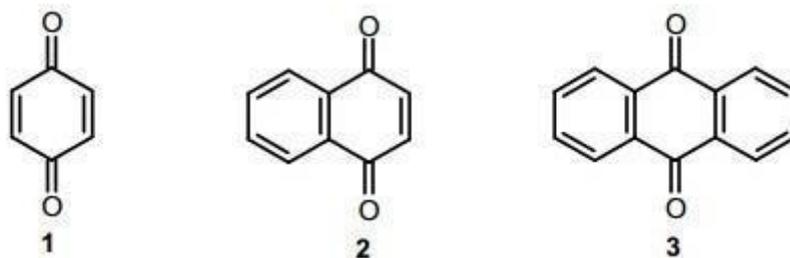
Além das diversas citocinas, espécies reativas de oxigênio são bem conhecidas na participação da inflamação articular na artrite. As espécies reativas de oxigênio geradas trazem danos ao ácido hialurônico, cartilagem, colágeno extracelular, componentes celulares como lipídios, DNA, proteínas e também afetam as funções de condrócitos. Em vista disso, estudos clínicos têm sido realizados, onde os antioxidantes têm mostrado alguns efeitos benéficos na artrite (HAFLAH et al, 2009).

Uma nova abordagem para o tratamento de artrite reumatóide é o uso de inibidores de topoisomerase I (campotecina e  $\beta$ -lapachona) e de topoisomerase II, tais como etoposídeo e mitoxantrona. O etoposídeo mostrou seletividade para depleção de monócitos em população de camundongos e coelhos (VAN'T WOUT, 1989). Foi demonstrado que camundongos tratados previamente com etoposídeo antes da imunização com colágeno do tipo II não desenvolveram artrite, nem clínica nem histologicamente (VERDRENGH, 2002). Jackson et al (2008) realizaram estudos *in vitro* com  $\beta$ -lapachona e observaram inibição no crescimento de sinoviócitos, diminuição da angiogênese e expressão de colagenase. Entretanto, não encontramos na literatura nenhum relato de uso da  $\beta$ -lapachona em modelo de artrite. Além de agir como inibidora de topoisomerase I, a  $\beta$ -lapachona inibe a enzima NO-sintase, segundo estudo realizado por Liu et al (1999), o que pode abrir caminhos para o desenvolvimento de novos fármacos.

### 1.3 Derivados quinônicos

As quinonas representam uma variada família de metabólitos de distribuição natural e tem sido objeto de interesse devido as suas diversas atividades biológicas (HILLARD et al, 2008). Dentre as suas múltiplas biodinamicidades, destacam-se suas propriedades microbicida, tripanossomicida, viruscida, antitumoral e inibidoras de sistemas celulares reparadores como, por exemplo, a inibição do complexo de topoisomerases, desencadeando a apoptose celular (SILVA et al, 2003).

Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático relacionado com o anel quinonoídico: **1)** benzoquinonas – um anel benzênico; **2)** naftoquinonas - um anel naftalênico e **3)** antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular (figura 2). Os detalhes químico-estruturais das quinonas estão diretamente relacionados com suas propriedades físicas, químicas e atividade biológica, podendo estas propriedades diferir entre as quinonas dependendo das posições das carbonilas (SILVA et al, 2003).



**Figura 2:** Esqueletos básicos dos núcleos das quinonas (JÚNIOR, 2009).

Nos últimos anos intensificou-se o interesse por estas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos. Na natureza estão envolvidas em etapas importantes do ciclo de vida de seres vivos, principalmente nos níveis da cadeia respiratória, onde atuam como componentes móveis no transporte de elétrons da respiração e da fotossíntese (GOODWIN; MERCER, 1972)

Compostos contendo o grupo quinona são conhecidos por exibir atividade antitumoral, tripanossomicida, moluscicida, fungicida e antimalárica. Sua atividade biológica pode ser relacionada com a capacidade da molécula receber elétrons, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio e consequente estresse oxidativo no interior da célula (FRANCISCO, 2010). A ação genotóxica desta família de compostos está relacionada à inibição da topoisomerase II, tornando permanentes as quebras no DNA produzidas por esta enzima (SILVA et al, 2003).

Algumas quinonas são reconhecidamente importantes na clínica médica como agentes terapêuticos. Dentre elas, está a mitomicina C<sup>8</sup>, isolada de cultura de *Streptomyces caespitosus* e utilizada na quimioterapia de certos tipos de tumores sólidos (PAN et al, 1984). Drogas antitumorais contendo o núcleo quinona, como as antraciclinas e mitoxantronas também demonstram excelente atividade antitumoral (SONG et al, 2011). A ação farmacológica das mitomicinas e antraciclinas pode estar relacionado a capacidade das quinonas de se reduzirem pelas flavoenzimas celulares. Foi observado que muitas quinonas possuem um grupo de saída que pode ser ativado por redução das carbonilas quinonoídicas, gerando intermediários alquilantes (LIN et al, 1984).

#### **1.4 Naftoquinonas**

Dentre os constituintes químicos das quinonas, as naftoquinonas e seus derivados são alvos de constantes estudos por vários grupos de pesquisa e podem ser encontradas amplamente distribuídas na natureza, apresentando-se com estrutura cristalina de cor amarela ou alaranjada. Elas são descritas como constituintes de várias famílias vegetais, tais como: Ebanaceae, Sapotaceae, Boraginaceae e Proteaceae (HUSSAIN et al, 2007). Jacome et al (1999) também citam este grupo das quinonas como o principal constituinte da família Bignoniaceae, gênero *Tabebuia*, por serem frequentes em várias espécies deste gênero (figura 3).



**Figura 3:** *Tabebuia avellanedae*. Imagem retirada do site: [www.lapachol.com](http://www.lapachol.com).

A atividade biológica das naftoquinonas da família Bignoniaceae foram estudadas pioneiramente pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, com destaque para o lapachol, o qual demonstrou forte ação contra bactérias gram positivas (LIMA; WEIGERT, 1972). Isolado primeiramente do lenho da *Tabebuia avellanedae* Lor., “lapacho”, o lapachol foi descrito inicialmente por Paternò, em 1882 (MORRISON et al, 1970) e sua estrutura química estabelecida em 1896, por Hooker (RAO et al, 1968).

No Brasil, os gêneros *Tabebuia* e *Tecoma* são os principais encontrados na família Bignoniaceae, sendo esta conhecida popularmente como pau-d’arco ou ipê roxo (OLIVEIRA et al,1990). Gonçalves de Lima et al (1976), constataram no cerne do pau d’arco roxo a existência de um composto de coloração amarela com atividade antimicrobiana e que no decurso dos estudos químicos concluíram ser o Lapachol.

### 1.5 Lapachol

O lapachol é de fácil extração da serragem da madeira de várias espécies de Ipê, juntamente com outros grupos das quinonas. As substâncias mais estudadas entre as naftoquinonas são: o Lapachol, os dois isômeros,  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -

lapachona e a xiloidona (desidro- $\alpha$ -lapachona) (BURNETT; THOMSON, 1967). Ensaio realizado com o lapachol tem comprovado a eficácia biológica desta naftoquinona. Wanick et al (1970) testou a atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico do líber do Pau d'arco em 20 pacientes portadores de cervicites e cervicovaginites crônicas. Os resultados demonstraram regressão do estado patológico entre 19 e 29 dias de tratamento, dependendo da gravidade das manifestações clínicas. Posteriormente, Lopes et al (1988) realizaram ensaios em pacientes portadores de bursite aguda, tendinite e em pacientes portadores de sinusites e otites agudas e crônicas. Em todos os casos os pacientes apresentaram respostas clínicas satisfatórias, apresentando índice de cura superior a 90%.

A atividade anti-inflamatória e antinoceptiva do lapachol também foram investigadas através de formulações de uso tópico em testes pré-clínicos utilizando o teste do edema de pata induzido por carragenina e contorções induzidas por ácido acético (LIRA et al, 2008). O resultado deste estudo demonstrou que a formulação em gel do lapachol, na dose de 15 mg/kg, apresentou máxima atividade antiedematogênica (50,16%) na quarta hora após a administração da carragenina e atividade antinoceptiva de 77,3%, esta última mais eficiente que o grupo tratado com diclofenaco (69,49%). Esta atividade antiedematogênica foi corroborada por um estudo anterior realizado por Almeida et al (1990), onde o lapachol, nas doses de 100 e 500 mg/kg, demonstrou percentuais de 76 e 85%, respectivamente, na inibição da formação do edema de pata após 4 horas da indução da inflamação pela carragenina.

No que se refere à ação antineoplásica, estudos realizados indicam que o estresse oxidativo induzido pelo lapachol ocorre no nível da enzima P450 redutase. Neste processo as espécies reativas do oxigênio promovem a cisão do DNA (KUMAGAI et al, 1997). A atividade antitumoral do lapachol também pode estar relacionada à sua interação com os ácidos nucleicos. Tem sido proposto que a interação desta naftoquinona com a dupla hélice do DNA impede a duplicação do ácido desoxirribonucléico, assim como a transcrição do RNA (MURAY; PIZZORNO, 1998). O Lapachol foi comercializado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) sob forma de cápsulas gelatinosas indicadas para pacientes portadores de várias neoplasias malignas, como, carcinoma epidermóide do colo uterino, carcinoma epidermóide do assoalho da boca, adenocarcinoma do aparelho

digestivo, além de auxiliar na quimioterapia, porém não se encontra mais disponível no mercado (SESTER, 1996).

