

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

**AÇÃO CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DA BETA LAPACHONA EM  
CÉLULAS ENDOTELIAIS**

Patrícia de Almeida Machado Gonçalves  
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA

2017

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

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

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

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

Nome completo do autor: Patrícia de Almeida Machado Gonçalves

Título do trabalho: Ação citotóxica e antioxidante da beta lapachona em células endoteliais

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  **SIM**     **NÃO**<sup>1</sup>

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

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

**Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo**  
**Patologia Animal/EVZ/UFG**  
**Mát. 6302307**

Data: 16 / 01 / 2018

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO GONÇALVES

**AÇÃO CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DA BETA LAPACHONA EM  
CÉLULAS ENDOTELIAIS**

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

**Área de Concentração:**

Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica

**Orientador:**

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

**Comitê de Orientação:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa de Sousa Cruz – EVZ/ UFG

Prof. Dr. Kleber Fernando Pereira – CAJ/ UFG

GOIÂNIA

2017

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

Gonçalves, Patrícia de Almeida Machado

Ação citotóxica e antioxidante da beta lapachona em células endoteliais [manuscrito] / Patrícia de Almeida Machado Gonçalves. - 2017.

xv, 33 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo; co orientadora Dra. Dra. Vanessa de Sousa Cruz; co-orientador Dr. Dr. Kleber Fernando Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, , Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

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

1. Isquemia e reperfusão. 2. Naftoquinona. 3. Proteção celular. 4. Radicais livres. I. Araújo, Dr. Eugênio Gonçalves de , orient. II. Título.

CDU 639.09

- 1 ATA NÚMERO **485** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE  
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às **14h00min** do dia **18/12/2017**, reuniu-se na sala  
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra  
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo  
6 (a) Pós-Graduando (a) **Patrícia de Almeida Machado Gonçalves**, intitulada: "*Ação citotóxica e*  
7 *antioxidante da beta lapachona na isquemia e reperfusão de células endoteliais*", apresentado  
8 para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Cirurgia,**  
9 **Patologia e Clínica Médica**, desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Prof. Dr.**  
10 **Eugênio Gonçalves de Araújo**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a)  
11 **Patrícia de Almeida Machado Gonçalves** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho.  
12 A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores,  
13 os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos,  
14 assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a  
15 arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu  
16 Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**
- 17 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo (Orientador (a)) Aprovada  
18 Profa. Dra. Ana Paula Iglesias Santin Aprovada  
19 Profa. Dra. Regiani Nascimento Gagno Porto Aprovada
- 20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Patrícia de Almeida**  
21 **Machado Gonçalves**, Habilitada [(Habilitado(a) ou não Habilitado(a))]  
22 pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):  
23 A candidata apresentou seu trabalho de forma  
24 adequada e respondeu os questionamentos da Banca  
25 Examinadora.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



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

35 *Ação citotóxica e antioxidante da beta lapachona*

36 *em células endoteliais.*

37

38

39

40

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

43 Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

44 Profa. Dra. Ana Paula Iglesias Santin

45 Profa. Dra. Regiani Nascimento Gagno Porto

*Eugênio Gonçalves de Araújo*  
*Ana Paula Iglesias Santin*  
*Regiani Nascimento Gagno Porto*

Dedico este trabalho aos meus filhos Heitor de Almeida Gonçalves e César de Almeida Gonçalves, ao meu marido Danilo de Araújo Gonçalves, aos meus pais Ana Lucia Campos de Almeida Machado e Laercio Machado e a minha irmã Larissa de Almeida Machado Mendonça.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar e me dar força nessa caminhada;

Aos meus filhos Heitor de Almeida Gonçalves e César de Almeida Gonçalves pela existência em minha vida e assim me dar animo a cada dia para lutar;

Ao meu marido Danilo de Araújo Gonçalves pelo apoio, compreensão, ajuda e companheirismo;

Aos meus pais Ana Lúcia Campos de Almeida Machado e Laércio Machado e minha irmã Larissa de Almeida Machado Mendonça meus sinceros agradecimentos por todo apoio, compreensão, incentivo e ajuda, sem a qual eu não teria concluído mais esta etapa;

Ao Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, pelos ensinamentos, auxílios, dedicação, compreensão, paciência, confiança e orientação. Por gerenciar o Laboratório Multiusuário de Cultivo Celular, sem o qual não teria sido possível realizar a parte experimental do meu projeto.

Aos meus co-orientadores Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa de Sousa Cruz e Prof. Dr. Kleber Fernando Pereira, pela disponibilidade e ajuda.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Arnhold pela disponibilidade e auxílio referente a estatística do trabalho;

Aos colegas da pós-graduação Nayane Peixoto Soares, Gabriela Hadler Gabriel, Fernanda Almeida Rodrigues, Leandro Lopes Nepomuceno, Karla Márcia da Silva Braga;

A colega da graduação Jaqueline Sales de Oliveira pela disponibilidade, atenção e dedicação a este trabalho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Estresse oxidativo .....	3
2.2. Isquemia e reperfusão .....	4
2.2.1. Modelos experimentais de isquemia / reperfusão e estresse oxidativo .....	5
2.3. Características químicas e ação da beta lapachona .....	9
2.3.1. Quinonas .....	9
2.3.2. Lapachol .....	12
2.3.3. Beta Lapachona .....	15
a) Propriedade citotóxica da BLAP .....	16
b) Propriedade anti-inflamatória da BLAP .....	19
c) Propriedade antioxidante da BLAP .....	20
3. OBJETIVOS .....	21
4. HIPÓTESE .....	21
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
5.1. Cultivo celular .....	22
5.2. Reagentes .....	22
5.3. Ensaio de isquemia / reperfusão .....	22
5.4. Ensaio da citotoxicidade e viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio .....	23
5.5. Análise estatística .....	24
6. RESULTADOS .....	24
7. DISCUSSÃO .....	25
8. CONCLUSÃO .....	27
REFERÊNCIAS .....	28

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Esquema representativo do ciclo redox e da geração de metabólitos pelas quinonas. No início do ciclo a redução de um ou dois elétrons catalisada pela enzima NQO1, formando radicais ânions semiquinonas instáveis. Na presença de O<sub>2</sub>, os ânions transferem um elétron e geram o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) que sofre ação da enzima superóxido dismutase (SOD) formando o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Forma-se o radical hidroxila (OH) e ocorre a transferência de elétrons. Os radicais livres reagem com o DNA e com macromoléculas, como lipídios e proteínas, causando danos celulares. .... 10
- FIGURA 2 – Estrutura química das naftoquinonas. A) orto-naftoquinona. Duas carbonilas nas posições um e dois em vermelho. B) para-naftoquinona. Duas carbonilas nas posições um e quatro em vermelho. C) beta xiloidona. Anel cromeno em azul, com dupla ligação (seta). D) alfa xiloidona. Anel cromeno em azul, com dupla ligação (seta); E) beta lapachona. Anel cromano em verde. F) alfa lapachona. Anel cromano em verde. .... 11
- FIGURA 3 - Imagem de um ipê (*Tabebuia sp*) no Condomínio Portal do Sol II, Goiânia. .... 12
- FIGURA 4 – Formação sintética da beta lapachona (B) e alfa lapachona (C) por meio de tratamento ácido do lapachol (A). .... 15
- FIGURA 5 – Esquema da formação dos complexos topoisomerases I e II com o DNA, seguida da interação com um inibidor que congela o complexo DNA-Topoisomerases levando à sua fragmentação e à morte celular..... 17
- FIGURA 6 – Imagem da câmara selada GasPack utilizada para simular isquemia. .... 23

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAPH	2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato
ABS	Absorbancia
AIF	Fator indutor de apoptose
Akt	Proteína quinase B
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	5' adenosina-monofosfato activada proteína quinase
AP-1	Ativador de proteína-1
ARE	Elemento de resposta antioxidante
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	Bcl-2 do tipo 4
Bcl2	Célula-B de linfoma 2
BLAP	Beta lapachona
CAT	Catalase
COX-2	Ciclo oxigenase 2
CREB	Proteína de ligação do elemento
CT	Citotoxicidade
Cyp-D	Ciclofilina D
DMEM	Meio dubelco modificado de Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Quinase regulada extra-celularmente
FA	Fosfatase alcalina
Fe <sup>2+</sup>	Ferro
Gama-GCLC	Gama-glutamil cisteina sintase subunidade catalítica
Gama-GCS	Gama-glutamilcisteína sintase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSK-3beta	Glicogênio sintase quinase 3 beta
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxido de hidrogenio
HepG2	Células hepáticas da linhagem hepatoma humano
HO-1	Heme oxigenasse-1
HUVEC	Celulas endoteliais de veia umbilical humana
IkappaBalfa	Fator nuclear kapa polipeptidio estimulador do gene em células B-inibidor alfa
IL-10	Interleucina 10
IL-1beta	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
I/R	Isquemia / Reperfusão
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
JAK	Ativador de quinase Janus

JNK1/2	Jun-c terminal-N quinase ½
LAP	Lapachol
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCPIP1	Quimiocina quimioatrativa de monócitos da proteína-1
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinase
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	Tetrazólio (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-diphnyl-2H-tetrazólio
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-kappabeta	Fator nuclear kapa beta
NGF	Fator de crescimento neuronal
NQO1	NAD (P) H: oxidorreductase quinina 1
Nrf2	Fator eritróide nuclear 2
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OH	Radical hidroxila
p70S6K	p70 ribossomal S6 proteina quinase
PARP	Poli [ADP ribose] polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
Q <sup>-</sup>	Radical semiquinona
RIP1	Receptor de interação de proteína
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
Sirt1	Sirtuína 1
SOD	Superóxido dismutase
STAT	Transdutor de transcrição Janus quinase
TIMP-2	Inibidor tecidual de metaloproteinase-2
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
TRFL4	Receptor toll like 4
VC	Viabilidade celular

## RESUMO

O estresse oxidativo é o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio que causam danos e até a morte das células. É um mecanismo que pode se originar da isquemia e reperfusão, um processo que acomete diversos órgãos e que está envolvido em doenças neurodegenerativas, cardíacas, insuficiências renais, disfunção hepática, entre outras. A necessidade da descoberta de novas substâncias antioxidantes, derivadas de fontes naturais, é importante para a prevenção e tratamento dessas doenças. A beta lapachona é uma substância com ação antioxidante, obtida da serragem da madeira do ipê, vegetação símbolo do cerrado brasileiro. Neste estudo objetivou-se analisar a ação citotóxica e antioxidante da beta lapachona em células endoteliais, *in vitro*. Células da linhagem EA.hy 926 foram subcultivadas, tratadas com a  $\beta$  lapachona em diferentes concentrações e submetidas à isquemia e reperfusão. A citotoxicidade e a ação antioxidante foram obtidas por meio da análise da viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio. As médias foram averiguadas pelo teste de Tukey (5% de significância) e pela análise de variância. Houve progressão dose dependente da citotoxicidade no grupo sem isquemia/reperfusão e da viabilidade celular no grupo com isquemia/reperfusão. No entanto, não houve diferença estatística entre as concentrações e entre os grupos. A beta lapachona, nas condições desse experimento, não apresentou ação citotóxica ou antioxidante nas células endoteliais.

Palavras-Chave: isquemia e reperfusão, naftoquinona, proteção celular, radicais livres

## ABSTRACT

Oxidative stress is the overproduction of reactive oxygen species that cause cell damage and even the death. It is a mechanism related to ischemia and reperfusion, a process that affects several organs and is involved in neurodegenerative diseases, cardiac and/or renal insufficiencies, hepatic dysfunction, among others. The discovery of new antioxidant substances derived from natural sources, is important for the prevention and treatment of these diseases. Beta lapachone is a substance with antioxidant action obtained from sawdust of Ipe wood, a symbolic tree from the Brazilian cerrado. This study aimed to analyze the cytotoxic and antioxidant action of beta lapachone in endothelial cells, in vitro. EA.hy 926 lineage cells were subcultured, treated with different concentrations of beta lapachone and subjected to ischemia and reperfusion. Cytotoxicity and antioxidant action were assessed through the cellular viability analysis by the tetrazolium reduction method. The averages were verified by the Tukey test (5% of significance) and by variance analysis. There was a dose-dependent progression of cytotoxicity in the non-ischemia/reperfusion (control) group and cell viability increase in the ischemia/reperfusion group. However, there was no statistical difference between the concentrations and between groups. Considering the settings of this experiment, Beta lapachone did not present cytotoxic or antioxidant action on endothelial cells.

