

**MODIFICAÇÃO NA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA PROTEÍNA
BTHTX-I INDUZIDA PELO LAPACHOL**

**PHARMACOLOGICAL ACTIVITY MODIFICATION OF THE PROTEIN
BTHTX-I INDUCED BY LAPACHOL**

**de Santis, L. H.¹; Fagundes, F. H.^{1,2}; Soares, V. C.¹; Paula, V. I.¹; Marangoni, S.²;
Toyama, M. H.³**

¹ Unianchieta, Jundiaí, SP, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia (IB), UNICAMP, Campinas, SP, Brasil;

³ UNESP, Campus do Litoral Paulista, São Vicente, SP, Brasil.

Palavras-chave: anti-inflamatórios, BthTx-I, lapachol, *B. jararacussu*.

Key words: antiinflammatory, BthTx-I, lapachol, *B. jararacussu*.

RESUMO

A naphthoquinona (Lapachol) é um composto encontrado naturalmente como constituinte de muitas plantas da família das *Bignoniaceae*. Esse composto foi estudado por muitos anos devido às atividades biológicas apresentadas. O trabalho atual investigou a ação do lapachol sobre a atividade inflamatória do veneno total de *Bothrops jararacussu* e da sua isoforma de fosfolipase A2 K49 (BthTx-I), através da indução de edema de pata em camundongos “Swiss”, produzido pela injeção subplantar do veneno total e da fração BthTx-I purificada. Os estudos foram realizados incubando-se o veneno e a BthTx-I com o Lapachol (1: 1 e 1: 2 p/p) e demonstraram que o

lapachol foi capaz de diminuir a atividade inflamatória no edema de pata. Novos estudos devem ser realizados para elucidar o seu mecanismo de ação.

ABSTRACT

Lapachol (naphthoquinone) is a compound naturally encountered as a constituent of many Bignoniaceae family plants. It has been the subject of much interest for many years due to biological activities shown. The present study investigated the effect of lapachol on *B. jararacussu* venom and on the K49 PLA₂ isoform (BthTx-I) in anti-inflammatory activity. Edema was induced by intradermal injection, in the foot pad of Swiss mice, of *B. jararacussu* venom and purified BthTx-I. Inhibition studies were performed by incubating venom and BthTx-I with Lapachol at different ratios (1:1 and 1:2 p/p). It has been concluded that Lapachol was capable of neutralizing the anti-inflammatory activity induced by crude venom, and the BthTx-I in paw edema. Further studies should be accomplished to elucidate its mechanism of action.

INTRODUÇÃO

A inflamação pode ser definida como uma reação da microcirculação induzida por uma injúria aos tecidos, com a conseqüente movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas, para o espaço extravascular. Ela é caracterizada por alterações no calibre vascular, seguida por aumento do fluxo sanguíneo, alterações estruturais nos componentes de microcirculação, acarretando aumento da permeabilidade vascular e saída de células e moléculas dos vasos para os tecidos, além de migração de células de defesa (leucócitos) e acúmulo no espaço extravascular, onde ocorreu a injúria (BJORKMAN, 1996).

A busca de novos compostos obtidos a partir de plantas tem proporcionado à indústria farmacêutica uma fonte de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos. A importância histórica desses compostos, como protótipo de categorias terapêuticas, data do século XVIII com a descoberta da digitoxina e, no século seguinte, da morfina, quinina, atropina, efedrina, cocaína e tubocurarina (SCHENKEL et al., 1999).

Os anti-inflamatórios que apresentam melhor eficácia terapêutica são os derivados de corticosteróides, no entanto, a utilização desses fármacos, principalmente a longo prazo, implica efeitos colaterais metabólicos indesejáveis. Como alternativa aos anti-inflamatórios esteroidais encontramos os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que também apresentam contra-indicações e restrições ao seu uso principalmente em indivíduos com problemas gastrointestinais. Atualmente há um melhor conhecimento da fisiopatologia dos processos inflamatórios, e têm-se sugerido diversos níveis de atuação ou estratégia na busca de novos fármacos, dirigidos ao controle de mecanismos específicos relevantes na resposta inflamatória (BJORKMAN, 1996).

Os princípios ativos obtidos a partir de plantas têm se mostrado promissores no tratamento de episódios inflamatórios. A possibilidade de uma grande diversidade química estrutural, que implica atividades farmacológicas distintas, tem sido amplamente explorada em busca de um novo composto com atividade anti-inflamatória.

