



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Bioquímica Médica

Ingred Goretti Riça

**Potencial Anti-Inflamatório de uma Pterocarpaquinona em Modelo
de Inflamação Pulmonar**

Orientador: Moisés Clemente Marinho Cavalcante

Co-orientador: Russolina Benedeta Zingali

Rio de Janeiro
Janeiro de 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INGRED GORETTI RIÇA

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE UMA PTEROCARPAQUINONA EM MODELO
DE INFLAMAÇÃO PULMONAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Moisés Clemente Marinho Cavalcante

Co-orientador: Russolina Benedeta Zingali

Rio de Janeiro
Janeiro de 2010

Riça, Ingrid Goretti

Potencial Anti-Inflamatório de uma Pterocarpaquinona em Modelo de Inflamação Pulmonar / Ingrid Goretti Riça. Rio de Janeiro, 2010. xiv, 109 f.

Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, 2010.
Bibliografia: f. 84-97.

Orientador: Moisés Clemente Marinho Cavalcante
Co-orientador: Russolina Benedeta Zingali

1. Inflamação. 2. Anti-inflamatórios. 3. TNF- α . 4. Pterocarpaquinona. 5. Lapachol. I. Cavalcante, Moisés Clemente Marinho (orient.). II. Zingali, Russolina Benedeta (co-orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica. III. Título.

INGRED GORETTI RIÇA

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE UMA PTEROCARPAQUINONA EM MODELO
DE INFLAMAÇÃO PULMONAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química
Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Química
Biológica

Aprovada em 8 de Janeiro de 2010 por:

Orientador: Dr. Moisés Clemente Marinho Cavalcante

Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de
Janeiro – UFRJ

Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes

Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de
Janeiro – UFRJ

Dr^a. Claudia Farias Benjamim

Prof^a. Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de
Janeiro - UFRJ

Dr. Samuel dos Santos Valença

Prof. Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de
Janeiro - UFRJ

AGRADECIMENTOS

A Deus, por absolutamente tudo.

À minha querida Mãe, a quem eu devo nada menos que a vida. Obrigada pela compreensão, paciência, dedicação, amor... Enfim, qualidades que a tornam uma mãe mais que perfeita. Amo-te muito!

Ao Zé, amigão, companheiro, parceiro, amor da minha vida. Não existe marido mais exemplar que você. "Tamo junto"! Obrigada por me aturar esses quase 3 anos. Você é tudo pra mim!

À Raquel, companheira certa nos momentos de procrastinação. Porque, afinal, nem só de trabalho vive o homem. Luv Ya, shooshoo.

À Gabi. Sem sua ajuda, muitos desses experimentos ficariam quase impossíveis de serem feitos. Obrigada pelas conversas, pelo apoio, pelas caronas e pelo trabalho braçal (rs!).

Ao Tatu, por sua imensa amizade e ajuda na finalização dessa etapa da minha vida. Valeu mesmo!

Aos remanescentes do Laboratório de Imunofarmacologia Celular: Dilma, Julio, Taiane, Natália, Diogo, Fran e Bárbara. Devo grande parte desse trabalho a vocês. Muito obrigada.

A todos do Laboratório de Tecido Conjuntivo, especialmente à Angélica, Chris e Celso, por me acolherem de forma tão carinhosa e me darem força em todos os momentos. Não sei o que seria de mim sem vocês. Também ao Leo e a Mari, pela ajuda e pelas dicas. Obrigada.

Ao grupo do NPPN, Prof. Paulo Costa, Prof. Alcides da Silva e Prof. Chaquip Netto.
Obrigada por toda a ajuda e orientação dadas a esse trabalho.

Aos professores Mourão e Ana Tovar, pela sua valiosa contribuição ao longo da minha estadia no Laboratório de Tecido Conjuntivo.

Ao Prof. Mauro Pavão, pela revisão e contribuição a esse texto e sua generosa acolhida. Muito obrigada.

À Prof^a. Lina Zingali, por toda a sua orientação e imensa ajuda. Sou muito grata a você.

À Prof^a. Vera Koatz, que ainda orienta meu trabalho de forma muito especial.

Aos membros da Banca, Prof^a. Claudia Benjamim, Prof. Samuel Valença, Prof. Jorge Moraes e Prof^a. Nelilma Romeiro, que disponibilizaram de pronto a sexta-feira da primeira semana de Janeiro (!!) para dar sua contribuição a esse trabalho. MUITÍSSIMO obrigada.

Ao Prof. Moisés Cavalcante, pela confiança, pela força e pelo exemplo. Essa é mais uma vitória nossa!

A todos que contribuíram para o desenvolvimento dessa dissertação, entre professores, amigos, colegas e companheiros, e que porventura eu não tenha mencionado nessas páginas.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo apoio financeiro.

RESUMO

RIÇA, Ingrid Goretti. Potencial Anti-Inflamatório de uma Pterocarpaquinona em Modelo de Inflamação Pulmonar. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

Na busca por novos agentes anti-inflamatórios, os produtos naturais são alvo de muitas pesquisas, assim como seus derivados sinteticamente modificados. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório do produto natural lapachol e também de seu derivado sintético, uma nova pterocarpaquinona, o LQB 118, em modelo de inflamação pulmonar, induzida por lipopolissacarídeo (LPS) inalado. Os resultados mostraram que o tratamento intraperitoneal com 1 mg/Kg de lapachol ou LQB 118 reduziu a migração de neutrófilos para o pulmão de camundongos C57/BL6 submetidos à inalação de LPS (0,5 mg/mL). Adicionalmente, o LQB 118 reduziu a concentração dos mediadores inflamatórios TNF- α e KC presentes no sobrenadante do lavado broncoalveolar (LBA). Esses efeitos são comparáveis aos da dexametasona e aspirina, dois anti-inflamatórios bem estabelecidos na clínica. A redução da concentração dos mediadores inflamatórios pelo LQB 118 é devida, em parte, a inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B por essa pterocarpaquinona nas células do pulmão dos camundongos. *In vitro*, o LQB 118 também inibiu a produção de TNF- α em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano. A maior concentração testada (100 μ M) foi capaz de inibir quase 100% da liberação de TNF- α . Esses dados confirmam a ação anti-inflamatória do lapachol observada em um modelo de edema de pata (Almeida, de et al., 1990) e revelam o LQB 118 como um potente modulador da inflamação através da redução de mediadores inflamatórios.

PALAVRAS-CHAVE: INFLAMAÇÃO, ANTI-INFLAMATÓRIOS, TNF- α ,
PTEROCARPAQUINONA, LAPACHOL.

ABSTRACT

RIÇA, Ingrid Goretti. Potencial Anti-Inflamatório de uma Pterocarpanquinona em Modelo de Inflamação Pulmonar. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

The search of new antiinflammatory agents is target of many researches. Natural products and their analogues modified synthetically are molecules of great interest. The aim of our investigation is to study the antiinflammatory effect of the natural product extracted from *Tabebuia*, lapachol, and its synthetic derivative, a new pterocarpanquinone. LQB 118, in the inhaled lipopolisaccharide (LPS)-induced lung inflammation model, using C57J/BL6 mice. Our results demonstrated that intraperitoneal treatment with 1 mg/Kg of lapachol or LQB 118 reduced neutrophil influx to lungs in mice submitted to inhaled LPS (0,5 mg/mL). Additionally, LQB 118 reduced the concentration of the inflammatory mediators TNF- α and KC in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). These effects of LQB 118 are comparable to those of dexamethasone or aspirin, two well-established antiinflammatory drugs. The reduction of mediators concentration by LQB 118 is partially due to reduction of NF- κ B activation in the cell lungs. *In vitro*, LQB 118 also inhibited TNF-alpha production in LPS-stimulated mononuclear cells of human peripheral blood (PBMC). The highest concentration tested (100 μ M) was able to inhibit almost 100% of TNF- α liberation. These data confirm the antiinflammatory action of lapachol observed in a paw edema model (Almeida de et al., 1990), and reveal the lapachol derivative, LQB 118, as a potent modulator of inflammation, through the reduction of inflammatory mediators.

KEYWORDS: INFLAMMATION, ANTIINFLAMMATORY DRUGS, TNF- α , PTEROCARPANQUINONE, LAPACHOL.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Os cinco sinais cardinais da inflamação..... | 17 |
| Figura 2. A via inflamatória..... | 18 |
| Figura 3. Etapas da migração de leucócitos da circulação sanguínea para o tecido..... | 21 |
| Figura 4. Estrutura do LPS..... | 23 |
| Figura 5. Principal via de transdução do TLR4..... | 25 |
| Figura 6. Vias de ativação do NF- κ B dependentes de receptor..... | 28 |
| Figura 7. Via de transdução de sinal pelo TNF-R1..... | 36 |
| Figura 8. Exemplos de plantas das quais derivam produtos naturais..... | 41 |
| Figura 9. Felix Hoffman sintetizou o ácido acetilsalicílico..... | 42 |
| Figura 10. Tabebuia, planta da qual se extrai o lapachol..... | 44 |
| Figura 11. Exemplos de benzoquinonas..... | 45 |
| Figura 12. LQB 118 foi sintetizado a partir da hibridização molecular do lapachol (naftoquinona) com um pterocarpano..... | 48 |
| Figura 13. Câmara de inalação para camundongos..... | 53 |
| Figura 14. Execução do lavado broncoalveolar..... | 54 |
| Figura 15. Curva de dose-resposta do tratamento com lapachol em camundongos C57/BL6 que inalaram LPS..... | 62 |
| Figura 16. Curva de dose-resposta do tratamento com LQB 118 em camundongos C57/BL6 que inalaram LPS..... | 64 |
| Figura 17. Tratamento com 10 mg/Kg de LQB 118 comparado ao tratamento | |

| | |
|---|----|
| com a mesma dose de anti-inflamatórios usados na clínica..... | 66 |
| Figura 18. Dosagem de mediadores inflamatórios por ELISA no lavado broncoalveolar de camundongos C57/BL6 tratados com 10 mg/Kg de LQB 118..... | 67 |
| Figura 19. Ativação de NF- κ B avaliado por EMSA do pulmão de camundongos C57/BL6 tratados com 10 mg/Kg de LQB 118..... | 69 |
| Figura 20. Efeito do LQB 118 na inibição da liberação de TNF- α pelo PBMC... | 70 |
| Figura 21. Avaliação do metabolismo celular do PBMC estimulado com LPS e incubado com lapachol e LQB 118..... | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Alguns mediadores da resposta inflamatória..... | 30 |
| Tabela 2. Efeitos inibitórios de glicocorticóides nos componentes da resposta imune/inflamatória..... | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Ácido acetilsalicílico
AINE – Anti-inflamatório não-esteroidal
bioNCES – Novas entidades químicas bioativas
CD-14 – Domínio celular-14
c-IAP – Proteína celular inibidora da apoptose
COX – Ciclooxigenase
CXCL – Ligante quimiocina CXC
CXCR – Receptor de quimiocina CXC
d.C. – Depois de Cristo
DEXA – Dexametasona
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucléico
ECAM-1 – Molécula de adesão endotelial de leucócito-1
ELAM-1 – Molécula de adesão intracelular-1
ELISA – Ensaio de imunabsorbância ligada à enzima
ERK – Cinase relacionada com a sinalização extracelular
FADD – Domínio de morte associado ao Fas
GM-CSF – Fator estimulante de colônia de granulócito-macrófago
HTS – varredura biológica automatizada
i.p. – Intraperitoneal
ICAM-1 – Molécula de adesão intracelular do tipo-1
ICD – Domínio intracelular
I κ B – inibidor de kappaB
IKK – Cinase de I κ B
IL – Interleucina
IL1R – Receptor de IL-1
IRAK – Cinase associada ao receptor de interleucina
JNK – Cinase Jun N-terminal
KC – Citocina derivada de queratinócito

KDa - Kilodalton

LBA – Lavado broncoalveolar

LBP – Proteína ligadora de LPS

LFA-1 – antígeno associado à função linfocitária-1

LPS – Lipopolissacarídeo

LQB – Laboratório de Química Bioorgânica

MAP – Proteína ativada por mitógeno

MD-2 – Domínio de membrana-2

MEC – Matriz extracelular

MEKK – Proteína cinase ativada por mitógeno/Cinase ERK

MGSA/GRO- α – Atividade regulatória de crescimento de melanoma/ oncogene relacionado ao crescimento humano-alfa

MTT - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromidídeo

MyD88 – Proteína de diferenciação mielóide 88

NAL – Núcleo de animais de laboratório

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappaB

NPPN – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais

NSL – Seqüência de ligação nuclear

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAF – Fator ativador de plaqueta

PAMP – Padrão molecular associado a patógeno

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico

RHD – Domínios homólogos do tipo Rel

RIP – Proteína de interação do receptor

RNA – Ácido ribonucléico

SFB – Soro fetal bovino

SODD – Proteína silenciadora dos domínios de morte

TACE – Enzima conversora de TNF- α

TIR – domínio Toll-IL1R

TIRAP/Mal – Proteína adaptadora contendo o domínio TIR/ proteína adaptadora de diferenciação semelhante a mielóide 88

TLR-4 – Receptor semelhante a Toll-4

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

TNFR – Receptor de TNF

TRADD – Proteína adaptadora do domínio de morte associada ao receptor de TNF

TRAF – Fator associado ao receptor de TNF

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 15 |
| 1.1. Inflamação..... | 16 |
| 1.2. Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS): Um indutor inflamatório..... | 22 |
| 1.3. Fator de Transcrição Nuclear-kappaB (NF-κB)..... | 26 |
| 1.4. Mediadores inflamatórios..... | 29 |
| 1.4.1. Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-α)..... | 32 |
| 1.4.2. Citocina derivada de Queratinócito (KC)..... | 34 |
| 1.5. Fármacos anti-inflamatórios..... | 35 |
| 1.6. Produtos naturais como fonte de novos fármacos..... | 37 |
| 1.6.1. Lapachol..... | 43 |
| 1.6.2. LQB 118: uma pterocarpaquinona..... | 46 |
| 2. Objetivos..... | 49 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 50 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 50 |
| 3. Material e Métodos..... | 51 |
| 3.1. Reagentes..... | 52 |
| 3.2. Animais..... | 52 |
| 3.3. Tratamento com os compostos..... | 52 |
| 3.4. Inalação de LPS..... | 53 |
| 3.5. Lavado broncoalveolar (LBA)..... | 54 |
| 3.6. Contagem de células..... | 54 |
| 3.7. Extrato nuclear do pulmão..... | 55 |
| 3.8. Ensaio de desvio de mobilidade eletroforética (EMSA)..... | 56 |
| 3.9. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano..... | 57 |
| 3.10. Estímulo com LPS e incubação com LQB 118 em PBMC humano..... | 57 |
| 3.11. Dosagem de citocina e quimiocina..... | 58 |

| | |
|--|-----------|
| 3.12. Metabolismo celular..... | 58 |
| 3.13. Análise estatística..... | 59 |
| 4. Resultados..... | 60 |
| 4.1. Efeito do lapachol em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS..... | 61 |
| 4.2. Efeito do LQB 118 na inflamação pulmonar induzida por LPS..... | 61 |
| 4.3. Efeito do LQB 118 comparado a anti-inflamatórios usados na clínica..... | 62 |
| 4.4. Modulação de mediadores inflamatórios pelo LQB 118 <i>in vivo</i> | 63 |
| 4.5. Ativação de NF- κ B <i>in vivo</i> | 65 |
| 4.6. Inibição de TNF- α pelo LQB 118 em PBMC humano..... | 68 |
| 4.7. Citotoxicidade do lapachol e LQB 118 em PBMC humano..... | 68 |
| 5. Discussão..... | 72 |
| 6. Conclusão..... | 82 |
| Referências Bibliográficas..... | 84 |
| Anexos..... | 98 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é a resposta fisiológica a um agente que possa causar lesão tecidual. Esse agente, que pode ser de natureza física (raios UV, traumas), química (toxinas e ozônio) ou biológica (bactérias, fungos e tecido necrótico), desencadeia o processo inflamatório que tem como função eliminar o causador do dano tecidual e reparar o tecido (COTRAN, KUMAR & ROBBINS, 1994; BARTON, 2008).

A primeira descrição da inflamação é creditada ao romano A.C. Celsus no século I d.C., que documentou quatro sinais clínicos da inflamação, os chamados sinais cardinais: calor, rubor, edema e dor. No século XIX, Rudolf Virchow adicionou um quinto sinal, a perda de função. Até hoje, esses cinco sinais cardinais são aceitos para definir uma resposta inflamatória clássica (Figura 1) (BENAROYO, 1994; SCOTT, KHAN & DURONIO, 2004).

Desde Celsus, outras descrições foram feitas sobre a inflamação que ajudaram a compreender seu papel fisiológico. Em 1794, Jonh Hunter conclui que a inflamação não tinha apenas um aspecto patológico, mas também, ao contrário, era benéfica e fundamental na homeostasia corporal. Julius Cohnheim, em 1873, observou a participação do sistema circulatório nos processos inflamatórios, enquanto Elie Metchnikoff e Paul Ehrlich foram os primeiros a descrever a inflamação como um processo celular, com a participação de fagócitos que seriam recrutados ao local da lesão. Por essa razão, compartilharam o prêmio Nobel de medicina em 1908. Finalmente, em 1927, Sir Thomas Lewis sugeriu que todo este processo deveria ser

mediado por substâncias químicas (COTRAN, KUMAN & ROBBINS, 1994; SCOTT, KHAN & DURONIO, 2004).

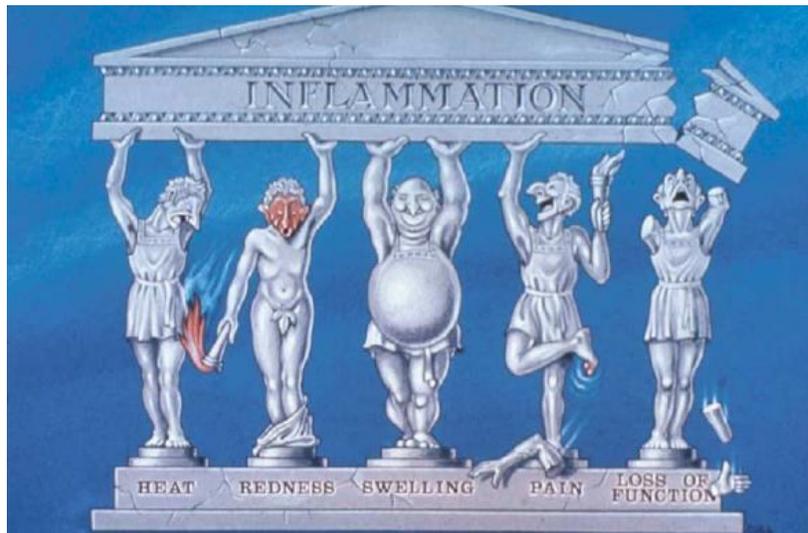


Figura 1. Os cinco sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, edema, dor e perda de função. Disponível em www.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular_immunology.

Atualmente, o conceito de inflamação é ainda mais complexo e envolve mecanismos celulares e moleculares bastante amplos. Em geral, o processo inflamatório segue uma via particular que consiste de indutores, sensores, mediadores e efetores (Figura 2). Os indutores, que podem ser classificados como exógenos e endógenos, são os responsáveis por iniciar a resposta inflamatória. Eles ativam sensores especializados, que, por sua vez, aumentam a produção de grupos de mediadores específicos. Estes mediadores alteram o estado funcional de órgãos, tecidos e células, que são os efetores da inflamação. A alteração funcional dos efetores

os permite adaptar-se de forma específica às condições indicadas por um determinado indutor (MEDZHITOV, 2008).

Os sensores inflamatórios são basicamente receptores que reconhecem de forma específica o seu ligante, no caso o indutor inflamatório. Esses receptores estão principalmente em macrófagos e mastócitos residentes do tecido, já que estas células são aquelas que terão o primeiro contato com o agente causador da lesão tecidual (MARSHALL & JAWDAT, 2004; MARTINEZ, HELMING & GORDON, 2009).

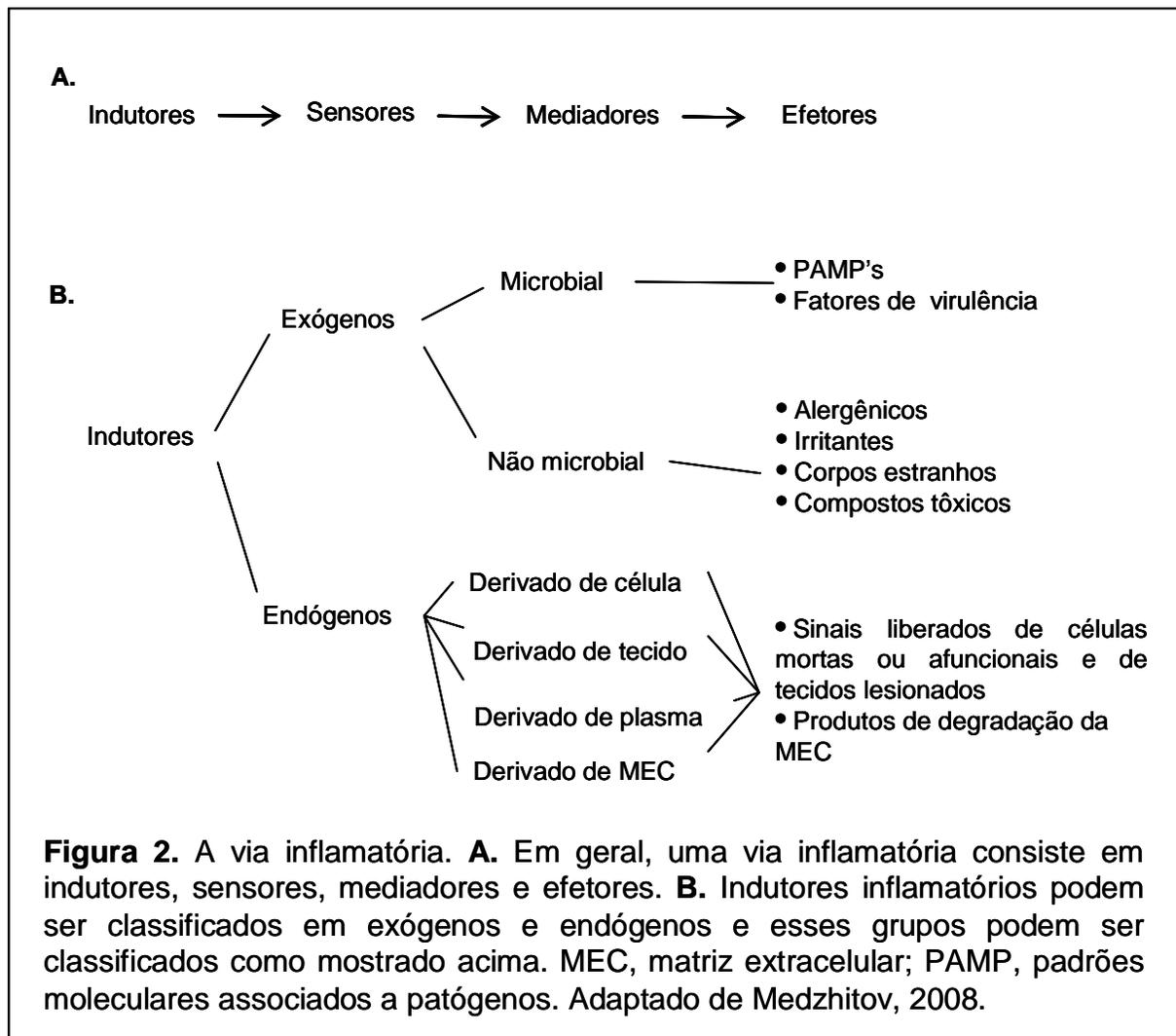


Figura 2. A via inflamatória. **A.** Em geral, uma via inflamatória consiste em indutores, sensores, mediadores e efetores. **B.** Indutores inflamatórios podem ser classificados em exógenos e endógenos e esses grupos podem ser classificados como mostrado acima. MEC, matriz extracelular; PAMP, padrões moleculares associados a patógenos. Adaptado de Medzhitov, 2008.

A ligação do indutor no receptor induz a ativação das células residentes, levando ao aumento da taxa respiratória celular, ativação de fatores de transcrição e consequente produção e liberação de mediadores inflamatórios (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2009). Os mediadores atuam localmente, intensificando a resposta inflamatória e alcançam a circulação sanguínea, ativando o endotélio e leucócitos, permitindo o recrutamento dessas células para o foco inflamatório (POBER & SESSA, 2007).

A ativação do endotélio e dos leucócitos leva à expressão de moléculas de adesão essenciais para a interação entre esses dois tipos celulares, permitindo a passagem dos leucócitos da circulação sanguínea para o tecido inflamado (POBER & SESSA, 2007). Além disso, o calibre dos vasos aumenta e a morfologia dos capilares se altera. Neles, o citoesqueleto se reorganiza e forma poros, aumentando a permeabilidade vascular. Isso facilita a passagem dos leucócitos pelo endotélio e também permite o extravasamento de proteínas plasmáticas para o meio extracelular (PETRACHE et al., 2003; LUCAS et al., 2009). Essas alterações vasculares são as principais responsáveis pelos aspectos característicos de um tecido inflamado: o aumento de fluxo sanguíneo em conjunto com o extravasamento de células e fluido plasmático rico em proteína (conhecido com exudato) tornam o tecido avermelhado, edemaciado, quente e dolorido (POBER & SESSA, 2007).