Keywords: cell protection, free radicals, ischemia/reperfusion, naphtoquinone.

## 1. INTRODUÇÃO

O excesso da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) desencadeia a morte celular, que é a principal consequência das lesões de isquemia e reperfusão (I/R). A lesão de I/R promove aumento das proteínas caspase 3 e 9 e diminuição da célula antiapoptótica célula-B de linfoma 2 (Bcl2), aumento da fissão mitocondrial e desencadeia vias de apoptose celular gerando grandes áreas de infarto<sup>1,2</sup>.

As substâncias antioxidantes atuam inibindo a produção excedente de ROS. A isquemia e a reperfusão provocam lesão na mucosa intestinal por meio de metabólitos ROS derivados do sistema da xantina oxidase após a reperfusão. A glutamina protege o intestino, inibindo a produção de ROS, a clivagem das caspases, a apoptose e a peroxidação lipídica por meio da ativação da via de sinalização fator eritróide nuclear relacionada ao fator 2 (Nrf2) / elemento de resposta antioxidante (ARE). Por essa razão, a glutamina é uma substância que foi utilizada com sucesso no tratamento de lesões experimentais de isquemia e reperfusão no intestino de ratos<sup>3</sup>.

Outro exemplo é a enzima heme oxigenase-1 (HO-1), que previne o enfraquecimento da parede do miocárdio, a inflamação, a fibrose e a disfunção cardíaca induzida por lesões, com redução da morte celular por apoptose. Os mecanismos antioxidantes protegem os cardiomiócitos e podem ser uma estratégia de proteção para pacientes com doença arterial coronariana e com alto risco de isquemia miocárdica recorrente<sup>4</sup>.

Além dos mecanismos antioxidantes endógenos, há compostos com efeitos similares, que podem ser consumidos na dieta diária. Antioxidantes exógenos também desempenham importante papel na proteção contra o desenvolvimento de doenças que cursam com danos provocados por moléculas oxidativas. A beta lapachona (BLAP) é um exemplo de composto com ação antioxidante<sup>5,6,7</sup>.

O bioma cerrado apresenta grande diversidade vegetal, com mais de 6.000 espécies de plantas. Dentre os vegetais, cujas partes são utilizadas com finalidade medicinal, destacam-se as plantas do gênero *Tabebuia* sp., que pertencem à família Bignoniácea. Algumas espécies encontradas são *Tabebuia impetiginosa*, *T. avellanadea*, *T. serratifolia*, *T. chryso-tricha*, *T. roseo-alba*, conhecidas popularmente como ipê roxo, ipê amarelo, ipê dourado e ipê branco, respectivamente. No Brasil, são encontrados 46 tipos de ipês. São árvores altas, com troncos tortuosos, de casca grossa e floração entre os meses de junho e setembro<sup>8,9,10,11</sup>.

A casca do ipê tem sido utilizada para a confecção de chás desde o Império Inca, no século XIII. Por meio do conhecimento popular, é empregada na Argentina, México, Estados Unidos e Brasil para o tratamento de diarreia, infecções respiratórias, infecções do trato urinário, anemia, febre, alergias, artrite, infecções bacterianas, candidíase, gripe, infecções fúngicas, leucemia, doenças hepáticas, parasitoses, ulcerações cutâneas, asma, colite, cistite, gastrite e gengivite<sup>11,12</sup>.

Do ipê podem ser extraídos compostos como as quinonas. Dentro do grupo das quinonas estão presentes as naftoquinonas, que são compostos cuja característica é a presença de anel naftaleno. São encontradas em plantas, fungos e bactérias e possuem ações farmacológicas, com destaque para o Lapachol (LAP). O LAP foi isolado pela primeira vez em 1882 pela extração da serragem da casca da árvore da família Bignoniácea. O produto final da extração é um pó amarelo, solúvel em água. É um composto biologicamente ativo, que pode gerar espécies reativas de oxigênio e induzir estresse oxidativo e morte celular. A alfa-lapachona e a beta-lapachona foram os primeiros isômeros do LAP a serem isolados<sup>8,13,14,15</sup>.

A BLAP é um composto natural, obtida pela ciclização do LAP catalisada por ácido. Começou a ser investigada pelo químico Samuel Hooker no final do século XIX. O mecanismo de ação envolve a enzima NAD (P) H: oxidorreductase quinina 1 (NQO1), a inibição de mediadores inflamatórios e as espécies reativas de oxigênio<sup>16,17,18</sup>. Por esta característica, a BLAP apresenta potencial para minimizar a injúria de isquemia e reperfusão sobre as células. Faz-se necessária, a priori, uma revisão dos principais conceitos e processos envolvidos nessa possível inibição, para que possa ser definida uma estratégia eficaz de investigação desse potencial, particularmente em células endoteliais normais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Estresse oxidativo

A fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares e neuronais é complexa e tem participação fundamental do fenômeno conhecido por estresse oxidativo. O aumento intracelular de ROS induz o estresse oxidativo, que pode desencadear a morte celular por apoptose e por ativação de cascatas apoptóticas intrínsecas. O estresse oxidativo, induzido por radicais livres por meio da clivagem das caspases 4 e 12 por tempo prolongado no retículo endoplasmático, resulta em apoptose<sup>19,20</sup>.

O estresse oxidativo pode se apresentar no organismo em diferentes situações e nos mais diversos órgãos e tecidos<sup>19</sup>. Possui ação exógena como no consumo de dieta rica em gordura que está relacionado com o aumento do estresse oxidativo e disfunções mitocondriais em diversos órgãos. Este promove o aumento da expressão de glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3 beta) no sangue periférico e no baço de animais com consumo de dieta rica em gordura. Em contraste, o nível do Nrf2 em células T reguladoras (Treg), a expressão de HO-1 e da proteína de desacoplamento 2 (UCP2) diminui<sup>6</sup>.

ROS formadas endogenamente, como consequência do metabolismo de xenobióticos, são eliminados por enzimas e por sistemas celulares não enzimáticos. O estresse oxidativo aumenta a liberação de lactato desidrogenase (LDH) e promove alterações histológicas como perda de integridade celular, vacuolização e degradação das células acometidas<sup>5</sup>.

As células submetidas à situação de isquemia e reperfusão (I/R) aumentam a produção de ROS, o que induz o estresse oxidativo e a morte celular mediada pela tensão oxidativa. Na mucosa intestinal, por exemplo, a lesão decorrente da I/R é induzida pela produção de ROS por meio do sistema de xantina oxidase após a reperfusão<sup>19,21</sup>. No coração, a importância das lesões por acúmulo de ROS também pode ser ilustrada por episódios múltiplos e recorrentes de isquemia e reperfusão e isquemia miocárdica transitória, que resultam em significativos danos ao miocárdio. Tais lesões incluem a morte de cardiomiócitos, fibrose e adelgaçamento da parede do coração, prejudicando a função ventricular e resultando em insuficiência cardíaca<sup>4</sup>.

## 2.2. Isquemia e reperfusão

Isquemia é o evento no qual há interrupção do fluxo sanguíneo para os órgãos, que promove danos que podem ser irreversíveis e causar morte celular. Alguns danos que podem ocorrer são geração de radicais livres, estresse oxidativo, disfunção do órgão acometido, danos histológicos, apoptose, reação inflamatória. A reperfusão é o retorno do fluxo sanguíneo às células. Apesar da reperfusão ser importante para retornar à normalidade das células e prevenir a irreversibilidade da injúria, ela pode agravar as lesões causadas inicialmente pela isquemia. Estes danos celulares induzidos são denominados lesão de isquemia-reperfusão (I/R). Alguns órgãos importantes que podem ser acometidos pelas lesões de isquemia-reperfusão são fígado, rins, coração e cérebro<sup>22,23,24,25,26</sup>.

A isquemia e a reperfusão tem como consequência a morte celular que resulta de uma sequência de eventos. No caso, a apoptose é causada principalmente pela sobrecarga de cálcio e despolarização mitocondrial. O acúmulo de cálcio aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial, com diminuição do potencial de membrana e transição de permeabilidade de membrana mitocondrial interna, o que inicia o processo de apoptose celular. Com a despolarização mitocondrial ocorre a liberação do citocromo c para o citosol. Há também aumento das proteínas pró-apoptóticas Bcl2 do tipo 4 (Bax) e caspase 3 e diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-2. A redução da viabilidade celular é causada também pelo aumento das citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 1beta (IL-1beta), interleucina 6 (IL-6) e diminuição das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR). Ainda ocorre a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio devido ao esgotamento das enzimas antioxidantes e aumento do malondialdeído (MDA), produto da lipoperoxidação<sup>26,27,28,29</sup>.

A isquemia hepática e renal induz grau significativo de lesões por I/R com diminuição significativa dos níveis da Bcl-2 e aumento dos níveis de caspase 3. Há um aumento da aspartato aminotransferase (AST) e dos níveis séricos de creatinina no fígado e nos rins, respectivamente. No fígado, a expressão dessas enzimas e proteínas que causam morte celular pode ser minimizada com o pré-condicionamento hepático isquêmico (utilizado em casos de transplante), que consiste em procedimentos de isquemia e reperfusão curtos, com duração de alguns minutos antes da isquemia prolongada. Nos rins, a proteção ocorre pela ativação da via da proteína de choque térmico (Hsp27), uma molécula anti-apoptótica que aumenta a resistência celular contra diferentes tipos de estresse como choque térmico, condições oxidativas e exposição a drogas tóxicas<sup>23,24</sup>.

A I/R e o estresse oxidativo podem ser induzidos de forma experimental, por meio de modelos experimentais como no fígado e nos rins, com o intuito de aprimorar o conhecimento do mecanismo de ação e propiciar o estudo de substâncias antioxidantes.

### 2.2.1. Modelos experimentais de isquemia / reperfusão e estresse oxidativo

Células cultivadas de astrócitos primários de ratos foram submetidas à ação do peróxido de hidrogênio, com aumento da produção de ROS e morte celular. Utilizando a BLAP, verificou-se ação antioxidante com estímulo da expressão de genes enzimáticos antioxidantes de fase II pela sinalização de NQO1-AMPK, PI3K/Akt e Nrf2/ARE. A ação citoprotetora ocorreu pela inibição da produção de ROS. As enzimas induzidas pela BLAP foram HO-1, NQO1, catalase e MnSOD. Houve, também, a indução do aumento da glutatona intracelular. Como a BLAP mostrou proteger as células contra estresse oxidativo, esta pode ser uma potencial substância terapêutica para doenças neurodegenerativas<sup>7</sup>.

A privação de oxigênio e glicose (OGD) com reoxigenação (OGDR) foi aplicada em células neuronais Neuro-2a, NB41A3 e neurônios primários do hipocampo CA1 para imitar as lesões de isquemia-reperfusão. Houve a translocação da p53 para as mitocôndrias que se associaram a ciclofilina D (Cyp-D) desencadeando a ativação da via de necrose programada. Os danos celulares causados foram a despolarização mitocondrial com posterior liberação do citocromo c e produção de ROS. Para proteger as células neuronais dos efeitos da isquemia e reperfusão, foi realizado o pré-tratamento com o composto C19 com redução da morte celular e aumento da viabilidade da mesma. A proteção neuronal ocorreu devido ao bloqueio da principal proteína alvo Cyp-D mitocondrial com consequente inibição da via de necrose programada<sup>27</sup>.

Em células endoteliais e neurais as enzimas antioxidantes, como a heme oxigenase 1 (HO-1), atuam na regulação e supressão do estresse oxidativo. Essas proteínas, também conhecidas como enzimas de fase II de desintoxicação, podem manter o equilíbrio metabólico do oxigênio no meio intracelular. A produção dessas enzimas ocorre por meio da ativação da via de sinalização antioxidante fator eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) / elemento de resposta antioxidante (ARE), por meio de diversas substâncias pesquisadas com potencial antioxidante<sup>19,32</sup>.

Em células endoteliais vasculares humanas foi induzido aumento da produção de ROS. O composto C (6- [4- (2-piperidina-1-il-etoxi) -fenil] -3-piridina-4-il-pirazolo [1,5-a] pirimidina) um potente inibidor de proteína quinase adenosina-monofosfato ativada (AMPK)

por meio da competição com adenosina trifosfato (ATP), estimulou a expressão de HO-1 por ativação da via Nrf2/ARE que protegeu as células através da inibição da produção de ROS. Assim como a glutathione, doadora de N-acetil-L-cisteína, que também bloqueou o aumento na formação de ROS<sup>33</sup>.