Quinonas, classe estrutural amplamente distribuída na natureza, são encontradas em plantas, fungos e bactérias. Estruturalmente, possuem anéis aromáticos com duas substituições cetona e são altamente reativas (HUANG et al., 2002). A bioquímica e citotoxicidade das quinonas vêm sendo extensivamente estudadas *in vitro*. Naftoquinonas, por exemplo, sofrem oxidorredução cíclica, formando espécies reativas de oxigênio, pela reação com agentes redutores celulares. Átomos de carbono adjacentes a grupos carbonila são eletrofílicos, tornando as naftoquinonas que não são totalmente substituídas no anel quinona em agentes alquilantes (MUNDAY et al., 1995).

A *Tabebuia avellanedae*, pertencente à família das Bignoniaceae, é uma planta nativa da América do Sul, onde é conhecida como Pau D'Arco, Tahebo ou Ipê Roxo. As cascas dessas árvores são utilizadas na medicina popular como adstringente e anti-reumático, e estudos demonstraram a atividade antitumoral e antimicrobiana atribuída à presença da naftoquinona lapachol. A naftoquinona natural mais conhecida devido à facilidade de extração é o lapachol (Figura 1), sendo material de partida para estudos de seus derivados. (FERREIRA, 2001; BRAZ-FILHO, 2002; VARGAS, 2006).

As fosfolipases A2 (PLA2) são enzimas amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, plantas, tecidos de mamíferos (pulmão, fígado,

baço, coração, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares). No entanto, as mais conhecidas são aquelas encontradas nos tecidos pancreáticos de mamíferos e nos venenos de serpentes e insetos (VERHEIJ et. al., 1980). As PLA2s de serpentes possuem vários efeitos farmacológicos, tais como: neurotoxicidade pré e pós sináptica, miotoxicidade, atividade coagulante (LANDUCCI et al., 1994) e anticoagulante, convulsionante, hipotensiva, hemolítica (ROSENFELD, 1971), hemorrágica e edematológica (KINI; IWANAGA, 1986; KINI; EVANS, 1987). Estas moléculas são enzimas que desempenham importante papel no metabolismo de lipídios com alta especificidade estereo específica para hidrólise da ligação 3sn-fosfoglicídeos na posição sn-2 (DENNIS, 1997).

Trabalhos realizados por Chandra et al. (2002) e Singh et al. (2003) mostram que compostos polifenólicos podem interagir de forma específica com PLA2 secretórias e modificar sua estrutura, podendo induzir a uma redução da atividade farmacológica destas PLA2, principalmente na parte de inflamação.

Apesar de possuir estágios de atuação biológica não muito conhecidos, o lapachol deve atuar por diferentes mecanismos, sendo de interesse investigar a sua atuação no tratamento da inflamação induzida por fosfolipase de venenos de serpentes.

OBJETIVOS

Visto o potencial farmacológico das quinonas, foi avaliada a ação do lapachol, estrutura dessa classe de compostos, isolada e identificada no Centro Universitário Padre Anchieta quanto à atividade anti-inflamatória, quando esta foi induzida por proteína de veneno de cobra.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Extração do lapachol

O lapachol foi extraído a partir da serragem da madeira de ipê amarelo, *Tabebuia avellanedae*, através de uma solução básica de carbonato e bicarbonato de sódio (FERREIRA et al., 2001; FERREIRA et al., 2003). A solução da serragem de ipê

imediatamente se torna vermelha intensa com a adição do meio básico. A mudança de coloração se deve à alteração estrutural dos grupos cromóforos devido à desprotonação fenólica, formando o lapacholato de sódio. O lapacholato de sódio é bastante solúvel em água, sendo assim facilmente separado dos resíduos da serragem da madeira por filtração. A solução resultante, quando acidificada com ácido clorídrico 6M, resulta na protonação do grupo fenólico, formando o lapachol, insolúvel em água, sendo carregado para a superfície pelo gás carbônico (CO₂) e liberado na forma de espuma. O lapachol é cristalizado em etanol e lavado com etanol/água gelada e recristalizado em diclorometano/hexano.

O lapachol poderá ser caracterizado por técnicas de ponto de fusão, infravermelho e RMN de ¹H e ¹³C.

