



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SAMÁRIO LINO DOS SANTOS

Estudo sobre os efeitos anti-inflamatórios do ácido *trans*-cinâmico

Maceió - AL,
2018

SAMÁRIO LINO DOS SANTOS

Estudo sobre os efeitos anti-inflamatórios do ácido *trans*-cinâmico

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde sob orientação do professor Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.

Maceió - AL,

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante – CRB: 1664

- S237e Santos, Samário Lino dos.
Estudo sobre os efeitos anti-inflamatórios do ácido trans-cinâmico /
Samário Lino dos Santos. – 2018.
58 f. : il., grafs., tabs.
- Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, Maceió, 2018.
- Bibliografia: f. 50-58.
1. Inflamação. 2. Ácido cinâmico. 3. Neutrófilos. 4. Terapia anti-
Inflamatória. 5. Produtos naturais. I. Título.

CDU: 616-002



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C.
Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Samário Lino dos Santos

Estudo sobre os efeitos anti-inflamatórios do ácido cinâmico

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 28 de junho de 2018.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador)

Prof.ª Dr.ª Maria Danielma Santos Reis - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Ana Carolina de Carvalho Correia - (UPE)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por terem me guiado por esse caminho, pelo apoio, dedicação e tudo que fizeram e ainda fazem por mim. E aos meus irmãos, que foram referência em muitas das ações que me trouxeram até aqui.

À minha esposa, antes namorada, mas sempre companheira, que me apoiou sempre que precisei e, nas noites em claro, sempre me fez companhia nos devaneios insones de quem sonha com um futuro incerto.

Aos meus amigos, pelas risadas e conversas, pelos conselhos, pela atenção e por compartilhar os momentos mais importantes, bons ou ruins, na vida de cada um.

Aos membros do Laboratório de Biologia Celular, a “Família LBC”. Especialmente à Flávio, Marvin, Tácio, Noé, Jordana, Poly, Polli, Fernanda e Ju, não só pela ajuda que foi indispensável, mas também pelos bons momentos e piadas que nunca faltaram. À Janylle, que nunca hesitou em me ajudar e me incentivar, me acompanhando de perto e dividindo sua experiência em cada momento, e que sem dúvida foi uma das minhas maiores referências.

Ao meu orientador, por me guiar nos tantos ensinamentos, pela referência que é como pessoa, professor e pesquisador, pelo conhecimento adquirido, pelo incentivo e pela oportunidade de provar pra mim mesmo que eu sou capaz.

À Universidade Federal de Alagoas, ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde e às instituições de fomento, CAPES e FAPEAL, pelo provimento da formação, condições estruturais e financiamento da pesquisa.

RESUMO

A inflamação é uma resposta fisiológica de tecidos vascularizados iniciado por uma agressão química, física ou biológica, que objetiva eliminar a causa inicial assim como reparar os possíveis danos teciduais causados. No entanto, a resposta inflamatória pode ser iniciada inapropriadamente ou escapar dos controles fisiológicos do organismo, contribuindo para o desenvolvimento de diferentes tipos de doenças. A identificação de moléculas candidatas a fármacos capazes de modular a inflamação permanece como um processo de suma importância para a etapa de desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios. Nesse contexto, os produtos naturais constituem uma fonte importante de substâncias bioativas, e são frequentemente utilizados no tratamento de um grande número de doenças. Dentre os compostos de origem natural, os ácidos fenólicos são detentores de uma vasta gama de efeitos farmacológicos relevantes. Entretanto, o ácido *trans*-cinâmico (ATC), um composto polifenólico encontrado em alimentos como soja, café, maçã e óleo de oliva, tem sido reportado como possuidor de efeitos supressores da peroxidação lipídica e antitumorais. Porém, ainda são escassos os trabalhos que descrevem os efeitos desta substância sobre resposta inflamatória aguda. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do ácido *trans*-cinâmico sobre parâmetros da resposta inflamatória *in vivo* e *in vitro*. Para atingir este propósito foram utilizados os modelos de edema de pata induzido por carragenina e prostaglandina E₂, pleurisia induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e ensaios *in vitro* utilizando neutrófilos humanos. Nossos resultados mostraram que após 4 h do estímulo inflamatório, o ATC inibiu de maneira significativa a formação de edema induzido por carragenina. Além disso, quando a resposta edematogênica foi induzida por PGE₂, o tratamento com a menor dose de ATC também promoveu uma inibição da formação do edema. No modelo de pleurisia induzida por LPS, utilizado para avaliar o efeito do ácido no recrutamento leucocitário, o ATC (10 mg/kg) reduziu de forma significativa o influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório. *In vitro*, o tratamento de neutrófilos humanos com ATC inibiu a adesão neutrófilo-endotélio e a mudança de forma ("shape change") induzidas por TNF- α , porém sem interferir com a geração de espécies reativas de oxigênio, ou mesmo, afetar a viabilidade destas células. Portanto, estes resultados demonstram o potencial do ácido *trans*-cinâmico em inibir a resposta inflamatória por afetar a mobilização de neutrófilos *in vivo* e seu perfil de ativação *in vitro*.

Palavras-chave: inflamação; ácido cinâmico; neutrófilos.

ABSTRACT

Inflammation is a physiological response of vascularized tissues initiated by chemical, physical or biological aggression, which aims to eliminate the initial cause and repair tissue damage. However, the inflammatory response can be triggered inappropriately or be out of physiological limits, contributing to the development of several types of disease. Development of anti-inflammatory drugs remains an important process for therapeutics due to some available drugs side effects. In this regard, natural products are a significant source of bioactive molecules that are usually utilized in the treatment of a large number of diseases. Among compounds found in natural sources, phenolic acids have a large variety of relevant pharmacological effects. The cinnamic acid, a polyphenol compound found in soy, coffee, apple, olive and others, have been reported as a suppressor of lipid peroxidation and tumor cell growth. However, cinnamic acid effects on the inflammatory response still poorly described. Therefore, the present study aimed to evaluate cinnamic acid effects on inflammatory response *in vivo* and *in vitro*. To achieve this purpose, models of carrageenan and prostaglandin E₂ induced mouse paw edema, lipopolysaccharide (LPS) induced pleurisy and *in vitro* assays using human neutrophils were used. Results showed that cinnamic acid (in concentrations of 5, 50 and 100 mg/kg) significantly reduced carrageenan induced edema formation. In the LPS induced pleurisy, treatment with cinnamic acid at 10 mg/kg concentration significantly decreased neutrophil influx to the inflammatory site. *In vitro* neutrophil treatment with cinnamic acid inhibited TNF- α induced neutrophil adhesion and shape change without interfering with reactive oxygen species generation nor cell viability. Thus, these results showed *trans*-cinnamic acid potential in decreasing inflammatory response by reducing edema formation and neutrophil motility *in vivo* and its activation profile *in vitro*.

Keywords: inflammation; cinnamic acid; neutrophils.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Sinais cardinais da inflamação segundo Celsus e Galeno.....	17
FIGURA 2 -	Eventos celulares da inflamação aguda	20
FIGURA 3 -	Fármacos aprovados para utilização de 1981 à 2014 distribuídos por fonte.....	23
FIGURA 4 -	Estruturas básicas dos derivados dos ácidos cinâmico e benzóico	25
FIGURA 5 -	Ácidos fenólicos e suas propriedades farmacológicas	26
FIGURA 6 -	Configurações <i>cis</i> e <i>trans</i> do ácido cinâmico.....	27
FIGURA 7 -	Etapas do isolamento de neutrófilos	32
FIGURA 8 -	Edema de pata induzido por carragenina	36
FIGURA 9 -	Edema de pata induzido por PGE ₂	37
FIGURA 10 -	Contagem diferencial de células do lavado pleural	38
FIGURA 11 -	Neutrófilos humanos isolados.....	38
FIGURA 12 -	Índice de adesão de neutrófilos em células endoteliais.....	39
FIGURA 13 -	Mudança na forma de neutrófilos estimulados por TNF- α	40
FIGURA 14 -	Produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos	41
FIGURA 15 -	Viabilidade de neutrófilos expostos ao ATC.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais efeitos colaterais associados ao uso de anti-inflamatórios	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i> / transportador de cassete dependente de ATP A1
AChE	Acetilcolinesterase
AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
Akt	Proteína cinase B
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> / Proteína cinase ativada por AMP
ATC	Ácido <i>trans</i> -cinâmico
B	Macromolécula biológica
Bax	<i>BCL2 associated x protein</i> / proteína x associada à BCL2
BChE	Butirilcolinesterase
CAT	Catalase
CD31	Cluster de diferenciação 31
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
GPx	Glutationa peroxidase
DCFH-DA	<i>2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate</i> / 2',7',diacetato de diclorofluoresceína
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> / Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> / Ácido etilenodiamino tetraacético
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> / óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FLS	<i>Forward Light Scatter</i> / espalhamento de luz frontal
fMLP	<i>N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i> / N-formilmetionil-leucil-fenilalanina
G-6-pase	Glicose 6-fosfatase
GLUT4	<i>Glucose transporter 4</i> / Transportador de glicose 4
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> / Solução salina balanceada de Hank

i.p.	intraperitoneal
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> / Molécula de adesão celular
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	<i>Induced-nitric oxide synthase</i> / óxido nítrico sintase induzível
I κ B- α	<i>NF-kappa-B inhibitor alpha</i> / inibidor de NF kappa B alfa
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> / C-Jun N-terminal cinase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> / lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> / antígeno associado a função linfocitária 1
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
Mac-1	antígeno macrófago-1
MAPK	MAP cinase
MDA	Malondialdeído
MTT	<i>Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i> / 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N	Produto natural sem modificação
NaCl	Cloreto de sódio
NB	Baseado em produto natural
ND	Derivado de produto natural
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i> / Armadilha extracelular de neutrófilos
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> / Fator nuclear kappa B
NM	Mímico de produto natural
NO	<i>Nitric oxide</i> / óxido nítrico
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> / Fator nuclear relacionado ao fator eritroide-2
PAF	<i>Platelet-activating factor</i> / Fator de ativação plaquetária
PBS	Tampão fosfato-salina
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> / Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PI3	Fosfoinosotídeo 3
PKC- α	<i>Protein kinase C alpha</i> / proteína cinase C alfa
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> / receptor ativado por proliferador de peroxissoma gamma
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> / glicoproteína ligante de P-selectina 1
S	Sintético
S*	Sintético associado a produto natural
SBF	Soro bovino fetal
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> / substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> / Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> / Fator de necrose tumoral alfa
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
V	Vacina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Aspectos gerais da inflamação.....	17
2.2	Neutrófilos e as doenças inflamatórias.....	20
2.3	Terapia anti-inflamatória.....	21
2.4	Produtos Naturais.....	23
2.5	Ácidos fenólicos.....	24
2.5.1	Ácido cinâmico.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Reagentes e soluções.....	30
4.2	Animais.....	30
4.3	Avaliação da formação do edema de pata.....	30
4.4	Pleurisia induzida por LPS.....	31
4.5	Isolamento de neutrófilos humanos.....	31
4.6	Avaliação da adesão neutrófilo-endotélio.....	32
4.7	Análise da alteração da forma (<i>shape change</i>) de neutrófilos.....	33
4.8	Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio.....	33
4.9	Avaliação da viabilidade dos neutrófilos.....	34
4.10	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS.....	36
5.1	Efeito do ATC no edema de pata induzido por carragenina.....	36
5.2	Efeito do ATC no edema de pata induzido por prostaglandina E ₂	36
5.3	Efeito do ATC no modelo de pleurisia induzida por LPS.....	37
5.4	Isolamento de neutrófilos.....	38
5.5	Efeito do ATC sobre a adesão de neutrófilos.....	39
5.6	Efeito do ATC sobre a mudança de forma de neutrófilos.....	40
5.7	Efeito do ATC sobre a produção de EROs.....	41
5.8	Efeito do ATC sobre a viabilidade de neutrófilos.....	42

6	DISCUSSÃO.....	43
7	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta protetora dos tecidos vascularizados contra estímulos extremos, e tem como objetivo principal eliminar o agente causador e proporcionar o reparo tecidual (KOTAS; MEDZHITOV, 2015). Apesar de ser um processo majoritariamente fisiológico e benéfico, a inflamação está envolvida na patogênese e progressão de muitas doenças como asma, aterosclerose, artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doenças cardíacas e câncer (HALARIS, 2013; PANT et al., 2013; AGUSTI; SIN, 2014; DIAKOS et al., 2014; KOJIMA et al., 2014; WENDELL; BAFFI; HOLGUIN, 2014; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

O tratamento das desordens de origem inflamatória é realizado com auxílio dos fármacos anti-inflamatórios. O repertório destes fármacos atualmente disponível consiste, principalmente, em anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), glicocorticoides e imunossupressores. Apesar de existir uma grande variedade destes medicamentos, a resposta do paciente a seu uso muitas vezes não se mostra satisfatória, seja pelos efeitos colaterais ou pela refratariedade ao medicamento, o que acaba dificultando e/ou impossibilitando a continuidade do tratamento, e comprometendo a qualidade de vida dos pacientes (BARNES et al., 2015).

Neste sentido, a busca por novos compostos anti-inflamatórios traz alternativas de tratamento para minimizar os efeitos colaterais da terapêutica farmacológica atual, bem como ampliar as possibilidades de tratamento, colaborando assim para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para as diferentes doenças que comprometem a qualidade de vida de grande parte da população mundial e são responsáveis por um considerável índice de morbimortalidade em todo o mundo (FÜRST; ZÜNDORF, 2014).