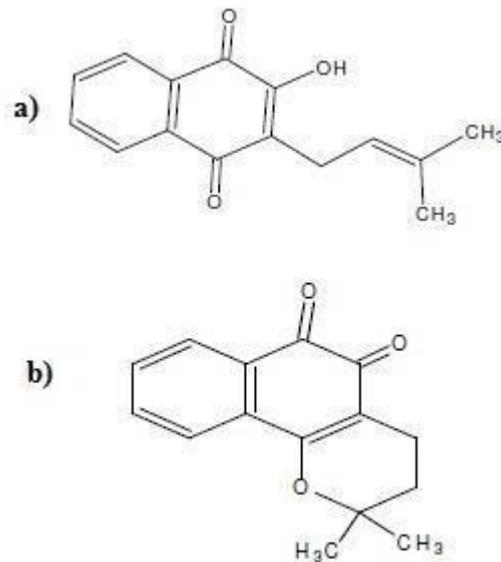
A atividade antitumoral do lapachol foi constatada pelo CCNS (Cancer Chemotherapy National Service, dos Estados Unidos da América do Norte) em 1962, que foi usado a partir daí, em vários modelos experimentais de neoplasias (RAO et al, 1968). Ballassiano et al (2005) avaliou o potencial anti-metastático e os efeitos do lapachol em uma linhagem de células humanas. Os resultados indicaram que o lapachol, na concentração de 400 µg/mL (correspondente a  $10^{12}$  de moléculas de droga/célula), inibiu a invasividade celular, representando uma importante atividade anti-metastática. O lapachol e seu derivado 2-(3-metil-2-butenil)-3- (tretaacetil-b-D-glicopiranosiloxi)-1,4-naftoquinona também mostraram atividade contra o carcinoma ascítico de Ehrlich na dose de 150mg/kg e inibiram o crescimento tumoral em 0-12% e 95,4- 99,6%, respectivamente (OLIVEIRA et al, 1978). Embora promova a regressão definitiva de neoplasias, além de agir como analgésico, os ensaios clínicos o desaprovam em decorrência de efeitos colaterais que, em muito, agravam o quadro clínico de pacientes com câncer: anemia, problemas gastrointestinais e aumento do tempo de coagulação (OLIVEIRA et al, 1990).

As observações sobre os efeitos secundários do lapachol incentivaram pesquisadores a desenvolverem derivados desta naftoquinona com base na sua estrutura molecular, levando-se em consideração a relação estrutura-atividade. Com base neste princípio, houve a síntese de vários análogos do lapachol com uma expressiva atividade biológica e menor toxicidade, como, por exemplo, a β-lapachona (ALMEIDA, 2009).

## 1.6 β-lapachona

Através da ação controlada do calor ou por hidrólise ácida do lapachol, obtém-se a β-lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2*H*-naftol[1,2-*b*]pirano-5,6-diona), uma orto-naftoquinona de estrutura molecular  $C_{15}H_{14}O_3$  (D'ALBUQUERQUE et al, 1972) (figura 4), igualmente responsável por diversas atividades farmacológicas, tais como: atividade *in vitro* contra células malignas humanas dos cânceres de pulmão, mama, colo-retal, próstata, melanoma e leucemia (SILVA et al, 2003); inibição da proliferação e indução da apoptose em linhagens de células de retinoblastoma

(SHAH et al, 2008); atividade antiviral, anti-psoriática, anti-parasitária e antifúngica (CUNHA-FILHO et al, 2007).



**Figura 4:** Estrutura química do lapachol (a) e  $\beta$ -lapachona (b) (CASTELLANOS et al, 2009).

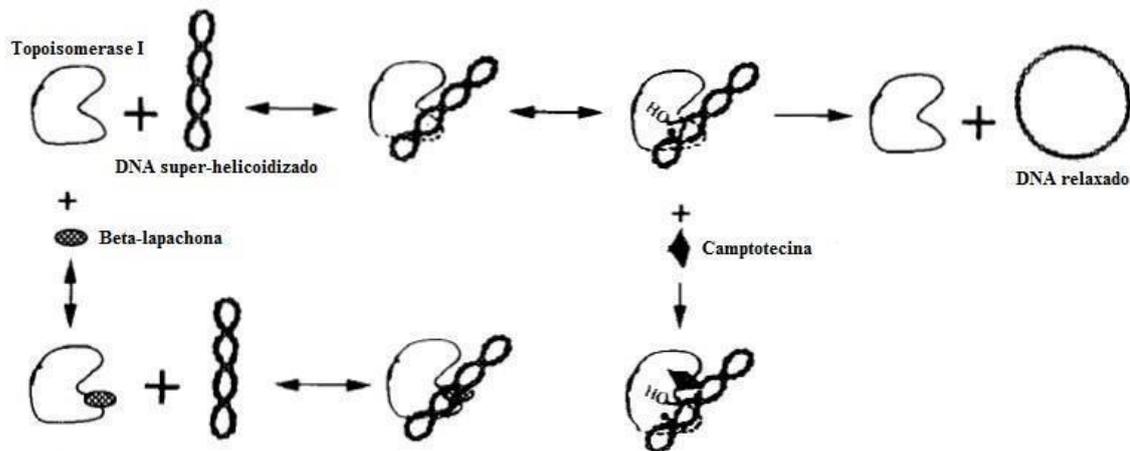
Estudos também apontam para o efeito cicatrizante da  $\beta$ -lapachona. Kung et al (2008) demonstrou que a  $\beta$ -lapachona, em baixas concentrações, promove a proliferação *in vitro* de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais em comparação com as células não tratadas, além de aumentar a porcentagem de células na fase S do ciclo celular. Os autores sugerem que esta atividade está relacionada à capacidade da  $\beta$ -lapachona em promover a síntese de DNA. Durante a pesquisa, a atividade cicatrizante da  $\beta$ -lapachona também foi avaliada em camundongos normais e diabéticos, onde foi comprovada através da aceleração da cicatrização das feridas em relação ao grupo controle. O exame microscópico revelou que a recuperação da derme e epiderme foi mais rápida, e a densidade dos vasos foi maior na ferida tratada com pomada contendo a  $\beta$ -lapachona do que nos animais tratados com pomada sem a naftoquinona. Os resultados também revelaram que a  $\beta$ -lapachona aumentou significativamente o número de macrófagos em 14 dias após o ferimento em camundongos normais e em 7 dias nos camundongos diabéticos, além de induzir a secreção de VEGF e EGF durante o processo de cicatrização, o que pode atrair outras células para o local da injúria, tais como células endoteliais e epidérmicas.

O potencial efeito antitumoral da  $\beta$ -lapachona tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa que visam o esclarecimento do mecanismo de ação desta molécula frente a diversas linhagens de tumores. Estudos já demonstraram a atividade antineoplásica da  $\beta$ -lapachona contra células de câncer de próstata (LI et al, 1995), leucemia promielocítica (PLANCHON et al, 1995), tumor ascítico S180 (sarcoma 180) em camundongos, entre outros.

Dentre os possíveis mecanismos de ação da  $\beta$ -lapachona sobre a proliferação tumoral, está a capacidade desta naftoquinona em inibir a ação das enzimas topoisomerases. As DNA topoisomerases são proteínas expressas por todas as células cujo mecanismo de ação é efetuar um corte temporário na molécula-alvo de DNA, promovendo a passagem da cadeia complementar pelo espaço criado. O corte é mantido pela ligação da tirosina do centro catalítico da topoisomerase à extremidade da cadeia clivada, através de uma ligação fosfodiéster (LI et al, 1993). De acordo com o tipo de corte que executam na molécula de DNA, as topoisomerases celulares dividem-se em topoisomerases de tipo I (efetuem o corte em uma única cadeia) e II (clivam as duas cadeias do DNA-alvo) (WASSERMAN et al, 1993).

Krishnan e Bastow (2000) demonstraram em suas pesquisas que a  $\beta$ -lapachona age como um potente inibidor irreversível da enzima topoisomerase II, importante no processo de replicação do DNA e em maior atividade nas células em proliferação. Durante este trabalho, a  $\beta$ -lapachona, quando co-incubada com o etoposídeo (inibidor da topoisomerase II), DNA e a enzima, interferiu significativamente ( $P < 0.05$ ) na formação do complexo de clivagem. Porém, um maior antagonismo foi constatado quando a  $\beta$ -lapachona foi pré-incubada com a enzima e o DNA, antes da adição do etoposídeo. Os autores associam estes resultados à capacidade da  $\beta$ -lapachona em inativar a topoisomerase II antes da adição do etoposídeo ou competição pelo sítio de ligação do etoposídeo no complexo enzima-DNA. Estudo realizado anteriormente por Li et al (1993) demonstrou o efeito inibitório da  $\beta$ -lapachona sobre a topoisomerase I em comparação com a camptotecina. Os resultados revelaram que a incubação direta da  $\beta$ -lapachona com a topoisomerase I, antes da adição de DNA como substrato, aumenta drasticamente o efeito inibitório, sugerindo a interação direta da  $\beta$ -lapachona com a topoisomerase I. Também foi verificado que esta ação depende da presença de NQO1-redutase. Este modo de atuação difere em relação ao da

camptotecina, que atua estabilizando o complexo de clivagem topoisomerase I-DNA. O mecanismo proposto pelos autores de inibição da topoisomerase I pela  $\beta$ -lapachona está ilustrado na figura 5.



**Figura 5:** Inibição da topoisomerase I pela  $\beta$ -lapachona (LI et al, 1993)

Ensaios pré-clínicos utilizando a  $\beta$ -lapachona em testes *in vivo* comprovaram a atividade antifúngica desta naftoquinona em infecções por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* em camundongos imunossuprimidos. Os autores concluíram neste estudo que o tratamento diário com a  $\beta$ -lapachona reduziu a população de *C. neoformans* em 10.000 vezes nos pulmões e cérebro e limpou a levedura do baço e fígado, sugerindo que o tratamento prolongado poderia aumentar a esterilização em todos os órgãos. Este efeito protetor foi confirmado por exame histológico, que demonstrou que os danos nos órgãos foram menos intensos no grupo tratado com a  $\beta$ -lapachona que no grupo tratado com PBS (MEDEIROS et al, 2010).