Células H9c2, linhagem celular de cardiomiócitos, foram induzidas à isquemia e reperfusão, o que resultou em morte celular por apoptose, pelo aumento do estresse oxidativo e da atividade das caspases. A enzima HO-1 desempenhou papel protetor nas células através da inibição da apoptose e do estresse oxidativo. O mecanismo de ação desta enzima foi mediado pela enzima biliverdina redutase e pela via de sobrevivência celular PI3K/Akt. A enzima HO-1 diminui a atividade das caspases e a via PI3K/Akt inibiu as vias apoptóticas nas mitocôndrias. O aumento da atividade de Akt foi resultante da sua fosforilação pela proteína fosfatidilinositol 3-quinase subunidade alfa (p85), mediado pela HO-1 e parcialmente pela enzima biliverdina redutase. A ativação de Akt por HO-1 é realizada a nível pós-transducional por vários mecanismos e possivelmente inclui eventos diretos de p85 e Akt por HO-1 ou pela enzima biliverdina redutase ou ambos<sup>21</sup>.

Em ratos com indução de isquemia e reperfusão no coração, houve aumento de MDA e diminuição das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR, aumento dos níveis das citocinas inflamatórias TNF alfa, IL-6 e IL-1beta, que estão relacionadas com o mecanismo de lesão do músculo cardíaco. TLR4 ativa muitas citocinas e promove a formação de espécies reativas de oxigênio contribuindo com as lesões ocasionadas pela resposta inflamatória na I/R. A via NF-kappabeta é ativada durante a reperfusão gerando estresse oxidativo e sobrecarga de cálcio. O extrato de folhas de Ginkgo biloba (EGb 761) confere proteção contra as lesões miocárdicas induzidas pela I/R pela diminuição do estresse oxidativo e repressão da cascata inflamatória *in vivo*, por inibição da via TLR4/NF-kappa-beta. Neste estudo, sua utilização melhorou significativamente a função cardíaca, por meio da restauração na estrutura do coração isquêmico. Portanto, houve uma melhora na contração cardíaca, atenuação da hipercontração e redução da pressão diastólica, que é considerado um dos principais motivos para o aumento da demanda de oxigênio. Ainda foi relatado que o grupo tratado teve diminuição significativa da porcentagem da área de infarto significativamente<sup>28</sup>.

Em outro estudo, a I/R em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), ativou as vias proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) / Akt, resultando em aumento da expressão de quimiocina quimioatrativa de monócitos da proteína-1 (MCP1) que desempenhou papel vital na migração e morte celular, resultando em aumento da angiogênese e apoptose durante os estágios de I/R.

HUVEC cultivadas foram submetidas ao processo de I/R que resultou no aumento da fosforilação das vias da MAPK e Akt e uma fosforilação transitória de p38. Essas vias estão envolvidas na indução da expressão de MCP1 em HUVEC. MCP1 mediou a diminuição da viabilidade celular induzida por I/R e o aumento da migração de células endoteliais. A regulação da expressão e da função de MCP1 pode ajudar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas complementares no tratamento de indivíduos com insuficiência cardíaca após I/R<sup>30</sup>.

Em células endoteliais, o eridictiol induziu aumento da expressão do RNAm e da proteína HO-1 por meio da sinalização de quinase regulada extra-celularmente (ERK) e da ativação da via Nrf2/ARE. Esta substância teve efeito protetor contra o estresse oxidativo nas células endoteliais, reduzindo a produção de ROS pela regulação positiva da enzima HO-1<sup>19</sup>.

Células endoteliais humanas EA.hy 926 foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para simular as lesões e os mecanismos do estresse oxidativo. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um dos produtos classificados como espécies reativas de oxigênio, promoveu aumento acentuado da liberação da LDH, um dos principais indicadores de lesão celular. Neste estudo também verificou-se morte celular e aumento da relação Bax/Bcl-2, ou seja, regulação negativa da Bcl-2, além disso houve um aumento significativo da expressão de caspase 3 clivada nas células<sup>31</sup>.

Sailuotong (SLT) é uma formulação padronizada de três ervas composta por *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba* e *Crocus sativus*, utilizada para o tratamento de alterações vasculares. O composto protegeu as células EA.hy 926 contra danos relacionados à ROS. Dessa forma, reduziu o excesso de LDH, suprimiu a geração de ROS, a morte celular e aumentou a modulação da atividade enzimática antioxidante demonstrando a propriedade anti-apoptótica e antioxidante. O efeito anti-apoptótico foi mediado por uma redução do Bax / Bcl-2 e pela supressão da ativação da via da caspase 3. Já o efeito antioxidante foi mediado pelo aumento da atividade de SOD nas células EA.hy 926<sup>31</sup>.

Lignanas foram isoladas da fruta *Schisandra chinensis*, utilizada no Sudeste da Ásia. Essas substâncias contêm o composto gomisina, que regula a expressão de moléculas inflamatórias e tem ação antioxidante em micróglias. Em células microgliais foi induzida inflamação com posterior tratamento com gomisina. Este teve ação antioxidante, pois inibiu a produção de ROS e ativou MAPK e o ativador Janus quinase (JAK)/ transdutor de transcrição Janus quinase (STAT). Inibiu também a expressão de moléculas inflamatórias como óxido nítrico, prostaglandina E2, citocinas (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6) e quimiocina (MCP1) por

meio do bloqueio da ativação da via NF-kappa beta. Aumentou os níveis de AMP cíclico (AMPC) e a fosforilação de proteína de ligação do elemento (CREB). As principais enzimas envolvidas na sinalização de Nrf2, proteína quinase (PKA) e CREB, tiveram seus níveis aumentados. A gomisina também aumentou a translocação do Nrf2 para o núcleo e a indução da expressão das enzimas HO-1 e NQO1<sup>34</sup>.

A linhagem celular PC12, originada de feocromocitoma de ratos, é um modelo de célula frequentemente utilizada em estudos de diferenciação e desenvolvimento neural. Essas células foram tratadas com fator de crescimento neuronal (NGF) e proteína quinase B (Akt), que promoveram o crescimento axonal, aumentaram a viabilidade celular e reduziram a apoptose. O Akt aumentou a expressão de enzimas antioxidantes HO-1, NQO1 e gama-glutamilcisteína sintase (gama-GCS) por meio da ativação da via Nrf2/ARE, principal mecanismo na prevenção do estresse oxidativo. Portanto o tratamento com Akt, associado ao NGF, contribui para a regeneração neuronal e pode ser uma promissora terapia para lesões medulares<sup>32</sup>.

Antcin C é um composto esteroide, isolado do cogumelo medicinal *Antrodia cinnamomea*, que possui ação antioxidante e protege as células do fígado, *in vivo* e *in vitro*, do estresse oxidativo e da morte celular pela ativação da via de sinalização Nrf2/ARE. Células hepáticas da linhagem hepatoma humano (HepG2) foram induzidas pela substância 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) ao estresse oxidativo e a morte celular. O antcin C protegeu o fígado de lesões, o que foi comprovado pela constatação de que os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) se encontravam dentro dos padrões normais de referência. O composto inibiu a clivagem das caspases 4 e 12 e regulou positivamente o gene protetor HSP70, impedindo o estresse oxidativo no retículo endoplasmático, que resultaria em apoptose. O antcin C *in vivo* tem efeito citoprotetor com regulação positiva de antioxidantes, protegendo as células hepáticas de estresse oxidativo por meio da ativação da via Nrf2 / ARE. Por fim, esse composto promoveu aumento da produção de GSH, inibiu a peroxidação lipídica e suprimiu a apoptose induzida por radicais livres por meio da supressão da geração de ROS<sup>20</sup>.

Durante o procedimento experimental de transplante de fígado em ratos, foi realizado o pós-condicionamento isquêmico. A enzima HO-1 foi expressa predominantemente no citoplasma das células de Kupffer, tendo induzido efeito citoprotetor contra a lesão de isquemia e reperfusão hepática e aumento da atividade antioxidante. Os efeitos protetores do pós-condicionamento isquêmico foram significativamente associados com maior expressão

intra-hepática de HO-1. Houve aumento das atividades da enzima SOD e redução da atividade da peroxidação lipídica, indicando a indução de mecanismos endógenos citoprotetores<sup>35</sup>.

Ratos foram submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e posteriormente tratados com glutamina. A glutamina reduziu a lesão do jejuno e a permeabilidade microvascular por meio do aumento dos níveis de ativação da via Nrf2/ARE e da expressão de HO-1. Nas células do jejuno também ocorreu aumento dos níveis de Bcl-2 e diminuição do nível da caspase 3, promovendo supressão da apoptose. O aumento do nível de Bcl-2 ocorreu por meio da via Nrf2/ARE. A produção de ROS foi inibida e a apoptose das células intestinais foi reduzida. A redução do estresse oxidativo resultou em aumento da atividade da SOD e redução da peroxidação lipídica induzida pela glutamina<sup>36</sup>.

### 2.3. Características químicas e ação da beta lapachona

#### 2.3.1. Quinonas

As quinonas são compostos em cuja estrutura química se encontra necessariamente um ou mais anéis aromáticos. As quinonas são metabólitos secundários de plantas com capacidade de atuar como agente oxidante ou desidrogenador. O LAP, a BLAP, a alfa lapachona, a estreptonigrina e a urdamicinona são compostos que possuem a estrutura química quinona em seu núcleo<sup>8,37</sup>.

Suas ações farmacológicas como atividade antitumoral, anti-inflamatória e antifúngica, se devem à propriedade redox e de transferência de elétrons, impulsionada pela formação de um sistema totalmente aromático. O potencial de redução da quinona está na sua capacidade intrínseca de receber elétrons, relacionada à presença de substituintes na porção quinonoídica que modulam a propriedade redox<sup>8,13</sup>.

O ciclo redox (Figura 1) pode ser iniciado pela redução de um ou dois elétrons, catalisada pelas enzimas NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina) e citocromo P450 redutase, originando radicais ânions semiquinonas ( $Q^-$ ) instáveis. Na presença de oxigênio molecular ( $O_2$ ), esses ânions  $Q^-$  transferem um elétron, gerando o radical superóxido ( $O_2^-$ ). Este sofre ação da enzima superóxido dismutase (SOD), formando o peróxido de hidrogênio. Simultaneamente, ocorre a reação de Fenton, formando o radical hidroxila pela redução catalisada pelo ferro ( $Fe^{2+}$ ). A transferência dos elétrons e a cinética desse processo são dependentes do potencial de redução da quinona. Os radicais livres formados no ciclo redox

podem reagir com o DNA (Ácido desoxirribonucleico) e com macromoléculas, como lipídios e proteínas, causando danos celulares<sup>8,13</sup>.

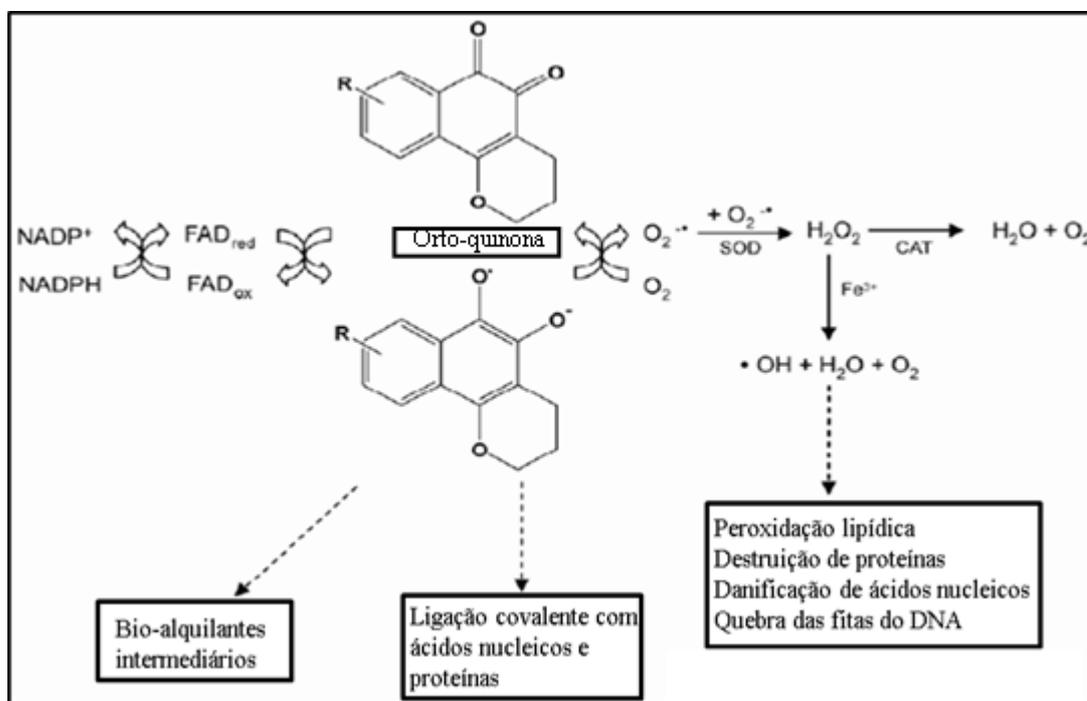


FIGURA 1 – Esquema representativo do ciclo redox e da geração de metabólitos pelas quinonas. No início do ciclo a redução de um ou dois elétrons catalisada pela enzima NQO1, formando radicais ânions semiquinonas instáveis. Na presença de O<sub>2</sub>, os ânions transferem um elétron e geram o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) que sofre ação da enzima superóxido dismutase (SOD) formando o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Forma-se o radical hidroxila (OH) e ocorre a transferência de elétrons. Os radicais livres reagem com o DNA e com macromoléculas, como lipídios e proteínas, causando danos celulares.