Dentre as fontes de princípios ativos utilizadas na terapêutica medicamentosa, as espécies vegetais foram as primeiras que se têm registros na história humana. Em todas as culturas, diferentes partes de uma grande variedade de plantas foram utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades (CRAGG; NEWMANN, 2013). Porém, a ideia de que uma ou mais entidades químicas eram responsáveis pelos efeitos farmacológicos destas plantas e que elas poderiam ser isoladas para a utilização apareceu apenas no século XIX, época em que foram descobertas, isoladas

e caracterizadas diferentes moléculas que são utilizadas na terapêutica até os dias atuais, como exemplo, a morfina (analgésico opioide isolado de *Papaver somniferum*), a quinina (antimalárico isolado de *Cinchona officinalis*), o ácido salicílico (anti-inflamatório obtido de *Salix alba*) e a teofilina (antiasmático isolado de *Camellia sinensis*) (BALUNAS; KINGHORN, 2005; FÜRST; ZUNDORF, 2014).

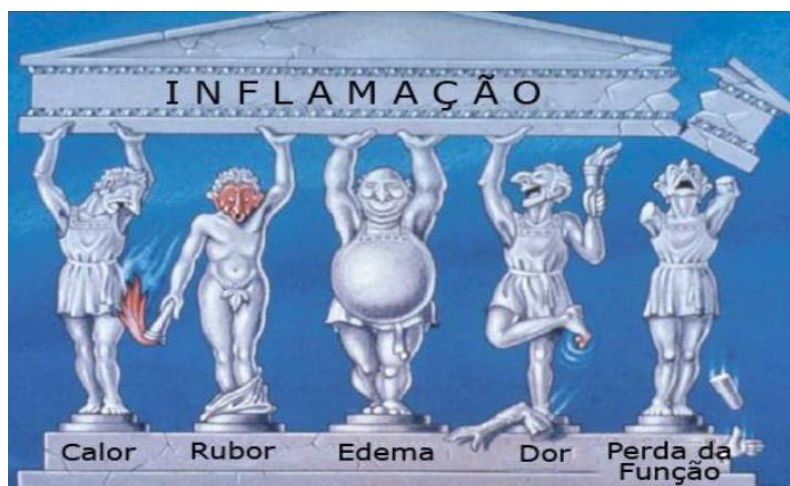
Os ácidos fenólicos constituem uma classe importante de metabólitos secundários por apresentar efeitos antioxidante, antidiabético, anticâncer e anti-inflamatório (SAIBABU et al., 2015). Essas substâncias são comumente encontradas em frutas, vegetais, plantas medicinais e aromáticas (CORTIJO et al., 2017). Um dos representantes dessa classe é o ácido cinâmico, que mesmo apresentando dois isômeros (*trans* e *cis*, que diferem entre si pelo arranjo espacial do grupamento carboxila) as atividades biológicas reportadas para este composto mostram-se semelhantes, tais como antitumoral e antidiabética (LÖSER et al., 2000; DE; BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011; HAFIZUR et al., 2015). Portanto, no presente estudo buscou-se avaliar o efeito anti-inflamatório do ácido *trans*-cinâmico em modelos de inflamação aguda *in vivo* e *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais da inflamação

A inflamação é uma resposta do organismo contra a agressão tecidual com o propósito de localizar, conter e eliminar o agente agressor, possibilitando a restauração da região danificada (KOTAS; MEDZHITOV, 2015). A reação inflamatória é caracterizada classicamente por cinco sinais cardinais denominados calor, rubor, tumor, dor e perda de função. Tais sinais decorrem de uma série de mudanças na vasculatura que incluem alterações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade dos vasos, que contribuem para o recrutamento de células circulantes para o local da injúria. Apesar de ser um processo fisiológico, a persistência da resposta inflamatória pode causar danos teciduais, tornando-a deletéria ao organismo e contribuindo, portanto, para o desenvolvimento de um grande número de doenças (OKIN; MEDZHITOV, 2012).

Figura 1 - Sinais cardinais da inflamação segundo Celsus e Galeno.



Fonte: Adaptado de LAWRENCE et al., 2002.

O processo inflamatório pode ser dividido em agudo e crônico tomando como base a sua duração e características fisiopatológicas. A inflamação aguda tem curta duração e é caracterizada pela vasodilatação, exsudação de líquido rico em proteínas, migração de células (principalmente neutrófilos) para o local da injúria e, em alguns casos, a ativação da cascata de coagulação. Já a inflamação crônica caracteriza-se por uma duração prolongada com ocorrência simultânea de inflamação ativa,

destruição tecidual e tentativa de reparo do tecido, além de infiltração de células mononucleares e fibrose tecidual (LEE; NA; SURH, 2013).

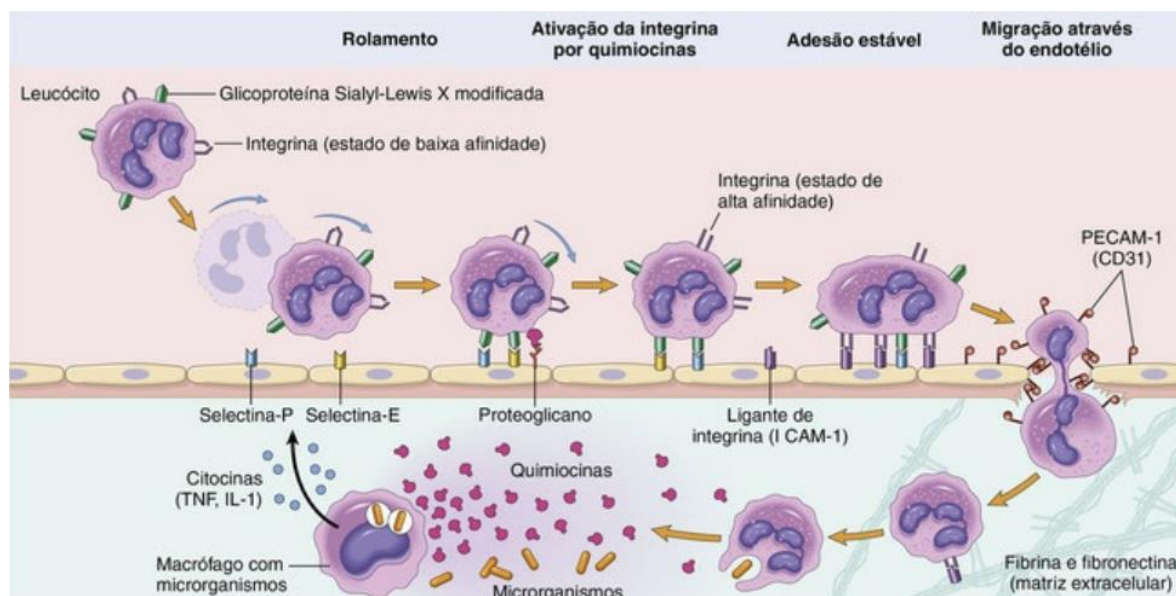
A resposta inflamatória mostra-se como um processo ordenado, no qual eventos são temporalmente ativados. No estágio inicial da inflamação, o estímulo provoca o aumento do calibre dos vasos sanguíneos, do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade dos vasos, de forma que ocorre o vazamento de fluido rico em proteínas. A vasodilatação é causada principalmente pela ativação de células endoteliais e produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGs) vasodilatadoras, como a prostaglandina E₂ (PGE₂), facilitando a chegada de mediadores solúveis e células inflamatórias. Em casos de inflamação sistêmica severa, como na sepse, a vasodilatação disseminada pode causar hipotensão e choque (FREIRE; DYKE, 2013; VANHOUTTE et al., 2016).

A vasodilatação proporciona o aumento da pressão hidrostática e da permeabilidade vascular provocam o extravasamento plasmático que forma o exsudato inflamatório no sítio da injúria. Este fluido rico em proteínas proveniente do compartimento intravascular para o interstício ocorre em resposta à ação de histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos (LTs), componentes do sistema complemento, substância P e fator ativador de plaquetas (PAF) (CHUNG et al., 1990; HELLER et al., 1998). Estes fatores alteram a função e a permeabilidade de capilares e vênulas, permitindo a passagem de água e proteínas plasmáticas, ao mesmo tempo em que a pressão hidrostática é aumentada no sítio inflamatório por causa da vasodilatação local. O extravasamento do plasma causa uma concentração de eritrócitos nos microvasos e aumenta a viscosidade do sangue. Esse fluxo transvascular de fluido eventualmente restaura a pressão intravascular no local da inflamação ao mesmo tempo em que a perda de proteínas do plasma diminui a pressão oncótica intravascular (POBER; SESSA, 2014; VANHOUTTE et al., 2016). Juntos, esses eventos agem induzindo o fluxo transvascular de fluidos e proteínas para o interstício inflamado, permitindo a entrega de fatores solúveis como anticorpos e proteínas de fase aguda no local da injúria (NEWTON; DIXIT, 2012; POBER; SESSA, 2014).

A alteração na permeabilidade vascular contribui para a chegada de neutrófilos ao local da inflamação, fenômeno migratório que ocorre nas vênulas pós-capilares da circulação sistêmica e nos capilares pulmonares. Em resposta aos mediadores

inflamatórios provenientes do local da injúria, tais como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), em caso de infecção, ou mediadores endógenos produzidos em resposta ao estímulo, como TNF- α e IL-1 β , as células endoteliais produzem moléculas de adesão como P-selectinas, E-selectinas e diversos membros da superfamília das integrinas (ICAMs). Os neutrófilos circulantes, que expressam constitutivamente dois tipos de proteínas reconhecedoras de sinais inflamatórios endoteliais (PSGL-1 e L-selectina) passam a interagir com as selectinas expressas no endotélio, permitindo uma adesão de baixa afinidade. Esse evento é seguido pelo característico rolamento dos neutrófilos antes de aderir firmemente ao endotélio, promovido pela combinação entre as forças da interação selectina-ligante e da pressão sanguínea. A ligação de PSGL-1 e L-selectina com as moléculas de adesão endoteliais inicia uma cascata de sinalização intracelular que resulta em uma série de mudanças nos neutrófilos que levam a uma adesão de alta afinidade mediada por integrinas da família beta 2 (LFA-1 e Mac-1, nos neutrófilos) e imunoglobulinas (ICAMs) no endotélio. Este evento, conhecido como adesão, é essencial para que essas células cheguem ao sítio inflamatório. A partir da adesão, os neutrófilos encontram junções celulares por onde possam transmigrar a partir de complexas interações entre integrinas e seus ligantes, moléculas de junções endoteliais e proteínas de membrana dos neutrófilos (AMULIC et al, 2012). Ao transmigrar os neutrófilos atingem o espaço intersticial, um local repleto de quimioatraentes e estimulantes inflamatórios exógenos, como a N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP, um tripeptídeo liberado por bactérias) e endógenos, como a interleucina 8 (IL-8). Os neutrófilos reagem de diferentes maneiras após o contato inicial com esses sinais inflamatórios, dependendo do mediador e sua concentração, mas o resultado final é a ativação dos mecanismos microbicidas dessas células, como fagocitose, degranulação e emissão de redes extracelulares (NETs) (PHILLIPSON; KUBES, 2011; AMULIC et al., 2012; MOCSAI et al., 2015). Os eventos mencionados acima estão resumidos na figura 2 (p. 19).

Figura 2 - Eventos celulares da inflamação aguda.



Os neutrófilos rolam, tornam-se ativados e aderem ao endotélio para transmigration e seguir em direção aos quimioatraentes produzidos no local lesionado. Diferentes mediadores predominam em cada etapa, a saber: as selectinas no rolamento; as quimiocinas na ativação dos neutrófilos; as integrinas na adesão forte; e a CD31 (PECAM-1) na transmigration. ICAM-1, Molécula de adesão intercelular; PECAM-1 (CD31), molécula de adesão celular endotelial plaquetária; TNF, fator de necrose tumoral. (Fonte: adaptado de KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Juntamente com a adesão ao endotélio passam a ocorrer mudanças morfológicas nos neutrófilos, que passam de um fenótipo arredondado para mais achatado. Essa mudança está associada à reorganização do citoesqueleto e consequente polarização da célula, que passa a apresentar extremidades anterior e posterior com uma distribuição diferencial de proteínas de sinalização intracelular, receptores de membrana e moléculas de adesão em cada extremidade. Essa polarização permite a mobilidade direcional dos neutrófilos e a formação de protrusões que ocorre durante a transmigration. Em conjunto, essas mudanças morfológicas são conhecidas como “*shape change*”, e são imprescindíveis para que os leucócitos atinjam o sítio inflamatório (NOURSHARGH; HARDIJK; SIXT, 2010).

2.2 Neutrófilos e as doenças inflamatórias

Os neutrófilos são importantes componentes da resposta imune e da eliminação da infecção. Porém, a resposta neutrofílica pode colaborar com a progressão de muitas doenças. O câncer, por exemplo, é uma doença relacionada à inflamação na qual os neutrófilos participam. Neutrófilos são abundantes em tumores

e influenciam seu desenvolvimento através da produção de mediadores como citocinas, EROs e proteases degradantes de matriz extracelular. Estudos clínicos indicam que tumores com maior infiltração de neutrófilos estão associados com um prognóstico menos favorável. Alguns tumores parecem recrutar neutrófilos através da produção de IL-8, assim como a depleção de neutrófilos pode reduzir o crescimento tumoral (PEKAREK et al., 1995; BELLOCQ et al., 1998; HOUGHTON et al., 2010; GREGORY; HOUGHTON, 2011).

Os neutrófilos são as principais células contidas no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, podendo ser encontrados também na cartilagem (RAZA et al., 2006). Essas células encontram complexos de imunoglobulinas na articulação e ativam a degranulação e produção de EROs no líquido sinovial e diretamente sobre a cartilagem. Essas reações implicam em dano tecidual, principalmente na destruição da matriz de colágeno no interior da cartilagem, de forma que os neutrófilos são considerados importantes alvos no tratamento da artrite reumatoide (WRIGHT et al., 2010).