Estudo realizado por Moon et al (2007) também demonstram uma possível atividade anti-inflamatória da  $\beta$ -lapachona. Nesta pesquisa, foi determinado o efeito da  $\beta$ -lapachona na produção, *in vitro*, da óxido nítrico sintase (iNOS),  $PGE_2$  e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) sobre células da micróglia estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados demonstraram que a  $\beta$ -lapachona, em concentração maior que  $1\mu M$ , foi capaz de inibir significativamente o nível de iNOS e a expressão do RNA mensageiro (mRNA) responsável pela produção desta enzima. Também foi constatado uma supressão na síntese de  $PGE_2$  através de uma diminuição na expressão do mRNA responsável pela síntese de

COX2. Utilizada na concentração de 2  $\mu$ M, o pré-tratamento com  $\beta$ -lapachona demonstrou significativos resultados sobre a produção das citocinas IL-6, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , através de uma redução dos níveis de mRNA expresso para essas citocinas. Estudo anterior já comprovava a atividade anti-inflamatória *in vitro* da  $\beta$ -lapachona através da inibição da produção de iNOS em macrófagos alveolares e endotélio da aorta torácica de ratos. Em macrófagos alveolares, a incubação com LPS em vários intervalos de tempo resultou em um aumento significativo na produção de nitrito e síntese de iNOS. Quando o LPS foi co-incubado com a  $\beta$ -lapachona, esta produção foi inibida e não houve efeitos citotóxicos. O tratamento com LPS por 6 horas resultou em uma significante expressão de mRNA para iNOS, a qual foi inibida pela presença da  $\beta$ -lapachona em macrófagos alveolares. A  $\beta$ -lapachona inibiu a hipocontratilidade à fenilefrina no endotélio aórtico tratado com LPS. Quando a  $\beta$ -lapachona foi adicionada ao meio 3 horas após o tratamento com LPS, não houve diferenças significativas nas contrações provocadas pela fenilefrina. Estes resultados indicam que a  $\beta$ -lapachona inibe a indução da expressão do gene para NO sintase.

Este perfil é semelhante ao dos glicocorticóides que provavelmente atuam por inibição da transcrição ou expressão do gene para mRNA da iNOS (LIU et al, 1999).

Com as informações disponíveis na literatura, pode-se apontar para o potencial da  $\beta$ -lapachona como tema de estudos farmacológicos devido à sua variedade de atividades biológicas, com enfoque para sua ação anti-inflamatória. A propriedade desta naftoquinona em induzir a apoptose, por agir sobre as enzimas topoisomerases I e II, pode ser aproveitada nos tratamentos de inflamações crônicas como a artrite reumatóide, pois nesta doença há um desequilíbrio entre a proliferação de células sinoviais e apoptose celular, desencadeando uma hiperplasia sinovial e a formação do pannus. A capacidade da  $\beta$ -lapachona em inibir a produção de óxido nítrico e citocinas envolvidas em processos inflamatórios agudos e crônicos também a inclui no âmbito de potenciais drogas para o desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios.

# **Materiais e métodos**

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 20 e 25 g para o ensaio da peritonite, ratos *Wistar* machos para o ensaio do edema de pata e ratos *Wistar* fêmeas adultos para o ensaio da artrite, ambos pesando entre 200 e 300 g, oriundos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos em ambiente com temperatura de  $22 \pm 2$  °C e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais utilizados para os ensaios da peritonite e edema de pata foram submetidos a jejum, com a retirada da ração cerca de 4 horas antes do início do experimento. Durante todos os experimentos os animais tiveram livre acesso à ingestão de água. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE sob o número 23076.012189/2009-41.

### 2.2 Material de estudo

A  $\beta$ -lapachona utilizada neste estudo foi fornecida pelo Prof. Alexandre José da Silva Góes do Laboratório Planejamento e Síntese de Substâncias de Interesse Terapêutico do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e a  $\beta$ -ciclodextrina foi fornecida pela Sigma-Aldrich. O complexo de inclusão foi realizado no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - LTM, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, sob a orientação do professor Pedro José Rolim Neto. Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina, exceto a  $\beta$ -lapachona pura, que foi suspensa em uma mistura (2:1) de propilenoglicol/tween, onde uma pequena quantidade desta mistura foi adicionada à  $\beta$ -lapachona e o volume total completado com salina. No teste do edema de pata induzido por carragenina foi utilizado o complexo de inclusão de  $\beta$ -lapachona em  $\beta$ CD, e nos demais testes foi utilizada a  $\beta$ -lapachona pura. Nos grupos controle foram administrados os veículos utilizados para a solubilização da  $\beta$ -lapachona.

## **2.3 Metodologia**

### **2.3.1 Formação do complexo de $\beta$ -Lapachona em $\beta$ -ciclodextrina**

O método de preparo segue a metodologia descrita por PRESMICH (2009), onde ambas as substâncias foram pesadas e solubilizadas separadamente em solventes diferentes sob agitação mecânica. A proporção estequiométrica já conhecida é de 1:1 mol (fármaco:  $\beta$ CD). A  $\beta$ -lapachona foi solubilizada em álcool etílico e a  $\beta$ CD solubilizada em água purificada. Após solubilização completa dos compostos, a solução de  $\beta$ -lapachona foi adicionada a de ciclodextrina, sendo mantida a agitação mecânica. A solução hidroalcoólica obtida permaneceu em agitador oscilante por 24 horas antes de ser levada ao rotaevaporador, onde os solventes foram evaporados e o complexo obtido. Em seguida, o complexo de inclusão foi armazenado em estufa a 40°C por um período de 48 horas antes de ser utilizado nos ensaios biológicos.

### **2.3.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina**

O edema de pata (Winter et al, 1962) foi induzido através da injeção de 0,1 mL de carragenina (1% p/v) em salina estéril na região subplantar da pata direita traseira de rato Wistar (n = 8). Uma hora antes da injeção de carragenina, a  $\beta$ -lapachona foi administrada nas doses de 40 mg/kg e 60 mg/kg. Foi utilizado como padrão a dexametasona (0,5 mg/kg) e ao grupo controle foi administrado o veículo. Todos os compostos e o veículo foram administrados via oral. O volume da pata foi medido imediatamente após a administração da carragenina (tempo zero) e nos intervalos de 60, 120, 180, 240 e 300 minutos, através do deslocamento de água registrado em pletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile Co., Varese, Italy).

### **2.3.3 Teste da peritonite induzida por carragenina**

Neste ensaio, foram utilizados quatro grupos contendo oito animais cada. Dois grupos receberam a  $\beta$ -lapachona nas doses de 40 e 60mg/kg, respectivamente, o terceiro grupo recebeu apenas o veículo (grupo controle) e o quarto grupo não foi

induzido com carragenina e foi tratado apenas com salina. Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida por aplicação intraperitoneal de 0,1 mL/10 g de carragenina (1% em salina). Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, sendo injetado na cavidade peritoneal 2 mL de PBS contendo EDTA. A contagem de leucócitos totais foi realizada em analisador hematológico micros 60 (GUERRA et al, 2011). Após a contagem dos polimorfonucleares, os exsudatos foram centrifugados e o sobrenadante guardado a - 40°C para análise de TNF- $\alpha$ , IL-6 e NO.

#### **2.3.4 Artrite induzida por adjuvante completo de Freund**

Para avaliar os efeitos da inflamação crônica, foi empregado o método descrito por Newbould (1963), com pequenas modificações. Foram utilizados quatro grupos contendo oito animais cada: grupo 1: veículo; grupo 2: metotrexato (0,1 mg/kg/dia); grupo 3:  $\beta$ -lapachona (60 mg/kg) e grupo 4: e grupo sham (não induzido e tratado com salina). Os animais receberam todos os tratamentos via oral, uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos. No terceiro dia do tratamento, 0,1  $\mu$ L do adjuvante completo de Freund (FCA) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) foi injetado no tecido subplantar da pata traseira direita de cada rato. O edema na pata injetada e colateral foi medido diariamente do 3<sup>o</sup> ao 21<sup>o</sup> dia através de pletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile Co., Varese, Italy). Ao final do experimento, os animais foram anestesiados e o coletado por punção cardíaca para a dosagem de NO.

#### **2.3.5 Determinação de níveis de TNF- $\alpha$ e IL-6**

Para investigar a participação destas citocinas no mecanismo de ação da  $\beta$ -lapachona, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 presentes no exsudato dos animais submetidos ao teste da peritonite foram determinados pelo método de ELISA utilizando kits específicos para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) e todas as amostras foram testadas em duplicata.

### 2.3.6 Quantificação de nitrito

O soro obtido dos animais do experimento da artrite e o exsudato coletado ao final do experimento da peritonite foram utilizados para quantificar, indiretamente, os níveis de óxido nítrico através da quantificação de nitrito, um marcador da atividade anti-inflamatória. A quantidade de NO foi avaliada através do ensaio colorimétrico baseado na reação de Griess. Alíquotas de 50µL de soro foram misturadas com 50µL do reagente de Griess (1% sulfanilamida/ 0,1% diaminonafitiletileno, 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos. A densidade óptica foi lida em 560 nm. A concentração de NO foi determinada através uma curva padrão de nitrito de sódio (MCCARTNEY-FRANCIS et al, 1993).

### 2.4 Análise dos dados

As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o software *Graph Pad prism. 5.0*. Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância.

# **Resultados e discussão**

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste do edema de pata (tabela 1), a injeção de carragenina na pata direita traseira dos ratos do grupo controle produziu um notável aumento de volume desde a primeira hora, atingindo seu efeito máximo após cinco horas. O tratamento dos ratos com o composto em estudo e indometacina atenuou a resposta inflamatória. A  $\beta$ -lapachona, na dose de 40 mg/kg, reduziu a formação do edema, em relação ao grupo controle, na 2ª, 3ª, 4ª e 5ª hora após a injeção da carragenina, onde na quinta hora houve um maior inibição do edema, com valor de 40%. O efeito anti-edematogênico da  $\beta$ -lapachona na dose de 60 mg/kg foi mais acentuado e estatisticamente significativo em relação ao grupo controle a partir da primeira hora após a indução da inflamação, apresentando um maior percentual de inibição na quinta hora – 46%. A inibição da formação do edema pela indometacina foi significativa da primeira a quinta hora após a administração do agente flogístico.