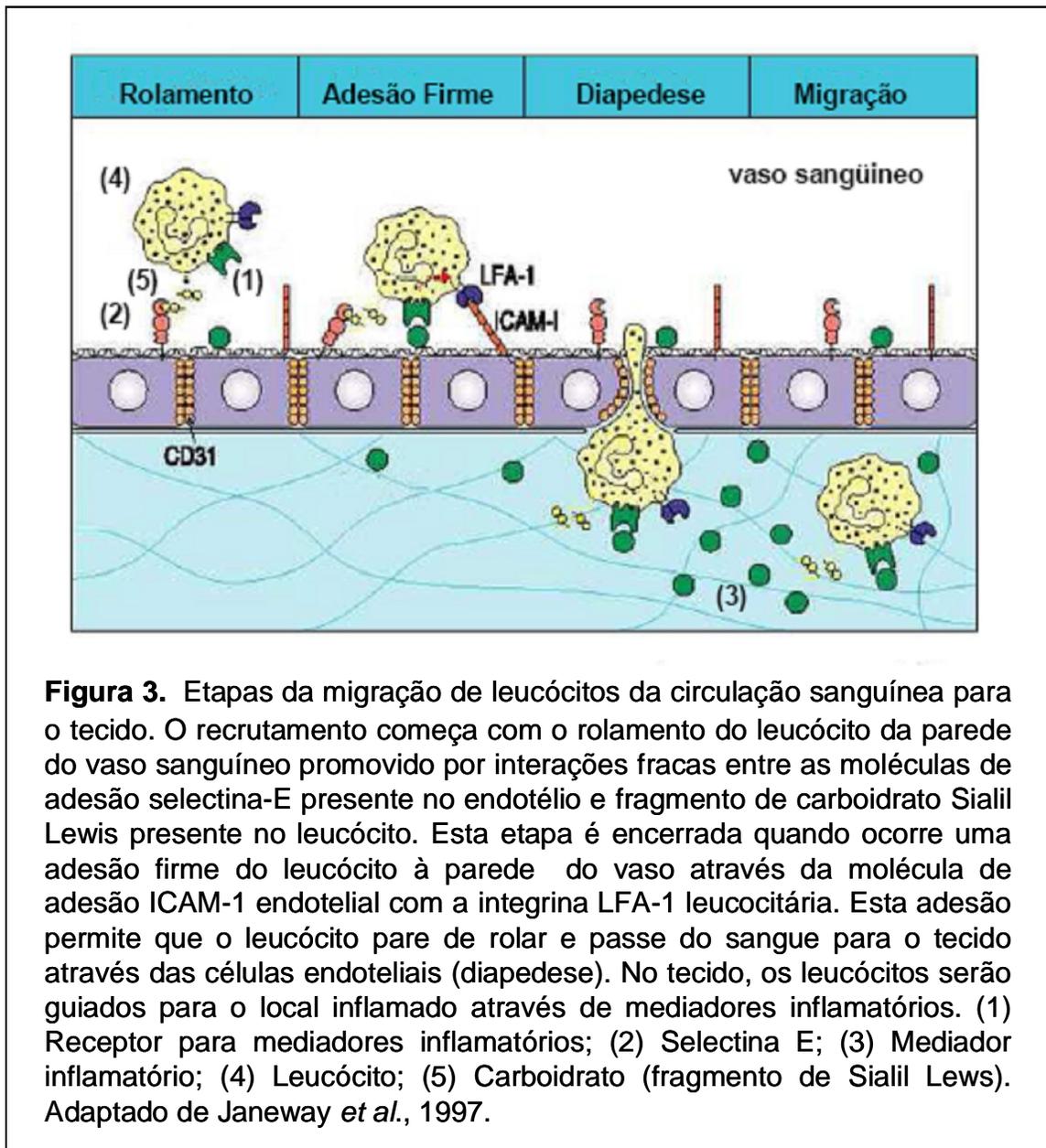
A saída dos leucócitos do vaso ocorre em etapas (Figura 3). Primeiro, há a marginação e rolamento das células na parede do vaso, promovidos por interações fracas entre as moléculas de adesão, como a selectina-E, presentes no endotélio e seu respectivo ligante, o fragmento de carboidrato Sialil Lewis, presente nos leucócitos. Depois ocorre uma interação mais forte que permite a adesão das células à parede do

vaso. Essa adesão firme ocorre pela interação entre a molécula de adesão celular do tipo 1 (ICAM-1) endotelial e a integrina antígeno associado à função linfocitária 1 (LFA-1) leucocitária. Com isso, as células podem realizar a transmigração, ou diapedese, que é a passagem do leucócito pelo endotélio. Já no tecido, o leucócito, por fim, migra em direção ao local da lesão guiado pelos mediadores inflamatórios (JANEWAY, TRAVES, WALPORT, 1997; MIDDLETON et al., 1997; POBER & SESSA, 2007).

Uma vez no local inflamado, os leucócitos podem então, conjuntamente com o tecido, atuar como efetores da via inflamatória. Essas células participam ativamente na defesa do organismo, liberando outros mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, além de proteases e espécies reativas de oxigênio que têm como função, em última instância, combater o agente infeccioso, culminado na reparação do tecido lesionado (WEISS et al., 1978; NATHAN, 2006; MEDZHITOV, 2008). Logo após a eliminação do indutor inflamatório deve haver uma transição entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios para que haja por fim a resolução do processo inflamatório (NATHAN, 2002; SERHAN & SAVILL, 2005).

Em resumo, uma resposta inflamatória ideal deve ser rápida e destrutiva (quando necessário), e ainda, específica e auto-limitada. No entanto, nem sempre o processo inflamatório evolui dessa forma. Se há falha na eliminação do agente indutor, ou um desequilíbrio de mediadores pró e anti-inflamatórios, a resposta inflamatória adquire novos aspectos, intensificando-se e podendo tornar-se crônica (MEDZHITOV, 2008). A produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios no local da lesão e a incapacidade de eliminar o patógeno levam à formação de granulomas e podem induzir danos irreparáveis no tecido (SOUZA et al., 2008). Os radicais livres e proteases liberados pelas células ativadas no local inflamado podem causar mais dano ao

hospedeiro do que ao patógeno. Dependendo da extensão do dano, a reparação só pode ser feita por fibrose, levando a uma perda de função tecidual (DALLEGRI & OTTONELLO, 1997; BARTON, 2008).



Por essa razão, existem inúmeras patologias inflamatórias como a artrite reumatóide, a síndrome da angústia respiratória, a psoríase, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e doenças inflamatórias intestinais (HINTZEN et al., 2009; HIRVONEN, 2009; FIORINO et al., 2009), e outras tantas em que a reação inflamatória está diretamente implicada, como a sepse, diabetes tipo I e II, obesidade, aterosclerose, mal de Alzheimer e câncer (SHIOIRI et al., 2009; ELZIRIK, COLLI & ORTIS, 2009; BROWN et al., 2009; SALMINEN et al., 2009; COUSSENS & WERB, 2002).

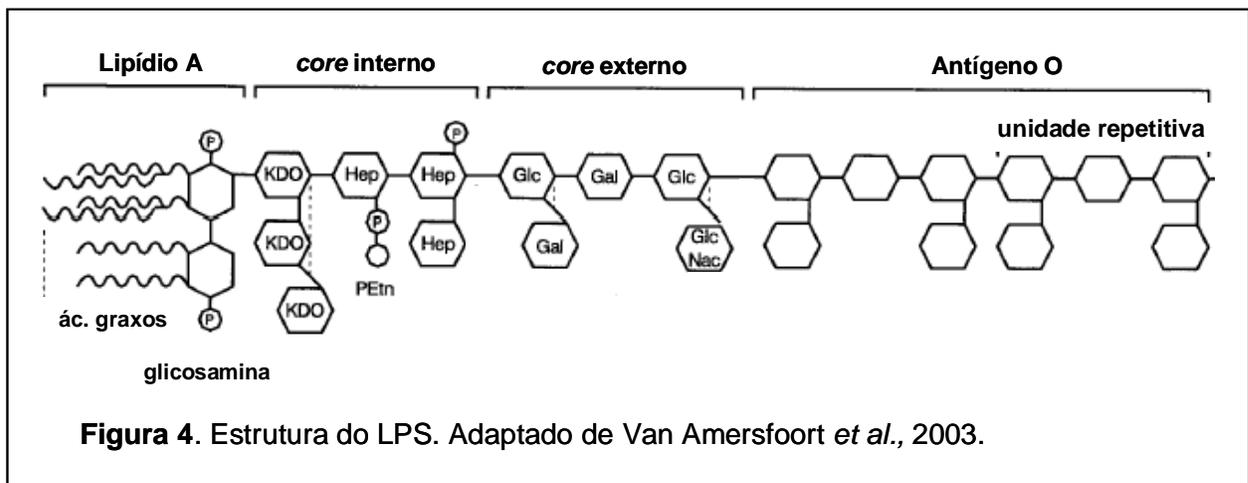
A grande relevância clínica de se entender o processo inflamatório e controlá-lo, traz a necessidade de modelos biológicos que viabilizem o seu estudo. Para estudar o processo inflamatório, os modelos que utilizam o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) como indutor inflamatório são bem descritos na literatura e estão entre os mais aceitos.

1.2 LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO (LPS): UM INDUTOR INFLAMATÓRIO

O LPS é o maior constituinte da parede celular de bactérias gram-negativas, uma única *E. coli* contém aproximadamente $3,5 \times 10^6$ moléculas de LPS. O LPS é pré-requisito para a viabilidade bacteriana, ele protege a bactéria das defesas do hospedeiro e medeia a entrada da bactéria nas células eucarióticas (VAN AMERSFOORT, VAN BERCKEL & KUIPER, 2003; BRANDENBURG & WIESE, 2004). Cada molécula de LPS é composta por uma parte lipídica, denominada lipídio A, responsável por ancorar a molécula à camada externa da parede celular, ligada covalentemente a uma parte polissacarídea hidrofílica (Figura 4). A parte hidrofílica consiste de um core oligossacarídeo de diferentes comprimentos e uma cadeia polissacarídea formada por

repetidas unidades, denominada antígeno O (VAN AMERSFOORT, VAN BERCKEL & KUIPER, 2003).

O LPS enquanto parte da parede bacteriana não é tóxico ao hospedeiro. Para que induza inflamação, o LPS deve ser liberado da bactéria, e isso acontece na multiplicação, morte ou lise bacteriana. Por essa razão o LPS é classificado como uma endotoxina (BEUTLER & RIETSCHER, 2003; VAN AMERSFOORT, VAN BERCKEL & KUIPER, 2003). O efeito inflamatório é creditado ao lipídio A, pois essa parte da molécula de LPS sozinha é capaz de induzir resposta inflamatória no hospedeiro (BISWAS et al., 2007).



A reação inflamatória desencadeada pelo LPS inicia-se com a sua ligação a dois receptores de membrana presentes principalmente em fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos): o CD 14, que é uma glicoproteína ancorada por fosfatidilinositol; e o receptor semelhante a *Toll-4* (TLR-4), que reconhece com mais sensibilidade o LPS quando complexado a uma proteína MD-2 (VAN AMERSFOORT, VAN BERCKEL & KUIPER, 2003; FITZGERALD, ROWE & GOLENBOCK, 2004)

(Figura 5). A ligação do LPS com o CD 14 pode ainda ser mediada pela proteína ligadora de LPS (LBP) presente no plasma (BEUTLER & RIETSCHEL, 2003; FITZGERALD, ROWE & GOLENBOCK, 2004). A LBP funciona como uma lipotransferase, aumentando a atividade do LPS em cerca de 300 vezes, por levá-lo ao CD14. Há ainda uma forma solúvel do CD 14, responsável por aumentar a ativação por LPS em células que não expressam essa glicoproteína. No entanto, o CD 14 não possui atividade de sinalização intracelular, já que não tem domínios transmembrana e citoplasmático. Sua função é aumentar a resposta celular ao LPS e permitir a ligação ao TLR4 (FITZGERALD, ROWE & GOLENBOCK, 2004). O mecanismo de sinalização intracelular desencadeado pelo LPS quando se liga ao TLR4 ainda não foi totalmente desvendado. O que se sabe é que a sinalização inicia-se com o recrutamento de proteínas adaptadoras contendo o domínio Toll-IL1R (TIR) ao domínio citoplasmático TIR do receptor TLR4 (AKIRA & TAKEDA, 2004; KAGAN & MEDZHITOV, 2006). O recrutamento de uma ou mais dessas proteínas (MyD88, TIRAP/Mal, TRIF/TICAM-1 e TRAM/TICAM-2) inicia diversas vias de sinalização que, em última instância, ativam fatores de transcrição (FITZGERALD et al., 2003; AKIRA & TAKEDA, 2004). A figura 5 ilustra uma dessas vias.

Vários fatores de transcrição são ativados pelo LPS e estão relacionados à expressão de genes inflamatórios e envolvidos na defesa do hospedeiro à infecção. Um importante fator de transcrição induzido por LPS é o fator de transcrição nuclear-kappaB (NF- κ B) (FINLAY & HANCOCK, 2004; TAKEDA & AKIRA, 2005; TOGBE et al., 2007).

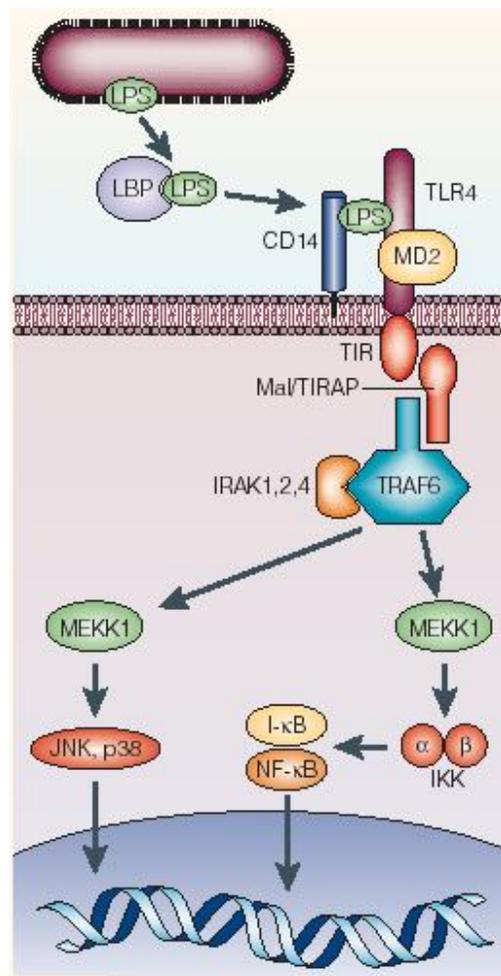


Figura 5. Principal via de transdução do TLR4. O LPS forma um complexo com a proteína ligadora de LPS (LBP), que se liga ao CD 14 presente na membrana da célula, e forma um complexo com TLR4 e MD2. No lado citoplasmático da membrana, o TLR4 interage com Mal/Tirap (proteína adaptadora de diferenciação semelhante à mielóide 88/proteína adaptadora contendo domínio do Toll/IL1R), que então ativa a cascata envolvendo a cinase associada ao receptor de interleucina-1, 2, 4 (IRAK), fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) e também o fator nuclear kappaB (NF-κB), que resulta na ativação transcricional de genes inflamatórios. 1- IKK, Cinase IκB; 2- JNK, Cinase Jun N-terminal; 3- MEKK, proteína cinase ativada por mitógeno/ Cinase ERK. Adaptado de Finlay e Hancock, 2004.

1.3 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR- kappaB (NF-κB)

Fatores de transcrição são proteínas que auxiliam a RNA polimerase na transcrição do DNA (ALBERTS et al., 2002). Esses fatores podem estar ativados de forma constitutiva ou de forma indutiva, após um determinado estímulo. O NF-κB está entre os fatores que respondem a estímulos para sua ativação e tem grande importância no processo inflamatório e nas respostas imunológicas, pois é o principal responsável pela transcrição de inúmeros genes relacionados a esses dois processos biológicos (BARNES, 1997; BONIZZI & KARIN, 2004; LI & VERMA, 2002).

O NF-κB em mamíferos consiste em uma família de proteínas com cinco membros: Rel (ou c-Rel), Rel A (também conhecido como p65 e NF-κB 3), Rel B, NF-κB1 (ou p50) e NF-κB2 (ou p52). Para as proteínas NF-κB1 e NF-κB2 existem os precursores p100 e p105, respectivamente. A característica comum a todas as proteínas NF-κB é a presença de domínios homólogos do tipo Rel (RHD), que consiste em uma parte conservada de 300 aminoácidos localizados na região *N*-terminal e são responsáveis pela dimerização e ligação ao DNA, sendo também o principal domínio regulatório (HAYDEN & GHOSH, 2004; KARIN, YAMAMOTO & WANG, 2004; MOYNAGH, 2005). O RHD contém na posição *C*-terminal uma seqüência de localização nuclear (NSL), que em células não-estimuladas encontra-se inativado pela ligação a inibidores específicos (KARIN, YAMAMOTO & WANG, 2004).

As proteínas da família NF-κB associam-se em homo ou heterodímeros que estão relacionados com respostas específicas a estímulos diferentes, e, portanto, levam a efeitos diferenciados na transcrição dos genes. Assim, temos homodímeros de p52 e

p50 que funcionam como repressores da transcrição, ao contrário dos homodímeros de Rel ou Rel A que são ativadores (CAAMAÑO & HUNTER, 2002). Já a subunidade Rel B é capaz de tanto estimular quanto inibir a síntese de RNA, sob a forma de heterodímeros estáveis (BONIZZI & KARIN, 2004).

O NF- κ B está presente no citoplasma da maioria das células em uma forma inativa, associada com uma classe de proteínas inibidoras conhecidas como inibidores de kappaB (I κ Bs) (GHOSH, MAY & KOPP, 1998). A família das I κ Bs inclui a I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , Bcl-3 e a região carboxi-terminal das proteínas p105 e p100 (CAAMAÑO & HUNTER, 2002).

A ativação da maioria dos dímeros de NF- κ B é conseguida através de uma seqüência de fosforilações intracelulares envolvendo proteínas cinases. Isso resulta na ativação das proteínas cinases de I κ Bs (IKK), que atuam, por sua vez, fosforilando os I κ Bs. A fosforilação gera poliubiquitinação e degradação dessas proteínas no proteossomo 26S, permitindo a exposição da NSL e, dessa forma, a liberação e translocação do NF- κ B para o núcleo. Essa ativação pode ocorrer através de vias independentes ou dependentes de receptores de membrana plasmática (GHOSH, MAY & KOPP, 1998; KARIN, YAMAMOTO & WANG, 2004). A ativação via independente de receptor se dá pelo efeito da radiação ultravioleta ou por estresse oxidativo, enquanto na via dependente a ativação ocorre pelo reconhecimento de patógenos ou citocinas reconhecidos pelo receptor de membrana (CAAMAÑO & HUNTER, 2002). Existem duas vias dependentes de receptor, a clássica e a alternativa (Figura 6) .

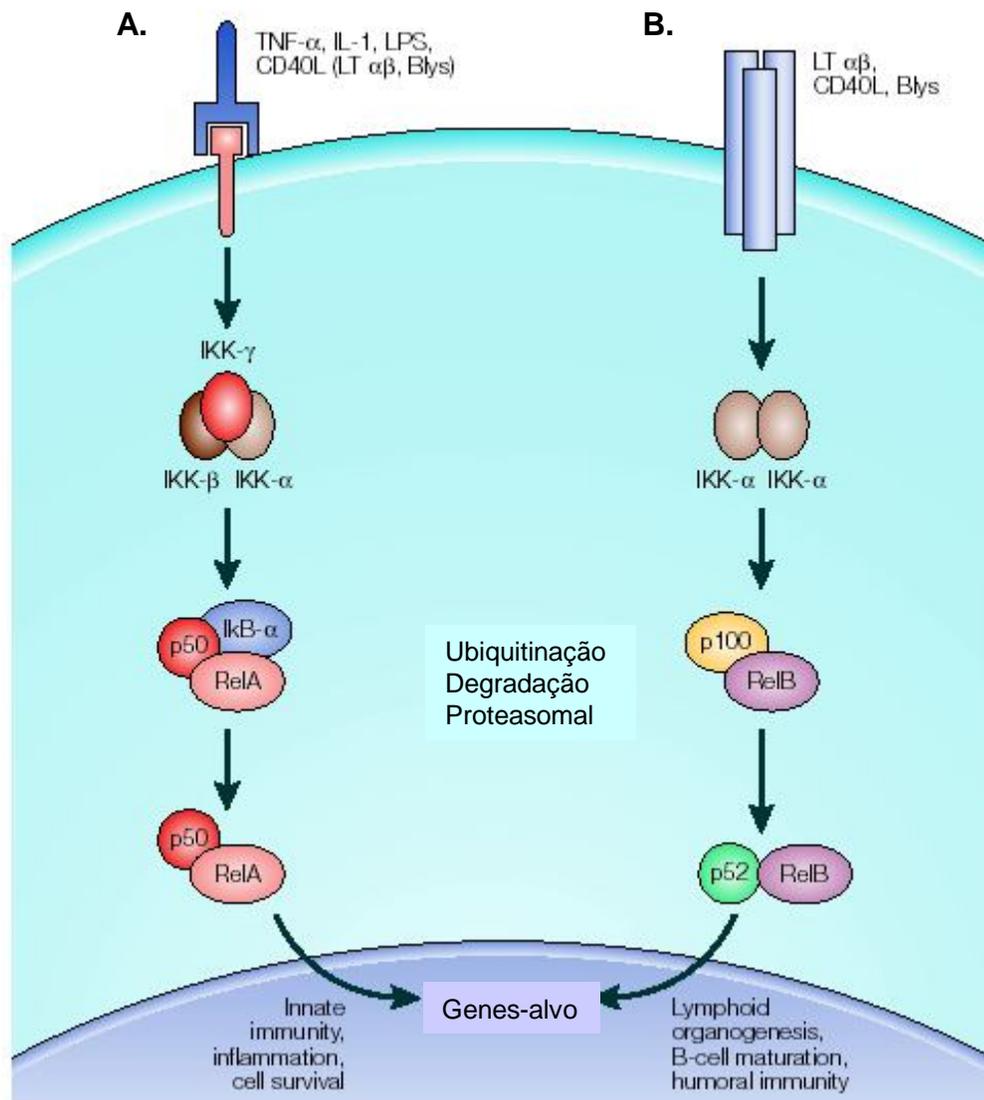


Figura 6. Vias de ativação do NF- κ B dependentes de receptor. A via clássica (A) é ativada pelo LPS ou citocinas, como o TNF- α , IL-1 β . A ativação dessa via depende do complexo IKK, que fosforila as I κ Bs. A fosforilação das I κ Bs expõe a seqüência de aminoácidos conhecida como Seqüência de Localização Nuclear (NLS) do NF- κ B, o que permite a migração desse fator para o núcleo. Essa via é crucial para a ativação da imunidade inata e inflamação, e para a inibição da apoptose. A via alternativa (B) está, envolvida no desenvolvimento, maturação e dos órgãos linfóides secundários e na imunidade adaptativa. I κ B, inibidor de NF- κ B; IKK, cinase de I κ B; IL, interleucina; LPS, lipopolissacarídeo; NF- κ B, fator nuclear-kappaB; TNF, fator de necrose tumoral. Adaptado de Karin *et al.*, 2004.

Na via clássica, o NF- κ B induz a transcrição de genes envolvidos no processo inflamatório como o de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas que produzem mediadores inflamatórios secundários e inibidores de apoptose. Já na via de ativação alternativa os genes transcritos estão relacionados com o desenvolvimento e manutenção dos órgãos linfóides (CAAMAÑO e HUNTER, 2002; BONIZZI & KARIN, 2004; KARIN, YAMAMOTO & WANG, 2004).

1.4 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

A regulação e a progressão dos eventos celulares e moleculares envolvidos com o processo inflamatório dependem em grande parte da ação de mediadores químicos. Apesar da grande variedade de espécies de mediadores, que podem possuir diversas funções, alguns princípios gerais são partilhados por todos os mediadores inflamatórios. Os mediadores podem se originar tanto do plasma (nesse caso, na forma de precursores) ou de células, que normalmente possuem grânulos de armazenamento. A maioria dos mediadores deve se ligar a um receptor específico para ter atividade biológica, mas alguns possuem atividade enzimática, ou causam danos oxidativos. Esta atividade biológica pode se restringir a um tipo ou atuar em várias células-alvo. A meia-vida desses mediadores costuma ser curta e é regulada eficazmente. Além disso, grande parte dos mediadores possui também efeitos nocivos (COTRAN, KUMAN & ROBBINS, 1994; MEDZHITOV, 2008). As ações desempenhadas por esses mediadores envolvem desde vasodilatação até broncoconstrição, sendo responsáveis por alguns dos sintomas desagradáveis das reações inflamatórias, como febre e dor. Na Tabela 1,

podemos observar alguns desses mediadores e seus efeitos durante a inflamação (COTRAN, KUMAN & ROBBINS, 1994). Existem sete grupos de mediadores, classificados de acordo com suas propriedades bioquímicas: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, componentes do sistema complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008). Dentre os mediadores que atuam no recrutamento e ativação de leucócitos, os dois grupos principais são os das citocinas e quimiocinas.

Tabela 1. Alguns mediadores da resposta inflamatória. Adaptado de Cotran *et al.*, 1994.

| Mediador | Fonte | Ação | | |
|--|---------------------------------------|-------------------------|-------------|---|
| | | Permeabilidade Vascular | Quimiotaxia | Outros |
| Histamina e Serotonina | Mastócitos e Plaquetas | + | - | |
| Bradiquinina | Substrato plasmático | + | - | Dor |
| C3a | Proteína Plasmática Macrófago | + | - | Adesão e ativação leucocitária |
| C5a | | + | + | |
| Prostaglandinas | Mastócitos, fosfolipídeos de membrana | Potencializa mediadores | - | Vasodilatação, dor e febre |
| Leucotrieno B ₄ | Leucócitos | - | + | Adesão e ativação leucocitária |
| Leucotrieno C ₄ , D ₄ , E ₄ | Leucócitos e mastócitos | + | - | Vasoconstrição Broncoconstrição |
| Metabólitos de Oxigênio | Leucócitos | + | +/- | Dano tecidual |
| PAF | Leucócitos e mastócitos | + | + | Broncoconstrição |
| IL-1 e TNF | Macrófagos, outras | - | + | Reações de fase aguda Ativação endotelial |
| IL-8 | Macrófagos, endotélio | - | + | Ativação leucocitária |
| Óxido Nítrico | Macrófagos, endotélio | | | Vasodilatação, Citotoxicidade |

As citocinas são fatores produzidos por diversos tipos celulares, como linfócitos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais e do tecido conjuntivo, que atuam em outras células, alterando seu estado funcional. Por essa razão, alguns as consideram como “hormônios” das respostas imunológicas e inflamatórias. No entanto, algumas

propriedades das citocinas não se enquadram nessa definição. Por exemplo, citocinas podem atuar apenas de maneira autócrina e parácrina. Além disso, hormônios geralmente são específicos de um determinado tecido, enquanto as citocinas são produzidas pela grande maioria das células (DINARELLO, 2007).

Citocinas atuam em praticamente todos os processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário até os processos degenerativos do envelhecimento. Por isso, o pleiotropismo é a principal característica dessas moléculas. Sua expressão é regulada por diversos sinais como fatores de crescimento, patógenos e outras citocinas. (COTRAN, KUMAN & ROBBINS, 1994; DINARELLO, 2007).

As quimiocinas são citocinas de características quimioatraentes com baixo peso molecular, normalmente entre 6 e 14 KDa, e estruturalmente muito similares. Esses peptídeos podem ser classificados em 4 grupos (CXC, CX₃C, CC e C) de acordo com a posição das duas primeiras e altamente conservadas cisteínas da sequência de aminoácidos (MURDOCH & FINN, 2000). Quimiocinas podem ter diversas funções nos mais variados processos, como organogênese, hematopoiese, comunicação neuronal, mas sua principal função no processo inflamatório é promover o recrutamento de leucócitos para o foco da inflamação. Esse processo, denominado quimiotaxia, é dependente do gradiente de concentração das moléculas quimioatraentes solúveis (COTRAN, KUMAN & ROBBINS, 1994; OLSON & LEY, 2002).

Atualmente, mais de uma centena de citocinas e quimiocinas já foram descritas, e outras novas estão sendo constantemente descobertas. A quantidade é tão grande que hoje já não nos referimos a citocinas e quimiocinas apenas como um único produto gênico, mas também a famílias de produtos gênicos relacionados. Assim temos, por exemplo, as interleucinas, com 33 membros, ou as quimiocinas CC, com 7 membros

(DINARELLO, 2007). Dentre todas as citocinas e quimiocinas, destacamos dois importantes mediadores que têm sua produção modulada pela ativação de NF- κ B: a citocina fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a quimiocina citocina derivada de queratinócito (KC).

1.4.1 FATOR DE NECROSE TUMORAL - ALFA (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória de papel importante na resposta inflamatória inata de vertebrados (VARFOLOMEEV & ASHKENAZI, 2004). Há duas décadas, o TNF- α foi descrito como o mediador principal da patogênese do choque séptico (BEUTLER, MILSARK & CERAMI, 1985). Esta citocina é um dos produtos mais abundantes secretados por macrófagos, e diversas outras células, como neutrófilos, células Natural Killer (NK) e células T, são capazes de liberá-la quando estimuladas com LPS (GOETZ, PLANAS & MACKENZIE, 2004). O TNF- α é ainda um dos primeiros e principais produtos produzidos a partir da ativação do fator de transcrição NF- κ B, quando ativado por estímulos inflamatórios (SIMMONDS & FOXWELL, 2008),

O TNF- α é sintetizado como um precursor transmembrana tipo II de 26 KDa, que ocorre na forma de homotrímeros estáveis. Para passar a forma ativa, o pró-TNF é hidrolizado pela enzima conversora de TNF- α (TACE), uma metaloproteinase, liberando a forma solúvel de 17 KDa (BLACK et al., 1997; MOSS et al., 1997).