Fonte: Adaptado de Pinto et al.<sup>13</sup>

Dentro do grupo das quinonas estão as naftoquinonas, compostos que contêm em sua estrutura química anéis aromáticos naftaleno. São classificadas em dois grupos, orto-naftoquinona e para-naftoquinona, com duas carbonilas ligadas ao anel naftaleno nas posições um e dois e nas posições um e quatro, respectivamente (Figura 2A E 2B). As orto-naftoquinonas (Figura 2C, 2D, 2E, 2F) que mais se destacam são as xiloidonas (alfa xiloidona, beta xiloidona) e as lapachonas (alfa lapachona, BLAP), caracterizadas pela presença dos anéis cromenos e cromanos em sua estrutura. São compostos com ação redox em vários tipos de processos biológicos oxidativos, sendo elos de cadeia de transporte de elétrons na via metabólica. Representam uma classe de compostos naturais e são encontrados em algumas famílias de plantas, bem como em fungos e bactérias<sup>8,13,14</sup>.

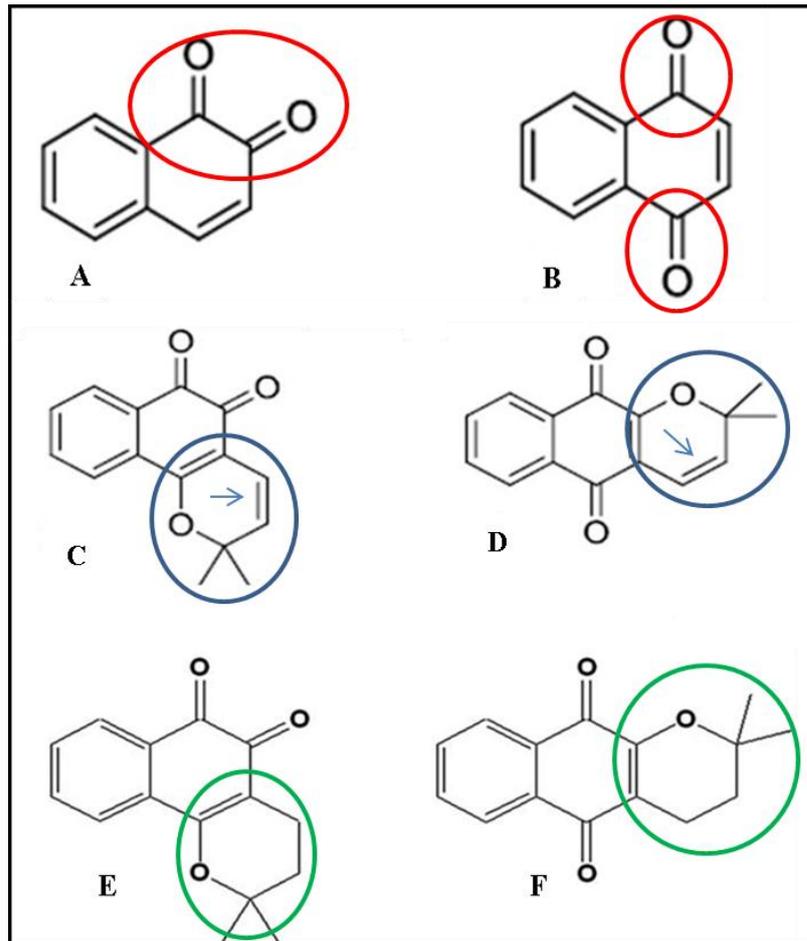


FIGURA 2 – Estrutura química das naftoquinonas. A) orto-naftoquinona. Duas carbonilas nas posições um e dois em vermelho. B) para-naftoquinona. Duas carbonilas nas posições um e quatro em vermelho. C) beta xiloidona. Anel cromeno em azul, com dupla ligação (seta). D) alfa xiloidona. Anel cromeno em azul, com dupla ligação (seta); E) beta lapachona. Anel cromano em verde. F) alfa lapachona. Anel cromano em verde.

Fonte: Adaptado de Ferreira et al<sup>8</sup>.; Pinto et al.<sup>13</sup>

Em 1946, deu-se o início das pesquisas sobre a ação anti-malárica das naftoquinonas com a demonstração da sua ação inibitória contra o crescimento do *Plasmodium vivax*. Em seguida, documentou-se a sua eficácia contra quatro cepas de vírus da gripe, de poliomielite e de estomatite vesicular. Desde então, as naftoquinonas naturais e sintéticas, como o LAP, estão sendo estudadas como terapêutica para diversas doenças tropicais. Tais compostos interferem no transporte de elétrons das células e inibem a cadeia respiratória. Possuem ação biológica nas atividades das enzimas, como a topoisomerase, e podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio<sup>14,15</sup>.

### 2.3.2. Lapachol

O LAP (2-hidroxi-3-(e-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) é extraído da serragem da casca da árvore da família Bignoniácea, do gênero *Tabebuia* sp. (Figura 3), conhecida como ipê ou pau d'arco. Foi isolado pela primeira vez em 1882 a partir da *Tabebuia avellanadae*<sup>8</sup>.



FIGURA 3 - Imagem de um ipê (*Tabebuia* sp) no Condomínio Portal do Sol II, Goiânia.

Fonte: Arquivo pessoal

Os extratos, a partir do qual o LAP foi purificado, são utilizados como agentes analgésicos, anti-inflamatórios, antineoplásicos, antimicrobianos e diuréticos. O composto foi chamado por E. Paterno de “ácido *lapachic*”, devido a suas propriedades ácidas. Posteriormente, Hooker (1892) atribuiu o nome “lapachol”, pelo qual é conhecido até hoje. Apesar de ter sido isolado pela primeira vez em espécies da família Bignoniácea, a substância pode ser encontrada também em árvores de outras famílias e espécies<sup>14,15</sup> (Quadro 1).

Em 1927, Fieser obteve o composto por síntese química, confirmando a manutenção da mesma estrutura, comparando-a com uma amostra autêntica extraída da casca da *T. avellanadae*. Trata-se de um pó cristalino amarelo, com forma tipicamente de prisma,

com pKa de 6,15 e ponto de fusão 141°C a 143°C. É solúvel em água com influência do pH, podendo variar de quatro a dez, dependendo da concentração. Os comprimentos de onda podem ser identificado por absorbância são 251, 278 e 331 nm. Pode formar complexos estáveis com metais de transição, como ferro, cobre, zinco, cobalto, níquel, bismuto e vários outros<sup>38</sup>.

QUADRO 1 – Famílias e espécies de árvores onde o lapachol pode ser encontrado.

FAMÍLIA	ESPÉCIE
Bignoniácea	<i>Tabebuia flavescens</i> Benth - & Hook. F. ex. Griseb. <i>T. guayacan</i> Hemsl. <i>T. avellanae</i> Lor. ex Griseb. <i>T. serratifolia</i> (Vahl.) Nichols <i>T. rosa</i> <i>T. bata</i> (E. Mey) Sandw <i>T. pentaphylla</i> (Linn) Hemsl. <i>T. heptaphylla</i> <i>Haplophragma adenophyllum</i> <i>Heterophragma adenophyllum</i> <i>Kigelia pinnata</i> <i>Phyllarthron comorense</i> <i>Radermachera sinica</i> <i>Paratecoma peroba</i> (Record) Kuhlm <i>Tecoma araliaceae</i> DC <i>T. undulata</i> <i>Stereospermum suaveolens</i> DC. <i>S. kunthianum</i> <i>Zeyhera digitalis</i> <i>Z. tuberculosa</i> <i>Millingtonia hortensis</i> Linn <i>Stereospermum tetragonum</i> DC. <i>Stereospermumpersonatum</i> <i>Catalpa longíssima</i> <i>Cydistax antisiphilitica</i> <i>Macfadyena unguis-cati</i> <i>Melloa quadrivalvis</i> <i>Newbouldia laevis</i>
Verbenaceae	<i>Tectona grandis</i> L. fil <i>Avicennia tomentosa</i> Jacq <i>Avicennia officinalis</i>
Proteaceae	<i>Conospermum teretifolium</i> R. Br.
Leguminosae	<i>Diphysa robinoide</i> Bent
Sapotaceae	<i>Bassia latifolia</i>
Malvaceae	<i>Hibiscus tiliaceus</i>
Scrophulariaceae	<i>Paulownia kawakamii</i>

Fonte: Adaptado de Hussain et al.<sup>15</sup>

A avaliação dos efeitos terapêuticos do LAP teve início em 1968, pelo estudo da sua atividade antineoplásica em modelo experimental com ratos. Os tipos de neoplasias testadas foram carcinoma (755), leucemia (L-1210 e P-1534), sarcoma (180) e carcinossarcoma (256 de Walker), sendo eficaz apenas no carcinossarcoma. Todavia, em 1974, o Instituto Nacional de Câncer (NCI) suspendeu os estudos sobre o LAP, alegando que as elevadas concentrações necessárias para essa substância atuar como quimioterápico eficaz contra as neoplasias humanas eram tóxicas e resultavam em efeitos colaterais. Porém, naquela época, não foram considerados os efeitos do LAP a nível molecular. Sabe-se que se trata de um dos compostos biologicamente ativos mais versáteis dentre as naftoquinonas. São utilizados para o tratamento de câncer, lúpus e infecções de feridas, além de apresentarem propriedades terapêuticas antimetastática, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antiparasitária, leishmanicida, muloscicida, entre outras<sup>15,39</sup>.

O LAP é um composto com estrutura química simples, que pode ser subdividido em compostos mais eficazes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os dois primeiros análogos naturais isolados do LAP foram a alfa lapachona e a BLAP. Esses compostos foram sintetizados a partir do LAP extraído da *T. avellanadae*, usando o procedimento de Hooker de ciclização catalisada por ácido sulfúrico. A protonação do grupo carbonila na posição beta inicia uma série de processos que levam à conversão da beta lapachona em alfa lapachona, em soluções ricas em água e soluções aquosas ácidas. As modificações no anel C da beta lapachona são utilizadas como estratégia para conseguir compostos mais ativos, com índice seletivo apropriado e melhor atividade<sup>18,37</sup> (Figura 4).

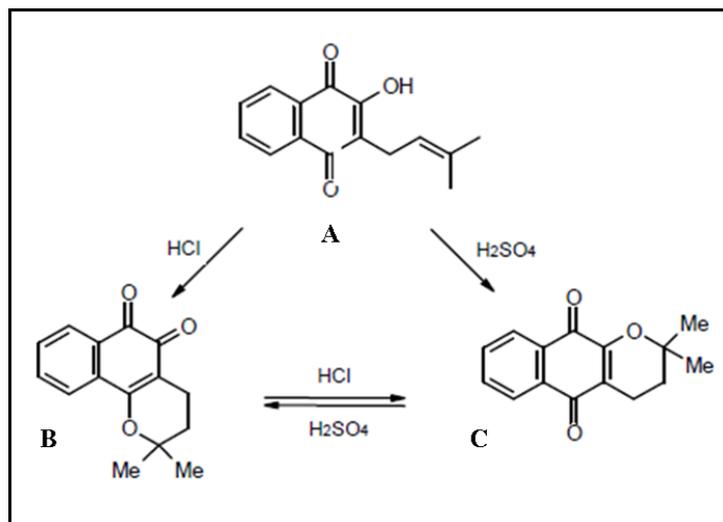


FIGURA 4 – Formação sintética da beta lapachona (B) e alfa lapachona (C) por meio de tratamento ácido do lapachol (A).  
Fonte: Litivack Júnior<sup>40</sup>

### 2.3.3. Beta Lapachona

A BLAP (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]piran-5,6-diona) é uma substância natural obtida a partir do LAP, baseada na reação de ciclização catalisada por ácido. É uma naftoquinona conhecida desde 1858, tendo sido purificada pela primeira vez em 1892. Após um período sem estudos, foi retomada em 1977 a caracterização desta substância<sup>8,15,18</sup>.