**Tabela 1:** Efeito da  $\beta$ -Lapachona no desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	0 hora	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
$\beta$ -lapachona	40	0,07±0,01	0,16±0,01	0,2±0,03* (31%)	0,27±0,04* (25%)	0,3±0,03* (36%)	0,31±0,02* (40%)
$\beta$ -lapachona	60	0,08±0,01	0,12±0,03* (40%)	0,18±0,04* (38%)	0,23±0,04* (36%)	0,26±0,04* (44%)	0,28±0,05* (46%)
Indometacina	10	0,02±0,006	0,09±0,02* (55%)	0,18±0,01* (38%)	0,16±0,01* (55%)	0,20±0,05* (57%)	0,22±0,03* (58%)
Controle	-	0,03±0,02	0,20±0,07	0,29±0,04	0,36±0,06	0,47±0,07	0,52±0,08

Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. A significância foi determinada por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ : estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Na inflamação induzida por carragenina, os sinais cardinais da inflamação - edema, hiperalgesia e eritema – desenvolvem-se imediatamente após a injeção subcutânea, resultantes da ação de agentes pró-inflamatórios, como bradicinina, histamina e espécies reativas de oxigênio. Estes últimos podem ser gerados por neutrófilos infiltrantes que migram para o local da inflamação. A resposta inflamatória é geralmente quantificada pelo aumento no tamanho da pata (edema), que é máxima em torno de cinco horas após a injeção do agente flogístico (MORRIS, 2003).

Inflamações locais induzidas por carragenina são comumente utilizadas na avaliação de drogas anti-inflamatórias e são modelos úteis na avaliação da contribuição de mediadores envolvidos nas alterações vasculares associadas com a inflamação aguda (CUZZOCREA, 2004).

O edema é um dos primeiros sinais da inflamação e vários estudos utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina indicam este ser um adequado modelo *in vivo* para prever o valor de anti-inflamatórios que agem inibindo os mediadores da inflamação aguda (MOREBISE, 2002). O edema de pata induzida por carragenina envolve muitos mediadores que induzem reação inflamatória em duas fases diferentes. Em particular, a fase inicial de inflamação (0-1 h), tem sido atribuída à liberação de histamina, 5-hidroxitriptamina, bradicinina e serotonina, seguido por uma fase tardia (1-6 h) sustentado principalmente pela liberação de prostaglandinas e à indução da COX-2 no tecido (NANTEL et al, 1999).

Estudos relatam que a histamina e serotonina são liberadas principalmente durante a primeira 1,5 h, enquanto a bradicinina é liberado até 2,5 horas após a injeção de carragenina. A fase final, ocorre a superprodução de prostaglandinas nos tecidos e pode continuar até 5 h após a injeção de carragenina (Pèrez-Gurrero et al, 2001).

A ação antiedematogênica da  $\beta$ -lapachona pode estar associada a uma inibição da enzima ciclooxigenase, com conseqüente inibição da síntese de prostaglandinas, levando à diminuição da permeabilidade vascular e redução de edema. Esta propriedade da  $\beta$ -lapachona foi comprovada Lee et al (2005) através de estudo *in vitro*, onde demonstrou em seu trabalho que esta naftoquinona reduziu significativamente a expressão de proteínas e RNAm para COX-2. Porém, a  $\beta$ -lapachona foi ineficaz em relação a expressão de COX-1.

A indometacina é um AINE derivado do ácido indolacético e inibidor não-seletivo da enzima ciclooxigenase, além de reduzir a migração leucocitária e proliferação de células T e B (SAYAR; MELLI, 1999). Amabeoku e Kabatende (2011) testaram o efeito anti-inflamatório da indometacina, na dose de 10 mg/kg, durante o teste do edema de pata induzido por carragenina, onde foi observado uma significativa resposta anti-edematogênica deste AINE durante o período de 4 horas de medição do edema, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Os resultados obtidos no teste da peritonite induzida por carragenina, quanto à migração leucocitária e produção de citocinas, estão apresentados nas tabelas 2 e

3. A análise dos dados mostrou que a  $\beta$ -lapachona, na dose de 60 mg/kg, apresentou uma redução de 78% na migração de leucócitos polimorfonucleares quando comparado com o grupo controle. A indometacina, droga de referência, inibiu a migração celular em 67%. O objetivo dos experimentos que usam o modelo de peritonite aguda é avaliar os níveis de migração de leucócitos através da contagem do número total destas células que são liberadas durante o processo inflamatório agudo. A ação dos anti-inflamatórios não esteróides, que inibem a síntese de prostaglandinas vasodilatadoras, causa uma redução do fluxo de sangue, prejudicando a migração de leucócitos polimorfonucleares ao local da inflamação (KIM *et al*, 2006). A análise estatística mostra que a  $\beta$ -lapachona, em ambas as doses, seguiu um perfil semelhante ao da indometacina, não mostrando diferença significativa na inibição da migração.

**Tabela 2:** Número de polimorfonucleares (PMNL) e percentual de inibição da migração leucocitária pela  $\beta$ -Lapachona no teste da peritonite induzida por carragenina.

Composto	Dose (mg/kg)	Nº de PMNL / mL ( $\times 10^6$ )	Inibição (%)
$\beta$ -lapachona	40	4,18 $\pm$ 1,4*	59
$\beta$ -lapachona	60	2,22 $\pm$ 0,3*	78
Indometacina	10	3,32 $\pm$ 0,7*	67
Controle	-	10,14 $\pm$ 1,4	-

Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. A significância foi determinada por ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ : estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Para avaliar a ação da  $\beta$ -lapachona sobre células do sistema imune inato, foram determinadas as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6, além da determinação da concentração de óxido nítrico no exsudato inflamatório. Os resultados das citocinas presentes no exsudato inflamatório são mostrados na tabela 3. A  $\beta$ -lapachona, nas doses de 40 e 60 mg/kg, apresentou uma redução dos níveis de IL-6 (38% e 88%, respectivamente) quando comparada ao grupo controle. Os resultados mostram que a concentração de IL-6 no exsudato dos animais tratados com  $\beta$ -lapachona foi estatisticamente diferente entre as doses testadas e significantes quando comparados com a indometacina. Na dose de 40 mg/kg, a  $\beta$ -lapachona apresentou uma inibição na produção de TNF- $\alpha$  quando comparada com o grupo controle. Na

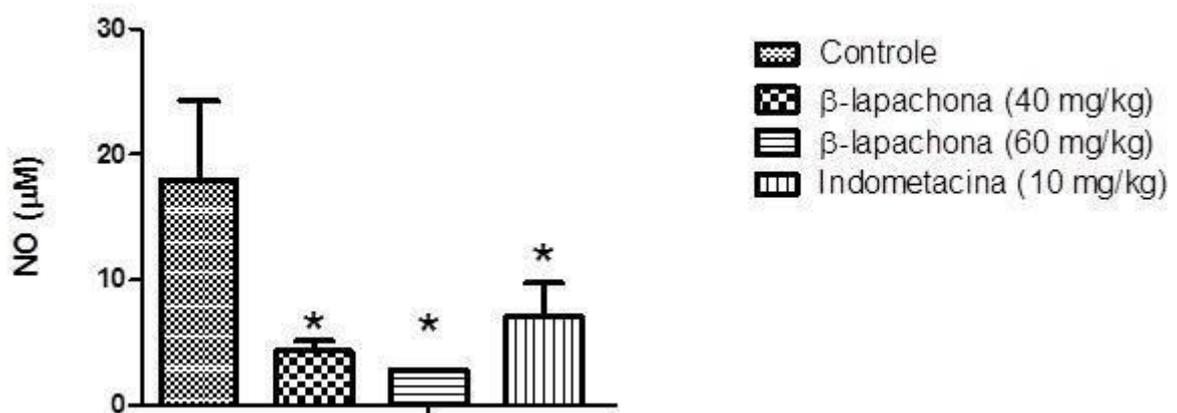
dose de 60 mg/kg, a concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato inflamatório ficou abaixo do limite de detecção indicado no kit de ELISA.

**Tabela 3:** Efeito da  $\beta$ -Lapachona sobre a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-6 no teste de peritonite induzida por carragenina.

Composto	Dose (mg/kg)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
$\beta$ -lapachona	40	164,3 $\pm$ 25,4*#	301,3 $\pm$ 1,2*#
$\beta$ -lapachona	60	-	55,8 $\pm$ 0,5*#
Indometacina	10	367,6 $\pm$ 10,8	385,3 $\pm$ 0,2*
Controle	-	378,1 $\pm$ 2,3	492,2 $\pm$ 2,3

Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. A significância foi determinada por ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ : estatisticamente significativo em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ : estatisticamente significativo em relação ao grupo padrão.

As concentrações de óxido nítrico presentes no exsudato inflamatório dos animais submetidos ao teste da peritonite estão representadas na figura 6. Os resultados mostram que a  $\beta$ -lapachona inibiu de forma significativa os níveis de NO quando comparado com o grupo controle. A  $\beta$ -lapachona, nas doses de 40 e 60mg/kg, apresentou percentual de inibição da produção de NO de 76% (4,3 $\pm$ 0,8) e 84% (2,8 $\pm$ 0,03), respectivamente, quando comparados com o grupo controle (18 $\pm$ 6,3).



**Figura 6:** Efeito da  $\beta$ -Lapachona sobre a concentração de NO na peritonite induzida por carragenina. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. A significância foi determinada por ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ : estatisticamente significativo em relação ao grupo controle.