A liberação do TNF- α desencadeia a expressão de quimiocinas e citocinas, promove a adesão, extravasamento, recrutamento e ativação de leucócitos no sítio da inflamação. Além disso, o TNF- α facilita a transição da imunidade inata para a adquirida

por estimular a apresentação de antígeno e a coestimulação de linfócitos T (VARFOLOMEEV & ASHKENASI, 2004).

Para exercer suas atividades biológicas, o TNF- α precisa se ligar a receptores de membrana. São conhecidos dois receptores distintos capazes de se ligar ao TNF- α com alta afinidade: o receptor de TNF tipo I (TNF-R1) e o receptor de TNF tipo II (TNF-R2). O TNF-R1 é expresso constitutivamente na maioria dos tecidos, enquanto a expressão de TNF-R2 é altamente regulada, sendo expressa quase que exclusivamente em células do sistema imunológico. Em relação ao TNF-R1, a função do TNF-R2 é ainda pouco compreendida (VARFOLOMEEV & ASHKENASI, 2004; IHNATKO & KUBES, 2007). De acordo com Chen e Goeddel (2002), o TNF-R1 seria o mais ativo e, portanto, inicia a maior parte das respostas biológicas.

A ligação do TNF- α ao domínio extracelular do TNF-R1 resulta na liberação da proteína silenciadora de domínios de morte (SODD) do domínio intracelular do TNF-R1 (ICD). O ICD livre então é reconhecido por uma proteína adaptadora do domínio de morte associado ao receptor de TNF (TRADD). Esta se liga ao receptor e atrai proteínas adaptadoras: proteína que interage com o receptor (RIP), o fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF2) e a proteína com domínio de morte associado ao Fas (FADD). Essas proteínas são as responsáveis por iniciar diferentes vias de sinalização (Figura 7) (CHEN & GOEDDEL, 2002).

Dependendo do estímulo, o TNF-R1 pode ativar três vias diferentes de sinalização intracelular mediadas pelas três proteínas adaptadoras recrutadas pela TRADD. Uma delas leva à apoptose por intermédio da FADD, que recruta a enzima caspase-8 para o complexo de receptores TNF, destravando uma seqüência de

reações que culmina com a morte celular. Uma segunda sinalização é através da ação do TRAF2 que sinaliza para inibidores de apoptose, como a proteína inibidora celular de apoptose 1 e 2 (cIAP-1 e cIAP-2). Essa via é capaz também de ativar a proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno (MAPKKK), bem como outras cinases, ativando a via dessas proteínas. O resultado final é a fosforilação e ativação do fator de transcrição c-Jun. A terceira via, na qual a proteína RIP é fundamental para o funcionamento, está ligada à ativação das enzimas do complexo IKK, responsáveis pela ativação do NF- κ B (CHEN & GOEDDEL, 2002).

1.4.2 CITOCINA DERIVADA DE QUERATINÓCITO (KC)

A KC é a homóloga em roedores de duas quimiocinas CXC (as duas primeiras cisteínas são intercaladas por um aminoácido qualquer na sequência) encontradas em humanos: a atividade regulatória de crescimento de melanoma/ oncogene relacionado ao crescimento humano (MGSA/GRO- α) e a interleucina-8 (IL-8) (NEELS et al., 2009). De acordo com a nova nomenclatura, MGSA/GRO- α passa a se chamar CXCL-1, e IL-8, CXCL-8. O L diferencia o ligante do receptor, identificado com a letra R (REMICK, 2005). Apesar de KC apresentar maior homologia com a CXCL-1(BOZIC et al., 1994), essa quimiocina é a equivalente murina mais próxima da CXCL-8, a julgar pelo seu padrão de expressão e por sua função (WATANABE et al., 1993; NEELS et al., 2009). Além do mais, CXCL-1 e CXCL-8 são muito similares, seja estruturalmente, ou funcionalmente, e têm muitos receptores em comum (WOOD & RICHMOND, 1995). Por

essa razão, as funções da CXCL-8 também são extrapoladas à KC (ZHANG et al., 2001; NEELS et al., 2009).

Assim como CXCL-1 e CXCL-8, a KC se liga ao receptor CXCR-2, aumentando a migração de células polimorfonucleares, pois rearranja o citoesqueleto, aumenta os níveis de Ca^{2+} intracelular, ativa integrinas e regula a polimerização e despolimerização de actina (GRAVES & JIANG, 1995; LOMAS et al., 2003). Seu efeito é mais pronunciado em neutrófilos, estimulando também nessas células a liberação de grânulos protéicos (GRAVES & JIANG, 1995; GREENBERGER et al., 1996).

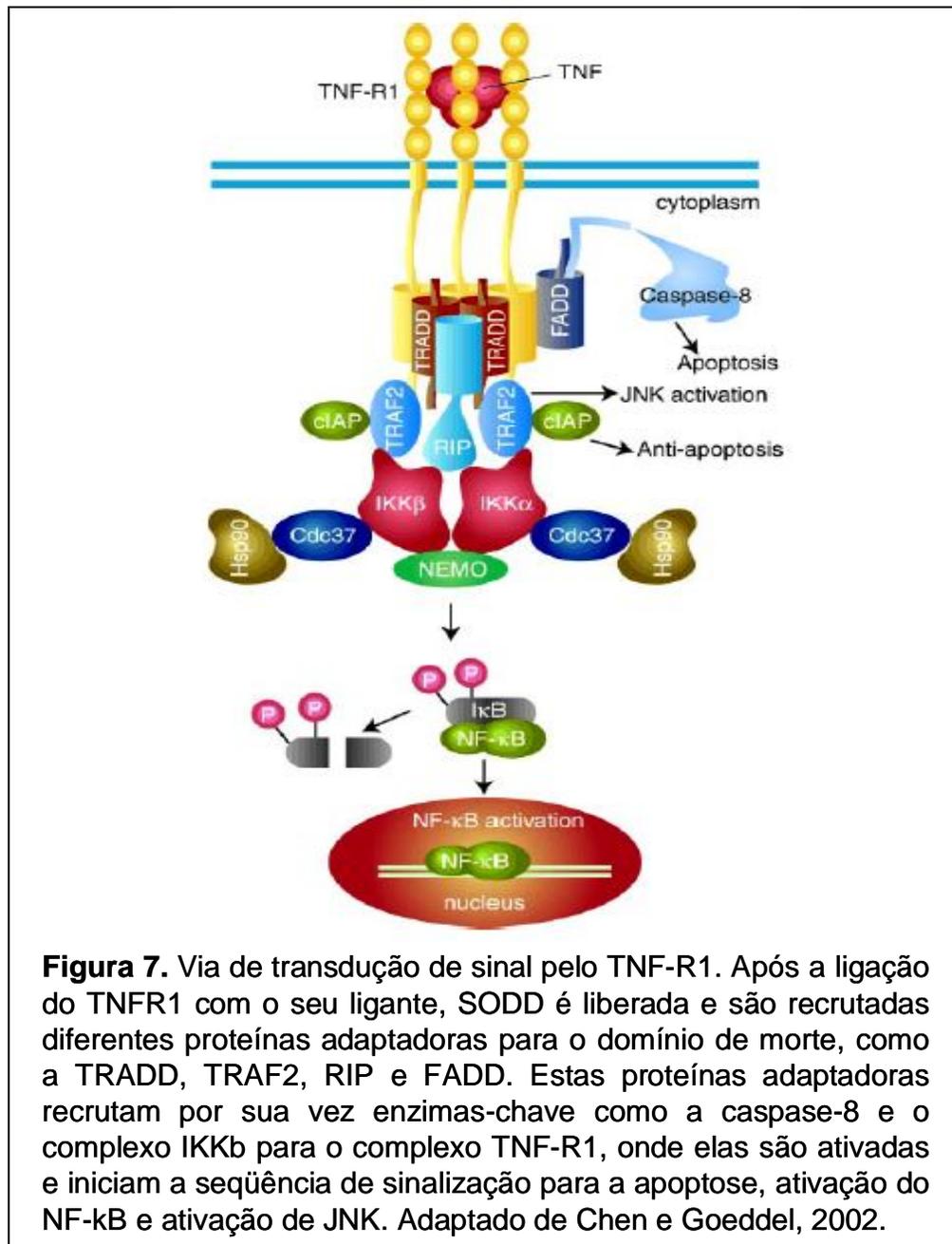
Monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, endoteliais e parenquimais podem liberar KC após estímulo com LPS (REUTERSHAN & LEY, 2004). A liberação de KC, assim como no caso da CXCL-1 e CXCL-8, pode ser precedida de aumento da sua expressão gênica regulada pelo fator de transcrição NF- κ B (HUGHES-FULFORD et al., 2006).

1.5 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS

Os fármacos utilizados como anti-inflamatórios podem ser classificados como esteroidais (glicocorticóides) como a dexametasona, ou não-esteroidais (AINE), como o ácido acetilsalicílico.

Os agentes anti-inflamatórios esteroidais são capazes de suprimir a inflamação com grande eficácia por vários mecanismos que inibem a resposta imune. São capazes, por exemplo, de inibir a produção de fatores inflamatórios de diversas células, o que acarreta a diminuição da liberação de mediadores vasoativos e quimioatraentes,

a diminuição da secreção de enzimas proteolíticas e do extravasamento de leucócitos para o foco inflamatório.



A Tabela 2 mostra alguns tipos de células e mediadores que são inibidos por glicocorticóides. Apesar da sua grande potência anti-inflamatória, seu uso muitas vezes

é restrito pelos vários efeitos colaterais. Por ter característica hormonal, os agentes esteroidais podem provocar efeitos em outros órgãos que não o alvo. Além disso, sua ação imunomoduladora aumenta a susceptibilidade a infecções (GOODMAN et al., 2003).

Os AINEs são fármacos que têm como exemplo clássico o ácido acetilsalicílico. Sua ação ocorre principalmente pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que é responsável pela produção de prostaglandinas (GOODMAN et al., 2003). Isso acarreta a inibição da resposta inflamatória através das principais vias de ativação celular como a via das MAP cinases e da transcrição mediada pelo NF- κ B (CASTRO et al., 2009). Além dos efeitos nas vias de sinalização intracelular, esses agentes podem afetar a transmigração de leucócitos para o tecido inflamado (TEGEDER PFEILSCHIFTER & GEISSLINGER, 2001; VOISARD et al., 2001; CASTRO et al., 2009). Os AINEs também possuem outras propriedades como antipirética e analgésica e outros tantos efeitos colaterais como ulceração e intolerância gastrointestinal; bloqueio da agregação plaquetária, pois inibe a síntese de tromboxano A_2 ; inibição da mobilidade uterina, o que acarreta prolongamento da gestação; inibição da função renal mediada por prostaglandina, além de reações de hipersensibilidade (GOODMAN et al., 2003).

1.6 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS

Desde os primórdios da humanidade, a natureza tem sido fonte de alívio e cura para diversas doenças. O conhecimento acumulado pelos povos primitivos e indígenas sobre a utilização de produtos naturais e o intercâmbio cultural dos mais diferentes

grupos étnicos impulsionaram a pesquisa de substâncias provenientes da natureza que poderiam ser úteis na cura e prevenção de doenças (VIEGAS JR., BOLZANI & BARREIRO, 2006).

No início, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, que compunham a farmacopéia da época, e se limitavam a identificar e isolar o princípio ativo presente no extrato. Como na época as plantas eram as principais fontes terapêuticas, a Química e a Medicina passaram a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos. Assim, várias substâncias ativas foram identificadas e extraídas de produtos naturais e algumas permanecem como medicamentos até hoje (Figura 8) (VIEGAS JR., BOLZANI & BARREIRO, 2006).

Entre os exemplos, temos o ópio, resina extraída dos bulbos da *Papaver somniferum*. Suas propriedades soponífera e analgésica já eram conhecidas desde a época dos Sumérios (4000 a.C.). Na mitologia grega existe associação da planta com o simbolismo de Morfeu, o deus do sono. Em 1804, na França, Armand Séquin isolou seu constituinte majoritário, a morfina, um analgésico de grande eficácia (VIEGAS JR., BOLZANI & BARREIRO, 2006).

Outro exemplo é a quinina, isolada em 1820 de espécies de *Chinchona*. Os índios utilizavam as cascas secas dessa planta no combate a alguns tipos de febre. Durante quase trezentos anos, a quinina foi o único medicamento eficaz contra a malária (VIEGAS JR., BOLZANI & BARREIRO, 2006).

Tabela 2. Efeitos Inibitórios dos glicocorticóides nos componentes da resposta imune/inflamatória. Adaptado de Goodman et al., 2003.

| Tipo Celular | Fator |
|------------------------|---|
| Macrófagos e Monócitos | <p>Ácido araquidônico e seus metabólitos (prostaglandinas e leucotrienos)</p> <p>Citocinas, incluindo interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)-α</p> <p>Reagentes da fase aguda</p> |
| Células Endoteliais | <p>Molécula de adesão endotelial de leucócito-1 (ELAM-1) e molécula de adesão intracelular-1 (ECAM-1)</p> <p>Reagentes de fase aguda</p> <p>Citocinas</p> <p>Derivados do ácido araquidônico</p> |
| Basófilos | <p>Histamina</p> <p>Leucotrieno C₄</p> |
| Fibroblastos | <p>Metabólitos do ácido araquidônico</p> |
| Linfócitos | <p>Citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF-α, GM-CSF, interferon-γ)</p> |

No entanto, a grande revolução no desenvolvimento dos fármacos derivados de produtos naturais ocorreu com a descoberta dos salicilatos obtidos do salgueiro (*Salix alba*). As cascas dessa planta já eram utilizadas há séculos atrás para alívio da dor. Na Grécia antiga, Hipócrates mencionava em sua obra o tratamento dos sintomas da inflamação com o uso da casca do salgueiro. Em 1757, o reverendo Edward Stone provou o sabor amargo das cascas do salgueiro e associou-o ao sabor da *Chinchona*. Seis anos depois, comprovou as propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato daquela planta (CIRILLO et al., 1994; VIEGAS JR., BOLZANI & BARREIRO, 2006).

Em 1828, o princípio ativo do salgueiro, a salicina, foi isolado, até que em 1860, Hermann Kolbe sintetizou o ácido salicílico, fruto do seu trabalho em melhorar a eficiência da salicina. Já em 1874 era aberta a primeira grande fábrica de produção de salicilatos (VIEGAS JR., BOLZANI & BARREIRO, 2006).

Em 1897, Felix Hoffmann pesquisando a cura para a artrite de seu pai, sensível aos efeitos colaterais dos salicilatos, sintetizou o ácido acetilsalicílico (AAS), que era menos ácido que o ácido salicílico e mantinha suas propriedades terapêuticas. Hoffmann foi contratado pela Bayer que passou a comercializar o AAS sob o nome de Aspirina® (Figura 9). Em poucos anos a Aspirina® se tornou o medicamento mais vendido no mundo. O AAS foi o pioneiro dos fármacos sintéticos e hoje, após mais de 100 anos de sua descoberta, continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico e anti-inflamatório (VIEGAS JR., BOLZANI & BARREIRO, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população mundial se vale dos produtos naturais como fonte primária de cuidados com a saúde

(SCHUSTER, 2001). De acordo com Newman e colaboradores (2003), 57% de todos os fármacos aprovados entre 1981 e 2002 são produtos naturais, análogos semi-sintéticos ou compostos sintéticos baseados em produtos naturais. Dentre os 50 anti-inflamatórios utilizados na clínica atualmente, 13 são derivados de produtos naturais (NEWMAN, CRAGG & SNADER, 2003).

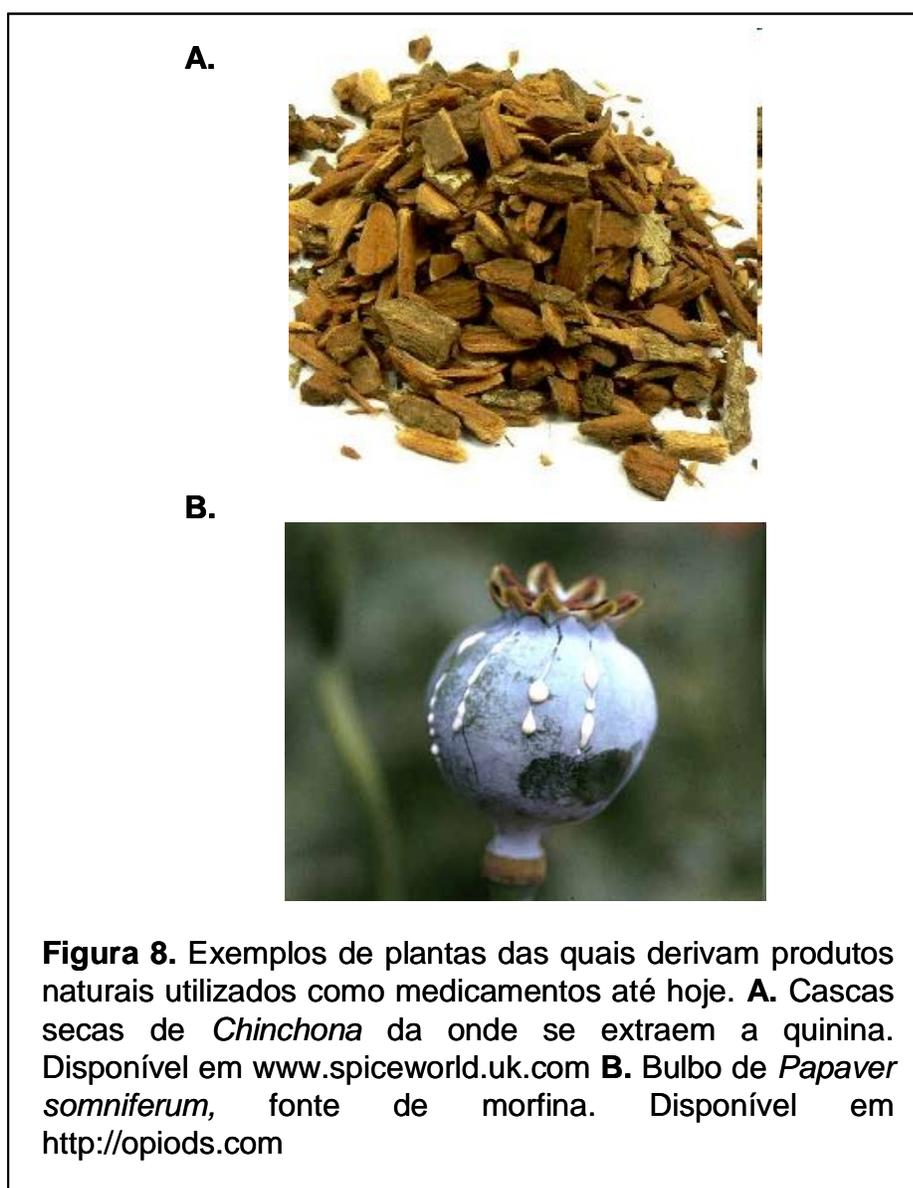


Figura 8. Exemplos de plantas das quais derivam produtos naturais utilizados como medicamentos até hoje. **A.** Cascas secas de *Chinchona* da onde se extraem a quinina. Disponível em www.spiceworld.uk.com **B.** Bulbo de *Papaver somniferum*, fonte de morfina. Disponível em <http://opioids.com>



Figura 9. Felix Hoffmann sintetizou o ácido acetilsalicílico, que passou a ser comercializado sob o nome de Aspirina® e se tornou o medicamento mais vendido no mundo. Disponível em <http://press.aspirin.de>.

Apesar desses números, a pesquisa em produtos naturais experimentou um declínio nas últimas duas décadas. Essa queda de investimentos pode ser explicada por inúmeros fatores, mas principalmente pela introdução de novas técnicas para a pesquisa de Novas Entidades Químicas bioativas (bioNCEs), como o uso da química combinatória, que deu lugar à química tradicional com produtos naturais que é lenta, dispendiosa e cara. Com a química combinatória obtém-se um grande número de novos compostos sintéticos através de combinações aleatórias de poucos reagentes. Além disso, houve o desenvolvimento de métodos de varredura biológicos automatizados (HTS) que passaram a permitir a avaliação *in vitro* de milhares de substâncias por experimento e a química com produtos naturais não era capaz de atender a essa

demanda (KOEHN & CARTER, 2005; NIELSEN, 2002; VIEGAS JR., BOLZANI & BARREIRO, 2006).

No entanto, a prometida avalanche de novos fármacos oriundos das novas tecnologias em química combinatória ainda não se concretizou. A razão para isso pode ser explicada pela ênfase dada à quantidade de novos compostos em detrimento da qualidade ou pureza desses elementos. Assim, a composição das atuais farmacopéias de bioNCEs é duvidosa. Além do mais, como a maioria das reações seguras da química combinatória envolve a interconversão de grupos funcionais, os compostos mais simples produzidos são oligômeros como peptídeos e nucleotídeos que não se parecem com as pequenas moléculas dos fármacos (ORTHOLAND & GANESAN, 2004).

Em vista disso, o que podemos ver atualmente é um crescente desenvolvimento do campo que combina as duas áreas. Os produtos naturais são reconhecida fonte de fármacos eficazes, fruto de milhares de anos de evolução do organismo que o produz. Usar esses produtos naturais como inspiração para a síntese ou simplesmente como os reagentes na construção de outros compostos fornece farmacopéias combinatórias com uma grande chance de se encontrar um potencial fármaco com atividade biológica (NIELSEN, 2002; ORTHOLAND & GANESAN, 2004).

1.6.1 LAPACHOL

O Lapachol é um produto natural extraído do cerne de espécies de *Tabebuia* (*Tabebuia sp*), árvore também conhecida popularmente como ipê ou pau-d'arco (Figura

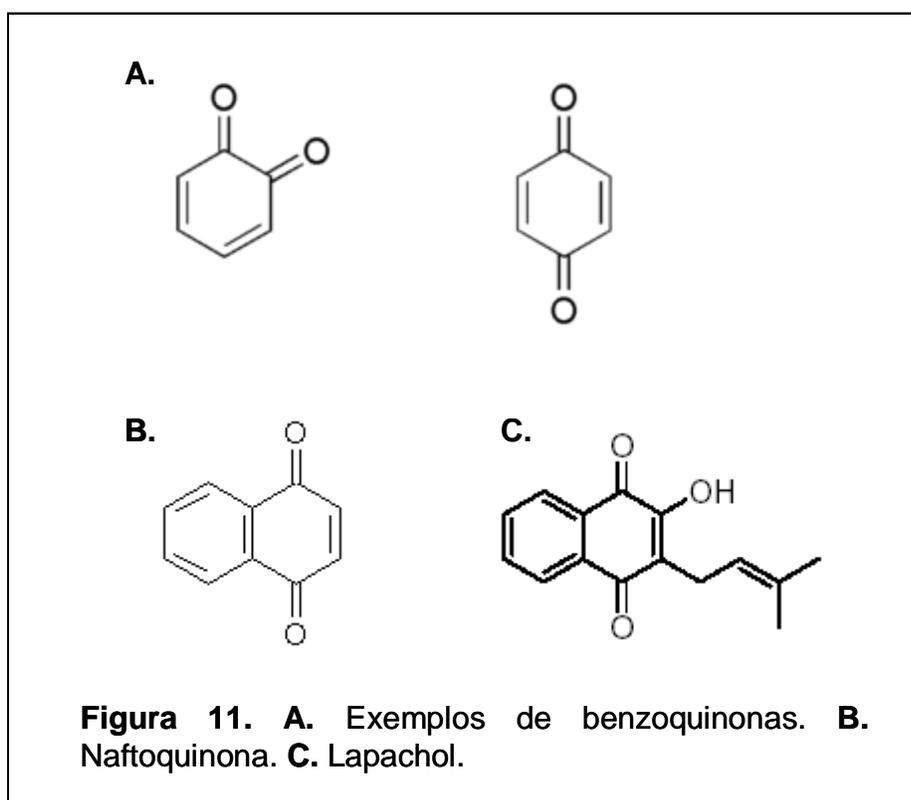
10). Por muitas décadas as preparações feitas com essa planta tem sido usadas no tratamento antitumoral, antifúngico, antiviral, antimicrobiano, antiparasitário e anti-inflamatório. Essas propriedades biológicas estão relacionadas aos diversos compostos presentes no extrato das Tabebuias, tais como saponinas, flavonóides, cumarinas e antibióticos naturais, mas suas principais substâncias ativas que são o lapachol, α -lapachona e β -lapachona pertencem à função química das quinonas (NETTO, 2007; LINARDI, OLIVEIRA, de & SAMPAIO, 1975; PEREIRA et al., 2006).



Figura 10. Tabebuia, planta da qual se extrai o Lapachol. Disponível em www.wikipedia.com.

Quinonas são encontradas em vários organismos, desde bactérias até plantas e animais. Podem atuar na cadeia respiratória ou na fotossíntese, como carreadores de elétrons, caso das ubiquinonas, ou serem cofatores de reações fisiológicas importantes, como no caso da vitamina K (SILVA, da et al., 2003).

Quimicamente, quinonas são anéis de hidrocarbonetos que contêm duas partes cetonas nas posições orto ou para. Suas posições podem ser substituídas, contanto que permaneçam as cetonas. Dependendo do anel de hidrocarboneto, a quinona terá uma nomenclatura diferente. Assim, se derivar de um benzeno, será uma benzoquinona. O lapachol especificamente deriva de um naftaleno, sendo, portanto uma naftoquinona (Biblioteca Virtual em Saúde, BVS) (Figura 11).



O lapachol já é conhecido desde 1858 e chegou a ser comercializado como coadjuvante no tratamento de certos tipos de câncer (BALASSIANO et al., 2005). Sua ação antitumoral é devida a sua capacidade de induzir estresse oxidativo pela formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (O'BRIEN, 1991), que danificam componentes importantes da célula. Essa alteração fisiológica é o estímulo que leva à

apoptose, caso não se consiga eliminar por completo o estresse oxidativo (SILVA, da et al., 2003).

Há relatos clínicos na literatura da ação do lapachol em carcinoma de Walker-256 e em sarcoma de Yoshida (SUBRAMANIAN, FERREIRA & TRSIC, 1998). Apesar da sua eficácia em regredir o tumor definitivamente em 30% dos casos, além de ter um efeito analgésico, os ensaios clínicos o desaprovam em virtude de seus efeitos colaterais que agravam o quadro clínico de pacientes com câncer: anemia, aumento do tempo de coagulação e problemas gastrintestinais (SILVA, da et al., 2003). Por isso, moléculas derivadas do lapachol vêm sendo pesquisadas a fim de se encontrar um fármaco com as características benéficas do lapachol, sem os seus efeitos colaterais.

Além de sua ação antineoplásica, outras atividades biológicas foram atribuídas ao lapachol, tais como antimicrobiana e antifúngica, atividade cercaricida (impede penetração da cercária do *Schistosoma mansoni* na pele), ação moluscicida (hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*), leishmanicida, tripanossomicida (SALAS et al., 2008) contra enterovirose e anti-ulcerante (SILVA, da et al., 2003).