Apresenta uma série de ações farmacológicas, incluindo atividades antibacteriana, antifúngica, tripanocida, entre outras, que estão ligadas à formação de espécies reativas de oxigênio. Por ser um substrato da NAD (P) H: oxidorredutase quinina 1 (NQO1), a BLAP facilita a oxidação, dependente de NQO1, de NADH para NAD<sup>+</sup> (Dinucleótido de nicotinamida e adenina), ao receber dois elétrons do NADH, aumentando assim a proporção NAD<sup>+</sup>/NADH. Desta forma, a redução da BLAP é catalisada pela enzima NQO1 no ciclo redox<sup>13,16</sup>.

Neste ciclo, ocorre a oxidação de NADH em NAD<sup>+</sup>. Sirt1 é uma proteína desacetiladora que regula processos metabólicos, como a lipólise, a oxidação da fosfatase alcalina (FA), biogênese mitocondrial e gliconeogênese. Este requer como cofator o NAD<sup>+</sup>. Por apresentar tais propriedades, a BLAP pode ser usada para inibir a cardiomiopatia lipotóxica através da ativação da AMPK (5' adenosina-monofosfato activada proteína quinase) dependente de Sirt1 (Inibidor de tradução induzido por sacarose). Em camundongos com indução experimental de cardiomiopatia lipotóxica, o tratamento com a BLAP preveniu o

remodelamento cardíaco, melhorou as disfunções cardíacas, diminuiu o acúmulo de triacilglicerol no coração e preservou a integridade da mitocôndria<sup>16,17</sup>.

O tratamento com BLAP para a síndrome clínica de doenças mitocondriais (MELAS), em células transmitocondriais citoplásmicas híbridas (*cybrid cells*), promoveu o aumento significativo dos níveis de ATP (Trifosfato de adenosina) mitocondrial, por meio da cadeia respiratória, reduziu a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e restringiu o lactato a um nível quase normal. Restaurou, também, a proporção de NADH / NAD<sup>+</sup>, aumentando a atividade da proteína Sirt1 e dos componentes mitocondriais codificados pelo DNA mitocondrial (mtDNA)<sup>16,17</sup>.

A BLAP é insolúvel em água, o que desfavorece a sua absorção no intestino delgado, visto que medicamentos altamente hidrofóbicos possuem absorção lenta devido à solubilidade limitada nos fluidos gastrointestinais, o que resulta em biodisponibilidade baixa. Em um estudo realizado em 2013, foram sintetizadas micelas em sistema lauril dodecil sulfato de sódio (LDS) para aumentar a taxa de absorção oral da BLAP. Verificou-se que a absorção foi lenta e pouco eficaz no intestino delgado, mas significativa no intestino grosso. A razão para absorção mais eficiente das micelas com BLAP no intestino grosso foi atribuída à menor espessura nesse segmento intestinal da chamada camada pré-epitelial de resistência à difusão (*unstirred layer* ou camada não mexida), que recobre externamente o epitélio da mucosa e é composta principalmente por muco (2-5%) e água (90-95%) e que funciona como barreira limitante da velocidade para absorção das moléculas lipofílicas menores<sup>41</sup>.

#### a) Propriedade citotóxica da BLAP

A BLAP é uma substância com atividade antineoplásica natural. O composto induz a morte das células de câncer por meio de apoptose, necrose e autofagia, com potencial para tratamento de neoplasias<sup>8,13</sup>.

A enzima NQO1, quando ativada pela BLAP, entra no ciclo redox, gerando radicais livres. Normalmente, a enzima reduz quinonas para hidroquinonas estáveis e é então excretada quando conjugada com glucoronido ou sulfato. Alguns tipos específicos de neoplasias apresentam elevados níveis de NQO1, como o câncer de mama, de pulmão de células não pequenas (NSLC), pancreático, de cólon e de próstata, quando comparados a células normais. Dessa forma, esses tumores apresentam maior sensibilidade à ação da BLAP<sup>13,42</sup>.

Esta substância possui ação anticancerígena comprovada, pois induz seletivamente a morte celular em várias linhas celulares de câncer humano. Um dos mais

relevantes mecanismos que permitem a proliferação das células neoplásicas e dificultam o tratamento do câncer é a indução de defeitos nas vias apoptóticas dessas células. Em 2006, foi proposta uma forma de contornar esse problema, a indução da morte celular por necrose. Esta pode ser conseguida pela ativação das vias de resposta ao dano do DNA por meio da BLAP. Também se descobriu que a BLAP ativa transitoriamente PARP1 (Poli [ADP ribose] polimerase 1), o principal regulador das vias de resposta a danos do DNA, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta indução da morte celular por necrose pode ser uma estratégia terapêutica para eliminar seletivamente as células cancerosas<sup>15</sup>.

A BLAP é capaz de inibir o complexo das topoisomerases, este permite que as funções de transcrição, reparação, replicação e estruturação do cromossomo ocorram normalmente. Ao inibir o complexo topoisomerases-DNA, impedindo as topoisomerases de se reconectarem ao DNA e desfazendo o complexo, ocorre a formação de pontos de checagem no processo da divisão celular, induzindo a morte das células malignas (Figura 5). O DNA e a enzima não prosseguem com suas funções normais. Por se multiplicarem com rapidez, as células neoplásicas se tornam um alvo mais sensível aos inibidores da topoisomerases<sup>43,44</sup>.

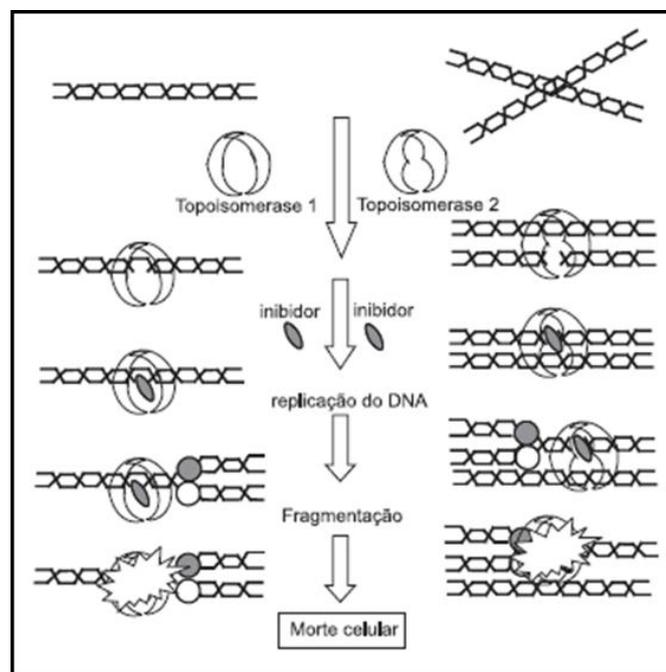


FIGURA 5 – Esquema da formação dos complexos topoisomerases I e II com o DNA, seguida da interação com um inibidor que congela o complexo DNA-Topoisomerases levando à sua fragmentação e à morte celular.

Fonte: Silva et al.<sup>43</sup>

A indução da morte celular por necroptose em células SK-Hep1 do carcinoma hepatocelular humano foi demonstrada em 2014. É importante ressaltar que a morte celular ocorreu de forma independente da caspase 3, enzima induzida no processo de apoptose. O mecanismo de ação para indução da necroptose é dependente de RIP1 (Receptor de interação de proteína 1). A indução da necroptose pela BLAP está associada com a translocação de AIF (Fator indutor de apoptose) mediada por PARP1, fazendo o composto constituir um agente terapêutico eficaz nas células SK-Hep1 de carcinoma hepatocelular humano<sup>42</sup>.

O composto também pode induzir morte por apoptose em células tumorais. A BLAP é citotóxica para as células AGS (ATCC CRL-1739<sup>®</sup>) do adenocarcinoma gástrico humano, bloqueando o ciclo celular na fase sub-G1 e induzindo a apoptose em uma via dependente de caspase. Induz, também, a disfunção mitocondrial, regulando a expressão de proteínas da família Bcl-2 nessas células, reduzindo a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e aumentando a expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Pode promover a morte celular por apoptose intrínseca, por ativação da caspase 9, que induz a perda da permeabilidade da membrana celular, podendo ocorrer eventualmente a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol. A BLAP também pode ativar a via de sinalização extrínseca da apoptose, induzindo caspase 8 que promove a liberação do citocromo c da mitocôndria, que por sua vez ativa a via intrínseca. A BLAP diminui a fosforilação e as formas ativadas da via PI3K/Akt sem alterar seus níveis totais, podendo ocorrer uma inativação dessa via<sup>45</sup>.

A BLAP inibiu eficazmente o crescimento de células do carcinoma escamoso oral da linhagem HN22 e HSC4 ao promover a condensação de DNA e corpos apoptóticos no núcleo das células. O tratamento inibiu a proliferação celular, levando à morte por apoptose. O composto suprimiu a expressão do Sp1 nas células cancerígenas. Sp1 desempenha um papel importante na gênese tumoral por meio da regulação de transcrição de genes relacionados com o crescimento e a proliferação celular. A BLAP promove a regulação negativa dessa proteína. PARP (Poli [ADP ribose] polimerase) e PARP clivada são usadas como indicadores de indução da apoptose. O bloqueio do ciclo celular por proteínas incluindo p27 (proteína 27) e p21 (proteína 21) foram melhoradas significativamente de forma dose-dependente da BLAP. A inibição da proliferação e sobrevivência celular foi associada a proteínas como caciclina D1 e a survivina. O tratamento das células do carcinoma escamoso oral pela BLAP induziu a regulação negativa do Sp1, resultando no bloqueio do ciclo celular e na indução da apoptose<sup>46</sup>.

Esta substância possui atividade citotóxica em células de osteossarcoma canino, diminuindo a viabilidade celular. Houve crescimento pouco significativo após o ensaio de sobrevivência clonogênica, demonstrando que a capacidade de proliferação celular diminuiu após a exposição à BLAP, diminuindo a possibilidade de recidivas. O mecanismo de ação da substância foi pela indução da apoptose intrínseca, relacionada com a ruptura da integridade do potencial de membrana das mitocôndrias e o bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1<sup>47</sup>.

#### b) Propriedade anti-inflamatória da BLAP

Foi investigado o mecanismo molecular anti-inflamatório da BLAP em células de micróglia BV2 (células microgliais primárias infectadas com retrovírus portador de oncogenes), em resposta aos mecanismos pró-inflamatórios induzidos por lipopolissacarídeos (LPS). O tratamento com a BLAP inibiu a expressão de mRNA (RNA mensageiro) das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), interleucina-1 beta (IL-1 beta) e interleucina (IL-6), óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), metaloproteinases (MMP), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), PI3K / Akt de sinalização. Todas desempenham um papel crítico no processo de ativação da micróglia e a fosforilação de três tipos de MAPKs e Akt. As vias das MAPK são conhecidas por serem importantes para a expressão de iNOS e ciclo oxigenase-2 (COX-2), sendo as MAPK alvos específicos de atuação para respostas inflamatórias, portanto envolvidas no processo inflamatório<sup>48,49,50</sup>.

A BLAP suprimiu também a ativação do fator nuclear kapa B (NF-kapaB) e AP-1 (Ativador de proteína-1), fatores de transcrição moduladores da expressão do gene das citocinas e da iNOS, bloqueando a degradação de IkapaBalfa (Fator nuclear kapa polipeptídeo estimulador do gene em células B-inibidor alfa) e a regulação negativa das MAPK, p38 (proteína 38) e ERK (quinase regulada extra-celularmente), além do Akt. As metaloproteinases MMP-3, MMP-8 e MMP-9 são importantes mediadores pró-inflamatórios em micróglia ativadas. A BLAP inibiu significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), por meio da supressão da expressão e fosforilação do subcomponente p47phox da NQO1 do citosol, uma importante enzima para a liberação microglial de ROS. Inibiu, também, a expressão de mRNA de gp91phox<sup>48,49,50</sup>.