A super-expressão de citocinas inflamatórias tais como TNF- $\alpha$  e IL-6 são relacionadas durante o desenvolvimento de inflamações crônicas e desordens

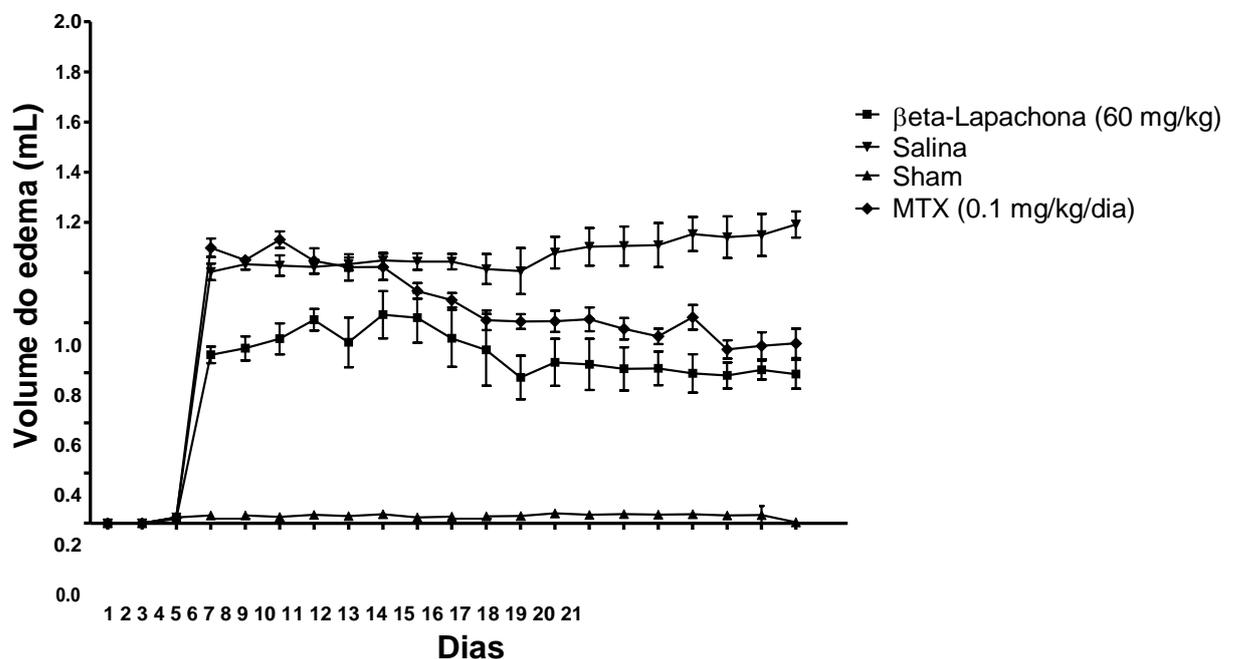
autoimunes (DINARELLO, 2002). A produção de TNF- $\alpha$  ocorre em resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) componentes da membrana de bactérias e a estímulos inflamatórios, sendo secretado por células do sistema imune, como macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos. Outros tipos celulares também secretam TNF- $\alpha$ , incluindo células endoteliais, mastócitos e tecidos neuronais. As células endoteliais vasculares respondem ao TNF- $\alpha$  submetendo-se a uma série de mudanças pró-inflamatórias, como o aumento da adesão leucocitária, migração transendotelial e extravasamento vascular (BRADLEY, 2008).

Após ser produzido e liberado, o TNF- $\alpha$  irá interagir com dois receptores diferentes designados TNFR1 e TNFR2, diferencialmente expressos em diversas células e tecidos (APOSTOLAKI et al, 2010). Após ligar-se ao receptor TNFR1, o TNF- $\alpha$  irá ativar, através de uma cascata de sinalização intracelular, o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B ativado irá agir no núcleo celular, induzindo a produção de proteínas envolvidas nas respostas inflamatória e imunológica responsáveis pelas principais ações biológicas do TNF- $\alpha$  (VITALE; RIBEIRO, 2007).

Estudo realizado por Manna et al (1999) comprovou o efeito inibitório da  $\beta$ -lapachona, em diversas concentrações, na ativação do NF- $\kappa$ B via TNF- $\alpha$  em células mielóides humanas. Este estudo também demonstrou que a  $\beta$ -lapachona foi capaz de inibir a citotoxicidade celular mediada pelo TNF- $\alpha$ .

Além do TNF- $\alpha$ , outras citocinas exercem efeito no desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório envolvido na artrite reumatóide, como a IL-6. Esta citocina é produzida por uma variedade de células incluindo os fagócitos mononucleares, células T e fibroblastos. Além da estimulação da síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, a IL-6 atua como um fator de crescimento para as células B maduras e induz a sua maturação final em células plasmáticas produtoras de anticorpos. Outro mecanismo de ação da IL-6 é a ativação e diferenciação de células T. Alguns dos efeitos reguladores da IL-6 envolvem a inibição da produção de TNF, fornecendo *feedback* negativo para limitar a resposta inflamatória aguda. Elevada produção de IL-6 tem sido observada em uma variedade de doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes como a tireoidite, diabetes tipo I e artrite reumatóide (FEGHALI; WRIGHT, 1997). Portanto, qualquer tentativa bem sucedida para bloquear estas citocinas virá a ser terapeuticamente importante.

No ensaio da artrite induzida por adjuvante completo de Freund, o pré-tratamento com a  $\beta$ -lapachona, na dose de 60 mg/kg foi eficaz em reduzir o volume do edema da pata neste modelo de inflamação crônica. O edema formado após a injeção do adjuvante foi medido diariamente a partir do terceiro dia de tratamento através de um pletismômetro (Ugo Basile) e os resultados obtidos estão apresentados na figura 7.



**Figura 7:** Efeito da  $\beta$ -Lapachona no desenvolvimento do edema de pata na artrite induzida por adjuvante completo de Freund. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. Os valores foram estatisticamente significante em relação ao grupo controle. A significância foi determinada por ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni com  $p < 0,05$ .

Quando comparada ao grupo controle, a  $\beta$ -lapachona apresentou uma resposta antiedematogênica a partir do terceiro dia de tratamento, com maior atividade a partir do décimo terceiro dia. O metotrexato, na dose de 0,1 mg/kg/dia, apresentou uma melhor inibição nos últimos cinco dias de tratamento, com percentuais entre 28 e 39,8%, este último apresentado no vigésimo primeiro dia. O desenvolvimento do edema na pata dos animais durante este ensaio está ilustrado na figura 8.



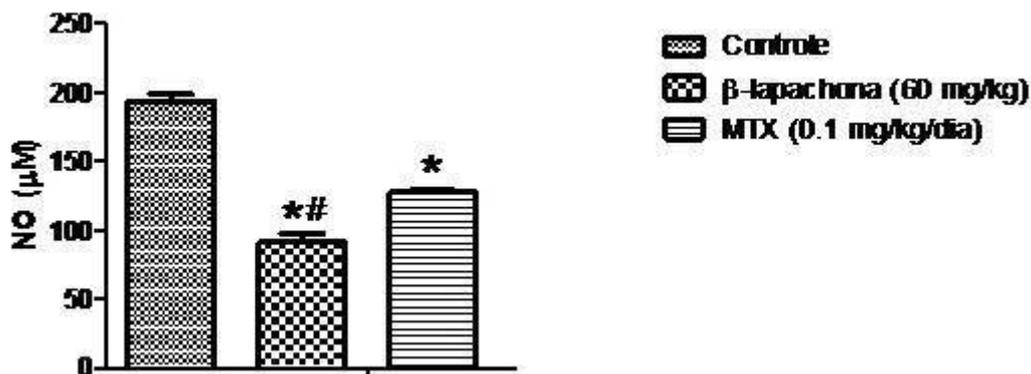
**Figura 8:** Edema da pata traseira direita de rato wistar submetido ao teste da artrite induzida por adjuvante completo de Freund.

Modelos de artrite em animais são utilizados para a avaliação do potencial de drogas antireumáticas para o uso clínico. Porém, é necessária a adoção de importantes critérios na seleção de um modelo, como: capacidade de previsão da eficácia em humanos, facilidade de uso, reprodutibilidade dos dados, duração razoável do período de teste e patogênese semelhante ao da artrite em humanos. O modelo de indução da artrite por adjuvante completo de Freund tem sido amplamente utilizado em testes pré-clínicos devido a suas características em comum com a artrite reumatóide em humanos, entre elas: inflamação poliarticular, proliferação óssea periosteal, reabsorção óssea e destruição da cartilagem (BENDELE et al, 1999).

Embora a etiologia da artrite reumatóide seja desconhecida, atualmente é aceito que um amplo espectro de elementos celulares e humorais do sistema imunológico contribui para a patologia da doença. Estudos demonstram o envolvimento de células T, auto-anticorpos produzidos por células B, infiltração de neutrófilos, linfócitos, células mononucleares e ativação de macrófagos. Acredita-se que as células T ativadas estimulam monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais a produzirem citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, prostaglandinas e quimiocinas, com consequente papel crucial destes últimos na patogênese da artrite reumatóide. Estes mediadores pró-inflamatórios iniciam e perpetuam o desenvolvimento da inflamação crônica imuno-mediada, levando à destruição articular (SILVA et al, 2011).

Radicais reativos de oxigênio também tem papel importante na patogênese da artrite reumatóide. Dentre as células ativadas durante o desenvolvimento da doença, leucócitos polimorfonucleares e macrófagos são responsáveis pela produção de peróxido de hidrogênio e superóxido, que podem causar destruição da cartilagem, do líquido sinovial e outros constituintes articulares. Esta atuação dos radicais livres, em particular o radical superóxido, se dá através do rompimento celular devido à peroxidação dos lipídeos da membrana (ABOTSI et al, 2010).

Os resultados obtidos no teste da artrite revelaram que a  $\beta$ -lapachona inibiu de forma significativa os níveis plasmáticos de NO dos animais submetidos ao tratamento por 14 dias, com valores estatísticos significantes quando comparado com o metotrexato e o grupo controle (figura 9). A  $\beta$ -lapachona, na dose de 60 mg/kg, apresentou percentual de inibição da produção de NO de 52,9% ( $91,2 \pm 6,4 \mu\text{M}$ ), enquanto o metotrexato, na dose de 0,1 mg/kg/dia, inibiu a produção deste mediador inflamatório em 34,3% ( $127,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ) quando comparados com o grupo controle ( $193,7 \pm 5,2 \mu\text{M}$ ). Estudo realizado por Liu et al (1999) comprovaram a eficácia da  $\beta$ -lapachona em inibir a expressão e a função de iNOS em macrófagos alveolares de ratos e anéis de aorta, corroborando com os resultados obtidos no nosso trabalho.