Com relação ao seu efeito anti-inflamatório, um estudo preliminar (ALMEIDA, de et al., 1990) o descreve como supressor de edema de pata. Formulações tópicas com o lapachol foram desenvolvidas e também apresentaram um bom efeito anti-edematogênico, além de antinocioceptivo (LIRA et al, 2008). Em modelo de inflamação induzida por LPS, não há registros na literatura.

1.6.2 LQB 118: UMA PTEROCARPAQUINONA

No Laboratório de Química Bioorgânica (LQB), do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), diversas novas moléculas são sintetizadas a partir de produtos naturais para se obter potenciais novos fármacos. Em busca de fármacos que poderiam ser promissores como antitumorais, o LQB 118 foi sintetizado a partir da hibridização molecular entre uma naftoquinona (lapachol) e um pterocarpano, sendo, portanto uma pterocarpaquinona (Figura 12).

Pterocarpanos são produtos naturais pertencentes ao grupo dos flavonóides (HARBONE, MABRY & MABRY, 1975), mais especificamente ao sub-grupo dos isoflavonóides (NETTO, 2007). Sua ocorrência restringe-se ao reino vegetal, a maioria em plantas da família *Leguminosae* (LAPCIK, 2007).

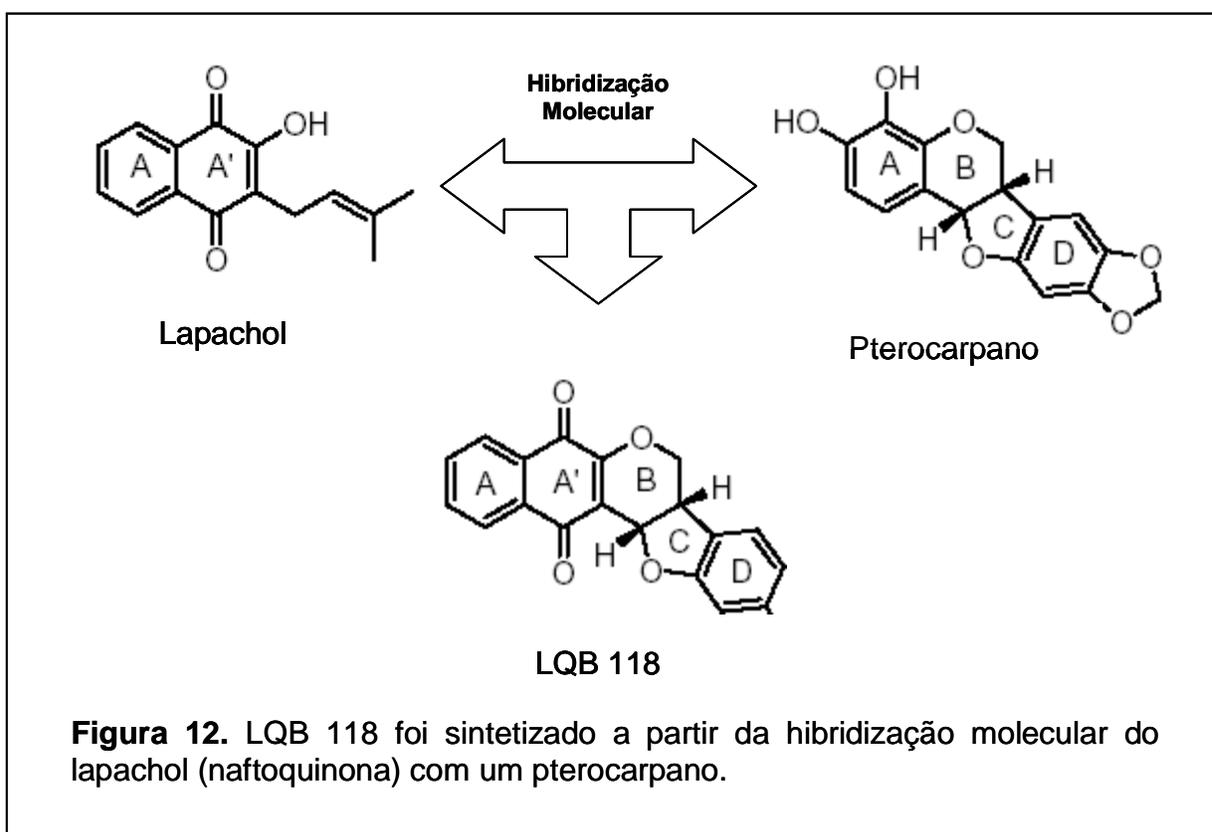
Sua estrutura química baseia-se na presença de quatro anéis; os diferentes padrões de substituição nos anéis aromáticos A e D são responsáveis pela diversidade de atividades farmacológicas apresentadas. Podem ter propriedades antitumoral, fungicida e bactericida. Assim, uma molécula que apresentasse as duas classes químicas seria um bom candidato a fármaco antitumoral. De fato, dados recentes mostraram que o LQB 118 foi citotóxico a diversas linhagens tumorais leucêmicas e de pulmão (NETTO, 2007; NETTO et al., manuscrito em anexo).

Cerca de 25% de todos os casos de câncer têm contribuição de um processo inflamatório crônico (HUSSAIN & HARRIS, 2007). Desde 1863, quando Virchow observou infiltrado leucocitário em tecidos neoplásicos, inúmeros estudos vêm corroborando a hipótese de que o câncer se origina em locais inflamados (BALKWILL & MANTOVANI, 2001). O processo inflamatório pode contribuir em cada etapa do desenvolvimento tumoral e os mediadores inflamatórios são os grandes responsáveis

por coordenar a relação entre as células inflamatórias e as células tumorais, favorecendo a progressão tumoral (COUSSENS & WERB, 2002; LIN & KARIN, 2007).

Em vista disso, seria interessante investigar uma possível ação anti-inflamatória do LQB 118, já que isto que lhe conferiria uma dupla propriedade, mataria as células tumorais ao mesmo tempo que resolveriam o ambiente inflamatório importante para o desenvolvimento tumoral.

Quanto a esta possível propriedade anti-inflamatória do LQB 118, não há nenhum trabalho além deste apresentado nessa dissertação.



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial anti-inflamatório de uma pterocarpaquinona, o LQB 118, na resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

2.2 Objetivos Específicos

1. Corroborar a ação anti-inflamatória do precursor do LQB 118, o lapachol, usando o modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS;
2. Verificar a atividade anti-inflamatória da pterocarpaquinona LQB 118 em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS em camundongos C57/BL6;
3. Comparar a atividade anti-inflamatória observada no LQB 118 com anti-inflamatórios usados na clínica;
4. Avaliar ação do LQB na inibição dos mediadores inflamatórios TNF- α e KC tanto *in vivo*, quanto *in vitro*;
5. Observar se a inibição de mediadores correlaciona-se com a inibição do fator de transcrição NF- κ B;
6. Verificar a citotoxicidade dos compostos estudados em células mononucleares humanas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Ácido acetilsalicílico (Bayer AG, Alemanha); dexametasona, RPMI 1640, albumina bovina sérica, N,N'-metileno-bis-acrilamida, HEPES, KCl, EDTA, EGTA, ditioneitol (DTT), NP-40, PMSF, ortovanadato, NaF, glicerol, MgCl₂, poli-dIdC, LPS de *E. Coli* O55:B5, Ficoll-Histopaque, β-mercaptoetanol, penicilina, estreptomicina, MTT (Sigma-Aldrich, MO, EUA); dimetilsulfóxido (DMSO), glicose, etanol, Tris, ácido bórico, NaHCO₃, NaCl, NaH₂PO₄.H₂O, NaHPO₄.7H₂O (Merck, Alemanha); soro fetal bovino (SFB) (GIBCO, NY, EUA); líquido de Bradford (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA); Panótico Rápido (Laborclin, PR, Brasil); γ- ³²P ATP (> 5000 Ci mmol⁻¹, Amersham Biosciences, EUA); filme para raio-X X-Omat, revelador e fixador –GBX (Kodak).

3.2 ANIMAIS

Nesse trabalho foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 machos, pesando entre 20 e 25 gramas. Estes animais foram obtidos do biotério do Laboratório de Imunofarmacologia Celular (CCS – UFRJ) ou do Núcleo de Animais de Laboratório (NAL) da Universidade Federal Fluminense. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia Celular, com ciclo de luz 12 horas claro e escuro, com oferta de ração (Purina, Brasil) e água *ad libitum*, de acordo com o Guia Internacional de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

3.3 TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS

Os animais foram pré-tratados com 10% de etanol em salina (NaCl 0,9%) fisiológica (veículo), lapachol (1, 10 e 100 mg/Kg), LQB 118 (1, 10 e 100 mg/Kg), ácido acetilsalicílico (10 mg/Kg) ou dexametasona (10 mg/Kg), intraperitonealmente uma hora antes da inalação de LPS.

3.4 INALAÇÃO DE LPS

O procedimento de inalação de LPS foi feito como descrito por Gonçalves et al. (1996). Para a inalação de LPS, foi utilizada uma câmara de inalação de vidro (Figura 13) com volume de 1 litro, com capacidade para até oito camundongos. Os camundongos foram colocados nesta câmara e inalaram por dez minutos os aerossóis produzidos por pressão positiva de 2 mL de uma suspensão de LPS contendo 0,5 mg/mL, preparado em salina. Os animais do grupo controle inalaram apenas salina fisiológica.



Figura 13. Câmara de inalação para camundongos.

3.5 LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Três horas após a inalação de LPS, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, suas traquéias foram expostas, canuladas e os pulmões foram lavados três vezes com salina fisiológica (Figura 14) para se obter um volume final de 1,5 mL. O LBA foi então coletado e mantido a 4°C. Uma alíquota de 300 µL do lavado foi utilizada para a contagem e identificação das células e o restante foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos (SORVALL, EUA). O sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior dosagem de citocina e quimiocina.



3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS

O número total de células foi determinado em um contador de células do tipo Coulter Counter (Coulter Electronics Inc. EUA). A identificação dos diferentes tipos de

células presentes no LBA foi feita após citocentrifugação de 200 μ L de LBA a 800 rpm por 1 minuto (Shandon - EUA). As lâminas preparadas a partir da citocentrifugação foram coradas pelo método de Romanowsky (Wittekind, 1983) utilizando um kit Panótico Rápido.

Foram contadas cerca de 200 células em cada lâmina. A identificação do tipo celular foi baseada conforme as descrições morfológicas descritas por Stevens e Lowe (1995).

3.7 EXTRATO NUCLEAR DO PULMÃO

O extrato nuclear foi feito conforme descrito por Castro et al. (2009). Após a obtenção do LBA, os pulmões foram perfundidos com salina heparinizada (1mg/L), retirados da cavidade torácica e homogeneizados com tampão fosfato pH 7,4 (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,12% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,02% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Depois de centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se 500 μ L de tampão A [10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM ditioneitol, 0,25% (v/v) NP-40, 0,5 mM PMSF, 100 mM ortovanadato e 1 mM NaF], incubando-se por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a 14000 rpm por 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso e incubado com tampão C [20 mM HEPES (pH 7,9), 0,4 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 10% (v/v) glicerol, 1 mM ditioneitol e 1 mM PMSF] a 4 °C por 15 minutos. Após esse período, o extrato foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos, o

sobrenadante aliquotado e estocado a -70°C . A quantidade de proteínas no extrato nuclear foi dosada pelo método de Bradford.

3.8 ENSAIO DE DESVIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA)

O EMSA para ativação de NF- κ B foi realizado conforme descrito por Castro et al. (2004), com algumas modificações. A reação de ligação entre a sequência consenso do fator de transcrição NF- κ B (5'-AGT TTG ATG AGT CAG CCG-3' e 3'-CGG CTG ACT CAT CAA ACT-5') com as proteínas nucleares (10 μg) foi realizado em um volume final de 30 μL de 8 mM HEPES, 10% (v/v) glicerol, 20 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1,0mg poli-dIdC (pH 7,0). Os oligonucleotídeos (DNAgency, PA, EUA) foram marcados radioativamente pela transferência do ³²-Pi da posição γ do ATP na região hidroxil 5' terminal, utilizando-se um kit T4 polinucleotídeo cinase (New England Biolabs, UK). 50000 cpm de nucleotídeos dupla fita foram usados por reação. O tempo da reação de ligação das amostras com os nucleotídeos marcados foi de 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram corridas em gel não desnaturante de poli-acrilamida a 6% com 0,5% de Tris-borato-EDTA a 180 V por 2 horas. O gel foi desidratado e exposto a um filme de raio-X por 24 horas a -70°C . O filme foi revelado e fixado em câmara escura. Como controle positivo da ativação de NF- κ B, células HeLa em suspensão foram incubadas com 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PHA, um ativador de NF- κ B, suplementado no meio de cultura RPMI 1640 com 10% SFB inativado. As células foram incubadas por 1 hora a 37°C e após esse período seu extrato nuclear foi obtido conforme descrito

acima. A amostra do extrato nuclear dessas células com a sonda de NF- κ B marcada radioativamente serviu como controle positivo.

3.9 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) HUMANO

Células mononucleares de sangue periférico foram obtidas a partir de unidades “buffy coat” (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF – UFRJ) de doadores saudáveis, por centrifugação com gradiente de Ficoll. 20 mL de sangue periférico diluído (1:1) em salina foram cuidadosamente colocados em 16 mL de Ficoll seguido de centrifugação a 1500 rpm por 30 minutos. Depois de recolhido, o PBMC foi lavado duas vezes com salina fisiológica e ressuspendido em meio de cultura RPMI 1640 contendo 2,0 g NaHCO₃, 50 μ M β -mercaptoetanol, 100 mg/L estreptomicina, 60 mg/L penicilina, suplementado com 10% de SFB inativado a 56°C por 1 hora.

3.10 ESTÍMULO COM LPS E INCUBAÇÃO COM LQB 118 EM PBMC HUMANO

O PBMC ressuspendido em RPMI foi semeado em placa de 24 poços (8×10^5 células/poço). As células foram estimuladas com LPS na concentração de 2 μ g/mL a 37°C em 4% de CO₂ por 2 horas. Adicionalmente, grupos de células foram incubadas sob as mesmas condições e ao mesmo tempo com 0,5% DMSO (veículo) ou LQB 118 em diferentes concentrações (10, 25, 50 e 100 μ M) Após o estímulo com LPS, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 14000 rpm por 1 minuto para descartar

qualquer célula eventual. O sobrenadante foi estocado a -20°C para posterior dosagem de citocina.

3.11 DOSAGEM DE CITOCINA E QUIMIOCINA

A dosagem quantitativa de TNF- α e KC do sobrenadante do LBA e de TNF- α do sobrenadante do PBMC estimulado com LPS foi feita através do ensaio da imunoadsorção ligada à enzima (enzyme immunoabsorbent assay – ELISA).

Para dosagem de TNF- α e KC foi utilizado kit com anticorpos anti-murino mono e policlonais com limite de detecção em torno de 10 pg/mL, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (R&D SYSTEMS, EUA).

3.12 METABOLISMO CELULAR

A citotoxicidade dos compostos testados foi avaliada após a incubação do PBMC estimulado com LPS, com o lapachol e o LQB 118 através do método quantitativo colorimétrico do MTT. Esse método é baseado na clivagem do sal brometo MTT pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase. Como resultado dessa clivagem, há formação de cristais de formazana de cor violeta. Assim, quanto mais funcional estiver esta enzima, mais cristais formazana serão formados, e conseqüentemente mais violeta ficará a reação. Esse é o indicativo quantitativo da viabilidade celular (HUSSAIN, NOURI & OLIVER, 1993). As células foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) e incubadas com ou sem LPS e adicionalmente, veículo, LQB 118 ou

lapachol em diferentes concentrações por 2 horas a 37°C em 4% de CO₂. Após esse período, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi então descartado. As células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS) glicosilado (5%) para a retirada de todo RPMI. Essa etapa é importante, pois o RPMI reage com o MTT. Posteriormente, foram adicionados 180 µL de PBS glicosilado e 20 µL de uma solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço e a placa foi incubada por 3 horas a 37°C em 4% de CO₂. Depois da incubação com a solução de MTT, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos para a retirada do sobrenadante. Os cristais de formazana foram então ressuspensos em 200 µL de DMSO e foi feita a leitura em espectrofotômetro de microplacas TP-Reader (THERMOPLATE,) a 570 nm com correção a 650 nm.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão. Para análise estatística foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) do programa Sigmaplot™ (Jandel, EUA), versão 9.0, considerando significativa a diferença entre as médias quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

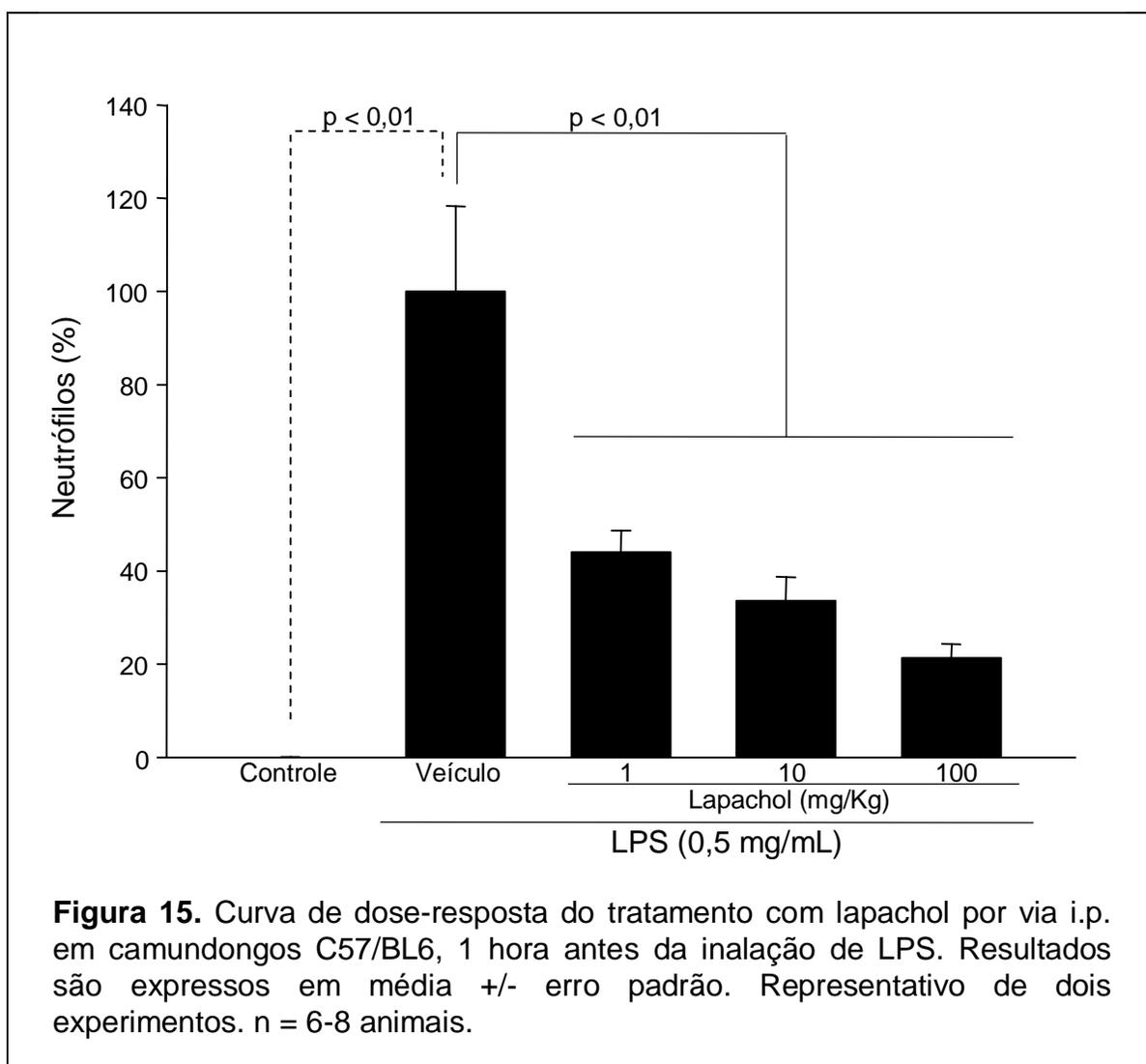
4.1 EFEITO DO LAPACHOL EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS

Almeida e colaboradores (1990) observaram que o lapachol era capaz de reduzir o edema de pata em ratos. Para comprovar sua ação anti-inflamatória, utilizamos um modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS em camundongos C57/BL6. Os animais foram tratados com doses crescentes de lapachol (1,10 e 100 mg/Kg) por via intraperitoneal (i.p.), 1 hora antes de serem submetidos à inalação de LPS. Conforme pode ser visto na figura 15, o lapachol reduziu de forma significativa o número de neutrófilos no lavado broncoalveolar desses animais, apresentando na dose de 1 mg/Kg, seu efeito máximo, já que a dose de 100 mg/Kg não apresentou diferença estatística em relação à dose de 1 mg/Kg. Esse resultado corrobora o encontrado anteriormente (Almeida, de et al., 1990), mostrando que o lapachol possui ação anti-inflamatória também no modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS.

4.2 EFEITO DO LQB 118 NA INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS

Para avaliar se o derivado sintético do lapachol, o LQB 118, também possuía a atividade anti-inflamatória observada no seu precursor, camundongos C57BL/6 foram tratados com doses de 1, 10 e 100 mg/Kg por via i.p., 1 hora antes de inalarem os aerossóis de LPS. O resultado mostrou que o LQB 118 foi capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos de forma significativa a partir da dose de 1 mg/Kg, alcançado um efeito ainda maior na dose de 100 mg/Kg, quando comparado ao grupo de animais que inalou LPS, mas foi pré-tratado apenas com veículo (Figura 16). Esses

dados sugerem que o LQB 118 mantém a propriedade anti-inflamatória observada no lapachol.



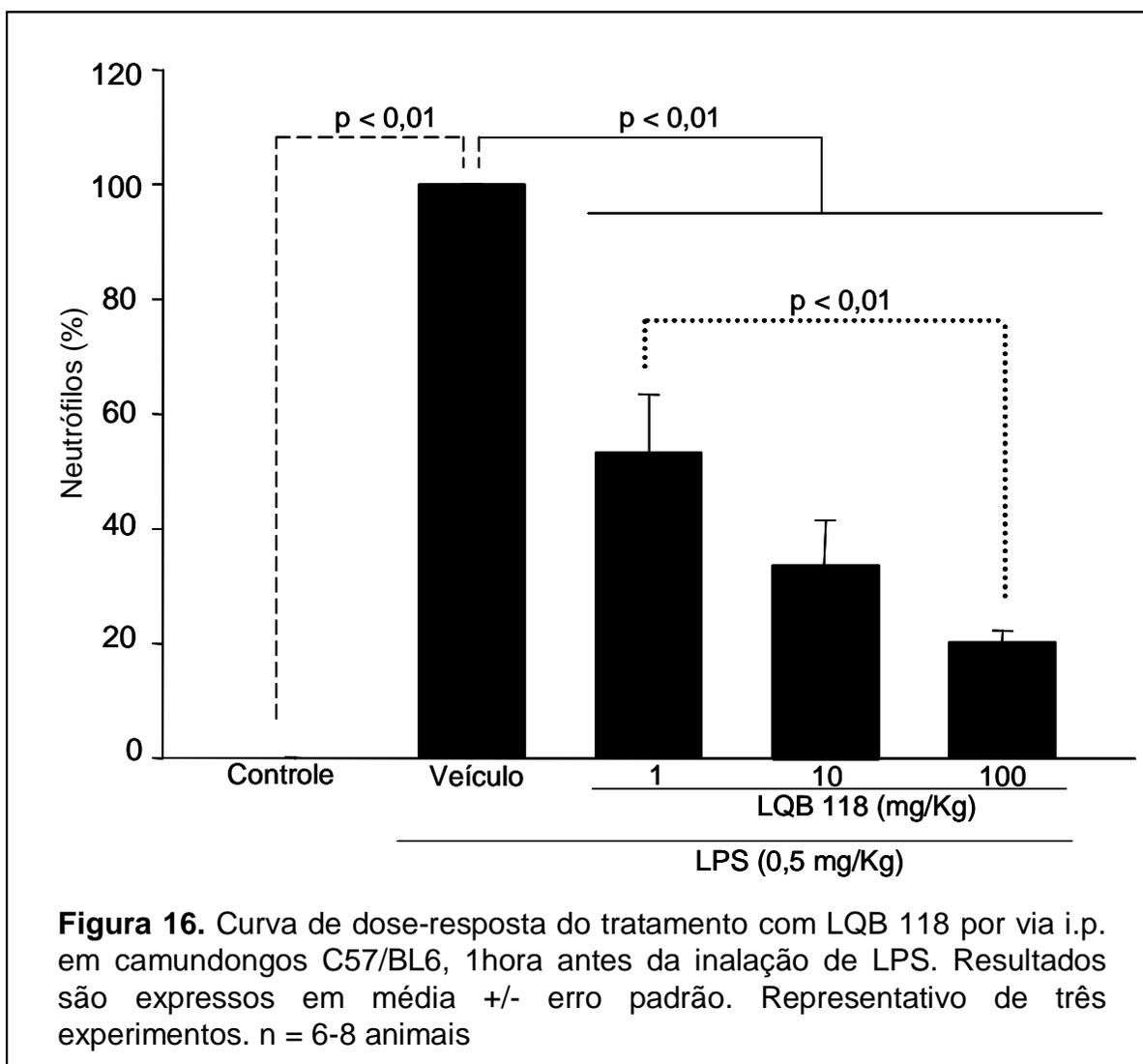
4.3 EFEITO DO LQB 118 COMPARADO A ANTI-INFLAMATÓRIOS USADOS NA CLÍNICA

O LQB 118 é uma molécula totalmente sintética e inédita, por isso resolvemos avaliar sua eficácia frente a anti-inflamatórios largamente utilizados na clínica. Existem dois grupos de fármacos usados para modular a inflamação: não-esteroidais e esteroidais. Escolhemos um representante de cada grupo para compararmos ao LQB 118: o ácido acetilsalicílico e a dexametasona, respectivamente. Para esse experimento estabelecemos a dose única de 10 mg/Kg, concentração essa em que o LQB 118 já apresenta ação anti-inflamatória pronunciada. Uma hora antes da inalação de aerossóis de LPS, camundongos C57/BL6 foram tratados via i.p. com veículo, LQB118, ácido acetilsalicílico ou dexametasona. Como mostrado na figura 17, tanto o ácido acetilsalicílico quanto a dexametasona inibem de forma significativa o influxo de neutrófilos para o pulmão de camundongos que inalaram o LPS, comparado ao grupo que é pré-tratado apenas com veículo. Esse efeito é comparável ao do LQB 118, que foi capaz de inibir a migração de neutrófilos no grupo que inalou LPS na mesma magnitude da dexametasona e ligeiramente melhor que o ácido acetilsalicílico.

4.4 MODULAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS PELO LQB 118 *IN VIVO*

Tanto o ácido acetilsalicílico, quanto a dexametasona modulam a resposta inflamatória através da inibição de mediadores inflamatórios (GOODMAN et al., 2003; CASTRO et al., 2009). Para avaliar se esse efeito seria compartilhado pelo LQB 118, escolhemos dois mediadores susceptíveis à ação dos anti-inflamatórios usados para serem dosados no sobrenadante do lavado broncoalveolar dos animais que inalaram LPS e foram tratados com LQB 118, ácido acetilsalicílico, ou dexametasona. Os

mediadores escolhidos foram o TNF- α , uma importante citocina pró-inflamatória liberada na resposta inflamatória, e KC, quimiocina importante para o recrutamento de neutrófilos para o local inflamado (TOGBE et al., 2007; ZHANG et al., 2001).