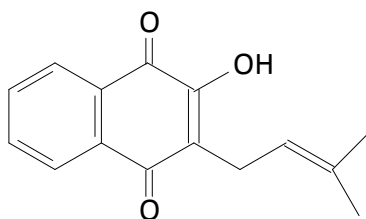


Fig. 1. Estrutura química do lapachol isolado de *Tabebuia avellanedae*.

- VENENOS

O veneno de *Bothrops jararacussu* foi doado pelo Instituto Butantã. Os venenos foram utilizados na forma dessecada e permaneceram conservados a -20° C.

- Purificação da PLA2 do veneno

- Cromatografia de exclusão molecular

Aproximadamente 20,0mg do veneno total foram purificados em uma coluna de exclusão molecular Protein Pack SW 300 (Waters), que foi acoplada ao sistema de cromatografia líquida de baixa pressão “APPS (HPLC) bio preparative – LC 650E”. O sistema cromatográfico foi previamente equilibrado com tampão Bicarbonato de amônio 0,2M, pH 7,9. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 290nm. As frações coletadas foram liofilizadas e estocadas a -20°C.

- HPLC de fase reversa

Tanto o veneno total como suas frações e as PLA₂ foram purificados em HPLC de Fase Reversa. O sistema cromatográfico usado foi o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 515/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 1,0mL e uma coluna μ -microbopak C-18 0,78 X 30 cm, previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5. A eluição das amostras foi realizada usando um gradiente linear com Acetonitrila 66%. As frações foram monitoradas a 280nm.

- Animais de Experimentação

Os camundongos “Swiss” machos utilizados foram fornecidos e mantidos pelo Biotério da UNICAMP.

- Animais e Grupo Controle

No ensaio de edema de pata foram utilizados 5 camundongos “Swiss”, machos, pesando em média 25g, tratados com ração balanceada PURINA-LABINA, água e ração “ad libitum” e ciclo claro-escuro de 12 horas. Foram realizados 2 experimentos independentes e complementados por grupos controles, nos quais os animais foram submetidos exatamente aos mesmos procedimentos que os grupos tratados.

- Modelos Experimentais

Os camundongos receberam injeção subplantar de veneno total e BthTx-I pura com lapachol, na proporção de 1:1 e 1:2 p/p, na pata posterior direita, na dose de 1 μ g/g de peso corporal. A aplicação de solução de NaCl 0,9% foi feita na pata contralateral para controle negativo. Os edemas formados foram medidos com um paquímetro em intervalos de tempo de 0min, 30min, 1h, 2h, 3h, 6h, 9h, 24h após as injeções. Os resultados foram calculados pela diferença entre os valores obtidos em cada pata e foram expressos em porcentagem do aumento do edema da pata direita em relação à pata esquerda (LLORET; MORENO, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A participação das fosfolipases A₂ (PLA₂) do grupo II em processos inflamatórios como artrite reumatóide e asma está bem estabelecida. (BOMALASKI; CLARK,

1993). Vários dados sobre a atividade inflamatória destas enzimas são baseados em estudos experimentais, utilizando PLA₂ purificadas de pâncreas e de venenos ofídicos. A escolha destas PLA₂ se faz devido a sua alta semelhança estrutural e funcional com as PLA₂ originais do organismo que desencadeiam esses fenômenos inflamatórios (PRUZANSKI; VADAS, 1989). As fosfolipases A₂ induzem edema em animais (CIRINO et al., 1989; CHAVES et al., 1998), acarretam degranulação de mastócitos *in vivo* (DAMERAU et al., 1975) e estimulam infiltrado leucocitário na cavidade pleural ou bolsa de ar em camundongos e em pele de coelho (CASTRO et al., 2000). Alguns destes efeitos não estão diretamente relacionados à atividade enzimática destas proteínas, como é o caso da BthTx-I, que não possui atividade enzimática significativa, mas possui uma atividade farmacológica relevante.

Neste ensaio foram avaliados os efeitos do lapachol (1:1 ou 1:2 p/p) sobre a resposta inflamatória induzida pela BthTx-I, no teste de edema de pata em camundongos. Os dados deste experimento foram expressos com o aumento do volume da pata (mm) registrado pelo paquímetro (Figuras 2 e 3).