HO-1 (heme-oxigenase) e NQO1 são mediadores dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios na micróglia ativada. O inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP-2) e a interleucina (IL-10) desempenham um papel anti-inflamatório. A BLAP aumentou a expressão de HO-1, NQO1, TIMP-2 e IL-10. O mecanismo envolvido na ação anti-inflamatória e anti-oxidante da BLAP é a ativação das vias de sinalização Nrf2/ARE (Fator

eritróide nuclear 2/ Elemento de resposta antioxidante), PKA/CREB (Proteína quinase A/ Proteína de ligação do elemento), MAPK<sub>s</sub> e PI3K/Akt. Este resultado mostra que a BLAP pode ser um potencial agente anti-inflamatório, podendo atuar em doenças inflamatórias<sup>48,49,50</sup>.

Nos macrófagos alveolares e nos anéis do endotélio da aorta torácica a BLAP inibiu a indução da produção de nitrito pelos lipopolissacarídeos, por meio da supressão da expressão de mRNA de iNOS sem ação citotóxica. O diferencial desse relato foi a ausência do efeito em níveis de nitritos basais nas células, as quais foram induzidas por LPS, mas tratadas após a retirada destes. Nos anéis aórticos, foi induzido um aumento da contração pela fenilefrina, que foi diminuída ao máximo pela indução dos LPS. A BLAP inverteu a ação dos LPS, comprovando a ação anti-inflamatória<sup>51</sup>.

As células endoteliais de linhagem ECV304 foram tratadas com BLAP, sendo a dose máxima de 4mM não citotóxica para essas células. Houve efeito citoprotetor da BLAP nas células endoteliais pré-tratadas com 2mM e 4mM, sendo reduzida significativamente a morte celular induzida por TNF-alfa. A BLAP aumentou a quantidade de NADH em relação a NAD<sup>+</sup>, diminuindo a ativação de NQO1. Aumentou também o nível de expressão de HO-1 pelo aumento da fosforilação de AMPK nas células endoteliais<sup>52</sup>.

### c) Propriedade antioxidante da BLAP

A ação antioxidante da BLAP ocorre por meio do estímulo da expressão de genes enzimáticos antioxidantes de fase II pela sinalização AMPK, Akt, Nrf2. Ela inibe a morte celular e a produção de ROS pela supressão da expressão e / ou fosforilação de NADPH e das proteínas da subunidade oxidase, como p47phox e gp91phox. Induz a expressão de HO-1, NQO1, catalase e MnSOD. Aumenta a glutatona intracelular, a transcrição e a ligação de proteínas nucleares de ARE, a quantidade celular total e translocação nuclear de Nrf2 e c-Jun. Aumenta, também, a fosforilação de AMPK, Akt e p 38 MAPK, sendo AMPK e PI3K/Akt envolvidos na atividade transcricional mediada por Nrf2-ARE. AMPK é um modulador a montante da ativação de PI3K/Akt e Nrf2/ARE<sup>7,50,52</sup>.

AMPK é uma molécula de sinalização importante que rege a expressão de genes de enzimas antioxidantes por meio da modulação das vias PI3K/Akt e Nrf2/ARE em astrócitos tratados com BLAP. NQO1 desempenha um papel importante na indução da expressão da enzima antioxidante por regulação da sinalização AMPK e Akt. A expressão dos genes antioxidantes pela BLAP é mediada pela ativação de AMPK e Akt. A BLAP pode

induzir a expressão de HO-1 em células endoteliais ECV304, aumentando a ativação de AMPK via oxidação de NADH pelo aumento da atividade de NQO1<sup>7,50,52</sup>.

### 3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a ação citotóxica e antioxidante da beta lapachona em células endoteliais.

### 4. HIPÓTESE

Considerando as ações citotóxica e antioxidante da beta lapachona, espera-se encontrar ação antioxidante e não citotóxica em células endoteliais normais da beta lapachona.

### 5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Multiusuário de Cultivo Celular da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG. Para realização da parte experimental foram instituídos dois grupos, um com submissão do processo de isquemia e reperfusão e outro sem a indução da isquemia e reperfusão. A divisão de cada grupo foi realizada da seguinte forma:

- um grupo de controle negativo sem indução de isquemia e reperfusão:
  - C-: células em normoxia em meio de cultura regular até o final do experimento
- um grupo de controle positivo induzido à isquemia e reperfusão:
  - C+: células não tratadas induzidas à 1h de isquemia e 2h de reperfusão
- seis grupos induzidos à isquemia e reperfusão e tratados com BLAP:
  - Grupo 1: adição de 0,01 µM da BLAP em meio de cultura, seguido por isquemia de 1h e reperfusão de 2h
  - Grupo 2: adição de 0,03 µM da BLAP em meio de cultura, seguido por isquemia de 1h e reperfusão de 2h
  - Grupo 3: adição de 0,1 µM da BLAP em meio de cultura, seguido por isquemia de 1h e reperfusão de 2h
  - Grupo 4: adição de 0,3 µM da BLAP em meio de cultura, seguido por isquemia de 1h e reperfusão de 2h

- Grupo 5: adição de 0,01  $\mu\text{M}$  da BLAP em meio de cultura, seguido por isquemia de 1h e reperfusão de 2h
- Grupo 6: adição de 0,03  $\mu\text{M}$  da BLAP em meio de cultura, seguido por isquemia de 1h e reperfusão de 2h

-seis grupos tratados com BLAP:

- Grupo 7: adição de 0,01  $\mu\text{M}$  da BLAP em meio de cultura
- Grupo 8: adição de 0,03  $\mu\text{M}$  da BLAP em meio de cultura
- Grupo 9: adição de 0,1  $\mu\text{M}$  da BLAP em meio de cultura
- Grupo 10: adição de 0,3  $\mu\text{M}$  da BLAP em meio de cultura
- Grupo 11: adição de 0,01  $\mu\text{M}$  da BLAP em meio de cultura
- Grupo 12: adição de 0,03  $\mu\text{M}$  da BLAP em meio de cultura

### 5.1. Cultivo celular

As células endoteliais (EA.hy926, BCRJ 0345, Lote 001100, Passagem Desconhecida) originárias da ATCC (*American Type Culture Collection* - Manassas, VA, USA) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ – Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina (10.000 U.I./ml - 10 mg/ml), anfotericina B e L glutamina (todos os reagentes da Cultilab, Campinas, Brasil) e mantidas em incubadora umidificada a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, de acordo com adaptação de Manea et al<sup>53</sup>.

### 5.2. Reagentes

A BLAP foi adquirida da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA). As alíquotas de teste foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido, Cultilab, Campinas, Brasil) na concentração de 1 mM e armazenadas a -20°C.

### 5.3. Ensaio de isquemia / reperfusão

A técnica executada foi adaptada de Zhu et al<sup>30</sup>. As células foram incubadas por 24 horas na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de cultivo com 96 poços, em incubadora umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As placas do grupo sem isquemia/reperfusão foram tratadas com a BLAP nas concentrações 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,03  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  pelo período de 24 horas de acordo com a descrição de cada grupo

acima e permaneceram na incubadora até o momento do ensaio da viabilidade celular. No grupo submetido à isquemia e reperfusão as células foram tratadas com BLAP nas concentrações 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,03  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  pelo período de 24 horas. O grupo controle foi tratado com 0,3  $\mu\text{l}$  de DMSO para garantir que o resultado é devido à ação da BLAP, pois a mesma é diluída em DMSO após aquisição para armazená-la. O DMEM foi substituído pelo tampão isquêmico nas células tratadas e as placas foram então colocadas numa câmara selada (GasPack) contendo a desoxigenação reagente (Microbiology Anaerocult A, Merck Germany), levando ao consumo de  $\text{O}_2$  e à produção de  $\text{CO}_2$  após quatro horas da ação do mesmo, proporcionando a isquemia por uma hora após este período de quatro horas. A reperfusão foi realizada com meio DMEM, após período de isquemia, com duração de duas horas.

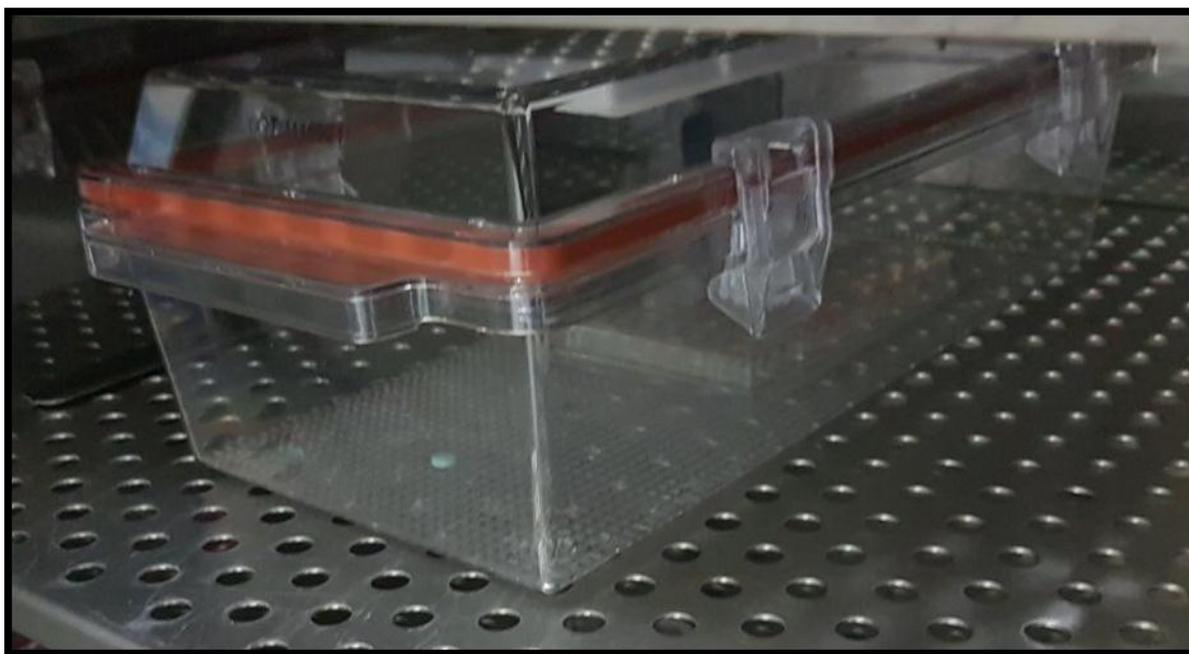


FIGURA 6 – Imagem da câmara selada GasPack utilizada para simular isquemia.  
Fonte: Arquivo Pessoal

#### 5.4. Ensaio da citotoxicidade e viabilidade celular pelo método de redução do tetrazólio

A técnica realizada foi adaptada de He et al<sup>29</sup>. Após o período de tratamento e isquemia/reperfusão, o meio DMEM foi descartado e foi adicionado, em cada poço, 10  $\mu\text{l}$  de tetrazólio (MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-diphnyl-2H-tetrazólio). As placas foram incubadas por três horas. Acrescentou-se 50  $\mu\text{l}$  de sodium dodecyl sulfato (SDS – Vivantis Biochemical) a 10% diluído em HCl (0,01N) por poço, para finalizar a reação do MTT. As placas foram mantidas por 24 horas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A densidade

óptica foi quantificada em espectrofotômetro (KHB ST-360, 570 nm). Os resultados obtidos do espectrofotômetro foram transformados em porcentagens para análise, através das equações seguintes.

A citotoxicidade foi determinada pela seguinte equação, nas placas não submetidas à isquemia/reperfusão:

$$\% \text{ CT} = 100 - [(\text{abs tratamento} / \text{abs controle}) \times 100]$$

na qual, CT é a citotoxicidade; e abs é a absorbância.

A viabilidade celular foi determinada pela seguinte equação, nas placas submetidas á isquemia/reperfusão:

$$\% \text{ VC} = (\text{abs tratamento} / \text{abs controle}) \times 100$$

na qual, VC é a viabilidade celular; e abs é a absorbância.