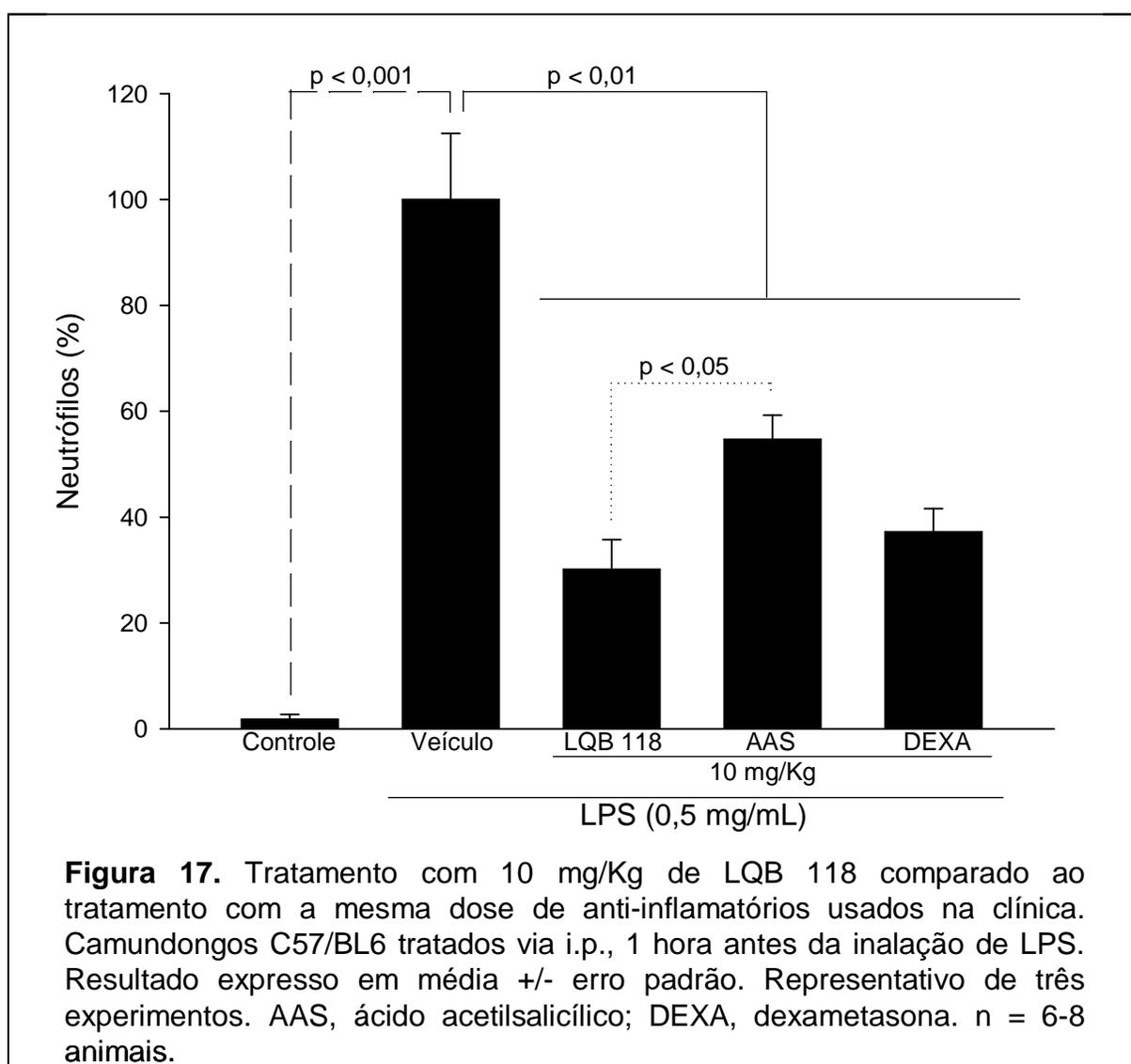
Camundongos C57/BL6 foram pré-tratados com veículo, LQB 118, ácido acetilsalicílico ou dexametasona, na dose de 10 mg/Kg, 1 hora antes da inalação de LPS. Do sobrenadante do lavado broncoalveolar desses animais, os níveis de TNF- α e

KC foram dosados por ELISA. Como esperado, tanto o ácido acetilsalicílico, quanto a dexametasona foram capazes de inibir a liberação de TNF- α e KC no pulmão dos camundongos que inalaram LPS em comparação com aqueles que foram tratados apenas com veículo (Figura 18) No entanto, a dexametasona se mostrou mais potente que o ácido acetilsalicílico na modulação de KC. O LQB 118 foi capaz de inibir significativamente o TNF- α com a mesma eficácia que o ácido acetilsalicílico e a dexametasona. Porém, em relação a KC, o LQB 118, apesar de também inibir significativamente sua liberação quando comparada ao grupo tratado com veículo, foi menos potente que o ácido acetilsalicílico e a dexametasona. Apesar de seu menor efeito na modulação de KC, isso aparentemente não influenciou em seu efeito final, já que, como visto na figura 17, o LQB 118 foi tão potente quanto o ácido acetilsalicílico ou a dexametasona em inibir o influxo de neutrófilos para o pulmão dos camundongos que inalaram LPS.

4.5 ATIVAÇÃO DE NF- κ B *IN VIVO*

A produção de TNF- α e KC é regulada pelo fator de transcrição NF- κ B (SIMMONDS & FOXWELL, 2008; HUGHES-FULFORD et al., 2006). Para verificar em que ponto da via de produção e liberação dessas citocinas o LQB 118 estaria agindo, investigamos a ativação do fator de transcrição NF- κ B. Camundongos C57/BL6 foram pré-tratados via i.p. com veículo, LQB 118, ácido acetilsalicílico ou dexametasona na dose de 10 mg/Kg, 1 hora antes da inalação de LPS. 3 horas após a inalação, os animais foram eutanasiados e tiveram seus pulmões perfundidos e retirados. O ensaio

EMSA foi realizado com o extrato nuclear dos pulmões para avaliar a ativação do NF- κ B. Como visto na figura 19, o LQB 118 foi capaz de atenuar a banda do NF- κ B em relação ao grupo tratado com veículo, sugerindo a inibição desse fator de transcrição. Porém, essa inibição não foi tão acentuada quanto à inibição pelo ácido acetilsalicílico e dexametasona. Isso pode explicar a diferença de modulação pelo LQB 118 em TNF- α e KC, sugerindo outro mecanismo para a inibição da citocina TNF- α pelo LQB 118.



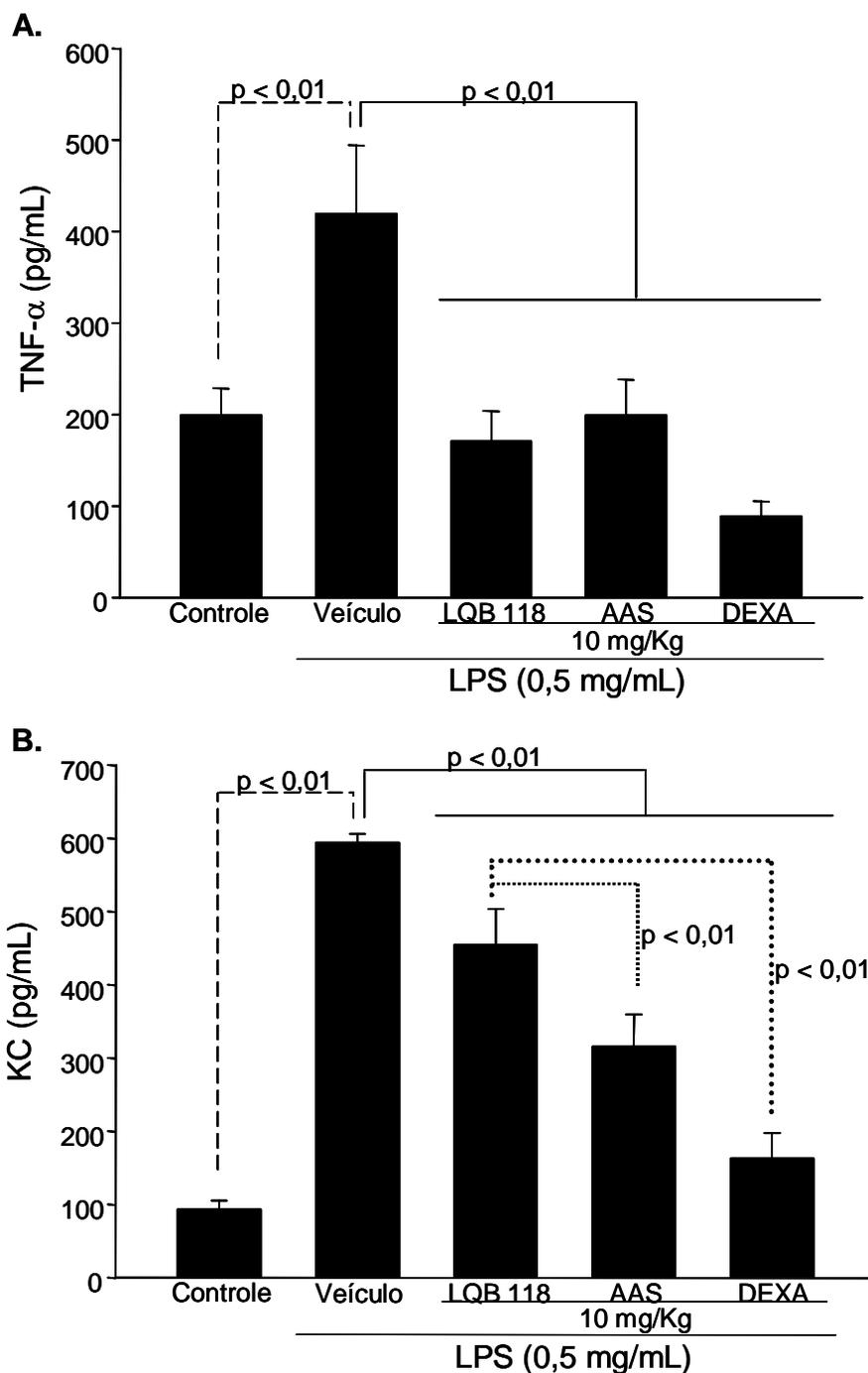


Figura 18. Dosagem de mediadores inflamatórios por ELISA no lavado broncoalveolar de camundongos C57/BL6 tratados com 10 mg/Kg de LQB 118. Comparado à mesma dose de anti-inflamatórios usados na clínica. **A.** Citocina TNF- α . **B.** Quimiocina KC. Resultados expressos em média \pm erro padrão. AAS, ácido acetilsalicílico; DEXA, dexametasona. n = 8-6 animais.

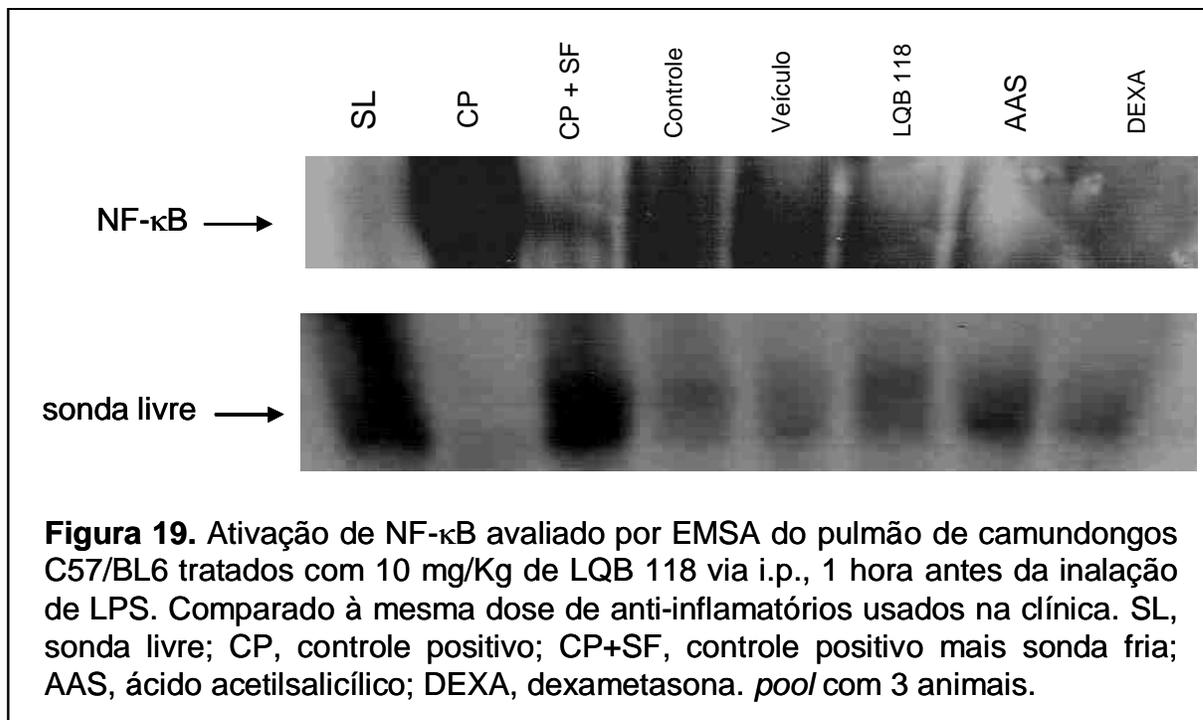
4.6 INIBIÇÃO DE TNF- α PELO LQB 118 EM PBMC HUMANO

Para avaliar se o LQB 118 também seria capaz de modular a resposta inflamatória em células humanas, 8×10^5 células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) foram estimuladas com $2 \mu\text{g/mL}$ LPS e incubadas concomitantemente com veículo ou LQB 118 nas com concentrações de 1,10 e $100 \mu\text{M}$. Após 2 horas o sobrenadante dessas células foi recolhido e os níveis de TNF- α foram dosados por ELISA. O estímulo com LPS aumenta significativamente a liberação de TNF- α pelo PBMC (Figura 20 - A) e o veículo sozinho não é capaz de reduzir os níveis dessa citocina. O LQB 118, por outro lado, reduzir drasticamente os níveis de TNF- α no grupo de células tratadas quando comparado ao grupo incubado com veículo, mas apenas na concentração de $100 \mu\text{M}$. A redução significativa dos níveis de TNF- α , observada na concentração de $100 \mu\text{M}$, quando comparada à concentração de $10 \mu\text{M}$, nos levou a buscar uma concentração intermediária entre essas duas doses, como mostrada na figura 20 – B. Dessa forma observamos um efeito dose-dependente, onde as doses de 25 e $50 \mu\text{M}$ também foram capazes de reduzir a liberação de TNF- α no sobrenadante das células estimuladas com LPS. Assim, o LQB 118 se mostrou eficaz em reduzir em quase 100% a liberação de TNF- α também em células humanas.

4.7 CITOTOXICIDADE DO LAPACHOL E LQB 118 EM PBMC HUMANO

Para descartar um possível efeito citotóxico que pudesse interferir na confiabilidade dos resultados encontrados na inibição do influxo de neutrófilos e na

modulação dos mediadores inflamatórios TNF- α e KC, uma avaliação do metabolismo celular foi realizada através do ensaio colorimétrico do MTT. Para isso, 8×10^5 células mononucleares obtidas de sangue periférico humano (PBMC) foram estimuladas com 2 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e incubadas com 1, 10 e 100 μM de lapachol ou LQB 118 por 2 horas. Não foi observada qualquer alteração metabólica nas células incubadas com lapachol (Figura 14 – A), porém as células incubadas com LQB 118 na concentração de 100 μM sofreram uma redução de atividade metabólica de aproximadamente 30% quando comparadas ao grupo que foi incubado apenas com veículo (Figura 14 – B). Essa redução, porém, não justifica a inibição de quase 100% na liberação de TNF- α observada com a concentração de 100 μM de LQB 118.



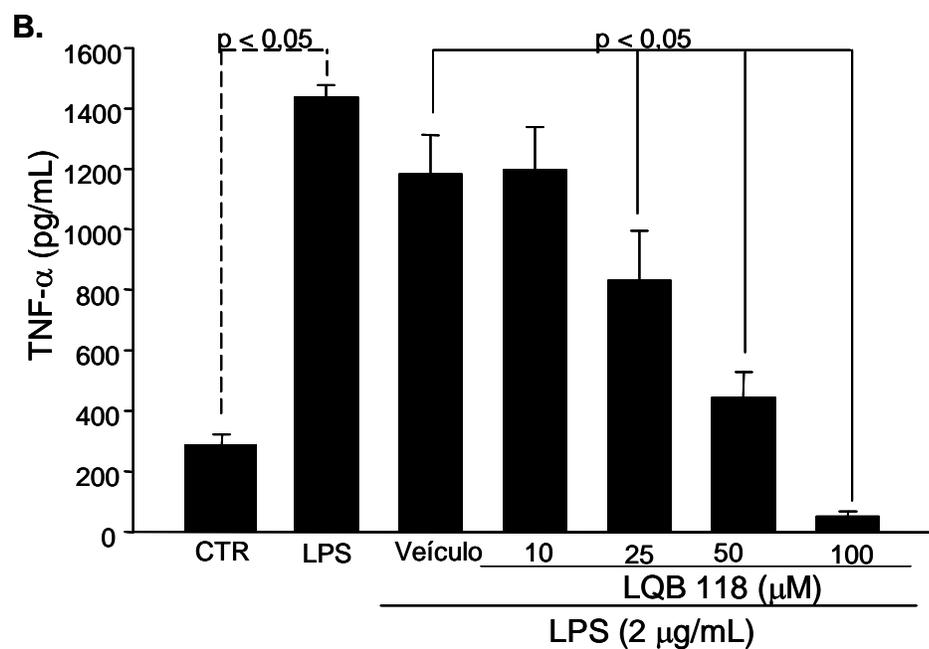
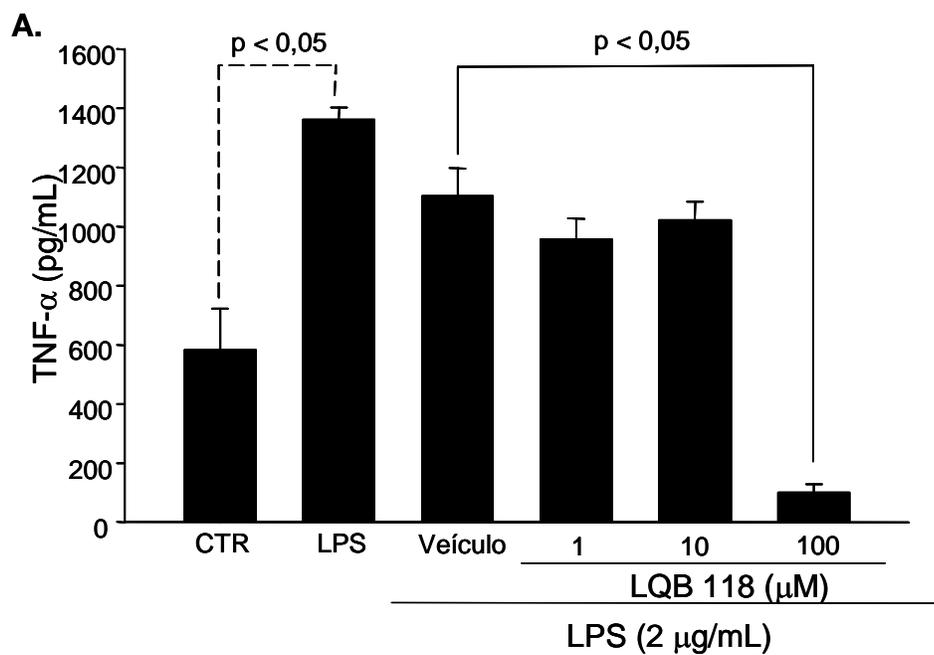
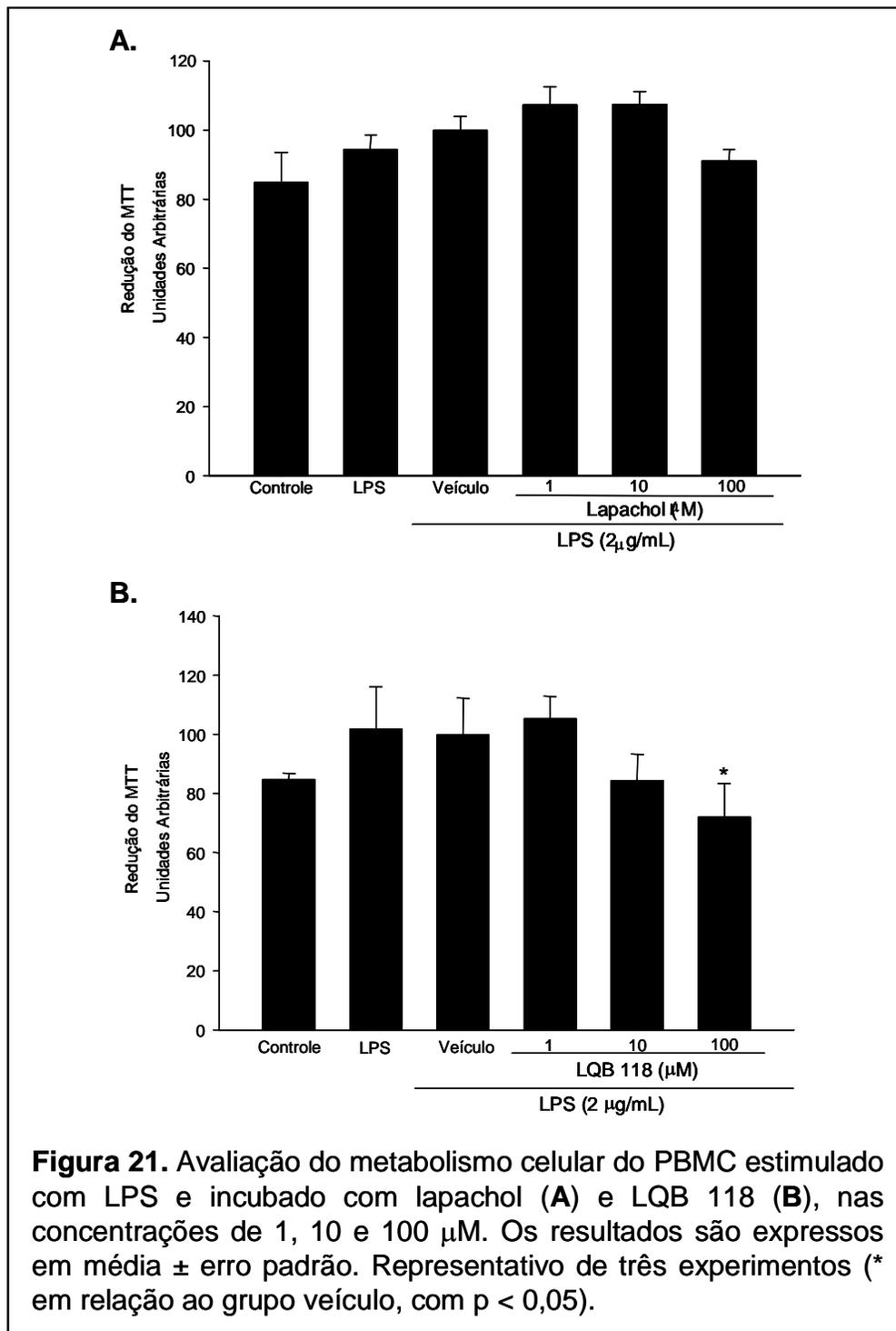


Figura 20. Efeito do LQB 118 na inibição da liberação de TNF- α pelo PBMC nas doses de 1, 10 e 100 μ M (A) e em doses intermediárias entre 10 e 100 μ M (B). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Representativo de 3 experimentos.



5 DISCUSSÃO

No presente estudo utilizamos um modelo de inflamação pulmonar induzida por inalação de LPS, estabelecido em nosso laboratório (GONÇALVES-DE-MORAIS et al., 1996). Nesse modelo, o LPS, uma vez inalado pelos animais, alcança os alvéolos pulmonares, ativando as células residentes e desencadeando a liberação de vários mediadores inflamatórios, entre eles TNF- α e KC (GONÇALVES-DE-MORAES et al., 1996; EVERHART et al., 2006; MARKOVIC et al., 2009). Esses mediadores induzem o recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para o local onde houve contato com LPS. Uma das primeiras e principais células recrutadas para o sítio inflamatório são os neutrófilos (GONÇALVES-DE-MORAES et al. 1996; MAYADAS & CULLERE, 2005; SIMPSON, PHIPPS & GIBSON, 2009).

Os neutrófilos são células polimorfonucleares importantes na defesa contra patógenos e responsáveis também pela reparação do tecido (MAYADAS & CULLERE, 2005). Segundo Mori e colaboradores (2002), a inibição de neutrófilos retarda o processo de remodelamento tecidual. No entanto, neutrófilos são geralmente células transientes e quando há falha em seu processo regulatório, podem se acumular no sítio da lesão, intensificando a reação inflamatória (SIMPSON, PHIPPS & GIBSON, 2009). As proteinases e radicais livres liberados por essas células danificam o tecido, muitas vezes de forma irreversível, o que torna o neutrófilo um indicador da gravidade de patologias inflamatórias (TISCORNIA et al., 2000; SIMPSON, PHIPPS & GIBSON, 2009).

Com relação a inflamações pulmonares, infiltrados neutrofilicos são característicos em doenças obstrutivas. Asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são as mais comuns, atingindo cerca de 10% da população cada uma e sendo

uma das maiores causas de mortalidade mundial (OMS, 2000; SIMPSON, PHIPPS & GIBSON, 2009). Nessas doenças, os neutrófilos podem representar mais de 60% das células presentes no escarro induzido (SIMPSON et al., 2006). Seus produtos e enzimas induzem hipersecreção de muco (O'DONNELL et al., 2006) e reduzem a frequência dos batimentos ciliares, diminuindo o *clearence* mucociliar (SIMPSON, PHIPPS & GIBSON, 2009). Em outras lesões pulmonares, como a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), a neutrofilia é associada à gravidade da doença (SIMPSON, PHIPPS & GIBSON, 2009) .

Há na literatura vários trabalhos que descrevem melhora na resolução do processo inflamatório quando a neutropenia é induzida. Dhami e colaboradores (2000), em modelo de enfisema, induziram a inibição do influxo de neutrófilos para o pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro através de um tratamento com um anticorpo anti-polimorfonucleares (PMN). Com isso, houve uma diminuição da atividade proteolítica proveniente dessas células, o que impediu a degradação da matriz extracelular e modificou o balanço protease-antiprotease, apontado como a principal causa no desenvolvimento do enfisema.

Nossos resultados mostraram que tanto o lapachol quanto o LQB 118 foram capazes de inibir o influxo de neutrófilos para o pulmão dos camundongos que inalaram LPS (Figura 15 e 16). O lapachol foi capaz de inibir o influxo de neutrófilos observado no LBA em todas as doses testadas, com efeito máximo já na dose de 1 mg/Kg, visto que não houve diferenças estatísticas entre as doses utilizadas. O LQB 118 também apresentou perfil similar, porém apresentou um efeito ainda maior na dose de 100 mg/Kg, quando comparado à dose de 1 mg/Kg.