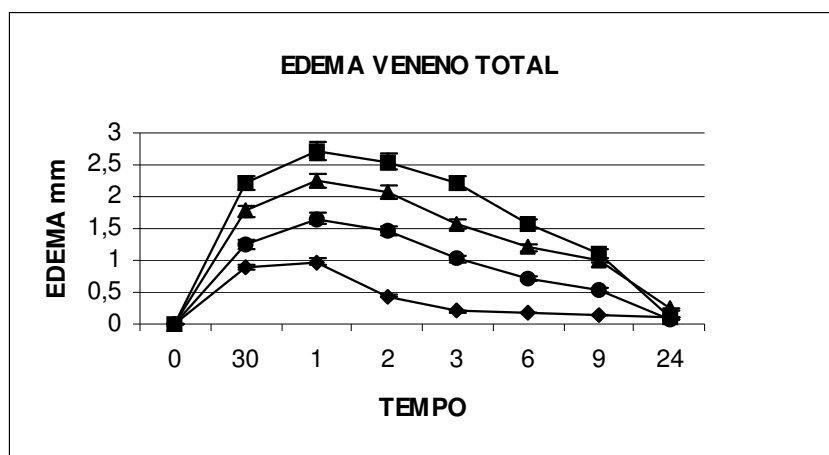


Fig. 2. Atividade edematogênica realizada por injeção subplantar na pata de camundongos. (■) 25µg /pata de veneno total; (▲) 25µg /pata de veneno total + lapachol 1:1; (●) 25µg /pata de veneno total + lapachol 1:2; (◆) Controle com PBS.

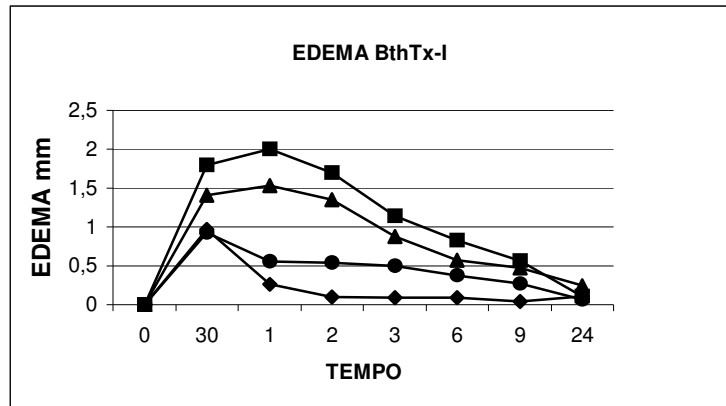


Fig. 3. Atividade edematogênica realizada por injeção subplantar na pata de camundongos. (■) 25µg/pata de BthTx-I; (▲) 25µg/pata de BthTx-I + lapachol 1:1; (●) 25µg/pata de BthTx-I + lapachol 1:2; (◆) Controle com PBS

Os resultados demonstram que o Lapachol possui um potencial efeito anti-inflamatório, inibindo a resposta edematogênica induzida pelo veneno total de *B. jararacussu* e pela fração BthTx-I purificada. Os animais tratados com veneno total incubado com lapachol demonstraram uma diminuição relativa do edema, de acordo com a proporção entre lapachol e veneno total. Os animais tratados com veneno total mais lapachol na proporção de 1:1 tiveram uma redução no edema de aproximadamente 20% em relação aos animais tratados apenas com veneno total; quando aumenta-se a proporção de lapachol para 1:2, observa-se a redução do edema para aproximadamente 40%, demonstrando que o lapachol interage com os componentes do veneno total inibindo sua atividade (Figura 4).

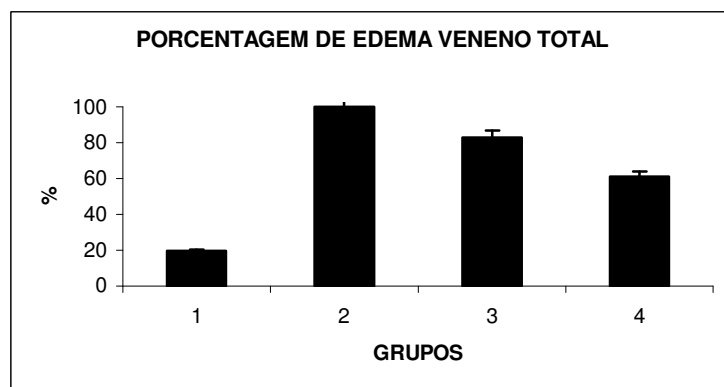


Fig. 4. Aumento do volume da pata depois de 1 hora da injeção de veneno total. Grupo 1, controle com PBS; Grupo 2, 25µg /pata de veneno total; Grupo 3, 25µg /pata de veneno total + lapachol 1:1; Grupo 4, 25µg /pata de veneno total + lapachol 1:2.