Os neutrófilos também estão envolvidos nos mecanismos da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) onde o recrutamento constante induzido pelo tabagismo leva a uma maior degranulação e à redução da apoptose e na eliminação de bactérias. Esses fatores contribuem para a destruição da matriz extracelular e consequente distúrbio da função muco-ciliar, o que permite a exacerbação da colonização bacteriana nas vias aéreas (HOENDERDOS; CONDLIFFE, 2013).

A participação dos neutrófilos em doenças como as citadas acima justifica a busca de substâncias que possam inibir sua função, e consequentemente reduzir a resposta inflamatória nociva presente nessas doenças.

2.3 Terapia anti-inflamatória

O comprometimento da resolução na resposta inflamatória causa efeitos indesejáveis e propicia o desenvolvimento de diferentes tipos de patologias, a depender do local e do tempo de exposição ao estímulo inflamatório. Dentre estas patologias, pode ser mencionada a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Nesta doença, a manutenção da migração de células para o pulmão provoca a

liberação de substâncias nocivas presentes nos grânulos leucocitários que geram os danos teciduais que propiciam a persistência da lesão (CHUNG; ADCOCK, 2008).

Atualmente existe uma ampla gama de medicamentos anti-inflamatórios disponíveis no mercado. Porém, muitos destes medicamentos provocam efeitos colaterais indesejados que podem inviabilizar seu uso em determinadas situações. A tabela 1 contém os principais efeitos colaterais observados com o uso de anti-inflamatórios.

Tabela 1 – Principais efeitos colaterais associados ao uso de anti-inflamatórios.

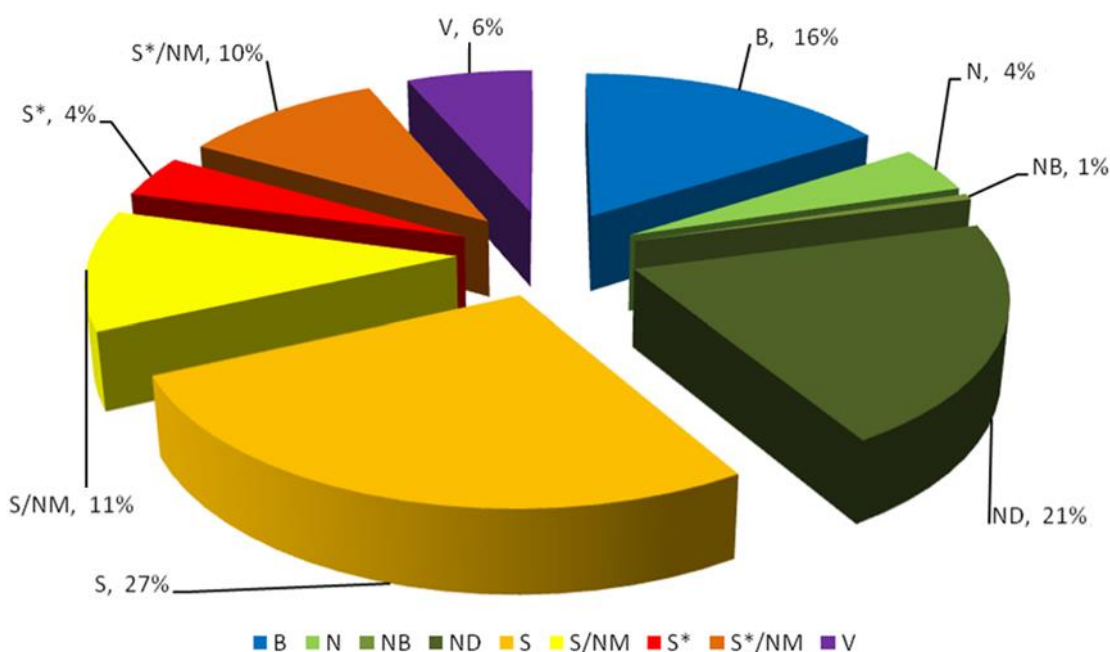
Classe	Efeitos colaterais	
	Curto prazo	Longo prazo
AINES	Irritação gastrointestinal	Úlceras, perfurações e sangramento gastrointestinal, complicações cardiovasculares, toxicidade renal, e retenção de fluidos.
Inibidores seletivos da COX-2 (Coxibes)	Vertigem, tosse	Complicações cardiovasculares, redução da capacidade regenerativa gastrointestinal, aumento da susceptibilidade à <i>Helicobacter pylori</i> , complicações renais
Glicocorticoides	Intolerância gastrointestinal, predisposição à infecção, comprometimento na cicatrização	Alterações no metabolismo lipídico, glicêmico e ósseo; gastrite, úlcera péptica, síndrome de Cushing, diabetes, hipertensão, dentre outros.

Adaptado de KUMMER; COELHO, 2002; BARNES; ADCOCK, 2003; PELAIA et al., 2003; MENDES et al., 2012; DAY; GRAHAM, 2013.

2.4 Produtos Naturais

Desde o início das civilizações o homem tem utilizado a natureza para suprir as suas necessidades básicas, o que inclui alimentação, vestimenta, utensílios e medicina. O termo “produtos naturais” abrange desde extratos complexos até compostos isolados, constituindo um grupo de substâncias que tem demonstrado papel importante no desenvolvimento de produtos medicamentosos. Dentre os 1211 medicamentos aprovados para o uso em humanos entre os anos de 1981 e 2014 cerca de 35% foram obtidos por síntese, enquanto mais da metade foram derivados ou tiveram suas estruturas químicas inspiradas em produtos naturais. Além disso, cabe informar ainda o grande número de medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil que são obtidos a partir de extratos padronizados de espécies vegetais da flora nacional. A figura 3 representa a distribuição das substâncias aprovadas para uso terapêutico no período entre 1981 e 2014. É possível observar que há um crescente número de substâncias de origem natural na última década, bem como uma forte prevalência de biocompostos e substâncias inspiradas em biomoléculas (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Figura 3 - Fármacos aprovados para utilização de 1981 à 2014 distribuídos por fonte.



B: macromolécula biológica; N: produto natural sem modificação; NB: Baseado em produto natural; ND: derivado de produto natural; S: sintético; S*: sintético associado a produto natural; V: vacina; /NM: mímico de produto natural. Fonte: NEWMAN; CRAGG, 2016.

Os produtos naturais podem ser definidos como substâncias produzidas naturalmente por qualquer organismo vivo que envolve a síntese e a degradação de metabólitos primários e secundários (PYE et al., 2017). Os metabólitos denominados como primários são produtos oriundos do metabolismo primário, e, portanto, essenciais para todos os organismos vivos como as proteínas, as gorduras, os ácidos nucleicos e os carboidratos. Já os produtos obtidos por biossíntese a partir de metabólitos primários são denominados metabólitos secundários. Os metabólitos secundários são importantes para as espécies vegetais por apresentarem funções ecológicas, que incluem: a proteção contra herbívoros e patógenos, servem como atrativos (aroma, cor, sabor) para polinizadores e funcionam como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos (SHITAN, 2016).

Os metabólitos secundários mostram-se subdivididos em vários grupos distintos, tendo como base a estrutura química e vias sintéticas, e esses grupos podem, por sua vez, serem diferenciados em termos da natureza de seus papéis ecológicos e efeitos finais. Quanto a classificação, os metabólitos secundários podem ser diferenciados pelos grupos químicos em três grupos distintos, sendo eles terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos. Os terpenos são obtidos a partir da acetil-CoA, via rota do ácido mevalônico, ou via rota do metileritritol fosfato. Já os compostos nitrogenados são sintetizados a partir dos aminoácidos, enquanto os compostos fenólicos são biossintetizados a partir de duas rotas principais, a do ácido chiquímico e do ácido mevalônico (KABERA et al., 2014).

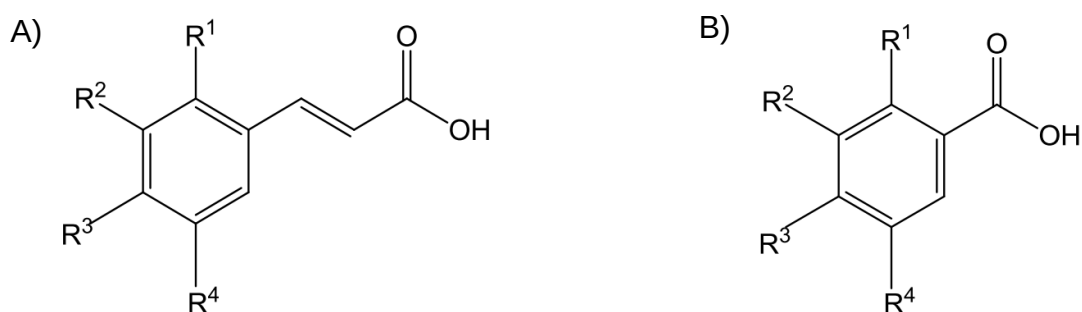
2.5 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos naturais presentes em frutas, vegetais, plantas aromáticas e com propriedades medicinais. O termo “ácidos fenólicos” se refere a um grupo distinto de ácidos orgânicos que contém dois tipos diferentes de estruturas de carbono (figura 4, p. 24), denominados hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos. Esta diferença permite uma subclassificação dos ácidos fenólicos em ácidos benzoicos, que contendo sete átomos de carbono, e em ácidos cinâmicos, que contém nove átomos de carbono (SAIBABU et al., 2015). Como exemplos de derivados do ácido benzóico amplamente estudados podem ser citados os ácidos *p*-

hidroxibenzóico, vanílico, siríngico e gálico. Enquanto que representantes de ácidos cinâmicos mais abundantes são ácido ferúlico, desidrodímeros e desidrotrimeros de ácido ferúlico e ácidos sinápico e *p*-cumárico.

Os ácidos fenólicos estão entre os metabólitos mais abundantes presentes nos vegetais e cereias comestíveis e contribuem para a qualidade de vida humana e animal, principalmente, devido as suas importantes atividades antioxidantes. De fato, estes compostos representam 30% do total de compostos fenólicos na dieta mediterrânea, uma dieta rica em óleos vegetais, legumes, frutas e grãos integrais que é geralmente associada à diminuição do risco de doenças como câncer e distúrbios cardiovasculares (LADDOMADA; CARETTO; MITA, 2015; DAVIS et al., 2015; SOFI et al., 2013).

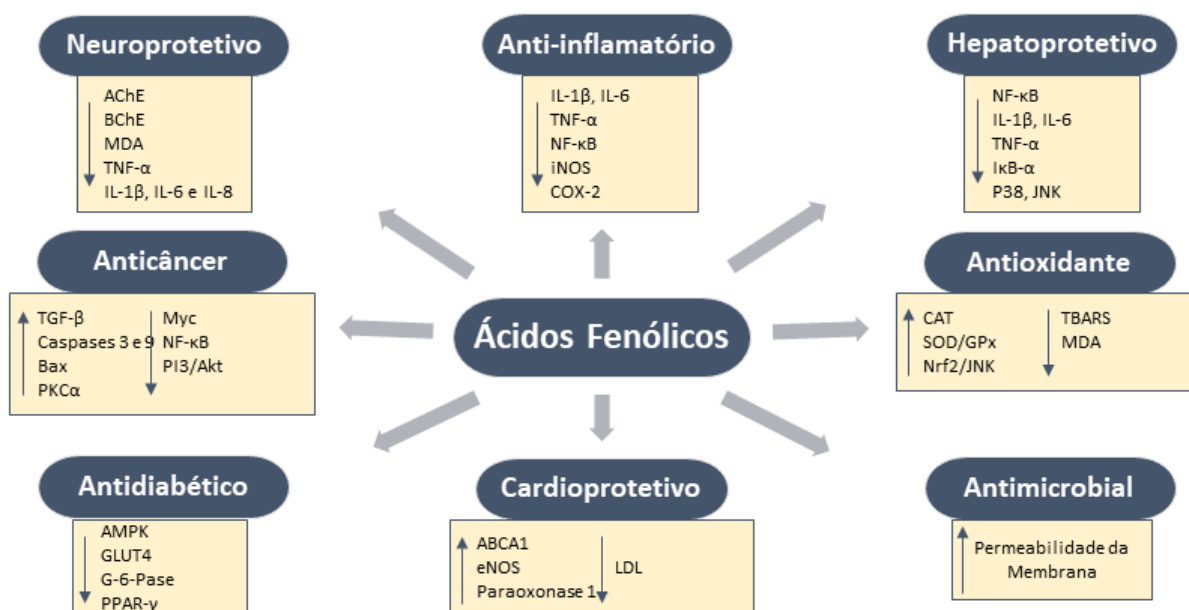
Figura 4 – Estruturas básicas dos derivados dos ácidos cinâmico e benzóico.



Legenda: A) estrutura básica do ácido cinâmico e seus derivados; B) estrutura básica do ácido benzoico e seus derivados. Os radicais (Rⁿ) representam os grupamentos que podem variar nos respectivos derivados.

Os ácidos fenólicos têm despertado interesse da comunidade científica pela variedade de propriedades farmacológicas que possuem. Esta classe de metabólitos foi alvo de diferentes estudos onde se comprovou suas propriedades antioxidantes, anti-ulcerativa, antidiabética, cardioprotetora, anticâncer, neuroprotetora, hepatoprotetora, antimicrobiana e anti-inflamatória (Figura 5, p. 25) (PRABHAKAR; DOBLE, 2009; CHAO; HSU, YIN, 2009; LI et al., 2011; BESERRA et al., 2011; KARUNANIDHI et al., 2013; SRIGOPALRAM et al., 2014; ZHANG et al., 2014; LEE et al., 2014; CHEN; WU, 2014).

Figura 5 - Ácidos fenólicos e suas propriedades farmacológicas.