O lapachol é extraído da casca de árvores *Tabebuia*, com o qual popularmente se faz preparações para tratamento anti-inflamatório. Recentemente, formulações tópicas utilizando o lapachol mostraram-se eficazes em reduzir o edema inflamatório em ratos (LIRA et al., 2008), confirmando o efeito observado por Almeida, de (1990), quando o lapachol foi administrado oralmente. Nosso resultado corrobora esses achados, reafirmando o efeito anti-inflamatório do lapachol também em modelo de inflamação pulmonar em camundongos. Novos estudos devem ser realizados para desvendar seu mecanismo de ação.

O LQB 118 é uma molécula inédita desenhada e sintetizada a partir da hibridização molecular do grupamento naftoquinônico do lapachol com um pterocarpano. Para aprofundarmos o seu estudo, avaliamos se o efeito anti-inflamatório do LQB 118 observado no modelo de inflamação pulmonar era comparável a anti-inflamatórios já estabelecidos em uso clínico. Testamos sua eficácia frente às duas classes de anti-inflamatórios: os esteroidais, representado pela dexametasona e os não-esteroidais, representado pelo ácido acetilsalicílico. Tanto a dexametasona quanto o ácido acetilsalicílico são capazes de inibir eficazmente a neutrofilia após um estímulo inflamatório (MURATORE et al., 2009; CASTRO et al., 2009). Como pode ser observado na figura 17, ácido acetilsalicílico e dexametasona na dose de 10 mg/Kg são capazes de inibir significativamente o influxo de neutrófilos para o pulmão de animais que inalaram o LPS comparado ao grupo que foi tratado apenas com veículo. Esse efeito foi comparável ao dos animais tratados com a mesma dose de LQB 118, que se mostrou ainda mais eficaz que o ácido acetilsalicílico na inibição do processo inflamatório.

De um modo geral, os anti-inflamatórios são capazes de inibir o processo inflamatório através da modulação de seus mediadores. Além de seu efeito bem descrito na inibição de ciclooxigenases, o ácido acetilsalicílico também é capaz de modular negativamente a produção de citocinas e quimiocinas tais como TNF- α , IL-1 β e MCP-1 (TEGEDER, PFEILSCHIFTER & GEISLINGER, 2001; CASTRO et al, 2009). Já a dexametasona, por sua característica esteroideal, tem um amplo espectro de ação inibindo inúmeros mediadores imunológicos (GOODMAN et al., 2003) Para investigar se o mecanismo de ação do LQB 118 também envolve essa modulação, investigamos a inibição de dois importantes mediadores envolvidos na ativação e recrutamento neutrofílico: a citocina TNF- α e a quimiocina KC.

Como vimos anteriormente, uma das principais citocinas liberadas na resposta inflamatória é o TNF- α . (VARFOLOMEEV & ASHKENAZI, 2004). No pulmão, já foi demonstrado que a liberação de TNF- α induz a aderência dos neutrófilos ao endotélio, favorecendo a migração e a infiltração dos neutrófilos no espaço pulmonar (ALBELDA et al., 1994; GONÇALVES-DE-MORAES et al., 1996; ULISH et al., 1993). O TNF- α sozinho é capaz de induzir resposta inflamatória, já que pode ativar o NF- κ B, levando a produção dos fatores responsáveis pelo estabelecimento do processo inflamatório (PULJIC et al., 2007). Quando expressado de forma inapropriada, o TNF- α pode desencadear o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (ANDREAKOS et al., 2002; AGGARWAL, 2003). Em pacientes com DPOC os níveis pulmonares de TNF- α estão aumentados (SAKAO et al., 2001) e o TNF- α circulante pode também contribuir para o desenvolvimento da doença (RENNARD, 2004). Por essa razão, a supressão do TNF- α é uma ferramenta reconhecida, inclusive na clínica, para o tratamento de

doenças inflamatórias. Atualmente, novos compostos inibidores de TNF- α vem sendo sintetizados para serem utilizados como anti-inflamatórios. Um exemplo são os análogos da Talidomida, um potente inibidor da expressão de TNF- α (HUTCHISON et al., 2008; MACHADO et al., 2002).

Como esperado, tanto o ácido acetilsalicílico quanto a dexametasona inibiram significativamente a liberação de TNF- α no sobrenadante do LBA (Figura 18). O LQB 118 também foi capaz de inibir significativamente os níveis de TNF- α com a mesma eficácia dos anti-inflamatórios testados.

A KC é um dos principais quimioatraentes de neutrófilos, induzindo também sua desgranulação. Essa quimiocina murina é análoga à CXCL-8 humana. Na bronquite neutrofílica, há superexpressão e secreção de CXCL-8 (SIMPSON et al., 2007), e seus níveis aumentados se correlacionam com algumas formas mais graves de asma (GIBSON et al., 2003). Simpson e colaboradores (2009) propuseram o envolvimento de CXCL-8 em um mecanismo de amplificação responsável pela persistência de infiltrado neutrofílico em doenças respiratórias. Portanto, inibir essa quimiocina é uma importante ferramenta para induzir neutropenia (NOMELLINI et al., 2008).

Para investigar se a inibição de neutrófilos observada com o tratamento com anti-inflamatórios no modelo de LPS inalado é devido também a uma inibição de KC, dosamos seus níveis no sobrenadante do LBA dos animais que inalaram LPS. Como observado na figura 19, todos os anti-inflamatórios testados são capazes de inibir significativamente a liberação de KC, quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo. Porém, o LQB 118 foi o menos eficaz em reduzir os níveis de KC, enquanto o

ácido acetilsalicílico e a dexametasona tiveram a mesma eficácia, já que não apresentaram diferença estatística quando comparados um ao outro.

A fim de entender o mecanismo pelo qual o LQB 118 estaria inibindo a produção de mediadores inflamatórios, analisamos a ativação de NF- κ B. O NF- κ B é o principal fator de transcrição relacionado ao processo inflamatório. Sua ativação desencadeia a produção de inúmeros mediadores, inclusive de TNF- α e KC, e o aumento de sua atividade é encontrado em várias patologias associadas à inflamação (ROGLER et al., 1998; ZHOU, SCHULMAN & RAIJ, 2009). Por essa razão, a inibição de NF- κ B já foi sugerido como um objetivo interessante para intervenções terapêuticas (LUO et al., 2004; SUNNIL, RAMADORI & RADDATZ, 2009).

Tanto o ácido acetilsalicílico quanto a dexametasona são capazes de inibir eficazmente a ativação de NF- κ B, o que explica seu efeito inibitório sobre a liberação de mediadores inflamatórios (CASTRO et al., 2009; AYROLDI & RICCARDI, 2009). O ácido acetilsalicílico atua impedindo a fosforilação de I κ B por IKK, dessa forma prevenindo a degradação de I κ B e mantendo o NF- κ B no citoplasma (YIN, YAMAMOTO & GAYNOR, 1998). Já a dexametasona, assim como outros glicocorticóides, age induzindo a síntese de I κ B, prevenindo a ativação e translocação de NF- κ B (AUPHAN et al., 1995). Como esperado, os dois anti-inflamatórios inibiram a ativação de NF- κ B em pulmão de camundongos expostos ao LPS (Figura 19). Já o LQB 118 de fato foi capaz de inibir a ativação de NF- κ B, mas de forma menos eficaz que o ácido acetilsalicílico e a dexametasona.

A diferença entre o LQB 118 e os outros dois fármacos em inibir a ativação de NF- κ B explica a diferença observada entre essas moléculas na inibição de KC. Tanto

TNF- α quanto KC são produzidos a partir da ativação de NF- κ B, porém o LQB 118 só foi tão eficaz quanto ao ácido acetilsalicílico e a dexametasona na inibição de TNF- α . Esse resultado indica que provavelmente a inibição do TNF- α pelo LQB 118 pode estar sendo feita a nível pós-transcricional, ou por uma via independente de NF- κ B. Novos estudos devem ser feitos para confirmar esta hipótese.

Independentemente de sua ação modulatória em KC, o LQB 118 foi tão eficiente quanto a dexametasona e o ácido acetilsalicílico em inibir o influxo de neutrófilos após estímulo com LPS. Isso pode ser explicado pela grande importância do TNF- α na regulação do processo inflamatório, induzindo a ativação dos leucócitos necessária ao reconhecimento de quimiocinas e à adesão desses leucócitos ao endotélio (MAYADAS & CULLERE, 2005). Nagarkar e colaboradores (2009) observaram, em um modelo de asma viral em camundongos, uma menor responsividade ao vírus quando o receptor de TNF- α era depletado, mesmo com a adição de MIP-2/KC, concluindo portanto que a resposta ao TNF- α é importante para a atuação de quimiocinas, tal como KC. Dessa forma, apesar do LQB 118 não ter grande efeito inibitório sobre KC, esta quimiocina teria sua ação limitada pela inibição de TNF- α . Além disso, o LQB 118 poderia estar modulando outros mediadores além de TNF- α e KC, produzidos por mecanismos dependentes ou independentes de NF- κ B. Mais estudos devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

O efeito anti-inflamatório do LQB 118 observado em um modelo *in vivo* com camundongos, nos levou a investigar se esse efeito poderia ser extrapolado a células humanas. Para isso trabalhamos com cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano estimulada com LPS e incubada com LQB 118. Nosso

primeiro resultado utilizando as concentrações de 1, 10 e 100 μM mostrou que apenas na maior concentração o LQB 118 foi capaz de inibir significativamente a liberação de TNF- α pelo PBMC estimulado com LPS, diminuindo em quase 100% os níveis dessa citocina. Não houve sequer uma pequena diminuição de TNF- α liberado quando comparamos o grupo que recebeu a concentração de 10 μM e o que recebeu apenas o veículo. Isso nos levou a buscar outras concentrações intermediárias entre 10 e 100 μM , que pudessem ter algum efeito, mais dose-dependente. Sendo assim, testamos o LQB 118 nas concentrações de 25 e 50 μM e constatamos uma redução significativa dos níveis de TNF- α , com a concentração de 25 μM .

A preocupação com fato de que o efeito anti-inflamatório tanto do LQB 118 quanto do lapachol pudesse ser devido a uma atividade citotóxica, nos levou a realizar um ensaio de avaliação celular do PBMC quando estimulado com LPS e incubado com o lapachol ou o LQB 118, utilizando o método colorimétrico do MTT. Esse método é um dos muitos ensaios bem descritos e aceitos para avaliar o metabolismo celular e se baseia em medir a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Optamos por usar o método do MTT por ser a metodologia que dispúnhamos no momento para responder a nossa pergunta. Nossos resultados mostraram que o lapachol não altera a atividade metabólica dessas células em nenhuma das concentrações testadas (1, 10 e 100 μM). Já a incubação com 100 μM de LQB 118 diminuiu em cerca de 30% a atividade metabólica das células mononucleares quando comparadas àquelas incubadas apenas com o veículo. Essa diminuição não justifica a inibição de quase 100% na liberação de TNF- α pelo PBMC quando comparado ao

grupo que recebeu apenas o veículo. Podemos concluir então que ambas as moléculas possuem ação anti-inflamatória, independente de qualquer efeito citotóxico.

Vale ressaltar que o lapachol possui reconhecido efeito antineoplásico em diversas linhagens tumorais (BALASSIANO et al., 2005; SILVA, da et al., 2002) e o LQB 118 foi sintetizado como alternativa mais barata, eficaz e menos tóxica aos seus análogos nas pesquisas antitumorais (NETTO, 2007; SALUSTIANO et al., 2009). Hoje se sabe que inflamação e câncer são duas patologias que freqüentemente estão associadas. O meio inflamatório é capaz de criar o ambiente propício ao desenvolvimento de um tumor, seja pelos radicais livres liberados pelas células citotóxicas, que danificam o DNA de células saudáveis, seja pelas citocinas pró-inflamatórias que fornecem as condições para que um tumor possa se expandir e provocar metástases (LIN & KARIN, 2007). O TNF- α , por exemplo, medeia o crescimento de tumores induzidos por inflamação (LUO et al., 2004), além de ser apontado como citocina-chave no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias. A terapia com inibidores de TNF- α já está sendo utilizada em algumas patologias de origem inflamatória, como por exemplo, a artrite reumatóide, e tem sido apontada como uma alternativa no tratamento de tumores sólidos (SZLOSAREK & BALKWILL, 2003).

Nossos resultados sugerem que tanto o lapachol quanto o LQB 118 são capazes também de modular a inflamação. A ação inibitória do LQB 118 sobre o TNF- α , o torna fármaco potencial no tratamento de inflamações e câncer associados, pois pode atuar em duas frentes: mata as células tumorais ao mesmo tempo em que resolve o ambiente inflamatório.

6 CONCLUSÃO

1. O potencial anti-inflamatório do produto natural lapachol e de seu derivado sintético, LQB 118, na inflamação pulmonar induzida por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) inalado, foi descrito neste modelo pela primeira vez, tendo ambas as moléculas apresentado significativa atividade anti-inflamatória por inibição do influxo de neutrófilos.

2. Quando comparado ao ácido acetilsalicílico e dexametasona, o LQB 118 mostrou ser tão eficaz quanto os anti-inflamatórios utilizados na clínica em inibir o influxo de neutrófilos em camundongos que inalaram LPS.

3. O LQB 118 foi capaz de reduzir a liberação de TNF- α tanto no modelo *in vivo*, efeito comparável ao do ácido acetilsalicílico e da dexametasona, quanto *in vitro* em PBMC humano. A liberação de KC também foi inibida significativamente *in vivo*, porém de forma menos pronunciada que a dos anti-inflamatórios testados.

4. Possivelmente a capacidade moduladora de TNF- α e KC pode estar relacionada com o fator de transcrição NF- κ B. Estudos mais detalhados sobre em que ponto da via de ativação do NF- κ B essa modulação está ocorrendo e quais são os outros fatores associados à inibição de TNF- α precisam ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBELDA, S.M.; SMITH, C.W.; WARD, P.A. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* v. 8, p. 504-512, 1994.

ALBERTS, B. et al. In:____. *Molecular Biology of the Cell*. 4ª edição, EUA: Editora Garland, 2002.

ALMEIDA, E.R. de et al. Anti-inflammatory action of lapachol. *J. Ethnopharmacol.* v. 29, n. 2, p. 239-41, 1990.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* v. 4, p. 499-511, 2004.

ANDREAKOS, E.T. et al. Cytokines and anti-cytokines biological in auto-immunity: present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* v. 13, p. 299-313, 2002.

ARNOTT, C.H. et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates tumor promotion via a PKC alpha- and AP-1-dependent pathway. *Oncogene* v. 21, p. 4728-38, 2002.

AYROLDI, E.; RICCARDI, C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.* 2009. Aceito para publicação.

BALASSIANO, I.T. et al. Demonstration of the lapachol as potential drug for reducing cancer metastasis. *Oncol. Rep.* v. 13, p. 329-33, 2005.

BALKWILL, F.; MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* v. 357, p. 539-545, 2001.

BARNES, P.J. Nuclear Factor- κ B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 29, n. 6, p. 867-870, 1997.

BARTON, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.* v. 118, p. 413-20, 2008.

BENAROYO, L. How do we define inflammation? *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* v. 83, p. 1343-7, 1994.

BEUTLER, B.; MILSARK, I.W.; CERAMI, A.C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* v. 229 p. 869-71, 1985.

BEUTLER, B.; RIETSCHER, E.T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* v. 3, n. 2, p. 169-76, 2003.

BEZERRA, D.P. et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from Pipe. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 39 p. 801-807, 2006.

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. www.bireme.br

BISWAS, S.K. et al. Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *J. Immunol.* v. 179, p. 4083-92, 2007.

BLACK, R.A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* v. 385, p. 729-33, 1997.

BRANDENBURG, K.; WIESE, A. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr. Top. Med. Chem.* v. 4, p. 1127-46, 2004.

BROWN, W.V. et al. Obesity: why be concerned? *Am. J. Med.* v. 122, S4–S11, 2009.

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *TRENDS Immunol.* v. 25, n. 6, p. 280-8, 2004.

BOZIC, C.R. et al. The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. *J. Biol. Chem.* v. 269, p. 29355-8, 1994.

CAAMAÑO, J.; HUNTER, C.A. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 15, n. 3, p. 414-429, 2002.

CASTRO, P. et al. Inhibition of interleukin-1beta reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. *Eur. J. Pharmacol.* v. 498, p. 279-86, 2004.

CASTRO, P. et al. Aspirin and indomethacin reduce lung inflammation of mice exposed to cigarette smoke. *Biochem. Pharmacol.* v. 77, p. 1029-1039, 2009.

CIRILLO, M. et al. A history of salt. *Am. J. Nephrol.* v. 14, p. 426-31, 1994.

CHEN, G.; GOEDDEL, D.V. TNF-R1 signaling: A beautiful pathways. *Science* v. 296, p. 1634-5, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. In:_____. *Robbins - Pathologic Basis of Disease*. 5^o ed., Editora W.B. Saunders Company, 1994.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature* v. 420, p. 860-7, 2002.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res.* v. 46, p. 382-391, 1997.

DHAMI R. et al. Acute cigarette smoke – induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by α 1- Antitrypsin. *Am J Respir Cell Mol Biol* v. 22, p. 244-52, 2000.

DINARELLO, C.A. Historical insights into cytokines. *Eur. J. Immunol.* v. 37, S34-45, 2007.

ELZIRIK, D.L.; COLLI, M.L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Endocrinol.* v. 5, p. 219-226, 2009.

FERREIRA, M. et al. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). *Life Sci.* v. 81, p. 210-217, 2007.

FINLAY, B.B.; HANCOCK, E.W. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat. Rev. Microbiol.* v. 2, p. 497-504, 2004.

FIORINO, G. et al. Review article: Anti TNF- α induced psoriasis in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* v. 29, p. 921-7, 2009.

FITZGERALD, K.A. et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B Involves the Toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* v. 198, p. 1043-1055, 2003.

FITZGERALD K.A.; ROWE, D.C.; GOLENBOCK, D.T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex. *Microbes Infect.* v. 6, n. 15, p. 1361-7, 2004.

GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF- κ B and REL proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* v. 16, p. 225-60, 1998.

GLASMACHER, A.; VON LILIENFELD-TOAL, M. The current status of thalidomide in the management of multiple myeloma. *Acta Haematol.* v. 114, s. 1:3-7, 2005.

GOETZ, F.W.; PLANAS, J.S.; MACKENZIE, S. Tumor necrosis factor. *Dev. Comp. Immunol.* v. 28, p. 487-497, 2004.

GONÇALVES-DE-MORAES, V.L. et al. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors and modulators of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. *Brit. J. Pharmacol.* v. 117, p. 1792-1796, 1996.

GOODMAN L.S. et al. In: _____. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9^o edição. Editora Guanabara, Rio de Janeiro 2003.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* v. 3, p. 23-35, 2003.

GRAVES, D.T.; JIANG, Y. Chemokines, a family of chemotatic cytokines. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* v. 6, p. 109-118, 1995.

GREENBERGER, M.J. et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine Klebsiella pneumonia. *J. Infect. Dis.* v. 173, p. 159-65, 1996.

HARBONE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. In:____. *The Flavonoids* ed. Academic Press, NY, 1975.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Signaling to NF- κ B. *Genes Develop.* v. 18, p. 2195-2224, 2004.

HINTZEN, C. et al. Induction of CCL13 expression in synovial fibroblasts highlights a significant role of oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* v. 60, p. 1932-1943, 2009.

HIRVONEN, A. Gene-environment interactions in chronic pulmonary diseases. *Mutat. Res.* v. 667, p. 132-41, 2009.

HORINO, H.; INOUE, N. A new route to chromanocoumarans. Synthesis of (\pm)-pterocarpin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* v. 13, p. 500-501, 1976.

HUGHES-FULFORD, M. et al. Arachidonic acid activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling and induces gene expression in prostate cancer. *Cancer Res.* v. 66, p. 1427-1433, 2006.

HUSSAIN, P.S.; HARRIS, C.C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int. J. Cancer*, v. 121, p. 2373-2380, 2007.

HUSSAIN, R.F.; NOURI, A.M.; OLIVER, R.T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Methods.* v. 160, p. 89-96, 1993.

HUYENA, J.P.D.V. et al. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Letters* v. 243, p. 32–37, 2006.

IHNATKO, R.; KUBES, M. TNF signaling: early events and phosphorylation. *Gen. Physiol. Biophys.* v. 26, p. 159-167, 2007.

JANEWAY, C.A.J.; TRAVES, P.; WALPORT, M. In:____. *Immunobiology*. 3ª Edição. 1997.

JÖNSSON, D. et al. LPS induces GRO α chemokine production via NF-kappaB in oral fibroblasts. *Inflamm. Res.* 2009. Aceito para publicação.

KAGAN, J.C.; MEDZHITOV, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls toll-like receptor signaling. *Cell* v. 125, p. 943–955, 2006.

KARIN, M.; YAMAMOTO, Y.; WANG, Q.M. The IKK NF- κ B system: a treasure trove for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* v. 3, n. 1, p. 17-26, 2004.

KISS, L. et al. Further insight into the mechanism of Heck oxyarylation in the presence of chiral ligands. *Arkivoc.* v. 69, 2003.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* v. 4, p. 206-20, 2005.

LAPCIK O. Isoflavonoids in non-leguminous: a rarity or a rule? *Phytochemistry.* v. 68, p. 2909-16, 2007.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* v. 2, p. 725-734, 2002.

LIN, W.W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* v. 117, p. 1175-83, 2007.

LINARD, M.C.F.; OLIVEIRA, M.M. de; SAMPAIO, M.R.P. A lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. *J. Med. Chem.* v. 18, n. 11, 1975.

LIRA, A.A. et al. Development of lapachol topical formulation : anti-inflammatory study of a selected formulation. *AAPS PharmSciTech.* v. 9, pp. 163-8, 2008.

LOMAS, J.L. et al. Differential effects of macrophage inflammatory chemokine-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung

inflammation: assessment by adoptive cells transfer in mice. *Shock*, v. 19, p. 358-65, 2003.

LUCAS, R. et al. Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung inflammation. *Biochem. Pharmacol.* v. 77, p. 1763-1772, 2009.

LUO, J.L. et al. Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* v. 6, p. 297-305, 2004.

MACHADO, A.L. et al. Design, synthesis and antiinflammatory activity of novel phthalimide derivatives, structurally related to thalidomide *Bioorg Med Chem Lett* v. 15, p. 1169-72, 2005.

MANTOVANI, A. et al. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum. Immunol.* v. 70, p. 325-30, 2009.

MARSHALL, J.S.; JAWDAT, D.M. Mast cells in innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* v. 114, p. 21-7, 2004.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* v. 27, p. 451-483, 2009.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* v. 454, p. 428-435, 2008.

MIDDLETON, J. et al. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* v. 91, p. 385-395, 1997.

MOCELLIN, S. et al. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* v. 16, p. 35-53, 2005.

MORI, R. et al. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *FASEB J.* v. 16, p. 963-974, 2002.

MOSS, M.L. et al. Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J. Neuroimmunol.* v. 72, p. 127-9, 1997.

MOYNAGH, P.N. The NF- κ B pathway. *J. Cell Sci.* v. 118, p. 4589-92, 2005.

MURATORE, C.S. et al. Dexamethasone Alters the Hepatic Inflammatory Cellular Profile Without Changes in Matrix Degradation During Liver Repair Following Biliary Decompression. *J. Surg. Res.*, 2009. Aceito para publicação.

MURDOCH, C., FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* v. 95, p. 3032-3043, 2000.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature* v. 420, p. 846-52, 2002.

_____. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* v. 6, p. 173-182, 2006.

NEELS, J.G. et al. Keratinocyte-derived chemokine in obesity: expression, regulation, and role in adipose macrophage infiltration and glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* Aceito para publicação , 2009.

NETTO, C.D. Síntese de Pterocarpanos e Pterocarpanoquinonas: Substâncias com Potencial Atividade Antineoplásica, Antimalarial e Leishmanicida. Rio de Janeiro, RJ. Tese de Doutorado – NPPN-UFRJ, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v. 6, n. 3, p. 297-305, 2002.

NOMELLINI, V. et al. An age-associated increase in pulmonary inflammation after burn injury is abrogated by CXCR2 inhibition. *J. Leukoc. Biol.* v. 83, p. 1493-501, 2008.

O'BRIEN, P.J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* v. 80, p. 1-41, 1991.

OLSON, T.S.; LEY, K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* v. 283, R7-R28, 2002.

ORTHOLAND, J.Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v. 8, p. 271-280, 2004.

PEREIRA, E.M. et al. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* v. 5:5, 2006.

PETRACHE, I. et al. The role of microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cells permeability. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* v. 28, p. 574-581, 2003.

POBER, J.S.; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* v. 7, p. 803-815, 2007.

PULJIC, R. et al. Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. *Eur J Pharmacol* v. 557, p. 230-5, 2007.

REMICK, D.G. Interleukin-8. *Crit. Care Med.* v. 33, s. 466-467, 2005.

REUTERSHAN, J.; LEY, K. Bench-to-bedside review: Acute respiratory distress syndrome –how neutrophils migrate into the lung. *Crit. Care* v. 8, p. 453-461, 2004.

SALAS, C. et al. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and tripomastigote forms. *Bioorg. Med. Chem.* v. 16, p. 668-74, 2008.

SALMINEN, A. et al. Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-beta oligomers trigger innate immune defense via pattern recognition receptors. *Prog. Neurobiol.* v. 87, p. 181-94, 2009.

SALUSTIANO, E.J. et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. *Invest. New Drugs*, 2009. Aceito para publicação.

SCHUH, K.; PAHL, A. Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury. *Biochem. Pharmacol.* v. 77, p. 1827-34, 2009.

SCHUSTER, B.G. A new integrated program for natural product development and the value of an ethnomedical approach. *J. Altern. Complement. Med.* v. 7, s. 61-72, 2001.

SCOTT, A.; KHAN, K.M.; DURONIO, V. What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br. J. Sports Med.* v. 38, p. 248-249, 2004.

SERHAN, C.N.; SEVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* v. 6, p. 1191-7, 2005.

SHIN, K.Y. et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on expressions of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human bladder cancer cells. *Cancer Lett.* v. 159, p. 127-34, 2000.

SHIOIRI, T. et al. Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009. Aceito para publicação.

SIMMONDS, R.E.; FOXWELL, B.M. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology* v. 47, p. 584-90, 2008.

SIMPSON, J.L.; PHIPPS, S.; GIBSON, P.G. Inflammatory mechanisms and treatment of obstructive airway diseases with neutrophilic bronchitis. *Pharmacol. Ther.*, 2009. Aceito para publicação.

SILVA, A.J.M. da et al. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new (+/-) 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol. *Bioorg. Med. Chem.* v. 10, p. 2731-8, 2002.

SILVA, A.J.M. da; NETTO, C.D.; COSTA, P.R.R. The first synthesis of the (+)-3,4-dihidroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan, an antitumoral agent. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 15, p. 979, 2004.

SOUZA, P.R.S. et al. The role of chemokines in controlling granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni* infection. *ACTA Tropica*. v. 108, p. 135-138, 2008.

STASI, R. et al. Infliximab chimeric antitumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody as potential treatment of myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma* v. 46, p. 509-516, 2005.

STEVENS, A.; LOWE, J.S. In:____. *Histologia*. 1ª edição. Editora Manole. 1995.