### **5.5. Análise estatística**

Foi realizada análise de variância e teste de Tukey (5% de significância) para comparar médias de viabilidade celular (%) das diferentes concentrações de BLAP ( $\mu\text{M}$ ). Utilizou-se o software R (R Core Team, 2017) e o pacote easyanova (Arnhold, 2013) para auxílio nas análises estatísticas. Para o ensaio foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.

## **6. RESULTADOS**

No grupo que não foi submetido à isquemia e reperfusão não houve diferença estatística na comparação das médias entre as concentrações e o grupo controle. A BLAP possivelmente não teve ação citotóxica, pois os valores encontrados foram muito baixos, indicando pequena mortalidade celular.

TABELA 1 – Citotoxicidade celular do grupo não submetido à isquemia e reperfusão, tratados com BLAP.

Concentração de BLAP ( $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidade Celular (%)	p*	Coefficiente de Variância (%)
0 (controle)	0		
0,01	3,7 <sup>A</sup>		
0,03	5,3 <sup>A</sup>		
0,1	5,6 <sup>A</sup>	0,0842	3,54
0,3	3,9 <sup>A</sup>		
1	7,4 <sup>A</sup>		
3	10 <sup>A</sup>		

\*Valor de probabilidade do teste de Tukey e análise de variância.

No grupo submetido à isquemia e reperfusão foi analisado o efeito antioxidante. Notou-se aumento da viabilidade celular dose dependente (Tabela 2). No entanto, não houve diferença estatística na comparação das médias entre as concentrações e o grupo controle. Não foi possível constatar o efeito antioxidante da BLAP sob as condições desse experimento.

TABELA 2 – Viabilidade celular de células submetidas à isquemia e reperfusão, tratadas com Beta Lapachona (BLAP).

Concentração de BLAP ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidade Celular (%)	p*	Coefficiente de Variância (%)
0 (controle)	100		
0,01	93,7 <sup>A</sup>		
0,03	98 <sup>A</sup>		
0,1	100 <sup>A</sup>	0,0842	3,54
0,3	102,9 <sup>A</sup>		
1	101 <sup>A</sup>		
3	103 <sup>A</sup>		

\*Valor de probabilidade do teste de Tukey e análise de variância.

## 7. DISCUSSÃO

O modelo experimental utilizado para simular a isquemia foi uma câmara selada, que criou condições quase anaeróbicas, corroborando com o estudo de Zhu et al<sup>30</sup>, no qual também foi utilizada uma câmara selada que criou condições muito próximas à anaerobiose, com uma concentração de oxigênio menor que 1%.

A I/R pode ser induzida de forma experimental, com o intuito de aprimorar o conhecimento do mecanismo de ação e propiciar o estudo de substâncias antioxidantes e avaliar a possível citotoxicidade da mesma. No presente estudo foram utilizadas células endoteliais, assim como outro estudo utilizou modelo experimental *in vitro* como células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC)<sup>31</sup>. Também pode ser usada células endoteliais humanas EA.hy 926, que foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para simular as lesões e os mecanismos do estresse oxidativo, um dos mecanismos da isquemia e reperfusão<sup>32</sup>, assim como no presente estudo, o qual utilizou células endoteliais humanas EA.hy 926. Desta forma é possível minimizar o uso de animais em pesquisas. No entanto modelos experimentais *in vivo* também já foram utilizados como ratos, que foram submetidos a isquemia e reperfusão nos mais diversos órgãos<sup>28,36,37</sup>.

A maior concentração utilizada da BLAP neste experimento foi de 3,0 µM, corroborando com o estudo no qual a BLAP não teve ação citotóxica com dosagens até 4,0 µM em células endoteliais cultivadas<sup>52</sup>. Outra observação importante é que, diferente do presente estudo, grande parte dos ensaios que registraram citotoxicidade da BLAP foram realizados em células neoplásicas. Células cancerígenas são sensíveis à ação da BLAP por conter altos níveis da enzima NQO1, porém células normais contém uma quantidade inferior desta enzima sendo mais resistentes à ação citotóxica da BLAP<sup>56</sup>. A ausência de ação citotóxica em células normais, registrada neste estudo, confirma a ação citotóxica discriminatória da BLAP em células tumorais.

A BLAP é uma substância com atividade antineoplásica natural, pois induz a morte das células de câncer por meio de apoptose, necrose e autofagia. É um composto com potencial para tratamento de neoplasias<sup>8,13</sup>, porque tem ação seletiva não citotóxica em células normais e possivelmente irá causar poucos efeitos colaterais. Esta substância possui atividade citotóxica, tendo sido utilizada a dose de 0,3 µM, em células de osteossarcoma canino, diminuindo a viabilidade celular. Houve crescimento pouco significativo após o ensaio de sobrevivência clonogênica, demonstrando que a capacidade de proliferação celular diminuiu após a exposição à BLAP, diminuindo a possibilidade de recidivas. O mecanismo de ação da substância foi indução da apoptose intrínseca, relacionada com a ruptura da integridade do potencial de membrana das mitocôndrias e o bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, inibindo o crescimento celular, independentemente da concentração<sup>47</sup>. A dose citotóxica em células tumorais utilizada de 0,3 µM, é expressivamente menor que a dose não citotóxica em células normais de 3,0 µM, utilizada na presente pesquisa. Por isso, foi definido esta dosagem de 3,0 µM a dose máxima utilizada, neste estudo.

Não foi possível constatar o efeito antioxidante da BLAP sob as condições desse experimento, por isso novos estudos, com diferentes dosagens e tempos de exposição ao composto devem ser realizados para nova análise da propriedade antioxidante. Outros autores, no entanto, relataram efeitos antioxidantes da BLAP em células endoteliais ECV 304 e em células astrocíticas, com inibição da produção de espécies reativas de oxigênio e indução de vias de sinalização para produção de enzimas antioxidantes de fase II<sup>7,52</sup>. Similarmente, o resveratrol teve ação antioxidante em células endoteliais EA.hy 926 por meio da indução das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase 1 e supressão de genes pro-oxidativos, como NADPH oxidase, abolindo completamente o estresse oxidativo a qual foram induzidas<sup>57</sup>.

BLAP teve ação antioxidante também em modelo experimental ratos submetidos a isquemia e reperfusão renal. Foram analisadas a função renal, o estresse oxidativo e a apoptose tubular após I/R. Em animais não tratados com BLAP foram detectados níveis aumentados de nitrogênio ureico e creatinina, danos tubulares, estresse oxidativo e apoptose. No grupo tratado com BLAP melhorou significativamente a função renal pela ativação de NQO1, que tem um papel protetor contra a lesão renal induzida por I/R e que esse efeito parece ser mediado pela diminuição da atividade NOX através da modulação celular NADPH / NADP + também pela BLAP<sup>58</sup>.

As doses máximas com ação antioxidante da BLAP usadas nos estudos com células microgliais BV2<sup>53</sup>, microgliais primárias<sup>53</sup>, ECV 304<sup>52</sup>, foram 2  $\mu\text{M}$  e 4  $\mu\text{M}$ , assim como no presente estudo a dose máxima utilizada foi 3,0  $\mu\text{M}$ . Porém para o tipo celular investigado não foi testada dosagens maiores para analisar o possível efeito antioxidante. No estudo de Byun et al<sup>52</sup> o efeito citotóxico foi acima de 10  $\mu\text{M}$ , portanto novas pesquisas com dosagens maiores para estas células endoteliais são necessárias.

## 8. CONCLUSÃO

A BLAP não apresentou ação citotóxica ou antioxidante em células endoteliais humanas experimentalmente submetidas à isquemia e reperfusão, nas condições desse experimento.

## REFERÊNCIAS

1. Zhang M, Pan H, Xu Y, Wang X, Qiu Z, Jiang L. Allicin Decreases Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells through Suppression of Mitochondrial Dysfunction and Activation of Nrf2. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:2255-2267.
2. Jin Q, Li R, Hu N, Xin T, Zhu P, Hu S, Ma S, Zhu H, Ren J, Zhou H. DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways. *Redox Biology* 2018; 14: 576–587.
3. Wang AL, Niu Q, Shi N, Wang J, Jia XF, Lian HF, et al. Glutamine ameliorates intestinal ischemia-reperfusion Injury in rats by activating the Nrf2/Are signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(7):7896-904.
4. Pachori AS, Melo LG, Zhang L, Solomon SD, Dzau VJ. Chronic recurrent myocardial ischemic injury is significantly attenuated by pre-emptive adeno-associated virus heme oxygenase-1 gene delivery. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(3):635-43.
5. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol*. 2008;591(1-3):66-72.
6. Wang B, Sun J, Ma Y, Wu G, Tian Y, Shi Y, Le G. Resveratrol preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and attenuates oxidative stress in regulatory T cells of mice fed a high-fat diet. *J Food Sci*. 2014;79(9):H1823-31.
7. Park JS, Lee YY, Kim J, Seo H, Kim HS.  $\beta$ -Lapachone increases phase II antioxidant enzyme expression via NQO1-AMPK/PI3K-Nrf2/ARE signaling in rat primary astrocytes. 2016; S0891-5849(16)30271-4.
8. Ferreira SB, Gonzaga DTG, Santos WC, Araújo KGL, Ferreira VF.  $\beta$ -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Rev Virtual Quim*. 2010;2:140-60.
9. Stockman AL, Brancalion PHS, Novembre ADLC, Chamma HMCP. Sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. – Bignoniaceae): temperatura e substrato para o teste de germinação. *Rev Bras Sementes*. 2007;29:139-43.
10. Sousa CD, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2006;20:135-42.
11. Silva AR. Obtenção de derivados do lapachol e de compostos relacionados [Tese]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas; 2009.
12. Caruso F, Martinez MA, Rossi M, Goldberg A, Villalba EC, Aymonino P. Crystal and molecular structure of manganese (II) lapacholate, a novel polymeric species undergoing temperature-reversible metal to ligand electron transfer. *Inorg chem*. 2009;48:3529-34.

13. Pinto AV, Castro SL. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules*. 2009; 14:4570-90.
14. Epifano F, Genovese S, Fiorito S, Mathieu V, Kiss R. Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. *Phytochem Rev*. 2014;13:37–49.
15. Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, Miana GA, Green IR. Lapachol: an overview. *Arkivoc*. 2007;2:145-71.
16. Jeong MH, Kim JH, Seo KS, Kwak TH, Park WJ.  $\beta$ -Lapachone attenuates mitochondrial dysfunction in MELAS hybrid cells. *Biochem Bioph Res Comm*. 2014;454:417–22.
17. Jeong MH, Tran NKS, Kwak TH, Park BK, Lee CS, Park TS, Lee YH, Park WJ, Yang DK.  $\beta$ -Lapachone ameliorates lipotoxic cardiomyopathy in Acyl CoA synthase transgenic mice. *PLoS ONE* 2014: 91039. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091039>.
18. Du L, Li MD, Zhang Y, Xue J, Zhang X, Zhu R, Cheng SC, Li X, Phillips DL. Photoconversion of  $\beta$ -lapachone to  $\alpha$ -lapachone via a protonation-assisted singlet excited state pathway in aqueous solution: a time-resolved spectroscopic study. *J Org Chem*. 2015. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.joc.5b00086>.
19. Lee SE, Yang H, Son GW, Park HR, Park CS, Jin YH, et al. Eriodictyol Protects Endothelial Cells against Oxidative Stress-Induced Cell Death through Modulating ERK/Nrf2/ARE-Dependent Heme Oxygenase-1 Expression. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):14526-39.
20. Vani MG, Kumar KJ, Liao JW, Chien SC, Mau JL, Chiang SS, et al. Antcin C from *Antrodia cinnamomea* Protects Liver Cells Against Free Radical-Induced Oxidative Stress and Apoptosis In Vitro and In Vivo through Nrf2-Dependent Mechanism. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:296082.
21. Pachori AS, Smith A, McDonald P, Zhang L, Dzau VJ, Melo LG. Heme-oxygenase-1-induced protection against hypoxia/reoxygenation is dependent on biliverdin reductase and its interaction with PI3K/Akt pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(5):580-92.
22. Silva Jr OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir. Bras*. 2002; 17
23. Jeong JS, Kim D, Kim KY, Ryu S, Han S, Schin BS, Kim GS, Gwak MS, Ko JS. Ischemic Preconditioning Produces Comparable Protection Against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury Under Isoflurane and Sevoflurane Anesthesia in Rats. *Transplantation Proceedings*. 2017;49: 2188e2193
24. He K, Xia L, Zhang J. LPS ameliorates renal ischemia/reperfusion injury via Hsp27 up-regulation. *Int Urol Nephrol*. 2017. DOI 10.1007/s11255-017-1735-3
25. Rossello X, Riquelme JÁ, Davidson SM, Yellon DM. Role of PI3K in myocardial ischaemic preconditioning: mapping pro-survival cascades at the trigger phase and at reperfusion. *J. Cell. Mol. Med*. 2017; 1-10. doi: 10.1111/jcmm.13394