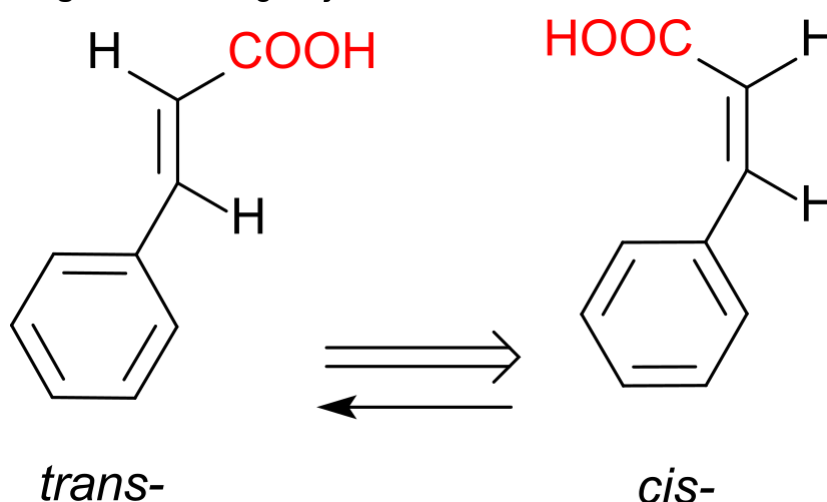
Legenda: IL: Interleucina; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral-alfa; iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzida; COX: Ciclooxigenase; AChE: Acetilcolinesterase; BChE: Butirilcolinesterase; MDA: malonil aldeído; TGF: Fator de Crescimento Tecidual; PKC: Proteína quinase C; NF: Fator nuclear; PI: fosfoinositídeo quinase; AKT: proteína quinase B; AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato; GLUT: transportador de glicose; G-6-Pase: glicose 6 fosfatase; PPAR: receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma; ABCA: transportador de cassete ligante de ATP; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; LDL: lipoproteína de baixa densidade; CAT: cloranfenicol acetil-transferase; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutatona peroxidase; NRF: fator relacionado ao fator nuclear eritróide 2; JNK: c-Jun n-terminal quinase; TBARS: substâncias relativas ao ácido tiobarbitúrico. Fonte: SAIBABU et al., 2015

Diferentes estudos foram desenvolvidos para identificar os efeitos e mecanismos através dos quais as diferentes moléculas isoladas exercem suas atividades. Neste contexto, os efeitos antioxidantes dos ácidos fenólicos foram atribuídos a sua capacidade em aumentar os níveis de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase e por reduzir a peroxidação lipídica em diferentes modelos experimentais (ALAM; SERNIA; BROWN, 2013; SINDHU; NISHANTHI; SHARMILA, 2015). Além disso, tem-se observado que a atividade anti-inflamatória destes compostos se deve à sua capacidade de reduzir os níveis de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como citocinas (IL-1 β e IL-6) e enzimas como a sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (Figura 5) (SONG et al., 2014).

2.5.1 Ácido cinâmico

O ácido cinâmico é um polifenol bioativo da classe dos ácidos fenólicos. Quimicamente, é um ácido graxo de baixa toxicidade em humanos. É composto por um anel fenil substituído por um grupamento ácido acrílico que geralmente se apresenta na geometria *trans* (Figura 6) (DE; BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011)

Figura 6 - Configurações *cis* e *trans* do ácido cinâmico.



Legenda: As extremidades em vermelho representam os grupamentos carboxila, que variam de posição de acordo com a configuração geométrica do ácido *trans*-cinâmico.

O ácido cinâmico e seus derivados são sintetizados nas plantas através da via do ácido chiquímico onde a fenilalanina e a tirosina são utilizadas como moléculas precursoras. Os produtos mais conhecidos desta via são o ácido cinâmico, o ácido caféico, o ácido ferulico, o ácido isoferúlico e o ácido *p*-hidroxicinâmico. Essas substâncias estão abundantemente presentes em alimentos como soja, café, maçã, óleo de oliva e derivados (D'ARCHIVIO et al., 2007; HELENO et al., 2015).

O ácido cinâmico e seus derivados são amplamente estudados por suas propriedades farmacológicas, no qual merece destaque as ações antitumorais do ácido cinâmico, onde foram descritos seus efeitos inibidores sobre células de glioblastoma, melanoma, câncer de próstata e carcinoma pulmonar, através da modulação dos genes da collagenase tipo IV e da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) (LIU et al., 1995). Além disso, os derivados do ácido cinâmico contribuem para o efeito anti-inflamatório do extrato de própolis, inibindo a ativação do fator nuclear κ B

(NF- κ B) e da MAP quinase (MAPK) e para o efeito antioxidante do vinho tinto, inibindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) pelo radical peroxil (LIAO et al., 2012; ABU-AMSHA et al., 1996). No entanto, informações sobre o efeito do ácido *trans*-cinâmico sobre aspectos da inflamação aguda ainda são escassos na literatura, incluindo trabalhos que reportam atividade do ácido *trans*-cinâmico *in vivo* sem identificar alvos celulares (LIAO et al., 2012).

Logo, com o propósito de ampliar o elenco de efeitos biológicos conhecidos do ácido cinâmico, em especial pela carência de relatos científicos a respeito dos possíveis efeito do ácido *trans*-cinâmico na formação de edema e na inflamação induzida por LPS, decidiu-se avaliar o potencial anti-inflamatório deste ácido fenólico em modelos *in vivo* e *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do ácido *trans*-cinâmico (ATC) sobre a inflamação aguda em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do ATC sobre a formação de edema induzido por carragenina e prostaglandina E₂.
- Avaliar o efeito do ATC na inflamação pleural induzida por LPS.
- Verificar a adesão neutrófilo-endotélio em células expostas ao ATC.
- Investigar o efeito do ATC sobre a ativação de neutrófilos *in vitro*.
- Avaliar o efeito do ATC sobre produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos humanos *in vitro*;
- Examinar a citotoxicidade do ATC em neutrófilos humanos *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

O ácido *trans*-cinâmico, tampão fosfato salina (PBS), meio de cultura DMEM, Percoll, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), lipopolissacarídeo (LPS; *Escherichia coli* I0127:B8), reagente de Bradford, 2',7',diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), carragenina, dexametazona, PGE₂ e o corante azul de Trypan foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich. Os corantes Giemsa e Panótico rápido foram adquiridos comercialmente da Vetec. O soro bovino fetal (SBF) e a gentamicina foram adquiridas comercialmente da Gibco. TNF- α foi obtido comercialmente da RD Systems. Thiopentax® (tiopental sódico) foi obtido comercialmente de Cristália produtos químicos e farmacêuticos.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* adultos (25-35 g) de ambos os sexos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração e água até a realização dos experimentos. Os animais foram deixados no local de experimentação por pelo menos uma hora antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram aprovados e estão de acordo com as normas do Comitê de Ética Institucional da UFAL (Protocolo n° 67/2014).

4.3 Avaliação da formação do edema de pata

Para investigar o efeito do ATC sobre a formação de edema foi utilizado o modelo de edema de pata como descrito por Barros e colaboradores (2011). Os volumes das patas dos animais foram mensurados utilizando o equipamento pletismômetro (Panlab, Itália) que consiste em um sistema com um sensor eletrônico de volume e duas cubetas de acrílico interligadas por um sistema de vasos comunicantes preenchidos com solução de NaCl 0,1 % e Triton X 1 %. As patas dos

animais foram imersas até a junção tíbio-tárcica em uma das cubetas e o volume deslocado na cubeta acoplada com o sensor foi registrado.

Os animais foram pré-tratados (i.p.) com o ATC (5, 10 ou 100 mg/kg) ou solução salina (NaCl, 0,9%) e estimulados uma hora depois com carragenina (300 µg/pata) ou PGE₂ (100 ng/pata) na pata esquerda, enquanto que na pata direita foi injetada solução salina como controle. O volume das patas foi monitorado por até 4 h após o estímulo. Cada pata foi medida três vezes e a média aritmética das medidas foi considerada para o cálculo do volume do edema, que foi calculado segundo a equação:

$$\text{Volume do edema} = (\text{volume da pata esquerda} - \text{volume da pata direita})$$

4.4 Pleurisia induzida por LPS

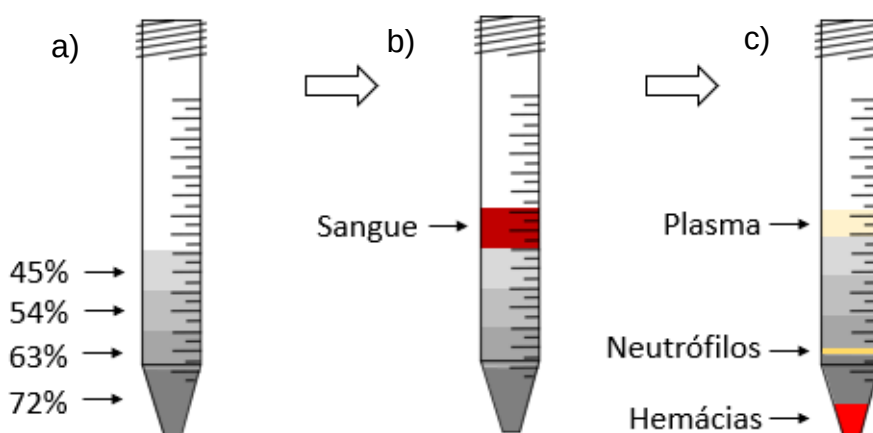
A pleurisia foi induzida através da injeção intratorácica de 0,1 mL de solução salina contendo 250 ng de LPS dissolvidos em solução salina. Os animais controles receberam o mesmo volume do veículo. Os animais foram pré-tratados (i.p.) 1 h antes do estímulo com ATC (10 mg/Kg) ou salina. Seguido o tempo de quatro horas após estímulo, os animais foram eutanasiados com overdose de tiopental (120 mg/Kg; i.p.) e tiveram a cavidade pleural aberta e lavada com 0,6 mL de solução de PBS/EDTA (10 mM). O volume foi recuperado com auxílio de pipeta automática, centrifugado e ressuspensionado em PBS 1X, onde uma alíquota foi diluída em solução de Turk para a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer. Em seguida, uma outra alíquota foi submetida a centrifugação para confecção de um citocentrifugado e posteriormente coradas com corante panótico para contagem diferencial dos leucócitos.

4.5 Isolamento de neutrófilos humanos

Os neutrófilos humanos foram isolados do sangue periférico de doadores saudáveis por densidade onde foram utilizadas diferentes concentrações de Percoll® (45%, 54%, 63% e 72%), cuidadosamente depositadas em tubos de 15 mL, formando um gradiente com 2 mL de cada concentração conforme a figura 7 (p. 31). Após a

preparação dos gradientes, foram cuidadosamente adicionados 2 mL de sangue periférico humano sobre os gradientes e os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 35 minutos (23° C). Em seguida, as células na interface entre 63% e 72% foram coletadas, transferidas para um novo tubo, diluídas em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) até atingir o volume de 15 mL e centrifugadas por 10 min à 1200 rpm. Após esta etapa o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 7 mL de NaCl 0,2% e centrifugadas por 10 min para sedimentação dos eritrócitos e em seguida ressuspensas em NaCl 1,6% para reestabelecimento da isotonicidade e centrifugadas por mais 10 minutos à 1200 rpm. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio DMEM para utilização nos ensaios necessários após a contagem do número de células viáveis por exclusão com azul de trypan. A pureza da obtenção dos neutrófilos foi realizada através de citocentrifugado e contagem de células em microscópio óptico (Adaptado de DOOLEY; SIMPSON; MERYMAN, 1982; FARIAS et al., 2011).

Figura 7 - Etapas do isolamento de neutrófilos.



Legenda: a) Distribuição do gradiente de Percoll®. b) Local de deposição do sangue a ser processado. c) Separação e localização dos componentes sanguíneos após a centrifugação.

4.6 Avaliação da adesão neutrófilo-endotélio

A capacidade de adesão dos neutrófilos foi verificada através de uma co-cultura com células endoteliais humanas da linhagem EA.hy 926. As células endoteliais foram semeadas sobre lamínulas em placas de 24 poços e deixadas aderindo por 12 h. Após esse período, células endoteliais e neutrófilos foram pré-tratados com concentrações

de ATC (0,1; 1 e 10 μ M) ou veículo (meio DMEM) por 1 h e estimuladas com TNF- α (50 ng/mL) por mais 1 h (neutrófilos) ou 6 h (células endoteliais). Em seguida, os neutrófilos foram transferidos para a placa de 24 poços e deixados em co-cultura com as células endoteliais para adesão por 2 h. Por fim, as células foram fixadas e coradas com corante Panótico rápido para contagem das células aderidas (LANNES-VIEIRA, 1993). O índice de adesão foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Adesão} = \frac{\text{EA.hy 926 com neutrófilos aderidos}}{n^{\circ} \text{ total de EA.hy 926}} \times \frac{\text{Neutrófilos aderidos nas EA.hy 926}}{n^{\circ} \text{ total de EA.hy 926}} \times 100$$

4.7 Análise da alteração da forma (*shape change*) de neutrófilos

A alteração na morfologia se mostra como uma característica básica capaz de indicar o nível de ativação celular, tanto que mudanças na forma de neutrófilos precedem eventos chaves como a secreção de mediadores e a quimiotaxia (DONABEDIAN; SAWYER; SENITZER, 1987). Tais alterações, conhecidas como *shape change* podem ser mensuradas por citometria de fluxo (COLE et al., 1995; TREVANI et al., 1999). Para análise do *shape change*, neutrófilos ($1,5 \times 10^6$ células/poço) foram semeados em placa de 96 poços e mantidos em estufa de CO₂ à 37 °C por 30 min, sendo tratados com ATC (0,1, 1 e 10 μ M) por 1 h e em seguida estimulados com TNF- α (50 ng/mL) por mais 1 h. Em seguida, as células foram avaliadas em citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences) para identificar mudanças na morfologia por meio da dispersão de luz de ângulo direto (Forward Light Scatter – FLS) em escala linear para cada 10^4 células. Dessa forma, há uma correlação positiva entre o aumento na FLS das células e a mudança na morfologia de neutrófilos (*shape changes*).