SUBRAMANIAN, S.; FERREIRA, M.M.C.; TRSIC, M. A structure-activity relationship study of lapachol and some derivatives of 1,4-naphthoquinones against carcinosarcoma Walker 256. *Struct. Chem.* v. 9, n. 1, 1998.

SZLOSAREK, P.W.; BALKWILL, F.R. Tumor necrosis factor α : a potential target for the therapy of solid tumors. *Lancet Oncol.* v. 4, p. 565-73, 2003.

SZLOSAREK, P.W.; CHARLES, K.A.; BALKWILL, F.R. Tumor necrosis factor-alpha as a tumor promoter. *Eur. J. Cancer* v. 42, p. 745-750, 2006.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.

TEGEDER, I.; PFEILSCHIFTER, J.; GEISSLINGER, G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.* v. 15(12), p. 2057-72, 2001.

TOGBE, D. et al. Toll-like receptor and tumor necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int. J. Exp. Path.* v. 88, p. 387-391, 2007.

VAN AMERSFOORT, E.S.; VAN BERCKEL, T.J.C.; KUIPER, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 16, p. 379-414, 2003.

VARFOLOMEEV, E.E.; ASHKENASI, A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JunKie? *Cell* v. 116, p. 491-497, 2004.

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova*, v. 29, p.326-337, 2006.

VOISARD, R. et al. Aspirin (5 mmol/L) inhibits leukocyte attack and triggered reactive cell proliferation in a 3D human coronary in vitro model. *Circulation*. v. 27, p. 1688-94, 2001.

ULISH, T.R. et al. Intratracheal administration of endotoxina and cytokines. IV. The soluble tumor necrosis factor receptor type I inhibits acute inflammation. *Am. J. Pathol.* v. 142, p. 1335-8, 1993.

WALD, M. et al. Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival times of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother. Pharmacol.* v. 47, s.16-22, 2001.

WATANABE, K. et al. Chemoattractants for neutrophils in lipopolysaccharide-induced inflammatory exudates from rats are not interleukin-8 counterparts but gro-gene-product/melanoma-growth-stimulating-activity-related factors. *Eur. J. Biochem.* v. 214, p. 267-270, 1993.

WATERSTON, A.M. et al. TNF autovaccination induces self anti-TNF antibodies and inhibits metastasis in a murine melanoma model. *Brit. J. Cancer* v. 90, p. 1279-1284, 2004.

WEISS, J. et al. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* v. 253, p. 2664-72, 1978.

WITTEKIND, D.H. On the nature of Romanowsky-Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view. *Histochem. J.* v. 15, p. 1029-47, 1983.

WOOD, L.D.; RICHMOND, A. Constitutive and cytokine-induced expression of the melanoma growth stimulatory activity/GRO α gene requires both NF- κ B and novel constitutive factors. *J. Biol. Chem.* v. 270, p. 30619-30626, 1995.

WU, W. et al. Involvement of TNF- α in enhancement of invasion and metastasis of colon 26- L5 carcinoma cells in mice by social isolation stress. *Oncol. Res.* v. 11, p. 461-9, 1999.

ZHANG, X.W. et al. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration *in vivo*. *Brit. J. Pharmacol.* v. 133, p. 413-421, 2001.

ZHOUA, G. et al. In vivo growth-inhibition of S180 tumor by mixture of 5-Fu and low molecular - carrageenan from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological Research.* v. 51, p. 153–157, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1: DEPÓSITO DE PATENTE

A) CAPA DA MATÉRIA DO DEPÓSITO DA PATENTE

**NOVOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS,
PROCESSO DE PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO OS
NOVOS COMPOSTOS DA FAMÍLIA DAS PTEROCARPAQUINONAS, USOS E
MÉTODO TERAPÊUTICO**

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção pertence a área químico-farmacêutica, sendo os novos compostos da família das pterocarpaquinonas desta invenção úteis no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas ao fenômeno de proliferação celular indesejada bem como, no tratamento de doenças e/ou disfunções relacionadas à elevação dos níveis TNF- α em animais mamíferos humanos e não humanos.

Esta invenção também se refere a um processo de produção econômica e ecologicamente viável dos novos compostos da família das pterocarpaquinonas.

O uso destes compostos e as composições farmacêuticas contendo estes compostos também são objetos desta invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O câncer é um grande problema de saúde pública em todo mundo, afetando indiscriminadamente todas as camadas da sociedade. Acomete em torno de sete milhões de pessoas por ano, sendo a segunda causa de morte por doença nos EUA, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), entre 11,4% a 13,7% do total de óbitos no Brasil está diretamente relacionado a neoplasias, sendo o terceiro maior fator de mortalidade no País.

B) EMAIL CONFIRMATÓRIO DO DEPÓSITO

Data: Fri, 28 Nov 2008 09:49:02 -0300 

De: "[Mauren Silva dos Santos Souza](mailto:mauren@pr2.ufrj.br)" <mauren@pr2.ufrj.br>   

Para: prrcosta@ism.com.br, alcides@nppn.ufrj.br, vivian@bioqmed.ufrj.br, bartira@biof.ufrj.br, salustiano@bioqmed.ufrj.br, chaquip@gmail.com, wallaceplima@hotmail.com, eduardocaiotorres@yahoo.com.br, moisesm@bioqmed.ufrj.br, seabra@biof.ufrj.br, ingredgoretti@bioqmed.ufrj.br

Cópia: kteivelis@pr2.ufrj.br, rogerio@pr2.ufrj.br

Assunto: Depósito de Pedido de Patente "Novos Compostos da Família das Pterocarpaquinonas, ... Usos e Método Terapêutico" [Cabeçalho Completo](#) Prezados Inventores,

É com satisfação que a Agência UFRJ de Inovação informa que o Pedido de Patente intitulado "Novos Compostos da Família das Pterocarpaquinonas, Processo de Produção, Composição Farmacêutica Contendo os Novos Compostos da família das Pterocarpaquinonas, Usos e Método Terapêutico" foi depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI em 06/11/2008, recebeu o seguinte número de protocolo 020080139198.

Como próximo passo, teremos que caminhar para a realização do chamado PCT – Tratado de Cooperação em Matéria de Patentes que é a primeira etapa para realizar a proteção do objeto da patente em outros países. O PCT permite, através de um único pedido, estender o prazo para realizar a proteção em mais de uma centena de países.

Sem o PCT a proteção do invento ficará restrita ao Brasil, desestimulando o investimento de empresas que visam o mercado global. Além disso, a criação torna-se domínio público fora do Brasil, podendo ser livremente fabricada e comercializada - sem qualquer pagamento de royalties para aqueles que investiram e desenvolveram a tecnologia.

O ideal é que antes de se decidir pelo PCT já haja a manifestação de interesse por parte de alguma empresa no futuro licenciamento do pedido de patente, uma vez que as despesas com os pedidos internacionais são em geral bastante elevadas. Isto justificaria de certa forma o investimento inicial que a Universidade faria na extensão da proteção para os demais países. Embora possa não ser uma tarefa fácil, solicitamos aos inventores a indicação de empresas possam se interessar em licenciar o presente pedido de patente. A indicação de setores industriais cujas atividades tenham algo a ver com o objeto da patente também é bem-vinda.

Lembramos ainda que, caso se decida prosseguir no processo até o PCT, temos até o dia 06/11/2009 para a realização daquele depósito, o que acarreta um

estritamento de negociação com alguma empresa interessada.

A Agência UFRJ de Inovação se coloca à disposição para quaisquer outros esclarecimentos.

Cordialmente,

Mauren Souza
Agência UFRJ de Inovação
2598-1748/1838

As informações contidas nesta mensagem e os arquivos anexos são confidenciais e devem ser lidos única e exclusivamente pelo destinatário. Se você a recebeu indevidamente, por favor, informe ao remetente e apague toda a mensagem, sem ler, copiar, gravar, distribuir, divulgar ou fazer qualquer uso da informação sem o explícito consentimento da Agência UFRJ de Inovação.

ANEXO 2: ARTIGO ACEITO



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells

Chaquip D. Netto^a, Alcides J. M. da Silva^b, Eduardo J. S. Salustiano^c, Thiago S. Bacelar^c, Ingrid G. Riça^d, Moises C. M. Cavalcante^d, Vivian M. Rumjanek^c, Paulo R. R. Costa^{b,*}

^a Laboratório Integrado Multiusuário II, Instituto Macaé de Metrologia e Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Brazil

^b Laboratório de Química Bioorgânica, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

^c Laboratório de Imunologia Tumoral, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

^d Laboratório Integrado Multiusuário I Prof. Vera Koatz, Instituto Macaé de Metrologia e Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2009

Revised 24 December 2009

Accepted 31 December 2009

Available online xxx

Keywords:

Naphthoquinone

Pterocarpan

Catalytic oxa-Heck reaction

Cancer

TNF- α modulation

Bioreduction

ABSTRACT

A new pterocarpanquinone (**5a**) was synthesized through a palladium catalyzed oxyarylation reaction and was transformed, through electrophilic substitution reaction, into derivatives **5b–d**. These compounds showed to be active against human leukemic cell lines and human lung cancer cell lines. Even multidrug resistant cells were sensitive to **5a**, which presented low toxicity toward peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cells and decreased the production of TNF- α by these cells. In the laboratory these pterocarpanquinones were reduced by sodium dithionite in the presence of thiophenol at physiological pH, as NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1) catalyzed two-electron reduction, and the resulting hydroquinone undergo structural rearrangements, leading to the formation of Michael acceptors, which were intercepted as adducts of thiophenol. These results suggest that these compounds could be activated by bioreduction.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Naturally occurring *para*-quinones and their synthetic analogs are an important source of antineoplastic products^{1–4} and some of these compounds have been used in clinic as anticancer^{5–10} and antiparasitic⁵ drugs. Anthraquinones such as daunorubicin and doxorubicin, used in cancer chemotherapy, act through DNA intercalation. These and other xenobiotic *para*-quinones can be reduced at the mitochondria to the corresponding semiquinone radicals through action of cytochrome P450 reductases (one electron reduction)^{1,2,5,6,10} and the resulting semiquinones can transfer one electron to molecular oxygen. The resulting superoxide anion can be transformed into hydroxyl radical which initiates a cascade of events leading to oxidative stress. Alternatively, enzymes such as NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1) catalyze two-electron reduction of xenobiotic *para*-quinones to the corresponding hydroquinones, which are subsequently conjugated (phase II metabolism) and them excreted.^{10–12}

However, some hydroquinones can undergo structural rearrangements leading to the formation of Michael acceptors, that can alkylate essential nucleophiles in the target cells. This process is known as bioreductive activation.^{10,13–18}

As part of a program directed at the discovery of new anticancer drugs, we previously synthesized the natural pterocarpan **1** (Fig. 1) and derivatives.^{19,20} We showed that the compound **1** was active against different leukemic cell lines, including MDR cell lines, and presented low cytotoxicity against lymphocytes activated by the mitogen phytohemagglutinin (PHA).²⁰ However, once catechols can be transformed in vivo into the corresponding *ortho*-quinones, compound **2** was considered as a possible metabolite of **1** and was prepared by the oxidation of the catechol system at ring A in **1**.²⁰ *ortho*-Quinone **2** was more potent against leukemic cells but presented high cytotoxicity against lymphocytes activated by PHA.²⁰ In order to prepare more active and less toxic compounds, we designed new derivatives, named pterocarpanquinones, in which the pro-toxic catechol group was changed by a naphthoquinone group. These compounds can also be seen as analogs of Kalfungin, an antimicrobial agent obtained from the culture broth of a soil isolate of *Streptomyces tanashiensis*, sharing in their structures the dihydrofuran moiety.^{21,22}

Pterocarpanquinones **4a–g** were synthesized and presented antineoplastic effect on human leukemic cell lines mentioned above²³ and MCF-7 breast cancer cell line.²⁴ Some of these pterocarpanquinones were also active in fresh leukemic cell samples obtained from patients and overexpressing ATP-binding cassette transporters (ABC) proteins.²³ On the other hand, these pterocarpanquinones showed low cytotoxicity to peripheral blood

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 6793; fax: +55 21 2562 6512.
E-mail address: prrcosta@ism.com.br (P.R.R. Costa).

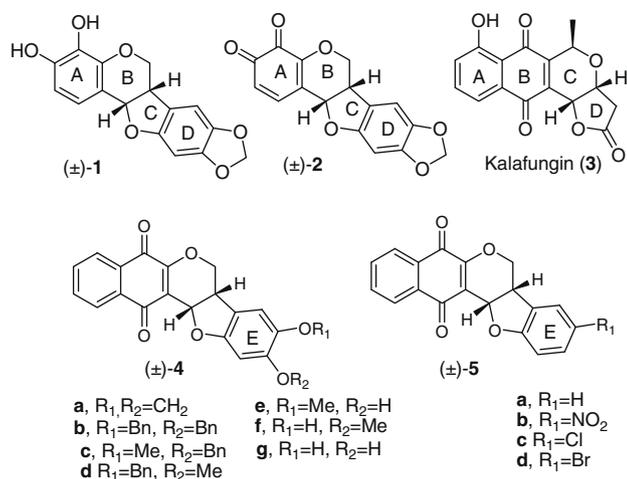


Figure 1. Pterocarpan, lapachol, and pterocarpanquinones.

mononuclear cells (PBMC) activated by PHA.²³ While in MCF-7 cells the antineoplastic activity was stronger for compounds bearing a phenol group at the E ring, the antileukemic profile was independent on the oxygenation pattern at this ring.²⁴ So, in order to know more about the structure–activity relationships, we decided to synthesise a new derivative (**5a**) without substitution at the E ring. Related non phenolic derivatives **5b–d** were also prepared and their antineoplastic activity was also evaluated. Antineoplastic effect of these new pterocarpanquinones on leukemia and lung human cell lines, and TNF- α modulation in PBMC cells was studied.

2. Results

2.1. Chemistry

Although very promising, pterocarpanquinones **4a–d** were synthesized²⁴ through the oxyarylation of chromenquinone **6** by *ortho*-mercuryphenols **8a–d** under the conditions developed by Horino and Cols²⁵ (stoichiometric PdCl₂, LiCl in acetone, condition A, Scheme 2, Table 1, entries 1–4). However, this procedure is expensive and the use of organomercurial reagents are not recommended to prepare drug candidates.

In contrast to the Heck reaction, only few examples of catalytic oxyarylation (oxa-Heck reaction) of olefins are described in the literature, and in these cases *ortho*-iodophenols^{26–29} were used instead *ortho*-mercuryphenols and we decided to try these more adequate procedures using **9** as source of the organopalladium species to prepare the pterocarpanquinone **4d**. Once arylbromides are also substrates for Heck reactions, compound **10** was also studied.³⁰

In contrast with the easy preparation of oxygenated *ortho*-mercury phenols by direct mercuriation of the corresponding

phenols,^{19,24,25} oxygenated *ortho*-iodo phenols are more difficult to obtain and only few examples describing the iodination of these very reactive substrates are reported in the literature. In our hands, phenol **7** could not be transformed into the corresponding *ortho*-iodophenol **9** when allowed to react with *N*-iodosuccinimide in trifluoroacetic acid or acetonitrile.^{31,32} In both cases a complex mixture of products was formed. However, **9** could be prepared from the corresponding *ortho*-mercuryphenol **8d** by reaction with I₂. On the other hand, the *ortho*-bromophenol **10** was prepared from phenol **7** by reaction with NBS (Scheme 1).^{33,34}

Unfortunately, attempts to accomplish the oxyarylation of **6** by **9** or **10** under the conditions favoring the neutral mechanism (Pd(OAc)₂, Et₃N, Condition B)^{26,27} or under conditions favoring the cationic mechanism (Pd(OAc)₂, Ag₂CO₃, Condition C)²⁸ did not lead to the desired adduct **4d** (Table 1, entries 5 and 6).

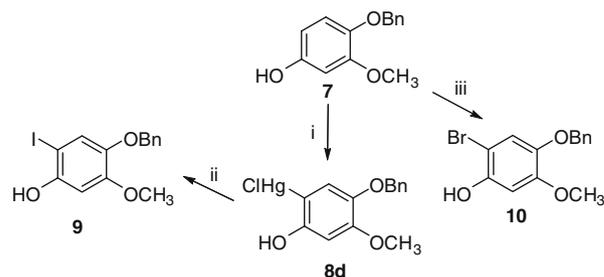
Probably, under the conditions employed it was not possible to accomplish the oxidative addition of Pd(0) in the C–I bond in *ortho*-iodophenol **9** and *ortho*-bromophenol **10**. This step is disfavored by the presence of electron releasing groups in the aromatic ring.

Next, we decided to accomplish the catalytic oxyarylation reaction of **6** using *ortho*-iodophenol (**11**). Compound **5a** was not formed in condition B (Scheme 3, Table 2, entry 1), but in condition C this pterocarpanquinone was obtained in 41% yield (entry 2). A similar yield was obtained in the absence of PPh₃ (entry 3).

Pterocarpanquinones **5b–d** were obtained from **5a** by electrophilic substitution, taking advantage of the great reactivity of E-ring for electrophilic aromatic substitution over the A-ring, which is deactivated due to the conjugation with the carbonyl groups of the quinone moiety (Scheme 4).^{33,35}

2.2. Pharmacology

The pterocarpanquinones **5a–d** were evaluated on two human leukemic cell lines, K562 and HL-60. K562 cells, from a chronic

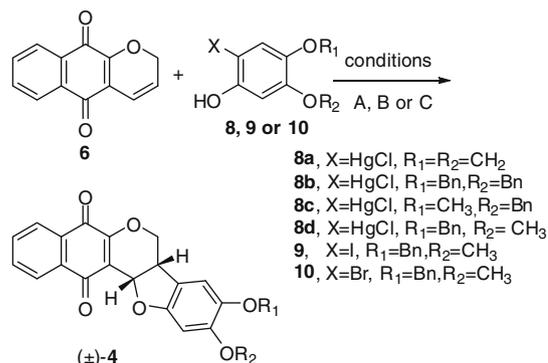


Scheme 1. Synthesis of *o*-halophenols. Reagents and conditions: (i) Hg(OAc)₂/LiCl/rt/quantitative yield; (ii) I₂, THF, rt, quantitative yield; (iii) NBS, CH₃CN, –30 °C, 75%.

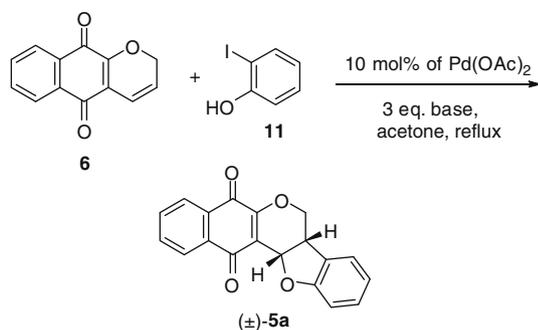
Table 1
Yields and major conditions for reactions showed in Scheme 1

| Entry | (Ar–X) | Conditions | 4 (yield%) |
|-------|-----------|------------|-------------------|
| 1 | 8a | A | 4a (57) |
| 2 | 8b | A | 4b (50) |
| 3 | 8c | A | 4c (58) |
| 4 | 8d | A | 4d (55) |
| 5 | 9 | C | – |
| 6 | 10 | B or C | – |

Conditions A = stoichiometric PdCl₂, LiCl in acetone at room temperature for 12 h. Conditions B = 10 mol % Pd(OAc)₂, 20 mol % PPh₃, 3.0 equiv Et₃N, acetone, reflux for 12 h. Conditions C = 10 mol % Pd(OAc)₂, 20 mol % PPh₃, 3.0 equiv Ag₂CO₃, acetone, reflux for 12 h.



Scheme 2. Synthesis for pterocarpanquinones **4a–d**.



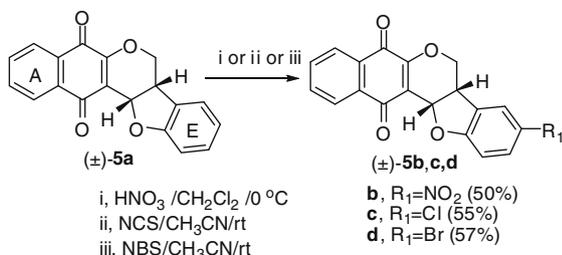
Scheme 3. Synthesis of pterocarpanquinone **5a** by catalytic oxy-arylation of **6**.

Table 2

Yields and major conditions for reactions showed in Scheme 3

| Entry | Condition | PPh ₃ | 5a (yield%) |
|-------|-----------|------------------|--------------------|
| 1 | B | 0.2 equiv | — |
| 2 | C | 0.2 equiv | 41 |
| 3 | C | — | 40 |

Conditions B = 10 mol % Pd(OAc)₂, 20 mol % PPh₃, 3.0 equiv Et₃N, acetone, reflux for 12 h. Conditions C = 10 mol % Pd(OAc)₂, 20 mol % PPh₃, 3.0 equiv Ag₂CO₃, acetone, reflux for 12 h.



Scheme 4. Synthesis of pterocarpanquinones **5b–d**.

myeloid leukemia, contains high levels of intracellular glutathione (GSH) and are resistant to oxidative stress.³⁶ Cell viability greater than 90% was observed, even after treatment of these cells with H₂O₂ 100 μM.³⁷ In contrast, HL-60 cells, a pro-myelocytic leukemia, presents a low level of antioxidant defense and is sensible to oxidative stress.³⁶ In Table 3 are presented the results obtained, showing that these new pterocarpanquinones are as active as compounds **1** and **4f**, used as reference in this study. Mitomycin C was used as reference too. Since **5a** was the more potent in K562 and

Table 3

Antineoplastic effect of pterocarpanquinones **5a,b,d,e** in K562 and HL-60 cell lines (IC₅₀ in μM)^a

| Quinone | K562 | HL-60 |
|-------------|-------|-------|
| 5a | 1.67 | 2.00 |
| 5b | 3.48 | 0.40 |
| 5c | 6.77 | 4.87 |
| 5d | 5.70 | 4.87 |
| 1 | 2.95 | 2.10 |
| 3 | 16.04 | ND |
| 4f | 2.18 | ND |
| Mitomycin C | 0.47 | ND |

ND = not done.

^a Results are reported as IC₅₀ values (concentration required to inhibit cell growth by 50%) in micromolar. Data represent the means of three independent experiments, with each concentration tested in triplicate and SD values were lower than 15%. Assays were performed as described in Section 5.

(excepted for **5b**) HL-60 cell lines (Table 3), we decided to investigate its pharmacological properties in more details in other selected leukemic cells.

As multidrug resistant (MDR) is one of the most important problems in cancer chemotherapy, the antineoplastic effect of **5a** was tested on Lucena-1 (Table 4). This cell line, derived from K562 and originally selected for resistance to the vinca alkaloid vincristine, is a MDR cell and overexpresses ATP-binding cassette sub-family B member 1 protein (ABCB1), a transmembrane protein of 170 KDa which belongs to the ABC superfamily of transporters and is codified by MDR-1 gene.³⁸ This protein is responsible for removing xenobiotics from the cell, being related to the process of MDR.³⁸

Table 4 shows the IC₅₀ obtained for **5a** on Lucena-1, Raji, Jurkat and Daudi human leukemic cell lines. Lucena-1 is also resistant to oxidative stress³⁹ and was slightly more resistant than K562. Jurkat, Raji and Daudi are human lymphocytic cell lines. Jurkat, a T cell leukemia with high levels of Bcl-2 expression, was more resistant than the other leukemic cell lines. Compound **5a** was very bio-selective and did not show significant cytotoxicity for PBMC activated by PHA (IC₅₀ > 20 μM). Mitomycin C (Mit. C) was used as reference.

Not only leukemic cells were sensitive to quinone **5a**. Table 5 shows that this quinone was very active against a small cell lung cancer cell line (GLC-4), and to a lesser extent to non-small cell lung cancer cell lines (A549 and H460). It is worth to mention that GLC-4 and A549 cell lines present high expression of MRP-1 protein (MDR phenotype).^{40,41}

Currently it is known that inflammation and cancer are often associated. The neoplastic microenvironment is rich in cytokines, chemokines and inflammatory enzymes that can become it more favorable to the tumor development.⁴² One of the most important inflammatory molecule is tumor necrosis factor (TNF-α), a cytokine that drives inflammatory reactions. Despite its name, TNF-α mediates inflammation-induced tumor growth and can act as an endogenous tumor promoter.^{43,44} To determine whether **5a** could modulate the production of TNF-α, we incubated human PBMC with lipopolysaccharide (LPS) and this quinone in different concentrations for 2 h. The levels of TNF-α in PBMC supernatants showed that **5a** significantly reduced TNF-α liberation at 25 μM concentration (Fig. 2). Moreover, the highest concentration tested (100 μM)

Table 4

Antineoplastic effect of pterocarpanquinone **5a** in leukemia cancer cell lines and PBMC (IC₅₀ in μM)^a

| Quinone | Lucena-1 | Raji | Jurkat | Daudi | PBMC |
|-----------|----------|------|--------|-------|------|
| 5a | 2.75 | 3.32 | 6.77 | 3.10 | >20 |
| Mit. C | 2.75 | ND | ND | 0.45 | 4.03 |

ND = not done.

^a Results are reported as IC₅₀ values (concentration required to inhibit cell growth by 50%) in micromolar. Data represent the means of three independent experiments, with each concentration tested in triplicate and SD values were lower than 15%. Assays were performed as described in Section 5.

Table 5

Antineoplastic effect of pterocarpanquinones **5a** on lung cancer cell lines, A549, H460, and GLC-4 cell lines (IC₅₀, μM)^a

| Quinone | A549 | H460 | GLC-4 |
|-----------|-------|-------|-------|
| 5a | 11.21 | 12.86 | 5.17 |

ND = not done.

^a Results are reported as IC₅₀ values (concentration required to inhibit cell growth by 50%) in micromolar. Data represent the means of three independent experiments, with each concentration tested in triplicate and SD values were lower than 15%. Assays were performed as described in Section 5.

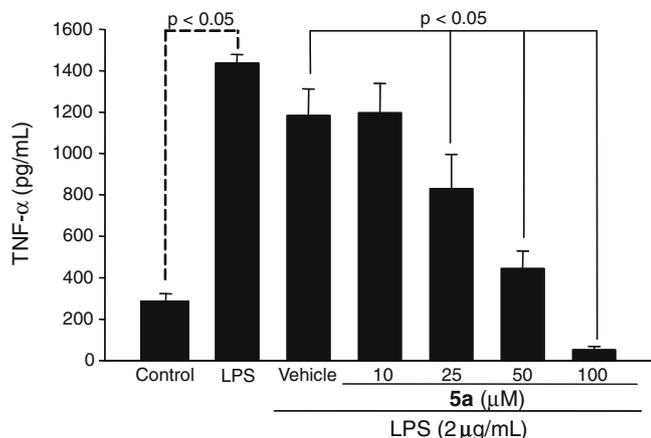


Figure 2. Effect of **5a** on LPS-stimulated TNF- α secretion by PBMC incubated for 2 h. Data are representative of three experiments and are mean \pm SEM.

was able to inhibit almost 100% of TNF- α liberation when compared to LPS-stimulated PBMC treated with vehicle.

Its worth to note that under this condition **5a** was still less toxic to PBMC activated by PHA. In PBMC stimulated by LPS, more than 70% of cell viability was observed even in the presence of 100 μ M of **5a** (data not shown).

