



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

TÁCIO NERTAN CARTAXO DE SOUZA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO NO MODELO MURINO
DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

TÁCIO NERTAN CARTAXO DE SOUZA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO NO MODELO MURINO
DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Coorientador: Ana Carolina de Carvalho Correia

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

S731e Souza, Tácio Nertan Cartaxo de.
Efeito anti-inflamatório do ácido *p*-cumárico no modelo murino de lesão pulmonar aguda induzido por lipopolissacarídeo / Tácio Nertan Cartaxo de Souza. – 2018.
60 f. : il. color.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Coorientadora: Ana Carolina de Carvalho Correia.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 51-60.

1. Lesão pulmonar aguda. 2. Ácido *p*-cumárico. 3. Ação anti-inflamatória.
4. Neutrófilo. 5. Lipopolissacarídeo. I. Título.

CDU: 615.276:616-002



Folha de Aprovação

Tacio Nertan Cartaxo de Souza

Efeito anti-inflamatório do ácido p-cumárico no modelo murino de lesão pulmonar aguda induzido por lipopolissacarídeo

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 10 de novembro de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador)

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

Prof.ª Dr.ª Juliane Cabral Silva - (UNCISAL)

Dedico essa dissertação primeiramente a Deus, por me dar forças e iluminar meus caminhos.

A minha família, pelo amor incondicional, e especialmente aos meus pais Tales e Sandra e pela educação que me possibilitou chegar até aqui.

A minha companheira Vanessa, pelo amor e paciência durante todos esses anos.

A pequena Sofia, por me trazer imensa alegria e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me trilhar pelos melhores caminhos e não os mais fáceis.

A minha família, Jose Tales (Seu Cartaxo), Sandra Marcia (Mamãe), Tales William (Zé) e Taisa Camila (Frebe). Por estarem juntos comigo em todos os momentos e por contribuírem em minha formação e caráter.

A minha companheira Vanessa, pelo amor, por estar sempre ao meu lado e por compreender minhas ausências.

A Sofia, por me trazer os melhores e mais felizes momentos em cada singela ação.

Ao meu orientador, Emiliano Barreto, a quem tenho grande admiração e apreço, por ter me acolhido como orientando, pelos ensinamentos, oportunidades e por sempre acreditar em meu potencial.

Aos membros do Laboratório de Biologia Celular, especialmente aqueles que dividiram os dias de bancada e estudos ao meu lado: Ana Carolina, Fernanda Lima, Flávio Martins, João Noé, Jordana Rodrigues, Julianderson Oliveira, Juliane Pereira, Lilian Mariane, Lylyan Melo, Marvin Lins, Navylla Candeia, Polliane Araújo, Polyane Rocha e Samário Lino. Em especial a Jamylle Nunes, pela dedicação imensurável, pela imensa predisposição em ajudar, por tornar esse trabalho possível e pela grande amizade.

Ao meu grande amigo de graduação Tales Lyra, por me apresentar o ambiente de pesquisa em laboratório e por me incentivar a fazer parte do mesmo.

Por fim, a todos que contribuíram para realização dessa conquista e que por ventura não foram citados, minhas desculpas e agradecimentos.