4.8 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio intracelulares foram quantificadas utilizando a sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) conforme o método utilizado por Chang e colaboradores (2016) com algumas modificações. Neutrófilos foram semeados ($1,5 \times 10^6$ células/poço) em placa de 96 poços e pré-

tratados com ATC (0,1; 1 e 10 μ M) por 1 h. Após este tempo, as células foram estimuladas com TNF- α (50 ng/mL) por mais 1 h. Em seguida, as células foram centrifugadas, e o sobrenadante armazenado a ultrabaixa temperatura (-80°C), sendo as células transferidas para tubos de citometria e ressuspensas em 100 μ L de uma solução de DCFH-DA (3 mM) por 30 min. As amostras foram então analisadas no citômetro considerando a emissão em 525 nm. Os resultados foram expressos como a média da intensidade de fluorescência dos grupos analisados proporcional ao grupo não marcado.

4.9 Avaliação da viabilidade dos neutrófilos

A viabilidade de neutrófilos humanos expostos ao ATC foi verificada utilizando o ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O ensaio de MTT é um teste colorimétrico que se utiliza da atividade mitocondrial para reduzir o MTT, um composto com coloração amarelada, em cristais de formazan que apresentam coloração púrpura, uma reação que ocorre apenas na mitocôndria de células vivas e é diretamente proporcional ao número de células (MOSMANN, 1983). Os neutrófilos humanos ($1,5 \times 10^6$ células/poço) foram semeados em placa de 96 poços e mantidos em estufa de CO₂ à 37 °C por 30 min. Após esse período as células foram tratadas com ATC (1, 10 e 100 μ M) e mantidas por 6 h nas mesmas condições citadas anteriormente. O meio foi então substituído por uma solução com 100 μ L de meio de cultivo celular contendo MTT (5 mg/mL) e a placa foi novamente incubada em estufa ao abrigo da luz por 3 h. O sobrenadante foi descartado e substituído por 150 μ L de DMSO por poço. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis segundo a fórmula:

$$\% \text{ viabilidade} = \left(\frac{\text{absorbância do grupo teste}}{\text{absorbância do grupo controle}} \right) \times 100$$

4.6 Análise estatística

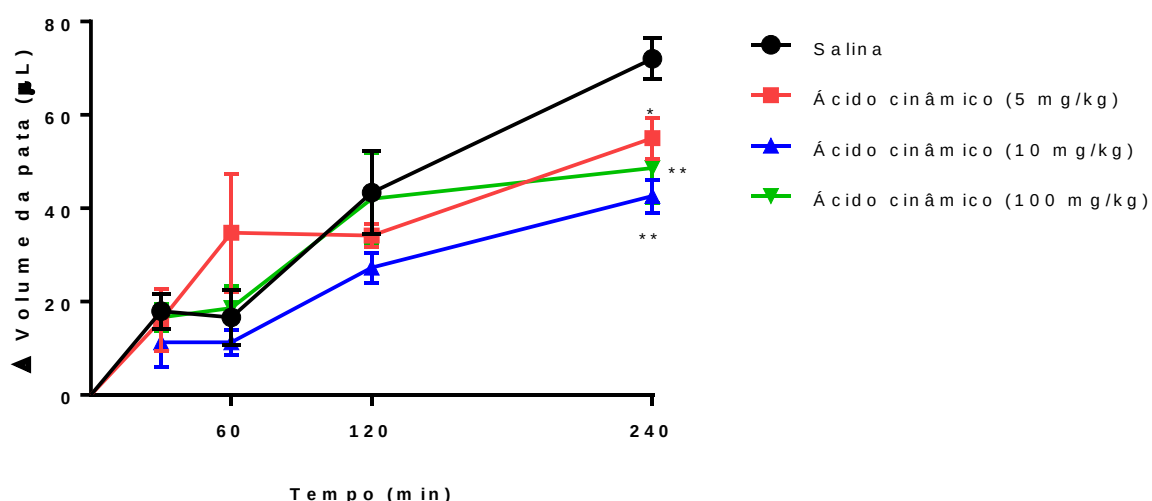
Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias e foram analisados através do software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA). Comparações entre os grupos experimentais foram feitas utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Newmann-Keuls-Student. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do ATC no edema de pata induzido por carragenina

Para avaliar o efeito anti-edematogênico do ácido *trans*-cinâmico foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina. A injeção de carragenina na pata dos animais induziu a formação de edema no tempo de 4 h (figura 8). O pré-tratamento com ácido *trans*-cinâmico foi capaz de reduzir significativamente a formação de edema em todas as concentrações utilizadas na formação do edema 4 h após o estímulo.

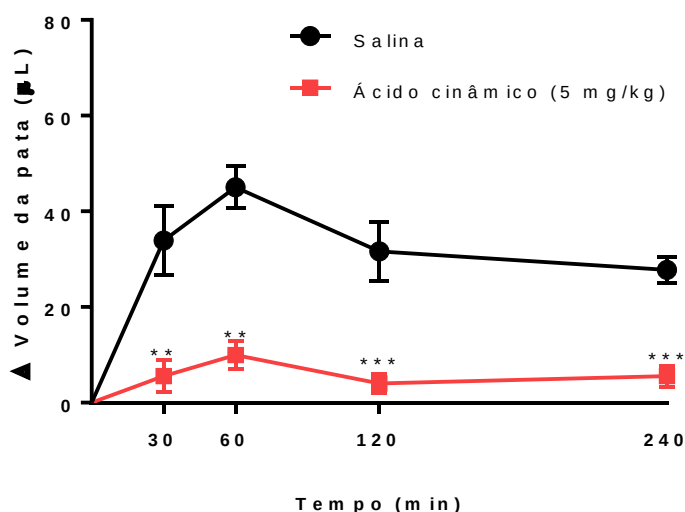
Figura 8 – Edema de pata induzido por carragenina.



Os camundongos foram pré-tratados com solução salina 0,9% ou ácido *trans*-cinâmico (5, 10 ou 100 mg/kg, i.p.) 1 h antes do estímulo com carragenina. Após diferentes tempos (60, 120 e 240 min) do estímulo o edema foi mensurado. Os resultados foram plotados como média $\pm$ erro padrão do Δ do volume da pata. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (*) representa $p < 0,05$ e (**) representa $p < 0,01$ quando comparado ao grupo tratado com salina no tempo de 240 min.

5.2 Efeito do ATC no edema de pata induzido por prostaglandina E₂

O tratamento com ácido *trans*-cinâmico (5 mg/kg) 1 h antes do estímulo interferiu na formação do edema induzido por PGE₂ de forma significativa em todos os tempos avaliados (figura 9, p. 36).

Figura 9 – Edema de pata induzido por PGE₂.

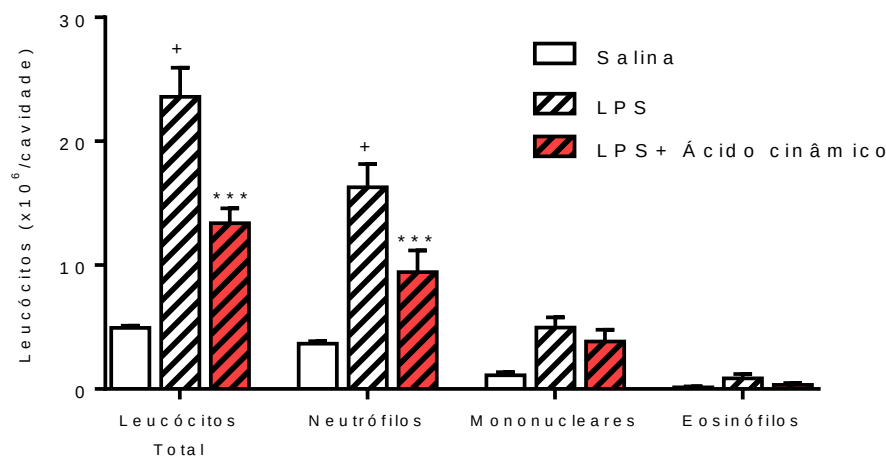
Camundongos foram pré-tratados com solução salina 0,9% ou ácido *trans*-cinâmico (5 mg/Kg, i.p.) 1 h antes do estímulo com PGE₂. Após diferentes tempos (30, 60, 120 e 240 min) do estímulo o edema foi mensurado. Os resultados foram plotados como média $\pm$ erro padrão do Δ do volume da pata. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (**) representa $p < 0,01$ e (***) representa $p < 0,001$ quando comparado ao grupo tratado com salina no respectivo tempo de análise.

5.3 Efeito do ATC no modelo de pleurisia induzida por LPS

No modelo de pleurisia, a injeção intratorácica de LPS induziu, após 4 h, um aumento no número de leucócitos totais na cavidade pleural dos animais em comparação ao grupo controle estimulados com solução salina (figura 10, p. 37). Entretanto, o pré-tratamento com ácido *trans*-cinâmico (10 mg/kg) reduziu significativamente o recrutamento leucocitário para o sítio inflamatório.

Ao avaliar os tipos de leucócitos mobilizados para a cavidade pleural após o estímulo com LPS foi observado após 4 h um intenso acúmulo de neutrófilos em comparação ao grupo controle estimulado com salina (figura 10, p. 37). De forma interessante, o pré-tratamento com ácido *trans*-cinâmico (10 mg/kg) promoveu redução significativa no acúmulo pleural apenas de neutrófilo (figura 10, p. 37).

Figura 10 – Contagem total e diferencial de células do lavado pleural.

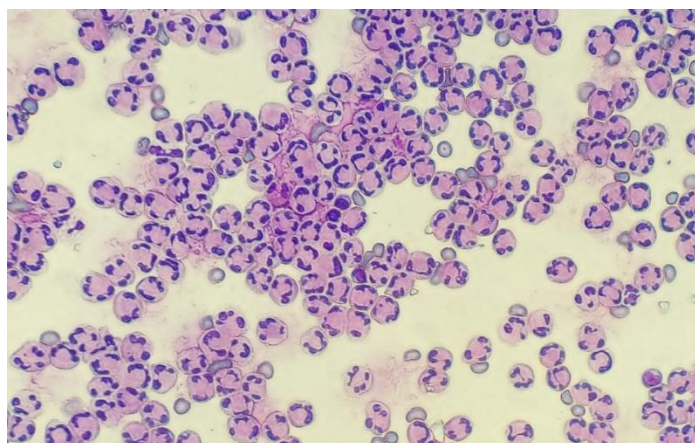


Os camundongos foram pré-tratados com solução salina 0,9% ou ácido *trans*-cinâmico (10 mg/kg) 1 h antes do estímulo pleural com LPS (250 ng/ml). Após 4 h, os animais foram sacrificados e o lavado pleural foi recolhido para contagem de leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. (+) representa $p < 0,001$ comparado ao grupo estimulado com salina (controle) e (***) representa $p < 0,001$ quando comparado ao grupo estimulado com LPS.

5.4 Isolamento de neutrófilos

Todos os experimentos foram realizados com neutrófilos provenientes de isolamentos com pureza (figura 11) e viabilidade ≥ 95 .

Figura 11 – Neutrófilos humanos isolados.

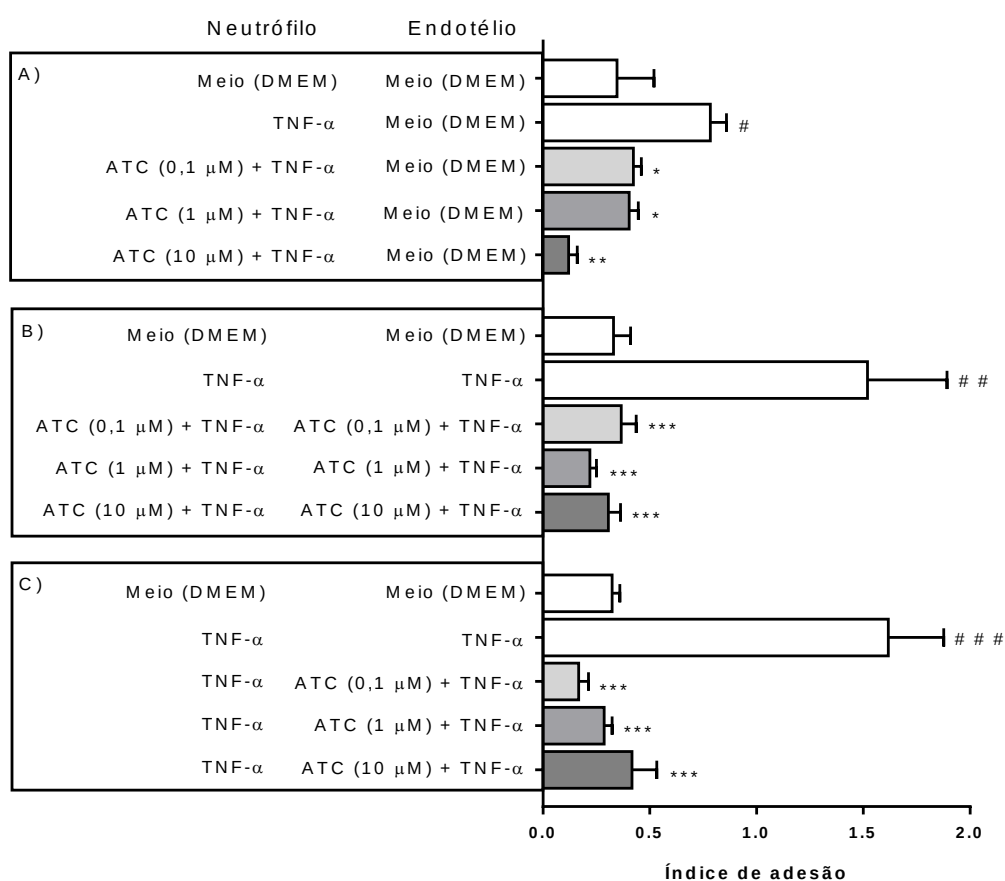


Após o isolamento, os neutrófilos foram citocentrifugados, corados com corante panótico para avaliação da pureza das amostras. A imagem representa neutrófilos provenientes de um isolamento com $\geq 95\%$ de pureza.