3. Discussion

Similar to what has been observed for other *para*-naphthoquinones,^{1,2,5,6,10} it seems reasonable to accept that pterocarpanquinones **4a–d** and **5a–d** can be transformed through one-electron reduction into the corresponding semiquinone radicals. These radicals can initiate a cascade of reactions leading to oxidative stress of the cell. The antineoplastic effect of these compounds on HL-60, Raji, and Daudi cell lines could be associated with this mechanism of action. However, Jurkat, K562 and Lucena-1 cell lines are resistant to oxidative stress and, at least in these cases, an alternative mechanism of action should be operating. Pterocarpanquinones **4** and **5** share with the pyranonaphthoquinone Kalafungin (**3**) an important structural feature, the presence of a C–O bond at D-ring (Fig. 3). It was proposed that Kalafungin acts as antibiotic through a mechanism¹³ similar to that suggested for Mitomycin C and analogs,^{5–7,17} and antitumor drugs model quinomethanes^{14,15} (bioreductive activation), being activated after reduction by NQO1 (two electron reduction). The resulting hydroquinone undergo a structural rearrangement, furnishing a Michael acceptor which react with essential nucleophiles in the cell, as proposed by Moore and Czeniak.^{13,16} The first experimental evidence for this metabolic pathway was supported by Brimble and Nairn through the reduction of the *O*-methyl ether of **3** by sodium dithionite in the presence of sulfur nucleophiles, leading to the incorporation of these nucleophiles.¹³

A similar result was obtained in our laboratory for **4a**, **5a** and **5b** (Scheme 5). The reduction of these compounds by sodium dithio-

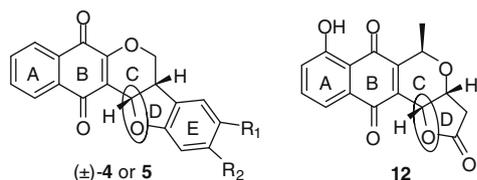
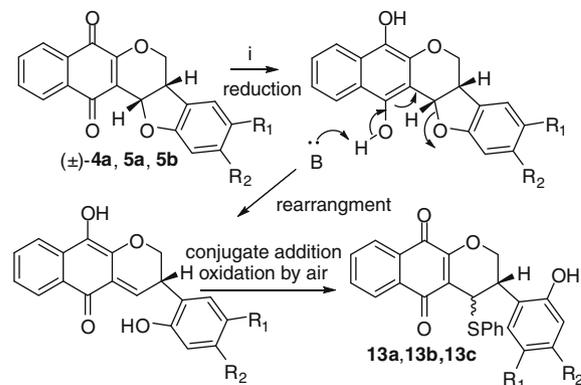


Figure 3. Pterocarpanquinones **4** and **5** and Kalafungin (**12**).



Scheme 5. Reductive activation of pterocarpanquinones **4a**, **5a**, and **5b**. Reagents and conditions: (i) sodium dithionite, Tris/HCl (pH 7.4), PhSH, 22% for **13a**, quantitative for **13b** and 67% for **13c**. Compound **13a**: $R_1, R_2 = -OCH_2O-$; **13b**: $R_1 = R_2 = H$; **13c**, $R_1 = NO_2$, $R_2 = H$.

nite at buffered pH 7.4 in the presence of thiophenol led to the adducts of thiophenol **13a**, **13b**, and **13c**, respectively, strongly suggesting that these compounds could be activated by bioreduction, acting as alkylating agents (Scheme 5). This mechanism of action could explain the potency of the antineoplastic effect of these compounds on cell lines resistant to oxidative stress.

It is interesting to mention that K562 and probably Lucena-1 expresses a high level of NQO2 (an isoform of NQO1), the enzyme responsible for two electron reduction of quinones to hydroquinones.^{45–47}

4. Conclusions

Although pterocarpanquinones **4a–d** and **5a–d** have similar pharmacological profile, the conditions used to prepare **5a–d** are less expensive, using catalytic amount of $Pd(OAc)_2$ and avoiding the use of organomercurial reagents.

Pterocarpanquinone **5a** showed potent antineoplastic effect against leukemic cell lines, including those with the MDR phenotype, suggesting that this compound is not a substrate to ABCB1, the transporter that confers resistance to Lucena-1 cells. Although to a lesser degree, **5a** was also effective against non-small lung cancer cell lines (A549 and H460) known to express different levels of the MDR transporters ABCB1 and ABCC1.^{48,49} The small cell lung cancer cell line GLC-4 was, however, more sensitive to **5a**.

One of the most important pro-inflammatory cytokines, TNF- α has a critical role in carcinogenesis too.⁵⁰ Interestingly, several studies have demonstrated endogenous TNF- α as a tumor promoter and metastatic factor.^{51–53} Significant levels of TNF- α was found in tumor microenvironment of various human cancers, including those of breast, ovarian, prostate, lymphoma, melanoma and leukemia.⁵⁴ We demonstrated that **5a** inhibited TNF- α liberation in human PBMC cells. This effect revealed **5a** as potentially even more effective against cancer, since it can act by two mechanisms, directly by killing tumor cells and indirectly, resolving the inflammatory environment that supports tumor development.

The key feature to the understanding the cytotoxic effect of these compounds on cell lines resistant to oxidative stress seems to be the bioreductive activation mechanism, transforming these compounds into potent Michael acceptors, especially in cells that overexpress NQO1. It is possible that this mechanism of action overcomes the antioxidant defenses present in these cells. The low toxicity in vitro (PBMC activated by PHA) and the efficient synthesis of **5a**, show that this compound is a good candidate to further evaluations in vivo.

5. Experimental

5.1. Pharmacology

5.1.1. Cell lines

All cell lines used in this work were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma–Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA), supplemented with 50 μ M β -mercaptoethanol, 25 mM Hepes, pH adjusted to 7.4 with NaOH, 60 mg/L penicillin, 100 mg/L streptomycin and 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco, Grand Island, NY, USA), inactivated at 56 °C for 1 h. Daudi cells were supplemented with 20% FCS. Vincristine sulfate (60 nM) (Sigma–Aldrich) was added to Lucena-1 in order to maintain the MDR phenotype.

5.1.2. Isolation of PBMC

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by fractionating heparinized blood from healthy volunteers. Blood was heparinized and fractionated on Ficoll–hpaque (Hystopaque) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) by density gradient centrifugation. The PBMC fraction was washed twice and resuspended in RPMI-1640, supplemented as described above, and the cell density was adjusted to 10^6 cells/mL. Cells were incubated with 5 μ g/mL of the mitogen phytohemagglutinin (PHA) (Sigma–Aldrich), in the presence or absence of the compounds being tested.

5.1.3. Cell treatment

Leukemic cell lines K562, Lucena-1, Daudi, Raji and Jurkat were exposed to **5a** in culture for 24 h, 48 h, or 72 h. Lung cancer cells A549, H460 and GLC-4 were let to adhere for 24 h before being exposed to **5a**. Briefly, 2×10^4 cells/mL in 200 μ L were seeded in 96-well microtiter plates in drug-free medium or in medium containing different concentrations of **5a** and maintained for 72 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, and cell viability was then measured.

5.1.4. Cell viability

Cell viability was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) colorimetric assay. MTT can be reduced by dehydrogenases present in active mitochondria of living cells. After incubation in the presence or absence of the compound being tested, 20 μ L of MTT (5 mg/mL) (Sigma–Aldrich) was added to each well. Plates were then kept at 37 °C in 5% CO₂ for 3 h. After centrifugation, 200 μ L of DMSO (Sigma–Aldrich) was added to all wells in order to dissolve the dark blue crystals formed by the reduction of MTT. Absorbance was measured with a Tecan Sunrise ELISA reader at 490 nm. Absorbance was directly proportional to the amount of formazan (reduction product) present, indicating the percentage of living cells. The IC₅₀ values were obtained by nonlinear regression on the GraphPad Prism v4.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.1.5. TNF- α release assay

PBMC were cultured in 24-well plates at 10^6 cells/mL. Stimulation of PBMC was induced by 2 μ g/mL of Escherichia Coli 055:B5 LPS (Sigma, Chemical Co., St Louis, MO, USA) for 2 h (37 °C, 5% CO₂). Additionally, groups of cells were incubated at same time with 0.5% DMSO in RPMI 1640 (vehicle) with or without **5a** in different concentrations (10, 25, 50 and 100 μ M). After stimulation, supernatants were collected and analyzed by ELISA. TNF- α Assay-TNF- α levels in PBMC supernatants were determined using sandwich-ELISA kits (R&D Systems, USA), with sensitivities of 4 pg/mL.

5.2. Chemistry

Melting points were determined with a Thomas–Hoover apparatus and are uncorrected. Column chromatography was performed on silica gel 230–400 mesh (Aldrich). ¹H NMR spectrum

was recorded on a Bruker Avance 400 (400.013 MHz) spectrometer at ambient temperature. All *J* values are given in Hz. Chemical shifts are expressed in parts per million downfield shift from tetramethylsilane as an internal standard, and reported as position (δ H) (relative integral, multiplicity (*s* = singlet, *d* = doublet, *dd* = double doublet, *dt* = double triplet, *m* = multiplet), coupling constant (*J* Hz) and assignment. ¹³C NMR spectrum was recorded on a Bruker Avance 400 (100.003 MHz) spectrometer at ambient temperature with complete proton decoupling. Data are expressed in parts per million downfield shift from tetramethylsilane as an internal standard and reported as position (δ C).

5.2.1. Synthesis of pterocarpanquinone **5a**

To a stirred solution of **6** (106 mg, 0.5 mmol) in acetone (10 ml), 2-iodophenol **11** (83 mg, 0.75 mmol), silver-carbonate (413 mg, 1.5 mmol), PPh₃ (26.2 mg, 0.1 mmol, 20 mol %) and Pd(OAc)₂ (11.2 mg, 0.05 mmol, 10 mol %) were added. The reaction mixture was refluxed for 16 h and filtered in celite with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhyd Na₂SO₄ and concentrated. The crude product was washed in *n*-hexane and purified by flash chromatography on silica. After column chromatography using *n*-hexane/ethyl acetate (95:5) as eluant, this compound was obtained as a yellow solid in 41% yield, mp 145 °C. A 40% yield was observed in absence of PPh₃.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.21–8.10 (m, 2H); 7.78–7.68 (m, 2H); 7.30–7.18 (m, 2H); 6.98–6.91 (m, 2H); 5.66 (d, *J* = 6.69 Hz; 1H); 4.59 (dd, *J* = 11.08, 5.03 Hz; 1H); 3.81 (t, *J* = 11.08 Hz; 1H); 3.64–3.53 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 183.25 (C); 179.28 (C); 158.73 (C); 157.01 (C); 134.54 (CH); 133.38 (CH); 130.58 (C); 130.57 (C); 129.58 (CH); 126.49 (CH); 126.42 (CH); 125.11 (C); 124.51 (CH); 121.23 (CH); 118.16 (C); 110.80 (CH); 72.32 (CH); 67.09 (CH₂); 38.37 (CH); LRMS (EI) *m/z* 304.

5.2.2. Electrophilic substitution reactions on **5a**. Synthesis of **5b**, **5c** and **5d**

5.2.2.1. Pterocarpanquinone **5b.** To a solution of **5a** (100 mg, 0.33 mmol) in 3.5 mL of CHCl₃ was added fuming HNO₃ (0.5 ml) at –30 °C. The reaction mixture was stirred for 2 h at same temperature. After this time, the TLC showed the formation of a product more polar than start material. The reaction mixture was dropped into cold water and then extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhyd Na₂SO₄ and concentrated in vacuum. The crude product was purified by flash chromatography on silica to furnish a yellow solid (57.6 mg, 0.165 mmol) in 50% yield, mp 250 °C.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.24–8.16 (m, 4H); 7.86–7.77 (m, 2H); 7.02 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz); 5.90 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz); 4.67 (d, 1H, *J* = 4.1 and 10.9 Hz); 3.90 (t, 1H, 10.8 Hz); 3.78–3.75 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 179.0 (C); 164.2 (C); 157.4 (C); 142.6 (C); 134.9 (CH); 133.9 (CH); 131.8 (C); 130.7 (C); 127.2 (CH); 126.8 (CH); 126.8 (CH); 121.2 (CH); 117.3 (C); 110.9 (CH); 74.8 (CH); 66.6 (CH₂); 38.1 (CH). LRMS (EI) *m/z* 349.

5.2.2.2. Pterocarpanquinone **5c.** To a solution of **5a** (50 mg, 0.165 mmol) in 5 mL of CH₃CN was added NCS (100 mg, 0.75 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 24 h. After the reaction was complete, the solvent was evaporated under reduced pressure and ethyl acetate was added. The organic layer was washed with brine, dried over anhyd Na₂SO₄ and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography on silica to furnish a yellow solid (30.8 mg, 0.091 mmol) in 55% yield, mp 228 °C.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.18 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz); 8.13 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz); 7.81–7.71 (m, 2H); 7.25 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz); 7.17 (dd, 1H, *J* = 8.5, 2.1 Hz); 6.85 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz); 5.69 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz); 4.57 (dd, 1H, *J* = 11.2, 5.1 Hz); 3.81 (t, 1H, *J* = 11.1 Hz); 3.61–3.55 (m, 1H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ 183.31 (C); 179.3 (C); 157.63 (C); 157.20 (C); 134.8 (CH); 133.66 (CH); 131.98 (C); 130.76 (C); 129.71 (CH); 127.14 (C); 126.72 (CH); 126.17 (C); 124.87 (CH); 117.96 (C); 111.96 (CH); 73.16 (CH); 66.92 (CH_2); 33.67 (CH); LRMS (EI) m/z 338.

5.2.2.3. Pterocarpanquinone 5d. To a solution of **5a** (50 mg, 0.165 mmol) in 5 mL of CH_3CN was added NBS (106.5 mg, 0.6 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 24 h. After the reaction was complete, the solvent was evaporated under reduced pressure and ethyl acetate was added. The organic layer was washed with brine, dried over anhyd Na_2SO_4 and concentrated. The crude product was purified by flash chromatography on silica to furnish a yellow solid (36.3 mg, 0.095 mmol) in 57% yield, mp 228 °C.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.2 (m, 2H); 7.8 (m, 2H); 7.4 (d, 1H, $J = 1.97$ Hz); 7.35 (dd, 1H, $J = 8.5$ and 2.14 Hz); 6.85 (d, 1H, $J = 8.45$ Hz) 5.7 (d, 1H, $J = 5.9$ Hz); 4.6 (dd, 1H, $J = 11.3$, 6.0 Hz); 3.8 (t, 1H, $J = 11.0$ Hz); 3.6 (m, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ 183.16 (C); 179.15 (C); 158.0 (C); 157.06 (C); 134.67 (CH); 133.54 (CH); 132.48 (CH); 131.82 (C); 130.6 (C); 127.6 (CH); 126.58 (CH); 117.78 (C); 113.04 (C); 112.43 (C); 112.2 (CH); 73.0 (CH); 66.8 (CH_2); 38.44 (CH); LRMS (EI) m/z 382 (100%), 383, 384, 385, 386.

5.2.2.4. General procedure for reductive thioalkylation. A solution of pterocarpanquinone (0.06 mmol) in 3:1 THF–MeOH (8.0 mL) and Tris–HCl buffer (pH 7.4, 3.0 mL) was degassed for 15 min with dry nitrogen. To this solution was added sodium dithionite (254.04 mg 1.46 mmol) to effect hydroquinone formation, followed by a solution of the thiophenol (24.6 μL , 0.24 mmol) in degassed 3:1 THF–MeOH (2.0 mL). The reaction was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere and monitored periodically by TLC. The reaction mixture was extracted by ethyl acetate and the organic layer was washed with brine and dried over sodium sulfate. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography using 9:1 hexane/ethyl acetate as eluant.

5.2.2.5. Reductive thioalkylation of 4a. Treatment of **4a** (21.2 mg; 0.06 mmol) with sodium dithionite and thiophenol following the general procedure furnished **13a** 6.04 mg (0.0132 mmol; 22% yield) of a yellow oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.15 (m, 2H); 7.70 (m, 4H); 7.30 (m, 3H); 6.78 (s, 1H); 6.70 (s, 1H); 6.25 (s, 1H); 5.80 (s, 1H); 5.79 (s, 1H); 4.98 (dd, $J = 11.73$, 3.47 Hz; 1H); 4.85 (d, $J = 4.85$ Hz; 1H); 4.64 (s, 1H); 3.62 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ C 14.52 (CH); 30.12 (C); 36.55 (CH); 42.41 (CH); 67.73 (CH_2), 98.62 (CH), 101.53 (CH_2), 106.96 (C), 116.60 (C), 118.05 (C), 119.64 (C); 126.92 (CH), 126.97 (CH), 128.60 (CH); 129.47 (CH); 131.36 (CH), 132.63 (C), 133.68 (CH), 133.90 (CH); 134.74 (CH), 142.08 (C), 147.43 (C), 148.10 (CH); 155.36 (C), 179.55 (C), 183.05 (C).

5.2.2.6. Reductive thioalkylation of 5a. Treatment of **5b** (18.2 mg; 0.06 mmol) with sodium dithionite and thiophenol following the general procedure furnished **13b** 26.5 mg (0.06 mmol; quantitative yield) of a yellow oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.15 (m, 2H); 7.70 (m, 4H); 7.30 (m, 3H); 7.0 (m, 2H); 6.70 (m, H); 5.1 (s, 1H); 4.9 (m, 1H); 4.8 (s, 1H); 3.7 (s, 1H).

5.2.2.7. Reductive thioalkylation of 5b. Treatment of **5b** (21 mg; 0.06 mmol) with sodium dithionite and thiophenol following the general procedure furnished **13c** 17.8 mg (0.04 mmol; 67%) as yellow oil.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8.15 (m, 2H); 7.75 (m, 4H); 7.35 (m, 3H); 6.45 (m, 3H); 4.98 (m, 2H); 4.7 (s, 1H); 3.65 (s, 1H).

5.2.3. Synthesis of ortho-halophenols 9 and 10

5.2.3.1. ortho-Iodophenol 9. To a stirred 0.1 M solution of organomercurial **8d** in THF at -78 °C was slowly added a 1 M solution of I_2 in THF until the reaction mixture was purple. Immediately was added a solution of NaHSO_3 (20% w/v). The organic layer was extracted with ethyl acetate, dried over anhyd Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure to furnish a dark oil. The product was used in crude form.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.48–7.25 (m, 5H), 7.10 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 3.82 (s, 3H).

5.2.3.2. ortho-Bromophenol 10. To a stirred solution of phenol **7** (920 mg, 4 mmol) in 15 mL of CH_3CN at 0 °C was added NBS (784 mg, 4.4 mmol). After the reaction was complete (10 min) the reaction mixture was extracted with ethyl acetate, washed with brine, dried over anhyd Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate 7:3) on silica to furnish a dark solid in 75% yield.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7.50–7.20 (m, 5H), 6.99 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.82 (s, 3H).

Acknowledgments

Our research was supported by Grants from FINEP, Programa de Oncobiologia-UFRJ, PRONEX, FAPERJ, CNPq and CAPES. C.D.N. and P.R.R.C. are supported by CNPq fellowship and E.J.S.S. by FAF/FECD fellowship. We are grateful to Dr. Ottilia R. Affonso-Mitidieri for useful suggestions and Central Analítica NPPN-UFRJ for the analytical data.

References and notes

- O'Brien, P. J. *Chem. Biol. Interact.* **1991**, *80*, 1.
- Salas, C.; Tapia, R. A.; Ciudad, K.; Armstrong, V.; Orellana, M.; Kemmerling, U.; Ferreira, J.; Maya, J. D.; Morello, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 668.
- Linardi, M. C. F.; de Oliveira, M. M.; Sampaio, M. R. P. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 1159.
- Portela, M. P. M.; Stoppani, A. O. M. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 275.
- Williams, D. A. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Lemke, T. L., Ed., third ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 2002; p 924.
- Galm, U.; Hager, M. H.; Lanen, S. G. V.; Ju, J.; Thorson, J. S.; Shen, B. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 739.
- Wolkenberg, S. E.; Boger, D. L. *Chem. Rev.* **2005**, *102*, 2477.
- Gewirtz, D. A. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727.
- Zhang, G.; Fang, L.; Zhu, L.; Zhong, Y.; Wang, P. G.; Sun, D. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1792.
- Chen, Y.; Hu, L. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 29.
- Pink, J. J.; Planchon, S. M.; Tagliarino, C.; Varnes, M. E.; Siegel, D.; Boothman, D. A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5416.
- Park, H. J.; Ahn, K. J.; Ahn, S. D.; Choi, E.; Lee, S. W.; Williams, B.; Kim, E. J.; Griffin, R.; Bey, E. A.; Bornmann, W. G.; Gao, J.; Park, H. J.; Boothman, D. A.; Song, C. W. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2005**, *61*, 212.
- Brimble, M. A.; Nairn, M. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, 317.
- Lin, A. J.; Cosby, L. A.; Shansky, C. W.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1247.
- Lin, A. J.; Pardini, R. S.; Cosby, L. A.; Lillis, B. J.; Shansky, C. W.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1268.
- Moore, H. W.; Czerniak, R. *Med. Res. Rev.* **1981**, *1*, 249.
- Denny, W. A. *Lancet Oncol.* **2000**, *1*, 25.
- de Abreu, F. C.; Lopes, A. C. O.; Goulart, M. O. F. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *562*, 53.
- da Silva, A. J. M.; Netto, C. D.; Costa, P. R. R. *Brazil Chem. Soc.* **2004**, *15*, 979.
- Netto, C. D.; Santos, E. S. J.; Castro, C. P.; da Silva, A. J. M.; Rumjanek, V. M.; Costa, P. R. R. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 920.
- Johnson, L. E.; Dietz, A. *Appl. Microbiol.* **1968**, *16*, 1815.
- Donner, C. D. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8888.
- Salustiano, E. J. S.; Netto, C. D.; Fernandes, R. F.; da Silva, A. J. M.; Bacelar, T. S.; Castro, C. P.; Buarque, C. D.; Maia, R. C.; Rumjanek, V. M.; Costa, P. R. R. *Invest. New Drugs* **2009**, doi:10.1007/s10637-009-9231-y.
- da Silva, A. J. M.; Buarque, C. D.; Brito, F. V.; Aurelian, L.; Macedo, L. F.; Malkas, L. H.; Hickey, R. J.; Lopes, D. V. S.; Nöel, F.; Murakami, Y. L. B.; Silva, N. M. V.; Melo, P. A.; Caruso, R. R. B.; Castro, N. G.; Costa, P. R. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2731.
- Horino, H.; Inoue, N. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1976**, 500.
- Emrich, D. E.; Larock, R. C. *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 3756.
- Larock, R. C. U.S. Patent. 1998, 5,721,371.

28. Kiss, L.; Kurtan, T.; Antus, S.; Brunner, H. *Arkivoc* **2003**, 69.
29. Ulgheri, F.; Marchetti, M.; Piccolo, O. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6056.
30. Smith, M. B. In *Organic Synthesis*, 2nd ed.; McGraw-Hill, 2002; pp 1120–1121.
31. Li, C. C.; Xie, Z. X.; Zhang, Y. D.; Chen, J. H.; Yang, Z. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8500.
32. Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Reddy, P. S. R.; Basak, A. K.; Narsaiah, A. V. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 77.
33. Carreño, M. C.; Ruano, J. L. G.; Sanz, G.; Toledo, M. A.; Urbano, A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5328.
34. Eaton, P. E.; Martin, R. M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2728.
35. da Silva, A. J. M. M.Sc. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, 1993.
36. Chau, T. P.; Shiah, S. G.; Don, M. J.; Kuo, M. L. *Free Radical Biol. Med.* **1998**, *24*, 660.
37. Nagai, F.; Kato, E.; Tamura, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 492.
38. Rumjanek, V. M.; Trindade, G. S.; Wagner-Souza, K.; de-Oliveira, M. C.; Marques-Santos, L. F.; Maia, R. C.; Capella, M. A. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2001**, *73*, 57.
39. Trindade, G. S.; Capella, M. A.; Capella, L. S.; Affonso-Mitidieri, O. R.; Rumjanek, V. M. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *69*, 694.
40. Mülder, H. S.; Lankelma, J.; Dekker, H.; Broxterman, H. J.; Pinedo, H. M. *Int. J. Cancer* **1994**, *15*, 275.
41. Lehmann, T.; Köhler, C.; Weidauer, E.; Taeye, C. *Toxicology* **2001**, *5*, 59.
42. Balkwill, F.; Mantovani, A. *The Lancet* **2001**, *357*, 539.
43. Balkwill, F. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002**, *13*, 135.
44. Luo, J. L.; Maeda, S.; Hsu, L. C.; Yagita, H.; Karin, M. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 297.
45. Yan, C.; Kepa, J. K.; Siegel, D.; Stratford, I. J.; Ross, D. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 1657.
46. Buryanovskyy, L.; Fu, Y.; Boyd, M.; Ma, Y.; Hsieh, T.; Wu, J. M.; Zhang, Z. *Biochem.* **2004**, *43*, 11417.
47. Bantscheff, M.; Eberhard, D.; Abraham, Y.; Bastuck, S.; Boesche, M.; Hobson, S.; Mathieson, T.; Perrin, J.; Rida, M.; Rau, C.; Reader, V.; Sweetman, G.; Bauer, A.; Bouwmester, T.; Hopf, C.; Kruse, U.; Neubauer, G.; Ramsden, N.; Rick, J.; Kuster, B.; Drewes, G. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 994.
48. Torkey, A. R.; Stehfest, E.; Viehweger, K.; Taeye, C.; Foth, H. *Toxicology* **2005**, *207*, 437.
49. Zaman, G. J.; Versantvoort, C. H.; Smit, J. J.; Eijndems, E. W.; de Haas, M.; Smith, A. J.; Broxterman, H. J.; Mulder, N. H.; de Vries, E. G.; Baas, F. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1747.
50. Mocellin, S.; Rossi, C. R.; Pilati, P.; Nitti, D. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, *16*, 35.
51. Szlosarek, P. W.; Charles, K. A.; Balkwill, F. R. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 745.
52. Wu, W.; Yamaura, T.; Murakami, K.; Ogasawara, M.; Hayashi, K.; Murata, J.; Saiki, I. *Oncol. Res.* **1999**, *11*, 461.
53. Shin, K. Y.; Moon, H. S.; Park, H. Y.; Lee, T. Y.; Woo, Y. N.; Kim, H. J.; Lee, S. J.; Kong, G. *Cancer Lett.* **2000**, *159*, 127.
54. Szlosarek, P. W.; Balkwill, F. R. *Lancet Oncol.* **2003**, *4*, 565.

CURRICULUM VITAE

Nome: Ingrid Goretti Riça
Nascimento: 08/07/1986
Naturalidade: Rio de Janeiro

➤ **Formação Acadêmica**

· Faculdade de Ciências Biológicas – Modalidade Médica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 2004 a dezembro de 2007.

· Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

➤ **Comunicação em Congresso**

· 2 comunicações em congressos nacionais.

· 1 comunicação em congresso internacional.

➤ **Publicações**

· Netto, C.D., Silva, A.J.M., Salustiano, E.J.S., Bacelar, T.S., **Riça, I.G.**, Cavalcante, M.C.M, Rumjanek, V.M., Costa, P.R.R. (2010). New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. *Bioorg. Med. Chem.* doi:10.1016/j.bmc.2009.12.073. Article in press.

· Castro, P., Nasser, H., Abrahão, A., dos Reis, L.C., **Riça, I.**, Valença, S.S., Rezende, D.C., Quintas, L.E.M., Cavalcante, M.C.M., Porto, L.C. (2009). Aspirin and indomethacin reduce lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Biochem. Pharmacol.* 77:1029-1039.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)