**Figura 9:** Efeito da  $\beta$ -Lapachona sobre a concentração de NO na artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. A significância foi determinada por ANOVA uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ : estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ : estatisticamente significativa em relação ao grupo padrão.

Os radicais reativos de nitrogênio, como óxido nítrico e peroxinitrito, estão relacionados ao desenvolvimento de doenças reumatológicas como a osteoartrite

(AMIN et al, 1997) e artrite reumatóide (GRABOWSKI et al, 1997). A produção aumentada de óxido nítrico na cartilagem exerce efeitos catabólicos nas funções dos condrócitos, determinando a degradação da cartilagem articular. Dentre esses efeitos pode-se citar a inibição da síntese de colágeno e proteoglicanos e ativação de metaloproteinases (CLANCY et al, 1998).

O óxido nítrico é um gás formado através da ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), que catalisam a reação de oxidação da L-arginina, gerando NO e L-arginina. Três isoformas da NOS foram descritas: a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a indutível (iNOS), esta última produzida a partir de estímulos inflamatórios, sendo esta última forma responsável pela produção de NO na cartilagem articular. Uma produção excessiva de NO pela iNOS tem potencial pró- inflamatório para células e tecidos circunvizinhos. Dentre suas ações pró- inflamatórias destacam-se a produção de radicais livres tóxicos, como o peroxinitrito, citotoxicidade, promoção de apoptose de macrófagos e estímulo à produção de TNF- $\alpha$  (CLANCY et al, 1998). Ueki et al (1996) demonstraram um aumento significativo de NO sérico em pacientes com artrite reumatóide em comparação com pacientes com osteoartrite e controles saudáveis, onde os níveis séricos de NO correlacionaram-se com rigidez matinal, número de articulações doloridas e edemaciadas. Estudo também demonstrou uma inibição significativa do desenvolvimento de osteoartrite em camundongos deficientes para iNOS no modelo de artrite induzida por colágeno (VAN DEN BERG et al, 1999).

Os efeitos destrutivos do NO na artrite estão relacionados a sua capacidade de se combinar com o radical superóxido ( $O_2^-$ ) para gerar espécies reativas do nitrogênio. Os elétrons desemparelhados do NO e  $O_2^-$  ligam-se e formam um produto potencialmente perigoso, o peroxinitrito, o qual pode inativar uma enzima antioxidante, a superóxido desmutase (SOD) (FERMOR et al, 2007). O equilíbrio das concentrações de NO,  $O_2^-$  e SOD na cartilagem articular é crucial, ocorrendo estresse oxidativo quando há um desequilíbrio entre a formação e neutralização de agentes oxidantes. Estudo realizado por Cuzzocrea et al (2005) revelou que camundongos *knockout* para a SOD extracelular desenvolveram artrite induzida por colágeno de forma mais severa que camundongos de tipo selvagem. Segundo Regan et al (2005), a expressão da proteína SOD extracelular está diminuída em humanos com osteoartrite e em modelos animais para esta desordem.

O aumento dos níveis de NO na cartilagem articular também pode resultar de um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- $\alpha$ . Uma pesquisa realizada por Sakurai et al (1995) comprovou tal afirmação ao constatar que em articulações artríticas, os níveis dessas citocinas estão elevados em relação a articulações saudáveis e que contribuem para o aumento da produção de NO. Um dos efeitos benéficos do uso de anticorpos anti TNF- $\alpha$  no tratamento da artrite reumatóide está correlacionado com o grau de redução da expressão de iNOS em linfócitos de pacientes com artrite reumatóide (FERMOR et al, 2007).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que a  $\beta$ -lapachona apresentou uma promissora atividade anti-inflamatória e anti-artrítica, atuando na inibição da migração celular, significativa atividade antiedematogênica em modelos de inflamação aguda e crônica e inibição dos mediadores pró- inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6 e NO.

**Conclusões**

## 4 CONCLUSÕES

- No teste do edema de pata induzido por carragenina, a  $\beta$ -lapachona apresentou atividade antiedematogênica desde a primeira hora após a indução da inflamação, sendo esta atividade mais pronunciada na quinta hora.
- No teste da peritonite, a  $\beta$ -lapachona inibiu significativamente a migração de polimorfonucleares para o local da inflamação nas duas doses utilizadas. Em relação à inibição das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, a dose de 60 mg/kg apresentou melhores resultados. A dosagem de NO do exsudato inflamatório dos animais submetidos ao teste da peritonite demonstrou melhores resultados na dose de 60 mg/kg em relação ao grupo controle;
- No teste da artrite induzida por adjuvante completo de Freund, a  $\beta$ -lapachona apresentou inibição na formação do edema ao longo do tratamento. A inibição na produção de NO na inflamação crônica pela  $\beta$ -lapachona, na dose de 60 mg/kg, foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

**Perspectivas**

## Perspectivas

O presente trabalho demonstrou o potencial anti-inflamatório e possível efeito imunomodulador da  $\beta$ -lapachona nos ensaios pré-clínicos, o que impulsiona o estudo de melhoramento farmacotécnico desta molécula.

Há um grande interesse pelo conhecimento da farmacologia da  $\beta$ -lapachona, como pode ser demonstrado pelo crescente número de publicações sobre o mecanismo de atuação desta substância. O progresso quanto aos conhecimentos da bioquímica das atividades enzimáticas e os recentes avanços da química computacional em muito pode contribuir para o esclarecimento em maior profundidade dos mecanismos de atividade da  $\beta$ -lapachona e, em consequência, para o planejamento de uma nova droga comercial. O contexto de previsibilidade, que estes estudos trazem, auxilia na busca de novos fármacos baseados em planejamentos racionais, resultando na obtenção de substâncias com maior seletividade e eficiência.

# **Referências bibliográficas**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOTSI, W.M.K.; WOODE, E.; AINOOSON, G.K.; AMO-BARIMAH, A.K.; BOAKYE-GYASI, E. Antiarthritic and antioxidant effects of the leaf extract of *Ficus exasperata* P. Beauv. (Moraceae). **Pharmacognosy Research** 2(2):89–97. 2010.
- AMABEOKU, G.J.; KABATENDE, J. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Leaf Methanol Extract of *Cotyledon orbiculata* L. (Crassulaceae). **Advances in Pharmacological Sciences** 2012. 2011.
- ALMEIDA, E.R.; FILHO, A.A.S.; SANTOS, E.R.; LOPES, C.A.C. Antiinflammatory action of lapachol. **Journal of ethnopharmacology** 29: 239-241. 1990.
- ALMEIDA, E.R. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. **The Open Natural Products Journal** 2: 42-47. 2009.
- AMIN, A.R.; ATTUR, M.; PATEL, R.N.; THAKKER, G.D.; MARSHALL, P.J.; REDISKE, J.; STUCHIN, S.A.; PATEL, I.R.; ABRAMSON, S.B. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. **The Journal of Clinical Investigation** 99:1231-1237. 1997.
- APOSTOLAKI, M.; ARMAKA, M.; VICTORATOS, P.; KOLLIAS, G. Cellular Mechanisms of TNF Function in Models of Inflammation and Autoimmunity. **TNF Pathophysiology. Molecular and Cellular Mechanisms**. Curr Dir Autoimmun. Basel, Karger 11:1–26. 2010
- ARAÚJO, E.L.; ALENCAR, J.R.B.; NETO, P.J.R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 12:57-59. 2002.
- ASHMAWI, H.A.; BRAUN, L.M.; SOUSA, A.M.; POSSO, I.P. Analgesic Effects of H<sub>1</sub> Receptor Antagonists in the Rat Model of Formalin-Induced Pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia** 59 (4):461-470. 2009.

BANSBACK, N.J.; REGIER, D.A.; ARA, R.; BRENNAN, A.; SHOJANIA, K.; ESDAILE, J.M.; ANIS, A.H.; MARRA, C.A. An overview of economic evaluations for drugs used in rheumatoid arthritis: focus on tumour necrosis factor-alpha antagonists. **Drugs** 65 (4):473-496. 2005.

BENDELE, A.; MCCOMB, J.; GOULD, T.Y.; MCABEE, T.; SENNELLO, G.; CHLIPALA, E.; GUY, M. Animal Models of Arthritis: Relevance to Human Disease. **Toxicologic Pathology** 27 (1):134-142. 1999.

BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica** 8 (2). 2007.

BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **The journal of pathology** 214 (2):149-160. 2008.

BRENOL, C.V.; MONTICIELO, O.A.; XAVIER, R.M.; BRENOL, J.C.T. Artrite Reumatóide e Aterosclerose. **Revista da Associação Médica Brasileira** 53 (5):465-470. 2007.

BURNETT, A.R.; THOMSON, R.H. Naturally occurring quinoes. Part. X. The quinoid constituents of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). **Journal of Chemical Society**: 2100-2104. 1967.

CAMUSSI, G.; ALBANO, E.; TETTA, C.; BUSSOLINO, F. The molecular action of tumor necrosis factor- $\alpha$ . **European Journal of Biochemistry** 202 (1):3-14. 1991.

CASTELLANOS, J.R.G.; PRIETO, J.M.; HEINRICH, M. Red lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) – a global ethnopharmacological commodity? **Journal of ethnopharmacology** 121: 1-13. 2009.

CLANCY, R.M.; AMIN, A.R.; ABRAMSON, S.B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis and Rheumatism** 41 (7):1141-1151. 1998.

CONE, J.B. Inflammation. **The American Journal of Surgery** 182:558-562. 2001.

CUNHA-FILHO, M.S.; DACUNHA-MARINHO, B.; TORRES-LABANDEIRA, J.J.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Characterization of  $\beta$ -lapachone and methylated  $\beta$ -cyclodextrin solid-state system. **AAPS PharmSciTech** 8 (3):60. 2007.

CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; PATEL, N.S.A.; DI PAOLA, R.; IALENTI, A.; GENOVESE, T.; CHATTERJEE, P.K.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A.P.; THIEMERMANN, C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , reduces acute inflammation. **European Journal of Pharmacology** 483:79– 93. 2004.