5.5 Efeito do ATC sobre a adesão de neutrófilos

No ensaio de adesão *in vitro*, quando neutrófilos humanos foram estimulados com TNF- α (50 ng/mL) e postos a aderir sobre o endotélio, mantido apenas com meio de cultura (DMEM), observou-se um significativo aumento no índice de adesão celular em comparação com neutrófilos não estimulados. Após o tratamento dos neutrófilos com ATC, o aumento no índice de adesão induzido pelo TNF- α foi significativamente inibido (figura 12A).

Figura 12 – Índice de adesão de neutrófilos em células endoteliais.



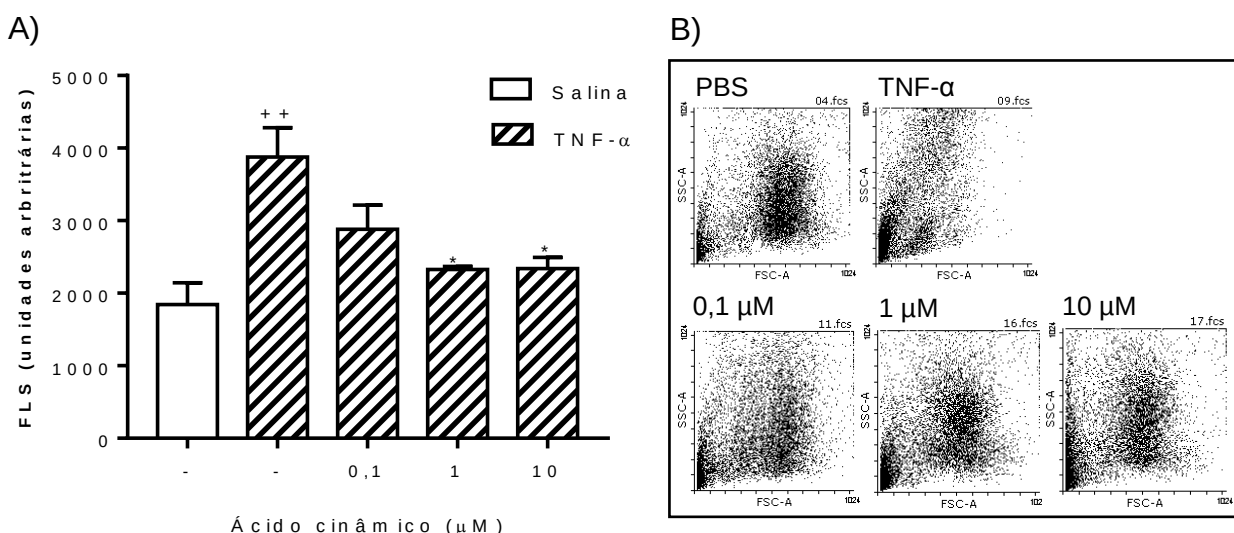
Legenda: A) Índice de adesão neutrófilo-endotélio com neutrófilos pré-tratados com ATC e estimulados com TNF- α . B) Índice de adesão neutrófilo-endotélio com neutrófilos e endotélio pré-tratados com ATC e estimulados com TNF- α . C) Índice de adesão neutrófilo-endotélio com endotélio pré-tratado com ATC e estimulado juntamente aos neutrófilos com TNF- α . O estímulo com TNF- α foi realizado por 6 h no endotélio e/ou 1 h nos neutrófilos. Após o estímulo, as células foram co-cultivadas por 2 h, e, em seguida, fixadas e coradas para quantificação do índice de adesão. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (#) $p < 0,05$, (# #) $p < 0,01$, (# # #) $p < 0,001$ comparado ao grupo mantidos apenas com meio de cultura DMEM (controle), (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo estimulado com TNF- α .

Neste mesmo modelo, o estímulo com TNF- α sobre as células endoteliais induziu um aumento ainda maior no índice de adesão de neutrófilos estimulados. Nesta condição, neutrófilos e endotélio tratados com ATC, exibiram uma redução significativa no índice de adesão celular (figura 12B, p. 38). Um fenômeno semelhante foi observado quando neutrófilos estimulados com TNF- α foram postos a aderir sobre o endotélio tratado com ATC e estimulado com TNF- α (Figura 12C, p.38).

5.6 Efeito do ATC sobre a mudança de forma (shape change) em neutrófilos

O efeito do ácido *trans*-cinâmico na mudança de forma (shape change) de neutrófilos induzidos por TNF- α foi avaliado por citometria de fluxo após 2 h da estimulação. As células expostas ao TNF- α (50 ng/mL) exibiram uma significativa alteração na morfologia, fenômeno que foi mensurado pelo aumento no espalhamento de luz (FLS). No entanto, as alterações na forma dos neutrófilos foram significativamente inibidas quando as células foram tratadas com ácido *trans*-cinâmico nas duas maiores concentrações avaliadas (1 e 10 μ M) (figura 13). O tratamento com a menor concentração de ácido *trans*-cinâmico (0,1 μ M) apesar de reduzir a mudança na forma dos neutrófilos, não exibiu diferença estatística.

Figura 13 – Mudança na forma de neutrófilos estimulados por TNF- α .



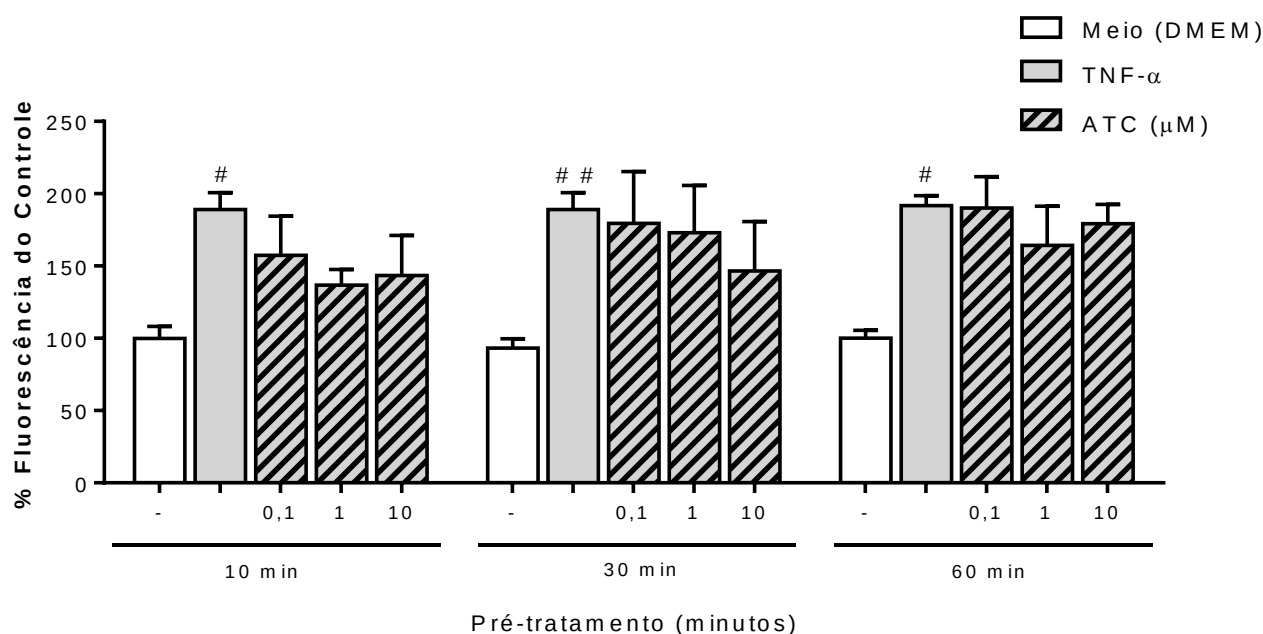
Legenda: A) Neutrófilos isolados foram pré-tratados com ácido *trans*-cinâmico (0,1, 1 e 10 μ M) por 1 h e estimulados com TNF- α (50 ng/mL). Após 1 h do estímulo, as células foram transferidas para tubos e levadas ao citômetro de fluxo para verificação morfológica. B) "dotplots" representativos de neutrófilos não estimulados (controle), estimulados com TNF- α , e pré-tratados com ácido *trans*-cinâmico. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguida com o teste de Newman-Keuls. (++) representa p < 0,01 quando comparado

ao grupo estimulado com salina (controle), (*) representa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo exposto ao TNF- α sem tratamento.

5.7 Efeito do ATC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio

Para avaliar o efeito do ácido *trans*-cinâmico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizada a sonda fluorescente DCFH-DA em neutrófilos tratados e submetidos a estimulação *in vitro*. Conforme mostrado na figura 14, neutrófilos estimulados com TNF- α por 1 h exibiram um aumento expressivo na intensidade de fluorescência do DCF, o que está relacionado diretamente com um aumento na geração de EROs. No entanto, o pré-tratamento dos neutrófilos com diferentes concentrações de ácido *trans*-cinâmico não provocou alteração significativa no conteúdo de EROs.

Figura 14 – Produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos.

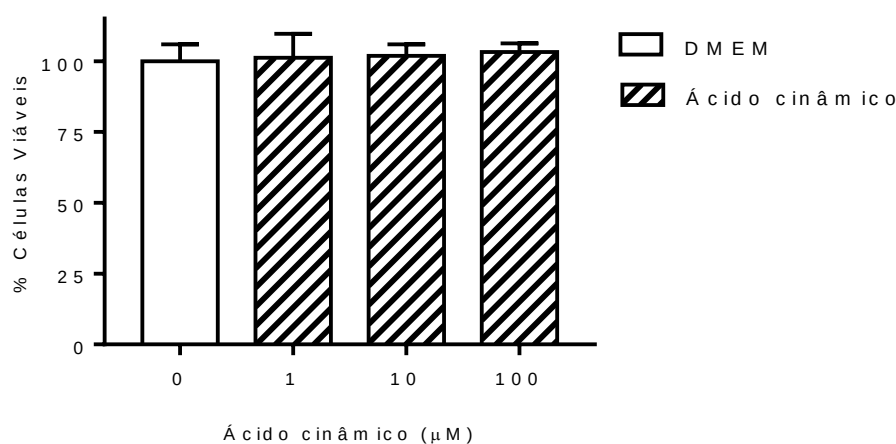


Os neutrófilos foram pré-tratados com ácido *trans*-cinâmico por 10, 30 ou 60 min e estimulados com TNF- α (50 ng/mL). Após 1 h do estímulo, as células foram incubadas com DCFH-DA por mais 30 min e avaliadas no citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Os grupos foram comparados através de ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. (##) representa $p < 0,01$ quando comparado ao grupo estimulado com meio (controle).

5.8 Efeito do ácido *trans*-cinâmico sobre a viabilidade de neutrófilos

Com propósito de verificar o efeito do ATC sobre a viabilidade neutrófilos, as células foram mantidas sob tratamento com ATC por 6 h, e em seguida tiveram sua viabilidade mensurada pela técnica do MTT. Conforme apresentado na figura 15, os neutrófilos expostos a diferentes concentrações de ATC não exibiram alterações significativas em sua viabilidade, o que descarta possíveis efeitos citotóxicos para este composto fenólico sobre os neutrófilos.

Figura 15 - Viabilidade de neutrófilos expostos ao ácido *trans*-cinâmico.



Os neutrófilos humanos foram expostos a diferentes concentrações de ácido *trans*-cinâmico por 6 h. Após esse período, as células foram incubadas com MTT por 4 h e, em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos como média das porcentagens em relação ao grupo controle (média do controle = 100% de viabilidade) $\pm$ erro padrão.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo objetivamos avaliar o efeito do ácido *trans*-cinâmico (ATC), um composto fenólico de origem natural, sobre diferentes parâmetros da resposta inflamatória aguda utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Nossos resultados revelaram que a administração sistêmica do ATC foi capaz de inibir a inflamação por reduzir a formação de edema e o recrutamento de neutrófilos. Além disso, verificamos ainda que o ATC inibiu a adesão entre neutrófilo e endotélio, bem como atenuou a ativação de neutrófilos por suprimir o “*shape change*” induzido por TNF- α sem afetar a viabilidade das células. Entretanto, apesar destes efeitos inibidores, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por neutrófilos ativados não sofreram interferência após tratamento com ATC, sugerindo que este composto fenólico age por vias específicas para afetar a função neutrofílica.

A identificação de substâncias a partir de fontes naturais tem contribuído significativamente para a obtenção de fármacos (LIU, 2013). Na atualidade, mesmo com todos os avanços no desenvolvimento de novos medicamentos, os produtos obtidos de fontes naturais continuam sendo utilizados como base para o desenvolvimento de medicamentos, seja de forma direta, ou tendo suas estruturas utilizadas como inspiração para síntese de novos compostos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Além disso, um crescente número de trabalhos tem apontado para os potenciais benefícios da inclusão de alimentos ricos em metabólitos secundários bioativos na dieta, em especial alimentos como hortaliças, cereais e frutas, que são ricos em compostos fenólicos. Os ácidos fenólicos têm sido relacionados à atenuação das alterações no organismo associadas ao envelhecimento, incluindo redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (SAIBABU et al., 2015).