Pelo menos três mecanismos são propostos para os efeitos pró-inflamatórios das PLA₂: a) atividade enzimática, b) quantidade de sítios positivos na molécula e c) presença de um sítio farmacológico com participação de resíduos positivos (WANG; TENG, 1990). Estas características colocam estas enzimas como ferramentas de pesquisa importantes para estudos farmacológicos em diversas funções nos organismos.

Com o objetivo de definirmos o principal componente inflamatório do veneno total que provavelmente estaria sendo inibido e o possível mecanismo de ação do lapachol, o veneno total foi fracionado de acordo com Toyama (1995), para obtenção de BthTx-I, que é uma fosfolipase conhecida sem atividade enzimática, mas com atividade farmacológica, a qual induz edema em camundongos. A BthTx-I purificada, quando aplicada nos animais, induziu edema que durou aproximadamente 1h. Quando aplicamos BthTx-I na presença de lapachol nas proporções de 1:1 e 1:2, observamos uma redução significativa no edema, que foi respectivamente de 30% e 70% (Figura 5), mostrando a efetiva ação do lapachol sobre BthTx-I, inibindo a capacidade desta proteína causar inflamação.

Os estudos conduzidos por Singh et al. (2003) sugerem que compostos polifenólicos, como as naftoquinonas, de características hidrofóbicas, podem entrar na cavidade hidrofóbica das PLA₂, mas a inserção e as modificações induzidas na estrutura da PLA₂ dependem da interação destas drogas com determinados resíduos de aminoácidos que podem ser independentes da cavidade hidrofóbica da proteína.

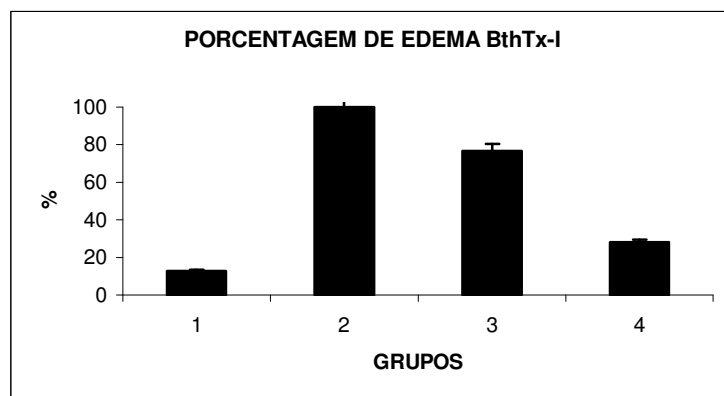


Fig. 5. Aumento do volume da pata depois de 1 hora da injeção de veneno total. Grupo 1, controle com PBS; Grupo 2, 25µg /pata de BthTx-I; Grupo 3, 25µg /pata de BthTx-I + lapachol 1:1; Grupo 4, 25µg /pata de BthTx-I + lapachol 1:2.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o lapachol apresenta atividade contra a inflamação induzida pela proteína BthTx-I extraída de veneno de serpente no modelo de edema de pata. O provável mecanismo de ação está relacionado com a inibição da atividade inflamatória da fosfolipase A₂.

REFERÊNCIAS

- Bjorkman, D. J. Nosteroidal anti inflammatory drug iduced gastrointestinal injury. Am. J. Med. 101: 25-32, 1996.
- Bomalaski J. S, Clark M. A Phospholipase A₂ and arthritis. Arthritis Rheum. 36: 190-8, 1993.
- Braz-Filho, R.; Oliveira, M. F., Lemos, T. L.G.; De Mattos, M. C.; Segundo, T. A.; Santiago, G. M. P. New enamine derivatives of lapachol and biological activity; An. Acad. Bras. Cienc., 74, 2, 2002.
- Chandra, V., Jasti, J., Kaur, P., Betzel, Ch., Srinivasan, A., Singh, T.P. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A₂ by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A₂ and alpha-tocopherol at 1.8 A resolution. J Mol Biol. 5; 320(2): 215-22, 2002.
- Chaves F, Gutierrez Jm, Lomonte B, Cerdas L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. Toxicon.;27: 1085-93, 1989.
- Cirino G, Peers Sh, Wallace Jl, Flower Rj. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. Eur J Pharmacol. 3; 166: 505-10, 1989.
- Damerau B, Lege L, Oldigs Hd, Vogt W. Histamine release, formation of prostaglandin-like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 25; 287: 141-56, 1975.