CUZZOCREA, S.; AYROLDI, E.; DI PAOLA, R.; AGOSTINI, M.; MAZZON, E.; BRUSCOLI, S.; GENOVESE, T.; RONCHETTI, S.; CAPUTI, A. P.; RICCARDI, C. Role of glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) in collagen-induced arthritis. **The FASEB Journal** 19 (10):1253-1265. 2005.

DANTAS, C. J. S.; SIQUEIRA, J. F. Mecanismos celulares e moleculares da Inflamação. Rio de Janeiro: Medsi, 68-73. 2000.

DAYER, J.M.; CHOY, E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. **Rheumatology** 49:15–24. 2010.

D'ALBUQUERQUE, I. L.; MACIEL, M. C. N.; SCHULER, A. R. P.; ARAÚJO, M. C.M.; MACIEL, G. M.; CAVALCANTI, M. A. B.; MARTINS, D. G. & LACERDA, A.L. Preparação e primeiras observações sobre as atividades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogas inferiores da série da 2-hidroxi-3-(3- metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol). **Revista do Instituto de Antibiótico** 12 (1/2):31-40. 1972.

DINARELLO, C.A. The IL-1 family and inflammatory diseases. **Clinical Experimental Rheumatology** 20:1–13. 2002.

FEGHALI, C.A.; WRIGHT, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience** 2:12-26. 1997.

FERMOR, B.; CHRISTENSEN, S.E.; YOUN, I.; CERNANEC, J.M.; DAVIES, C.M.; WEINBERG, J.B. Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. **European cells and materials** 13:56-65. 2007.

FERREIRA, S.B.; SALOMÃO, K.; SILVA, F.C.; PINTO, A.V.; KAISER, C.R.; PINTO, A.C.; FERREIRA, V.F.; CASTRO, S.L. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity

of b-lapachone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry** 46:3071-3077. 2011.

FRANCISCO, A.I.; CASELLATO, A.; NEVES, A.P.; CARNEIRO, J.W.M.; VARGAS, M.D.; VISENTIN, L.C.; MAGALHÃES, A.; CÂMARA, C.A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; FILHO, J.D.B.M.; MORAESE, M.O. Novel 2-(R-phenyl)amino-3-(2-methylpropenyl)-[1,4]-naphthoquinones: Synthesis, Characterization, Electrochemical Behavior and Antitumor Activity. **Journal of Brazilian Chemical Society** 21 (1):169-178. 2010.

FRASER, A. G.; MORTON, D.; MCGOVERN, D.; TRAVIS, S.; JEWELL, D.P. The efficacy of methotrexate for maintaining remission in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics** 16 (4):693-697. 2002.

GEPDIREMEN, A.; MSHVILDADZE, V.; SULEYMAN, H.; ELIAS, R. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 94 (1):191–195. 2004.

GILROY, D.W. Eicosanoids and the endogenous control of acute inflammatory resolution **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 42 (4):524-528. 2010.

GOODWIN, T. W.; MERCER, E.I. Introduction to Plant Biochemistry, Pergamon Press: New York, 1972.

GRABOWSKI, P.S.; WRIGHT, P.K.; VANTHOF, R.J.; HELFRICH, M.H.; OHSHIMA, H.; RALSTON, S.H. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **British Journal Rheumatology** 36:651-655. 1997.

GREGA, G. J.; SVENSJO, E.; HADDY, F. Macromolecular permeability of the microvascular membrane: Physiological and pharmacological regulation. **Microcirculation** 1:325-341. 1981.

GUERRA, A.S.H.S.; MALTA, D.J.N.; LARANJEIRA, L.P.M.; MAIA, M.B.S.; COLAÇO, N.C.C.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; SILVA, T.G. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole–imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology** 11:1816–1822. 2011.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; TAKAKI, G. M. C.; MURANDI, F. S. & BUOCHBERG, M. S. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and  $\beta$ -lapachone. **Planta Medica** 60 (4):373-374. 1994.

GYERMEK, L. Pharmacology of serotonin as related to anesthesia. **Journal of Clinical Anesthesia** 8 (5):402-425. 1996.

HAFLAH, N.H.; JAARIN, K.; ABDULLAH, S.; OMAR, M. Palm vitamin E and glucosamine sulphate in the treatment of osteoarthritis of the knee. **Saudi Medical Journal** 30 (11):1432-1438. 2009.

HILLARD, E. A.; DE ABREU, F. C.; FERREIRA, D. C. M.; JAOUEN, G.; GOULART, M. O. F.; AMATORE, C. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chem. Commun.**:2612–2628. 2008.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V.U.; MIANA, G.A.; GREEN, I.R. Lapachol: an overview. **Arkivoc** (2): 145-171. 2007.

IDZKO, M.; LA SALA, A.; FERRARI, D.; PANTHER, E.; HEROUY, Y.; DICHMANN, S.; MOCKENHAUPT, M.; DI VIRGILIO, F.; GIROLOMONI, G.; NORGAUER, J. Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 109 (5):839-846. 2002.

JACKSON J.K.; HIGO T.; HUNTER W.L.; BURT H.M. Topoisomerase inhibitors as anti-arthritic agents. **Inflammation Research** 57(3):126-134. 2008.

JACOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MULLER, A.; WAGNER, H. Analysis of naphotoquinones in *Zeyheria montana* crude extracts (bolsa-de pastor). **Química Nova** 22:3. 1999.

JUNIOR, J.T.L. Síntese de novos adutos de lapachol com aminas alifáticas. Dissertação de mestrado em química do Departamento de Química - UFRPE-Recife, Brasil, pag 18. 2009.

KERFOOT, S. M. & KUBES, P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4- integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology** 169 (2): 1000-1006. 2002.

KIM, J.Y.; HWANG, Y.P.; KIM, D.H.; HAN, E.H.; CHUNG, Y.C.; ROH, S.H. et al. Inhibitory effect of the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on carrageenan-induced inflammation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** 70 (4):858–864. 2006.

KIRVESKARI, J.; HELINTO, M.; SAAREN-SEPPALA, H.; RENKONEN, R.; TERVO, T. Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients. **Experimental Eye Research** 77 (3):387-390. 2003.

KUBES, P. & KERFOOT, S. M. Leukocyte in the microcirculation: the rolling paradigm revisited. **News in Physiological Sciences** 16 (2): 76-80. 2001.

KUMAGAI, Y.; TSURUTANI, Y.; SHINYASHIKI, M.; TAKEDA, S.H.; NAKAI, Y.; YOSHIKAWA, T.; SHIMOJO, N. Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPHcytochrome P450 reductase. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 3:245-250. 1997.

KUMAR, V., ABBAS A.K.; FAUSTO, N. Patologia – Bases Patológicas das Doenças; Ed. ELSEVIER, 7ª edição. 2005.

KUMAR, V.L.; GURUPRASAD, B.; WAHANE, V.D. Atorvastatin exhibits anti-inflammatory and anti-oxidant properties in adjuvant-induced monoarthritis. **Inflammopharmacology** 18 (6):303–308. 2010.

KUBES, P. The complexities of leukocyte recruitment. **Seminars in Immunology** 14 (2): 65-72. 2002.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K.F. Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase II Inhibition by Pyranonaphthoquinone Derivatives— Eleutherin,  $\alpha$ -Lapachone, and  $\beta$ - Lapachone. **Biochemical Pharmacology** 60:1367–1379. 2000.

LEE, J.H.; CHEONG, J.H.; PARK, Y.M.; CHOI, Y.H. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by  $\beta$ -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacological Research** 51:553–560. 2005.

LI, C.J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A.B.  $\beta$ -Lapachone, a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor with a Mode of Action Different from Camptothecin. **The Journal of Biological Chemistry** 268 (30):22463-22468.1993.

LI, J.C; WANG, C.; PARDEE, A.B. Induction of apoptosis by b-lapachone in human prostate cancer cells. **Cancer Research** 55:3712–3715. 1995.

LIMA, O.G.; WEIGERT, E. Atividade antimicrobiana e antineoplásica de Juglona, Lapachol e Plumbagina. **Revista do Instituto de Antibióticos** 12(1/2):3-12. 1972.

LIMA, O.G.; D.ALBUQUERQUE, I. L., GONÇALVES DE LIMA, C., MACHADO, M. P. Primeiras Observações sobre a Ação Antimicrobiana do Lapachol.- **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco** 14 (1/2):129-135. 1956.

LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I. L., GONÇALVES DE LIMA, C., MACHADO, M. P. Primeiras Observações sobre a Ação Antimicrobiana do Lapachol.- **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco** 14, Nº 1/2, 129-135,1956.44.Linardi, M. da C.F.; Oliveira, M.M de; Sampaio, M.R.P. A Lapachol deriva- tive active against mouse lymphocytic leukemia P-388. **Journal of Medicinal Chemistry** 18 (11):1159-1161.1976.

LIN, T. S; ANTONINI, I.; COSBY, L. A.; SARTORELLI, A. C. 2,3-Dimethyl-1,4-naphthoquinone derivatives as bioreductive alkylating agents with crosslinking potential. **Journal of Medicinal Chemistry** 27 (6): 813-815. 1984.

LIRA, A.A.M.; SESTER, E.A.; CARVALHO, A.L.M.; STRATTMANN, R.R.; ALBUQUERQUE, M.M.; WANDERLEY, A.G.; SANTANA, D.P. Development of Lapachol Topical Formulation: Anti-inflammatory Study of a Selected Formulation. **American Association of Pharmaceutical Scientists** 9 (1): 163–168. 2008.

LIU, S.-H.; TZENG, H.-P.; KUO, M.-L.; LIN-SHIAU, S.-Y. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by  $\beta$ -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. **British Journal of Pharmacology** 126: 746-750. 1999.

LOPES, C.A. C.; SILVA, F.A.A. Primeiros informes na utilização do lapachol em pacientes portadores de tendinites. Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. São Paulo. 1988.

LU, Y.; STINETTE, T.W.; WESTRICK, E.; KLEIN, P.J.; GEHRKE, M.A.; CROSS, V.A.; VLAHOV, L.R.; LOW, P.S.; LEAMON, C.P. Treatment of experimental adjuvant arthritis with a novel folate receptor-targeted folic acidaminopterin conjugate. **Arthritis Research & Therapy** 13 (2):56. 2011.

MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. **American Journal of Clinical Nutrition** 85 (5): 1185-1196. 2007.

MANNA, S.K.; Gad, Y.P.; Mukhopadhyay, A.; Aggarwal, B.B. Suppression of tumor necrosis factor-activated nuclear transcription factor-kB, activator protein-1, c-Jun N-Terminal kinase, and apoptosis by  $\beta$ -Lapachone. **Biochemical Pharmacology** 57 (7):763–774.1999.

MARTNEZ, J.E.; GIANINI, J.A.; FERRO, M.C.; HASIMOTO, F.N.; HASIMOTO, H.K.; JUNIOR, S.P.O. Nódulos Reumatóides Pulmonares Precedendo o Aparecimento de Artrite. **Revista Brasileira de Reumatologia** 48 (1):47-50. 2008.

MCCARTNEY-FRANCIS N.; ALLEN J.B.; MIZEL D.E.; ALBINA J.E.; XIE Q.W.; NATHAN C.F.; WAHL S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine** 178 (2):749-754. 1993.

MCCULLOCH, C. A.; DOWNEY, G. P.; EL-GABALAWY, H. Signalling Platforms that Modulate the Inflammatory Response: New Targets for Drug Development. **Nature Reviews. Drug Discovery** 5 (10):864-876. 2006.

MEDEIROS, C.S.; PONTES-FILHO, N.T. CAMARA, C.A.; LIMA-FILHO, J.V.; OLIVEIRA, P.C.; LEMOS, S.A.; LEAL, A.F.G.; BRANDÃO, J.O.C.; NEVES, R.P. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 43 (4):345-349. 2010.

MOON, D.-O.; CHOI, Y.H.; KIM, N.-D.; PARK, Y.-M.; KIM, G.-Y. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology** 7 (4):506–514. 2007.

MOON, D.-O.; KANG, C.-H.; KIM, M.-O.; JEON, Y.-J.; LEE, J.-D.; CHOI, Y.H.; KIM, G.-Y.  $\beta$ -Lapachone (LAPA) Decreases Cell Viability and Telomerase Activity in

Leukemia Cells: Suppression of Telomerase Activity by LAPA. **Journal of Medicinal Food** 13 (3):481–488. 2010.

MORRIS, C.J. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. **Inflammation protocols** 225:115-121. 2003.

MORRISON, R. K.; BROWN, D. E.; OLESON, J. J. COONEY, D. A. Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicology Applied Pharmacology** 17 (1):01–11. 1970.

MURAY, M.T.; PIZZORNO, J.E. Encyclopedia of natural medicine 2<sup>a</sup> ed. PA4 Rocklin, CA: Prima Pub. P. 967-972. 1998.

NAKAMURA, T.; ITADANI, H.; HIDAKA, Y.; OHTA, M.; TANAKA, K. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 279 (2):615–620. 2000.

NANTEL, F., DENIS, D., GORDON, R., NORTHEY, A., CIRINO, M., METTERS, K.M., CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology** 128 (4):853– 859. 1999.

NEWBOULD, B. B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. **British Journal of Pharmacology** 21 (1):127-136. 1963.

OLIVEIRA, M.M. DE; LINARDI, M.C.F.; SAMPAIO, M.R.P. Effects of quinone derivatives on an experimental tumor. **Journal of Pharmaceutical Sciences** 67 (4): 562-563.1978.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C.; MESQUITA, A. A. L; ZANI, C. L; FERREIRA, D. T; MAIA, J. G. S. Chemical structures and biological activities of naphthoquinones from Brazilian Bignoniaceae. **Quimica Nova** 13: 302-307. 1990.

PAN, S.; ANDREWS, P. A.; GLOVER, C. J.; BACHUR, N. R. **J. Biol. Chem.** 259: 959. 1984

PAULINO, N.; RODRIGUES, N. C.; PARDI, P. C.; SUAREZ, J. A. P. Q.; SANTOS, R. P.; VOGEL, C.; FEIST, H. & MICHALIK, D. Evaluation of anti-inflammatory effect of

synthetic 1,5-bis(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one, HB2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 17 (13):4290-4295. 2009.

PATERNO, E. Ricerche Sull Acido Lapacico. **Gazzetta Chimica Italiana** 12:337-392.1882.

PÈREZ-GURRERO, C., HERRERA, M.D., ORTIZ, R., DE SOTOMAYOR, M.A., FERNÁNDEZ, M.A. Apharmacological study of Cecropia obtusifolia Betrol aqueousextract. **Journal of Ethnopharmacology** 76:279–284. 2001.

PICCIO, L.; ROSSI, B.; SCARPINI, E.; LAUDANNA, C.; GIAGULLI, C.; ISSEKUTZ, A. C.; VESTWEBER, D.; BUTCHER, E. C.; CONSTANTIN, G. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric Gi-linked receptors. The **Journal of Immunology** 168: 1940-1949. 2002.

PLANCHON, S.M.; WUERZBERGER, S.; FRYDMAN, B.; WITIAK, D.T.; HUTSON, P.; CHURCH, D.R.; WILDING, G.; BOOTHMAN, D.A.  $\beta$ -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: A p53- independent response. **Cancer Research** 55 (17): 3706–3711. 1995.

PRESMICH, G.M.A. Incremento da soludilidade/dissolução da a  $\beta$ -lapachona utilizando tecnologias de dispersões sólidas e complexos de inclusão. 2009. Tese ( Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco.

PRESIBELLA, M. M.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Influência de extratos hidroetanólicos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 13 (2):75-82. 2003.

RAO, K.V.; MCBRIDE, T.J. OLESON, J.J. Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor Agent. **Cancer Research** 28:1952–1954. 1968.

REAVES, T. A.; CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 100 (1):191-198. 2005.

REGAN, E.; FLANNELLY, J.; BOWLER, R.; TRAN, K.; NICKS, M.; CARBONE, B.D.; GLUECK, D.; HEIJNEN, H.; MASON, R.; CRAPO, J. Extracellular superoxide

dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism** 52 (11):3479- 3491. 2005.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Fundamentos de patologia: bases patológicas das doenças** . 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p 829. 2006.

SAYAR, K.; MELLI, M. Effect of combination of misoprostol and indomethacin on eicosanoid production in carrageenan-induced air pouch inflammation in rats. **European Journal of Pharmacology** 369 (3):365–71. 1999.

SESTER, E.A. Avaliação Biofarmacêutica do Lapachol Tópico: ensaios in vitro e in vivo. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE- Recife, Brasil, págs 30-50,1996.

SHAH, H.R.; CONWAY, R.M.; VAN QUILL, K.R.; MADIGAN, M.C.; HOWARD, S.A.; QI, J.; WEINBERG, V.; O'BRIEN, J.M. Beta-lapachone inhibits proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cell lines. **Eye** 22: 454–460. 2008.

SIKANDER, A.; RANA, S. V.; PRASAD, K. K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. **Clinica Chimica Acta** 403 (1-2):47-55. 2009.

SILVA, M.A.R.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; BRACHT, L.; CAPARROZ-ASSEF, S.M. Protective Effects of Indomethacin and Cyclophosphamide but Not of Infliximab on Liver Metabolic Changes Caused by Adjuvant-Induced Arthritis. **Inflammation** 34 (6):519-30. 2011.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Quimica Nova** 26 (3):407-416. 2003.

SIMON S,I; GREEN, C.E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering** 7:151-85. 2005.

SONG, W.; GUO, J.; DING, F.; HU, W.; LI, Z.; GAO, M. Study on acute toxicity and structure–activity relationship of *Daphnia magna* exposed to naphthoquinones. **Environmental toxicology and pharmacology** 32 (1):102–106. 2011.

SZÉLES, L.; TÖRÖCSIK, D.; NAGY, L. PPAR $\gamma$  in immunity and inflammation: cell types and diseases. **Biochimica et Biophysica Acta** 1771 (8):1014-1030. 2007.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J.D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. **Neuroscience** 48 (2):485-490. 1992.

TAYLOR, P.C.; FELDMANN, M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology** 5:578-582. 2009.

UEKI, Y.; MIYAKE, S.; TOMINAGA, Y.; EGUCHI, K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology** 23 (2):230-236. 1996.

VAN'T WOUT, J.W.; LINDE, I.; LEIJH, P.C.; VAN FURTH, R. Effect of irradiation, cyclophosphamide, and etoposide (VP-16) on number of peripheral blood and peritoneal leukocytes in mice under normal conditions and during acute inflammatory reaction. **Inflammation** 13 (1):1-14. 1989.

VAN DEN BERG, W.B.; VAN DE LOO, F.; JOOSTEN, L.A.; ARNTZ, O.J. Animal models of arthritis in NOS2-deficient mice. **Osteoarthritis Cartilage** 7 (4):413-415. 1999.

VERDRENGH, M.; JONSSON, I.M.; ZAETHER, O.; BAJTNER, E.; HOLMDAHL, R.; TARKOWSKI, A. Total abrogation of collagen II-induced arthritis and the B cell response to type II collagen using suboptimal doses of a topoisomerase II antagonist. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 61(9):829-831. 2002.

VITALE, R.F.; RIBEIRO, F.A.Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** 73 (1):123-127. 2007.

WANICK, M.C.; BANDEIRA, J.A.; FERNANDES, R.V. Ação anti-inflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do líber do pau d'arco roxo (*Tabebuia avellanedae*) em pacientes portadoras de cervicites e cervico-vaginites. **Revista do Instituto de Antibióticos** 10 (1/2): 41-45. 1970.

WASSERMAN, R.A.; AUSTIN, C.A.; FISHER, L.M.; WANG, J.C. Use of Yeast in the Study of Anticancer Drugs Targeting DNA Topoisomerases: Expression of a Functional Recombinant Human DNA Topoisomerase II $\alpha$  in Yeast. **Cancer Research** 53: 3591-3596. 1993.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** 111:544–547. 1962.