O ácido cinâmico, mesmo tendo sido alvo de estudos anteriores por diversos grupos de pesquisa, onde foi reportado possuidor de atividades antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, antitumoral e antidiabéticas, até o momento, poucos estudos descrevem suas ações sobre a resposta inflamatória aguda, em especial sobre a formação do edema inflamatório e ativação de neutrófilos (ADISAKWATTANA, 2017; AMANO et al., 2017; SILVEIRA et al., 2018; LIMA et al., 2017; UESAWA et al., 2018).

Portanto, neste estudo objetivamos avaliar os efeitos do ácido *trans*-cinâmico sobre a inflamação aguda em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Inicialmente, decidimos avaliar o efeito do ATC na formação do edema inflamatório induzido por carragenina. O modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos é uma metodologia amplamente utilizada para a identificação de substâncias com potencial anti-inflamatório. Neste modelo experimental, a injeção da carragenina induz alterações vasculares que culminam na formação de um edema inflamatório regido por tipos diferentes de mediadores que atuam em momentos distintos. Como consequência, a injeção de carragenina permite a formação de edema em uma denominada primeira fase (até 2 h após o estímulo), onde nota-se a intensa participação da histamina, enquanto que na segunda fase (que ocorre entre 3 e 6 h após o estímulo) nota-se a intensa liberação de prostaglandinas e infiltração de neutrófilos no local da inflamação (HENRIQUES et al., 1987). No presente estudo, o tratamento prévio com ATC reduziu o volume das patas de animais estimulados com carragenina 4 h após o estímulo em todas as concentrações utilizadas. Porém, não foi possível identificar qualquer tipo de efeito inibidor nos tempos anteriores a 4 h. Logo, estes resultados sugerem que o ATC apresenta efeitos preferencialmente sobre o edema formado pela produção/ação das prostaglandinas e/ou sobre a infiltração de neutrófilos. De fato, estudos realizados *in vitro* por Liao e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento com ATC inibiu a expressão de COX-2 em macrófagos estimulados por LPS, o que reforça a proposta de ação inibidora do ATC sobre a geração de prostanoides.

Com propósito de melhor esclarecer o alvo de ação do ATC, os animais foram previamente tratados com este composto fenólico e submetidos ao modelo de formação de edema induzido por PGE₂. Neste conjunto de experimentos foi observado que o ATC inibiu a formação do edema em todos os tempos avaliados, indicando um efeito deste composto fenólico em prevenir as ações da PGE₂. Posadas e colaboradores (2004) observaram que a PGE₂ é um importante mediador presente nos tempos mais tardios da edematogênese, mantendo-se em níveis elevados até 96 h após o estímulo com carragenina.

Merece ser destacado ainda que a formação do edema inflamatório se mostra também dependente do influxo de leucócitos para o sítio inflamatório (SUO et al., 2014). Dessa forma, decidimos também verificar se os efeitos inibidores do ATC sobre a

formação do edema se estendem aos eventos de mobilização leucocitária. Para isso, utilizamos modelo de pleurisia induzida por LPS. Neste modelo experimental, a injeção intratorácica de LPS provoca, após 4 h, uma intensa mobilização leucocitária para o espaço pleural, em especial o recrutamento de neutrófilos (CAVALHER-MACHADO et al., 2008). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com ATC inibiu intensamente o influxo de neutrófilos, fenômeno que pode ser devido a efeitos diretos e/ou indiretos do ATC sobre os mecanismos responsáveis pela mobilização deste tipo celular para o tecido. Em sintonia com estes achados, estudos prévios demonstram que o ATC mostra-se capaz de inibir o acúmulo de neutrófilos no pulmão de animais estimulados com LPS (XU et al., 2017). Além disso, Bouriche e colaboradores (2016) observaram uma redução em dois importantes mediadores do recrutamento de neutrófilos (TNF- α e IL-1 β) quando pré-trataram células mononucleares de sangue periférico com extrato metanólico das folhas de *Hertia cheirifolia*, após o estímulo com concavalina A. Esse extrato tem como um de seus principais constituintes o ATC.

Cabe mencionar que apesar dos neutrófilos serem células importantes para a defesa do organismo contra agentes invasores, o número aumentado deste tipo celular no tecido mostra-se relacionado a patogênese de diferentes tipos de doenças como por exemplo artrite reumatoide, doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística e câncer (AMULIC et al., 2012; MOCSAI et al., 2015). Modelos experimentais com animais demonstraram que o leucotrieno B4 produzido por neutrófilos nas articulações é essencial para o desenvolvimento da artrite reumatoide. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no fluido sinovial de pacientes com essa doença (RAZA et al., 2006). Os neutrófilos são abundantes em tumores e influenciam seu desenvolvimento através da liberação de mediadores como ROS, citocinas e proteases. De fato, uma maior presença de neutrófilos está associada a prognósticos desfavoráveis. Diversos tumores recrutam neutrófilos através da produção de IL-8 (GREGORY; HOUGHTON, 2011). Essas informações justificam a identificação de substâncias capazes de controlar o tráfico de neutrófilos para o sítio inflamatório.

De fato, os eventos que levam a mobilização leucocitária para o tecido após o estímulo inflamatório constituem alvos farmacológicos importantes. O recrutamento de neutrófilos mostra-se orquestrado pela produção/secreção/ação de quimiocinas, citocinas, mediadores lipídicos e mudanças endoteliais. A ação ordenada de todos

estes eventos leva à transmigração de neutrófilos através da parede dos vasos, acumulando-se no espaço extravascular (AMULIC et al., 2012). A infecção por bactérias gram-negativas é um exemplo de evento inflamatório com alto recrutamento de neutrófilos. A membrana externa dessas bactérias tem em sua composição o LPS, molécula que se liga a receptores do tipo Toll (TLR) induzindo a produção de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, mediadores que estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos (BASIT et al., 2006; MOCSAI et al., 2015).

Dentre as etapas do recrutamento de neutrófilos, a adesão ao endotélio é um fenômeno essencial para a transmigração dessas células e consequentemente para sua chegada ao sítio inflamatório. O endotélio ativado expressa moléculas de adesão que permitem a interação com neutrófilos, que se inicia com baixa afinidade através de selectinas, e prossegue com a adesão firme que resulta da ativação de cascatas de sinalização intracelular ação de integrinas (PHILLIPSON; KUBES, 2011). A inibição farmacológica da adesão de neutrófilos contribui para a redução da inflamação, de forma que os neutrófilos não conseguem se firmar no lúmen endotelial e consequentemente não alcançam o sítio inflamatório (NOURSHARGH; HORDIJK; SIXT, 2010). Em condições experimentais, a adesão pode ser observada *in vitro* através da co-cultura de células endoteliais ativadas e neutrófilos, e constitui um meio de avaliar a o efeito de compostos de interesse farmacológico sobre este fenômeno e, consequentemente, sobre a inflamação.

Considerando que os resultados obtidos até o momento revelaram que o ATC reduziu o acúmulo de neutrófilos no modelo de pleurisia, decidimos avaliar uma possível ação direta deste composto fenólico sobre a ativação de células endoteliais e neutrófilos através da adesão entre essas células em co-cultura. O pré-tratamento com ácido *trans*-cinâmico inibiu a adesão não só quando administrado em neutrófilos, mas também em células endoteliais. A redução da capacidade adesiva nas células endoteliais pode indicar uma ação inibidora do ácido *trans*-cinâmico sobre a expressão de moléculas de adesão, já que essas moléculas não são expressas no endotélio em repouso (POBER; SESSA, 2007). Nos neutrófilos, é possível que o ácido *trans*-cinâmico esteja impedindo o “*shape change*”, fenômeno necessário para que essas células consigam aderir firmemente, transmigrar e seguir gradientes de quimiotáticos (NOURSHARGH; HORDIJK; SIXT, 2010). Em todo caso, esses resultados corroboram com a diminuição do recrutamento de neutrófilos observada no

modelo de pleurisia induzida por LPS. A inibição da adesão é um fenômeno desencadeado por diversos AINEs, colaborando com seus efeitos farmacológicos (CRONSTEIN et al., 1994).

O “*shape change*” de neutrófilos é um conjunto de alterações morfológicas indispensável para a migração dessas células. Ao detectar esses sinais inflamatórios, os neutrófilos reorganizam os componentes do citoesqueleto se tornando polarizados, um processo que cria um gradiente de sinalização intracelular que possibilita que os neutrófilos adiram, transmigrem e se desloquem até o sítio inflamatório seguindo o gradiente de concentração de agentes quimiotáticos (NOURSHARGH; HORDIJK; SIXT, 2010). Mudanças na morfologia de neutrófilos podem ser mensuradas, permitindo identificar a ativação celular, e, conseqüentemente, possibilitando o rastreamento de compostos capazes de induzir ou inibir a ativação celular. A citometria de fluxo é uma técnica consolidada para a identificação de mudanças na forma (*shape change*) de neutrófilos (CONTE et al., 2015; COLE et al., 1995).

Considerando o efeito inibidor do ATC sobre a adesão neutrófilo-endotélio, e tendo em vista que as mudanças morfológicas em neutrófilos são indicadoras de ativação celular, além de uma condição importante para o recrutamento dessas células, decidimos avaliar o efeito do ácido *trans*-cinâmico sobre o “*shape change*” de neutrófilos. Nossos resultados demonstraram que neutrófilos humanos tratados com ATC têm suas mudanças na forma atenuadas após ativação. Este resultado permite sustentar que o impedimento na mudança de forma de neutrófilo justifica a menor capacidade migratória desta célula, o que sustenta os achados *in vivo* no modelo de pleurisia. Corroborando com estes achados, El-Raouf e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento com ATC inibiu o acúmulo de neutrófilos no baço de ratos injetados com cisplatina, o que contribuiu para redução na esplenotoxicidade deste quimioterápico.

A partir da observação de que o ATC mostrou-se capaz de inibir a alteração na forma de neutrófilos, decidiu-se avaliar se outros parâmetros relacionados à ativação neutrofílica também estariam inibidos após o tratamento com este composto fenólico. É de conhecimento de que neutrófilos ativados produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) para realizar múltiplas funções. Por exemplo, ao engolfar bactérias os neutrófilos as isolam em pequenas vesículas – os fagossomos – onde são liberados os ânions superóxidos (precursor do peróxido de hidrogênio e de outras EROs) com

atividade microbicida (MITTAL et al., 2014). Os neutrófilos também utilizam EROs para sinalização em vias regulatórias através da enzima NADPH oxidase 2 (NOX2) e podem modificar alvos extracelulares e alterar a função das células vizinhas através da produção de oxidantes (WINTERBOURNE; KETTLE; HAMPTON, 2016). Mutações em genes envolvidos na produção de EROs resultam em desordens patológicas como a doença granulomatosa crônica, que é caracterizada por um grande aumento na suscetibilidade a infecções bacterianas e fúngicas (MITTAL et al., 2014). Tomados em conjunto estas informações, seguimos para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos após estimulação com TNF- α . Nossos resultados revelaram que o tratamento prévio com ATC não alterou a produção de EROs nos neutrófilos estimulados com TNF- α . Este resultado difere de alguns estudos já publicados na literatura científica que descrevem o potencial antioxidante do ácido cinâmico (MAKHMOOR et al., 2013; BELOBORODOVA et al., 2012). Entretanto, tal diferença entre os estudos deve levar em consideração a distinção do protocolo experimental tanto no que diz respeito ao tempo de ativação quanto a natureza do estímulo que foram diferentes entre os trabalhos. Além disso, outras funções dos neutrófilos podem estar comprometidas, dentre elas a migração. Entretanto, mais estudos são necessários para responder esta questão.

Para descartar um potencial efeito citotóxico do ATC sobre os neutrófilos, e com isso validar seus efeitos inibidores sobre o infiltrado de neutrófilos no modelo de pleurisia em camundongos, a adesão e as mudanças de forma (“shape change”) observadas nos neutrófilos *in vitro*, a interferência do ATC sobre a viabilidade de neutrófilos foi avaliada por MTT. Os resultados deste estudo demonstraram que o ATC, nas condições experimentais utilizadas, não foi citotóxico para neutrófilos nas concentrações utilizadas. Portanto, o conjunto de destes resultados demonstram que o ATC possui efeito anti-inflamatório sendo capaz de modular ações específicas sobre neutrófilos *in vivo* e *in vitro*.

Os resultados observados neste trabalho revelam os efeitos do ácido *trans*-cinâmico sobre alguns parâmetros da inflamação aguda. Contudo, muitos outros aspectos necessitam ser explorados para esclarecer os potenciais mecanismos de ação que este composto afeta para atingir seus efeitos nas células estudadas. Fatores como a expressão de moléculas de adesão endoteliais e em neutrófilos, citoesqueleto e expressão de NF- κ B, um fator de transcrição com papel central na inflamação,

envolvido com a expressão de moléculas de adesão, síntese de citocinas pró-inflamatórias e na produção da COX-2, podem contribuir de forma positiva para a construção do conhecimento sobre os efeitos anti-inflamatórios do ácido *trans*-cinâmico.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que o ATC:

- Apresentou atividade anti-inflamatória nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e prostaglandina E_2 .
- Mostrou-se capaz de inibir o recrutamento leucocitário, em especial de neutrófilos, no modelo de pleurisia induzida por LPS.
- Induziu a redução da adesão tanto em neutrófilos quanto em células endoteliais estimuladas por $TNF-\alpha$.
- Inibiu a alteração de forma de neutrófilos humanos estimulados por $TNF-\alpha$, mas não interferiu com a capacidade dos neutrófilos em produzir espécies reativas de oxigênio após estímulo com $TNF-\alpha$.
- Não apresentou efeitos citotóxicos sobre neutrófilos.