- De Castro R C, Landucci E C, Toyama M. H, Giglio Jr., Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. *Toxicon*. 38: 1773-85, 2000.
- Dennis, E.A. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci*. 22(1): 1-2, 1997.
- Ferreira, V. F.; Oliveira, C. G. T.; Miranda, F. F.; Freitas, C.C.; Rabello, R. F.; Carballido, J. M.; Corrêa, L. C. D. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 3-Hydrazino-Napthoquinones as Analogs of Lapachol; *J. Braz. Chem. Soc.*, 12, 3, 339-345, 2001.
- Ferreira, V. F.; Silva, M. N.; Souza, M. C. B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados; *Quím. Nova*, 26, 3, 407-416, 2003.
- Huang, S.; Kuo, H.; Hsiao, C.; Lin, Y. Efficient synthesis of redox-switched naphthoquinone thiol-crown ethers and their biological activity evaluation. *Bioorg. Med. Chem.*, v.10, 1947-1952, 2002.
- Kini, Rm.; Evans, HJ. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A2. *J. Biol Chem*. 25; 262(30): 14402-7, 1987
- Kini, Rm.; Iwanaga, S. Structure-function relationships of phospholipases. I: Prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon*. 24(6): 527-41, 1986
- Landucci Ec, Condino-Neto A, Perez Ac, Hyslop S, Corrado Ap, Novello Jc, Marangoni S, Oliveira B, Antunes E, De Nucci G. Crotoxin induces aggregation of human washed platelets *Toxicon*, 32(2): 217-26, 1994.
- Lloret, S.; Moreno, J. J. The edema formation and degranulation of mast ceels by phospholipasse A2 purified from porcine pancreas and snake venom. *Toxicon*, 31, 949-956, 1993.
- Munday, R.; Smith, B. L.; Munday, C. M. Toxicity of 2,3-dialkyl-1,4-naphthoquinones in rats: comparison with cytotoxicity in vitro. *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 6, 759-765, 1995.

- Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A₂ and inflammation. *Ann Rheum Dis.* 48: 962-3, 1989.
- Rosa, M. A. Estudo envolvendo a modificação e a interação do lapachol com compostos de transição. 2000. 95 f. Dissertação de mestrado IQ-UNICAMP, Campinas-SP, 2000.
- Rosenfeld G, Kalen Em. Measurement of the coagulation activity of snake venoms: importance to scientific research and therapeutic application *Rev Paul Med.* 77(4): 149-50, 1971.
- Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Petrovick, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 1999. cap.15, 291-320.
- Singh Rk, Vikram P, Makker J, Jabeen T, Sharma S, Dey S, Kaur P, Srinivasan A, Singh T.P. Design of specific peptide inhibitors for group I phospholipase A₂: structure of a complex formed between phospholipase A₂ from *Naja naja sagittifera* (group I) and a designed peptide inhibitor Val-Ala-Phe-Arg-Ser (VAFRS) at 1.9 Å resolution reveals unique features. *Biochemistry.* 14; 42(40): 11701-6, 2003.
- Toyama, M.H., Mancuso, L.C., Giglio, J.R., Novello, J.C., Oliveira, B., Marangoni, S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. *Biochem Mol Biol Int.* 37(6): 1047-55, 1995.
- Vargas, M. D.; Lima, E. L. S.; Pinto, A. C.; Cunha, A. S.; Esteves-Souza, A.; Echevarria, A.; Camara, C. A.; Torres, J. C. Synthesis of Novel Naphtoquinone-Spermidine Conjugates and their Effects on DNA-Topoisomerases I and II, *J. Braz. Chem. Soc.*, 17, 3, 439-442, 2006.
- Verheij HM, Boffa MC, Rothen C, Bryckaert MC, Verger R, de Haas GH. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. *Eur J Biochem.* 112(1): 25-32, 1980
- Wang J. P, Teng C. M. Comparison of the enzymatic and edema-producing activities of two venom phospholipase A₂ enzymes. *Eur J Pharmacol.* 13; 190:347-54, 1990.