26. Zhao B, Liu L, Leng Y, Yuan Q, Hou J, WU Y, Gao W. The role of histone deacetylase inhibitors in regulation of Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in mice following transient focal cerebral ischemia. *Acta Cir. Bras.* 2017;32(10):862-872. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020170100000008>
27. Zheng J, Cui E, Yang H, Li M, Zhou J, Yan M, Sun J, Tang DR. Targeting cyclophilin-D by compound 19 protects neuronal cells from oxygen glucose deprivation/re-oxygenation. *Oncotarget.* 2017; 8: 90238-90249
28. Tang Y, Zhou G, Yao L, Xue P, Yu D, Xu R, Shi W, Yao X, Yan Z, Duan JÁ. Protective effect of *Ginkgo biloba* leaves extract, EGb761, on myocardium injury in ischemia reperfusion rats *via* regulation of TLR-4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Oncotarget.* 2017; 8:86671-86680
29. He X, Li S, Fang X, Liao Y. TDCPP protects cardiomyocytes from hypoxia-reoxygenation injury induced apoptosis through mitigating calcium overload and promotion GSK-3 $\beta$  phosphorylation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2018;92: 39–45.
30. Zhu T, Yao Q, Hu X, Chen C, Yao H, Chao J. The Role of MCPIP1 in Ischemia/Reperfusion Injury-Induced HUVEC Migration and Apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 2015;37:577-591. DOI: 10.1159/000430378
31. Seto SW, Chang D, Ko WM, Zhou X, Kiat H, Bensoussan A, Lee SMY, Hoi MPM, Steiner GZ, Liu J. Sailuotong Prevents Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Induced Injury in EA.hy926 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 95. Doi:10.3390/ijms18010095
32. Xia B, Liu H, Xie J, Wu R, Li Y. Akt enhances nerve growth factor-induced axon growth *via* activating the Nrf2/ARE pathway. *Int J Mol Med.* 2015.
33. Liu XM, Peyton KJ, Shebib AR, Wang H, Durante W. Compound C stimulates heme oxygenase-1 gene expression *via* the Nrf2-ARE pathway to preserve human endothelial cell survival. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(4):371-9.
34. Park SY, Bae YS, Ko MJ, Lee SJ, Choi YW. Comparison of anti-inflammatory potential of four different dibenzocyclooctadiene lignans in microglia; action *via* activation of PKA and Nrf-2 signaling and inhibition of MAPK/STAT/NF-kappaB pathways. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(4):738-48.
35. Zeng Z, Huang HF, Chen MQ, Song F, Zhang YJ. Contributions of heme oxygenase-1 in postconditioning-protected ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Transplant Proc.* 2011;43(7):2517-23.
36. Wang AL, Niu Q, Shi N, Wang J, Jia XF, Lian HF, et al. Glutamine ameliorates intestinal ischemia-reperfusion Injury in rats by activating the Nrf2/Are signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):7896-904.
37. Costa WF, Oliveira AB, Nepomuceno JC. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene wt. *Genet Mol Res.* 2010;10(4):3236-45.

38. Fieser LF. The alkylation of hydroxynaphthoquinone III. A synthesis of lapachol. <http://pubs.acs.org>. 1927. doi: 10.1021/ja01402a030.
39. Rao KV, McBride TJ, Oleson JJ. Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor agent. *Cancer Res.* 1968;28:1952-4.
40. Litivack Jr JT. Síntese de novos adutos de lapachol com aminas alifáticas [Dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Química; 2009.
41. Jang SB, Kim D, Kim SY, Park C, Jeong JH, Kuh HJ, Lee J. Impact of micellar vehicles on *in situ* intestinal absorption properties of beta-lapachone in rats. *Kor J Physiol Pharmacol.* 2013;17:9-13.
42. Park EJ, Min KI, Lee IJ, Yoo YH, Kim YS, Kwon TK.  $\beta$ -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. *Cell Death Dis.* 2014,5(5):1230. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4047891/>.
43. Silva MN, Ferreira VF, Souza MCBV. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. *Quim Nova.* 2003;26:407-16.
44. Kleiner JA, Silva EG. Tumores ósseos em . *MedVep.* 2003;1(3):193-200.
45. Yu HY, Kim SO, Jin CY, Kim GY, Kim WJ, Yoo YH, Choi YH.  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis of human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K/Akt pathway. *Biomol Ther.* 2014;22(3):184-92.
46. Jeon YJ, Bang W, Shin JC, Park SM, Cho JJ, Choi YH, Seo KS, Choi NJ, Shim JH, Chael JI. Downregulation of Sp1 is involved in  $\beta$ -lapachone-induced cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2015;46:2606-12.
47. Pimenta VSC. Propriedades citotóxicas da  $\beta$ -lapachona em células de osteossarcoma canino *in vitro* [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2015.
48. Moon DO, Choi YH, Kim ND, Park YM, Kim GY. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int Immunopharm.* 2007;7:506-14.
49. Tseng CH, Cheng CM, Tzeng CC, Peng S, Yang CL, Chen YL. Synthesis and anti-inflammatory evaluations of  $\beta$ -lapachone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(2):523-31.
50. Lee EJ, Ko HM, Jeong YH, Park EM, Kim HS.  $\beta$ -Lapachone suppresses neuroinflammation by modulating the expression of cytokines and matrix metalloproteinases in activated microglia. *J Neuroinflammation* 2015;12:133. Disponível em: <http://www.jneuroinflammation.com/content/12/1/133>.

51. Liu SH, Tzeng HP, Kuo ML, Shiau SYL. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by b-lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. *Brit J Pharmacol*. 1999;126:746-75.
52. Byun SJ, Son Y, Pae HO. Cytoprotective effect of  $\beta$ -lapachone by inducing heme oxygenase-1 expression and AMP-activated protein kinase activation in human endothelial cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18: 949-58.
53. Manea SA, Fenyo IM, Manea A. c-Src tyrosine kinase mediates high glucose-induced endothelin-1-expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016;123–130
54. ARNHOLD, E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.50, n.6, p.488-492, 2013.
55. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
56. Kung HN, Lu KS, Chau YP. The Chemotherapeutic Effects of Lapacho Tree Extract:  $\beta$ -Lapachone. *Chemotherapy* 2014, 3:2 <http://dx.doi.org/10.4172/2167-7700.1000131>.
57. Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, Forstermann U, Li H. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (sod1), glutathioneperoxidase 1 (gpx1) and nadph oxidase subunit (nox4). *Journal of physiology and pharmacology*. 2009;60, suppl 4, 111-116
58. Gang GT, Hwang JH, Kim YH, Noh JR, Kim KS, Jeong JY, Choi DE, Lee KW, Jung JY, Shong M, Lee CH. Protection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 against renal ischemia/reperfusion injury in mice. [Free Radical Biology and Medicine](#). 2014;139-149



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AÇÃO ANTIOXIDANTE DA BETA LAPACHONA NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

**Pesquisador:** PATRICIA DE ALMEIDA MACHADO

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 1

**CAAE:** 60392816.7.0000.5083

**Instituição Proponente:** Escola de Veterinária e Zootecnia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.840.500

#### Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado trata-se de uma dissertação de mestrado que versa sobre a ação da beta lapachona, uma substância extraída da casca da *Tabebuia* sp. Essa substância possui propriedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antimalárica. A proposta do projeto é verificar a ação da beta lapachona como agente antioxidante, para proteção e tratamento terapêutico, no cultivo das células endoteliais induzidas experimentalmente à isquemia e reperfusão. A isquemia é a diminuição ou ausência de circulação sanguínea para um tecido e reperfusão é o retorno sanguíneo ao tecido. São processos nos quais há a privação de oxigênio e nutrientes para as células durante a isquemia e formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio na reperfusão, que provocam lesões celulares, e, dependendo da extensão da lesão, podem resultar na disfunção do órgão.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Verificar a possível ação antioxidante da beta lapachona no tratamento terapêutico de células endoteliais induzidas experimentalmente à isquemia e reperfusão.

**Endereço:** Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

**Bairro:** Campus Samambaia

**CEP:** 74.001-970

**UF:** GO

**Município:** GOIANIA

**Telefone:** (62)3521-1215

**Fax:** (62)3521-1163

**E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.840.500

#### Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis de proteínas oxidadas presentes nas células endoteliais
- Avaliar os níveis de MDA livre para avaliação da lipoperoxidação
- Avaliar os níveis de ativação das vias de transdução de sinal pró-sobrevivência e anti-apoptóticos
- Avaliar os níveis de apoptose presente no composto celular
- Avaliar ação da beta lapachona nas células em condições normais

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Serão utilizadas células endoteliais humanas comercializadas, portanto não haverá contato com participantes. Os pesquisadores apontam a contaminação das células como um risco, mas isso é um risco para o desenvolvimento do trabalho e não para o participante, mesmo porque ele inexistente neste projeto. Com relação aos benefícios, os pesquisadores esperam que a beta lapachona tenha ação antioxidante comprovada pelos baixos níveis de proteínas oxidadas e de malonildialdeído (MDA) livre nas células endoteliais, altos níveis de ativação das vias de transdução de sinal pró-sobrevivência e anti-apoptóticos e identificação do tipo de célula produtora das proteínas protetoras.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A isquemia é a diminuição ou ausência de circulação sanguínea para um tecido e reperfusão é o retorno sanguíneo ao tecido. As lesões de reperfusão provocam danos celulares devido a mecanismos biológicos diversos como ativação imunológica, acúmulo de íon e formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e radicais livres. Alguns exemplos de manifestações clínicas decorrentes dessa injúria são: o infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral e falência múltipla de órgãos. Há também exemplos de procedimentos cirúrgicos, como: transplantes, cirurgias vasculares, cirurgias com torniquetes. É importante pesquisar novas terapêuticas antioxidantes para auxiliar no tratamento dessas injúrias causadas pelas lesões de reperfusão, pois há altos índices de morbidade e mortalidade.

O projeto versa sobre a ação da beta lapachona, uma substância extraída da *Tabebuia* sp. (conhecida como ipê), como agente oxidante no cultivo das células endoteliais, induzidas experimentalmente a isquemia e reperfusão, com objetivo de comprovar a ação antioxidante, obtendo dados que resultem em baixos níveis de estresse oxidativo e lipoperoxidação, protegendo as células das lesões e morte. Para tanto, propõe a utilização de células endoteliais humanas, as

**Endereço:** Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

**Bairro:** Campus Samambaia

**CEP:** 74.001-970

**UF:** GO

**Município:** GOIANIA

**Telefone:** (62)3521-1215

**Fax:** (62)3521-1163

**E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.840.500

quais serão adquiridas comercialmente no banco de Celulas do Rio de Janeiro e realização das técnicas de western blot, imunofluorescência e citometria de fluxo para determinar os níveis de proteínas oxidadas presentes nas células endoteliais. Como não haverá recrutamento de participantes, propõe a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os termos obrigatórios, para a presente proposta, foram apresentados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos obrigatórios pertinentes a este projeto foram apresentados, a saber:

Folha de rosto assinada

Informações básicas do projeto

Projeto de pesquisa

Termo de compromisso dos pesquisadores envolvidos

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado, SMJC

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para março de 2017.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_797478.pdf	26/09/2016 17:33:01		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_cep.pdf	26/09/2016 17:32:16	PATRICIA DE ALMEIDA MACHADO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_cep.pdf	26/09/2016 17:29:49	PATRICIA DE ALMEIDA MACHADO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_Patricia_final.docx	22/09/2016 09:31:22	PATRICIA DE ALMEIDA MACHADO	Aceito

**Endereço:** Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

**Bairro:** Campus Samambaia

**CEP:** 74.001-970

**UF:** GO

**Município:** GOIANIA

**Telefone:** (62)3521-1215

**Fax:** (62)3521-1163

**E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 1.840.500

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

GOIANIA, 29 de Novembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**João Batista de Souza**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

**Bairro:** Campus Samambaia

**CEP:** 74.001-970

**UF:** GO

**Município:** GOIANIA

**Telefone:** (62)3521-1215

**Fax:** (62)3521-1163

**E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com