Em conjunto, os resultados obtidos apontam o potencial anti-inflamatório do ATC em modelos inflamatórios *in vivo* e *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABU-AMSHA, R. et al. Phenolic Content of Various Beverages Determines the Extent of Inhibition of Human Serum and Low-Density Lipoprotein Oxidation in Vitro: Identification and Mechanism of Action of Some Cinnamic Acid Derivatives from Red Wine. **Clinical Science**, [s.l.], v. 91, n. 4, p.449-458, out. 1996.
- ADISAKWATTANA, S. Cinnamic Acid and Its Derivatives: Mechanisms for Prevention and Management of Diabetes and Its Complications. **Nutrients**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.163-190, 21 fev. 2017.
- AGUSTI, A.; SIN, D. Biomarkers in COPD. **Clinics in Chest Medicine**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.131-141, mar. 2014.
- ALAM, M. A.; SERNIA, C.; BROWN, L. Ferulic Acid Improves Cardiovascular and Kidney Structure and Function in Hypertensive Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.240-249, mar. 2013.
- AMANO, R. et al. Cinnamic acid derivatives inhibit hepatitis C virus replication via the induction of oxidative stress. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 145, p.123-130, set. 2017.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.459-489, 23 abr. 2012.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, [s.l.], v. 78, n. 5, p.431-441, dez. 2005.
- BARNES, P. J. Therapeutic approaches to asthma—chronic obstructive pulmonary disease overlap syndromes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s.l.], v. 136, n. 3, p.531-545, set. 2015.
- BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. How Do Corticosteroids Work in Asthma? **Annals of Internal Medicine**, [s.l.], v. 139, n. 51, p.359-370, 2 set. 2003.
- BARROS, B. S. et al. Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. **Journal of Natural Medicines**, [s.l.], v. 65, n. 3-4, p.526-531, 6 abr. 2011.

BASIT, A. et al. ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. **American Journal of Physiology-lung Cellular and Molecular Physiology**, [s.l.], v. 291, n. 2, p.200-207, ago. 2006.

BELLOCCO, A. et al. Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. **The American journal of pathology**, v. 152, n. 1, p. 83, 1998.

BELOBORODOVA, N. et al. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. **Journal of Biomedical Science**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.820-826, 2012.

BESERRA, A. M. S. S. et al. Gastroprotective and Ulcer-Healing Mechanisms of Ellagic Acid in Experimental Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 59, n. 13, p.6957-6965, 13 jul. 2011.

BOURICHE, H. et al. Phytochemical screening and anti-inflammatory properties of Algerian *Hertia cheirifolia* methanol extract. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 54, n. 11, p.2584-2590, 9 de maio 2016.

CAVALHER-MACHADO, S. C. et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 8, n. 11, p.1552-1560, nov. 2008.

CHANG, H. C. et al. *Hericium erinaceus* Inhibits TNF- α -Induced Angiogenesis and ROS Generation through Suppression of MMP-9/NF- κ B Signaling and Activation of Nrf2-Mediated Antioxidant Genes in Human EA.hy926 Endothelial Cells. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2016, p.1-15, 2016.

CHAO, P.; HSU, C.; YIN, M. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition & Metabolism**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.33-41, 2009.

CHEN, W.; WU, L. Chlorogenic acid suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory mediators in human chondrocytes. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, [s.l.], v. 7, n. 12, p. 8797–8801, 2014.

CHUNG, K. F.; ADCOCK, I. M. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. **European Respiratory Journal**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.1334-1356, 5 mar. 2008.

CHUNG, K. et al. The role of increased airway microvascular permeability and plasma exudation in asthma. **European Respiratory Journal**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 329-337, 1990.

COLE, A. T. et al. A Flow Cytometric Method to Measure Shape Change of Human Neutrophils. **Clinical Science**, [s.l.], v. 89, n. 5, p.549-554, nov. 1995.

CONTE, F. et al. Effect of Gedunin on Acute Articular Inflammation and Hypernociception in Mice. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.2636-2657, 3 fev. 2015.

CORTIJO, V. et al. Conformational Map of Phenolic Acids. **The Journal of Physical Chemistry A**, [s.l.], v. 122, n. 2, p.646-651, 5 jan. 2017.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1830, n. 6, p.3670-3695, jun. 2013.

CRONSTEIN, B. N. et al. Nonsteroidal antiinflammatory agents inhibit stimulated neutrophil adhesion to endothelium: Adenosine dependent and independent mechanisms. **Inflammation**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.323-335, jun. 1994.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.348-361, 2007.

DAVIS, C. et al. Definition of the Mediterranean Diet; A Literature Review. **Nutrients**, [s.l.], v. 7, n. 11, p.9139-9153, 5 nov. 2015.

DAY, R.; GRAHAM, G. Correction. **British Journal of Sports Medicine**, [s.l.], v. 48, n. 18, p.1396-1396, 6 set. 2013.

DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents-A Review. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 11, p.1672-1703, 1 abr. 2011.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.545-558, 7 ago. 2015.

DIAKOS, C. I. et al. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 15, n. 11, p.493-503, out. 2014.

DONABEDIAN, H.; SAWYER, T.; SENITZER, D. Inhibition of Neutrophil Shape Change by an Inhibitor of Chemotaxis. **Journal of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 42, n. 5, p.510-518, nov. 1987.

DOOLEY, D. C.; SIMPSON, J. F.; MERYMAN, H. T. Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation. **Experimental hematology**, v. 10, n. 7, p. 591–9, ago. 1982.

EL-RAOUF, O. M. A.; EL-SAYED, E. M.; MANIE, M. F. Cinnamic Acid and Cinnamaldehyde Ameliorate Cisplatin-Induced Splenotoxicity in Rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.426-431, 24 jun. 2015.

FARIAS, J. A. C. et al. Modulation of Inflammatory Processes by Leaves Extract from *Clusia nemorosa* Both In Vitro and In Vivo Animal Models. **Inflammation**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.764-771, 13 ago. 2011.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.149-164, 11 ago. 2013.

FÜRST, R.; ZÜNDORF, I. Plant-Derived Anti-Inflammatory Compounds: Hopes and Disappointments regarding the Translation of Preclinical Knowledge into Clinical Progress. **Mediators of Inflammation**, [s.l.], v. 2014, p.1-9, 2014.

GREGORY, A. D.; HOUGHTON, A. McGarry. Tumor-Associated Neutrophils: New Targets for Cancer Therapy. **Cancer Research**, [s.l.], v. 71, n. 7, p.2411-2416, 22 mar. 2011.

HAFIZUR, R. M. et al. Cinnamic acid exerts anti-diabetic activity by improving glucose tolerance in vivo and by stimulating insulin secretion in vitro. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.297-300, fev. 2015.

HALARIS, A. Inflammation, Heart Disease, and Depression. **Current Psychiatry Reports**, [s.l.], v. 15, n. 10, p.400-413, 24 ago. 2013.

HELENO, S. A. et al. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 173, p.501-513, abr. 2015.

HELLER, A. et al. Lipid Mediators in Inflammatory Disorders. **Drugs**, [s.l.], v. 55, n. 4, p. 487-496, 1998.

HENRIQUES, M. G. et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 20, n. 2, p. 243–9, 1987.

HOENDERDOS, K.; CONDLIFFE, A. The Neutrophil in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Too Little, Too Late or Too Much, Too Soon? **American Journal of Respiratory Cell And Molecular Biology**, [s.l.], v. 48, n. 5, p.531-539, maio 2013.

HOUGHTON, A. M. et al. Neutrophil elastase–mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.219-223, 17 jan. 2010.

KABERA, J. N. et al. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, [s.l.], n. 2, p.377-392, 2014.

KARUNANIDHI, A. et al. In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activities of Chlorogenic Acid against Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the Trimethoprim/Sulfamethoxazole Resistant Strain. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-7, 2013.

KINGHORN, D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 12, n. 2, p. 189–96, mar. 2009.

KOJIMA, M. et al. Alexithymia, Depression, Inflammation, and Pain in Patients With Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Care & Research**, [s.l.], v. 66, n. 5, p.679-686, 22 abr. 2014.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. **Cell**, [s.l.], v. 160, n. 5, p.816-827, fev. 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010;

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.498-512, jul. 2002.

LADDOMADA, B.; CARETTO, S.; MITA, G. Wheat Bran Phenolic Acids: Bioavailability and Stability in Whole Wheat-Based Foods. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 9, p.15666-15685, 28 ago. 2015.

LANNES-VIEIRA, J. et al. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. **International Immunology**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.1421-1430, 1993.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s.l.], v. 1, n. 6, p.1651-1651, 7 out. 2009.

LAWRENCE, T. et al. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 2, n. 10, p.787-795, out. 2002.

LEE, H.; NA, H.; SURH, Y. Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy. **Seminars in Immunopathology**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.151-161, 31 jan. 2013.

LEE, J. H. et al. Protective Effect of Ellagic Acid on Concanavalin A-Induced Hepatitis via Toll-Like Receptor and Mitogen-Activated Protein Kinase/Nuclear Factor κ B Signaling Pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 62, n. 41, p.10110-10117, 2 out. 2014.

LI, X.; WANG, X.; CHEN, D.; CHEN, S. Research Open Access Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid in vitro. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 1, n. 7, p. 232–244, 2011.

LIAO, J. et al. Anti-Inflammatory Activities of Cinnamomum cassia Constituents In Vitro and In Vivo. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2012, p.1-12, 2012.

LIMA, T. C. et al. Antifungal activity of cinnamic acid and benzoic acid esters against *Candida albicans* strains. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.572-575, 20 abr. 2017.

LIU, L. et al. Cinnamic acid: A natural product with potential use in cancer intervention. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 62, n. 3, p.345-350, 28 jul. 1995.

LIU, R. H. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 78, n. 1, p.18-25, jun. 2013.

LÖSER, B. et al. Inhibition of Neutrophil Elastase Activity by Cinnamic Acid Derivatives from *Cimicifuga racemosa*. **Planta Medica**, [s.l.], v. 66, n. 8, p.751-753, dez. 2000.

MAKHMOOR, T. et al. Hepatoprotection by chemical constituents of the marine brown alga *Spatoglossum variable*: A relation to free radical scavenging potential. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.383-390, 14 fev. 2013.

MENDES, R. T. et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.774-782, out. 2012.

MITTAL, M. et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.1126-1167, mar. 2014.

MÓCSAI, A.; WALZOG, B.; LOWELL, C. A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. **Cardiovascular Research**, [s.l.], v. 107, n. 3, p.373-385, 21 maio 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, [s.l.] v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 79, n. 3, p.629-661, 7 fev. 2016.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**. [s.l.], v. 4, n. 3. 2012.

NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. **Immunity**, [s.l.], v. 41, n. 5, p.694-707, nov. 2014.

NOURSHARGH, S.; HORDIJK, P. L.; SIXT, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.366-378, maio 2010.

OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of Inflammatory Diseases. **Current Biology**, [s.l.], v. 22, n. 17, p.733-740, set. 2012.

PANT, S. et al. Inflammation and Atherosclerosis—Revisited. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.170-178, 31 out. 2013.

PEKAREK, L. A. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. **Journal of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 181, n. 1, p.435-440, 1 jan. 1995.

PELAIA, G. et al. Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. **Life Sciences**, [s.l.], v. 72, n. 14, p.1549-1561, fev. 2003.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1381-1390, nov. 2011.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Inflammation and the Blood Microvascular System. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-11, 23 out. 2014.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.803-815, out. 2007.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 142, n. 2, p.331-338, maio 2004.

PRABHAKAR, P. K.; DOBLE, M. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 16, n. 12, p.1119-1126, dez. 2009.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 114, n. 22, p.5601-5606, 1 maio 2016.

RAZA, K. et al. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.120-128, 2006.

SAIBABU, V. et al. Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. **Advances in Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 2015, p.1-10, 2015.

SHITAN, N. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 80, n. 7, p.1283-1293, 4 mar. 2016. Informa UK Limited.

SILVEIRA, G. et al. In Vitro Anti-Toxoplasma gondii and Antimicrobial Activity of Amides Derived from Cinnamic Acid. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.774-785, 28 mar. 2018.

SINDHU, G.; NISHANTHI, Emayavaramban; SHARMILA, Ramalingam. Nephroprotective effect of vanillic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in wistar rats: A biochemical and molecular study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.392-404, jan. 2015.

SOFI, F. et al. Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. **Public Health Nutrition**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.2769-2782, 29 nov. 2013.

SONG, Y. et al. Protocatechuic acid improves cognitive deficits and attenuates amyloid deposits, inflammatory response in aged A β PP/PS1 double transgenic mice. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.276-281, maio 2014.

SRIGOPALRAM, S. et al. Ellagic Acid Normalizes Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Attenuates Inflammation-Mediated Cell Proliferation in Experimental Liver Cancer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 173, n. 8, p.2254-2266, 28 jun. 2014.

SUO, J. et al. Neutrophils mediate edema formation but not mechanical allodynia during zymosan-induced inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 96, n. 1, p.133-142, 20 fev. 2014.

TREVANI, A. S. et al. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. **The Journal of Immunology**, v. 162, n.8, p.4849-4857, 1999.

UESAWA, Y. et al. Quantitative Structure–Cytotoxicity Relationship of Cinnamic Acid Phenetyl Esters. **Anticancer Research**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.817-823, 20 jan. 2018.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, [s.l.], v. 219, n. 1, p.22-96, 25 jan. 2016.

WENDELL, S. G.; BAFFI, C.; HOLGUIN, F. Fatty acids, inflammation, and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s.l.], v. 133, n. 5, p.1255-1264, maio 2014.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, [s.l.], v. 85, n. 1, p.765-792, 2 jun. 2016.

WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, [s.l.], v. 49, n. 9, p.1618-1631, 24 mar. 2010.

XU, F. et al. Protective effect of cinnamic acid in endotoxin-poisoned mice. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 31, n. 12, p.1946-1953, 11 out. 2017. Wiley-Blackwell.

ZHANG, Y. J. et al. Chlorogenic acid alters the voltage-gated potassium channel currents of trigeminal ganglion neurons. **International Journal of Oral Science**, 2014.