RESUMO

A lesão pulmonar aguda (LPA) persiste como um problema clínico responsável por elevada taxa de mortalidade devido a fatores que incluem, dentre outras coisas, a ausência de terapias disponíveis na prática clínica. Estudos prévios demonstram que o ácido *p*-cumárico (AC), um composto fenólico, possui propriedades farmacológicas relevantes, incluindo efeito antioxidante e atividade imunomoduladora. No entanto, seu efeito sobre a inflamação pulmonar não foi investigado até o momento. Neste estudo, procurou-se avaliar o efeito do AC na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Para tal, camundongos *Swiss* foram tratados por via intranasal com AC (0,1 e 1 µg/kg) 1 hora antes do estímulo com LPS (10 µg/animal). Após o tempo de 12 horas, o lavado broncoalveolar (LBA) foi recolhido para determinar o número de células inflamatórias e para quantificação de citocinas, enquanto que o pulmão foi utilizado para realização de análise histopatológica através de coloração de H&E, e também para quantificação de citocinas. No LBA os níveis de interleucinas (IL)-6, IL-8 e IL-10 foram mensurados, enquanto no tecido pulmonar os níveis de IL-6 e IL-10, todos avaliados por ELISA. Em outro conjunto de experimentos, realizou-se uma abordagem *in vitro* para avaliar o efeito do AC sobre a viabilidade de neutrófilos humanos e a adesão de neutrófilos a células endoteliais vasculares. Para tal, neutrófilos humanos, com ou sem pré-tratamento com AC foram deixados para aderir em células endoteliais vasculares (EA.hy926) estimuladas com TNF- α (10 ng/mL). Neste experimento, o número de neutrófilos aderentes por célula endotelial foi determinado por contagem direta. Para análise estatística entre os grupos experimentais foi utilizado o *one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls, sendo considerado significativo $p \leq 0,05$. Como resultado, observou-se que o estímulo com LPS aumentou tanto a contagem de leucócitos totais ($p < 0,01$) quanto a de neutrófilos no LBA, fenômenos que foram reduzidos pelo pré-tratamento com o AC. O tratamento com 1 µg/kg de AC diminuiu os níveis de IL-6 e IL-8, ao mesmo tempo que aumentou os níveis de IL-10 no LBA, fenômeno que se repetiu no tecido pulmonar com os níveis de IL-6 e IL-10. Ao avaliar o parênquima pulmonar, observou-se que em comparação com o grupo estimulado com LPS, o infiltrado de células inflamatórias ao redor dos brônquios foi significativamente menor nos grupos pré-tratados com AC ($p < 0,01$). As análises *in vitro* revelaram que o pré-tratamento com AC foi capaz de reduzir o índice de adesão dos neutrófilos às células endoteliais ($p < 0,001$), sem interferir na viabilidade dos neutrófilos. Estes resultados mostram, pela primeira vez, que o AC quando administrado por via tópica suprime a inflamação deflagrada por LPS por reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 e por estimular a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Os efeitos anti-inflamatórios do AC também se estenderam ao tecido pulmonar, uma vez que as alterações histopatológicas provocadas pelo LPS no pulmão também foram amenizadas. Além disso, o AC mostrou-se capaz de interferir na adesão de neutrófilos ao endotélio. Em conjunto, estes resultados demonstram que o AC pode ser útil para terapias que visam o tratamento da lesão pulmonar aguda.

Palavras-chave: Lesão pulmonar aguda. Ácido *p*-cumárico. Inflamação. Neutrófilo

ABSTRACT

Acute lung injury (ALI) persists as a significant clinical problem responsible for a high mortality rate due to factors that include, among other things, the absence of effective therapies in clinical practice. Previous studies have reported that *p*-coumaric acid (CA), a phenolic compound, possesses relevant pharmacological properties including antioxidant effect and immunomodulatory activity. However, its effect on lung inflammation remains unknown. Therefore, in this study, we sought to evaluate the effect of *p*-coumaric acid on acute lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS). To do so, male Swiss mice (30 g) were intranasally exposed to CA (0.1 or 1 µg/Kg) 1 h prior LPS stimulation (10 µg/mice) for inducing ALI. At 12 h after LPS stimulation, bronchoalveolar lavage fluid (BAL) was collected to determine the number of inflammatory cells and the quantification of cytokines, while the lung was used for histopathological analysis through H&E staining. The levels of interleukin (IL)-6, IL-8 and IL-10 were measured in the BAL, while in the lung tissue levels of IL-6 and IL-10, were evaluated by ELISA. In another set of experiments, an *in vitro* approach was performed to evaluate the effect of CA on the viability of human neutrophils and neutrophils adhesion to vascular endothelial cells. To this end, human neutrophils with or without CA pretreatment were allowed to adhere in TNF- α -stimulated (10 ng/mL) vascular endothelial cells (EA.hy926 cells). In this experiment, the number of adhered neutrophils per endothelial cell was determined by direct counting. The one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test was used for statistical evaluation between experimental groups with $P < 0.05$ considered significant. As a result, LPS stimulation increased both total leukocyte counts ($p < 0.01$) and neutrophils count in BAL, phenomena that were decreased by pretreatment with CA. In addition, treatment with 1 µg/kg of CA decreased levels of IL-6 and IL-8, at the same time that markedly increased levels of IL-10 in BAL fluid. The same was observed in lung tissue with levels for IL-6 and IL-10. When evaluating lung parenchyma, it was observed that, in comparison to the LPS-stimulated group, inflammatory cells infiltration around the bronchi was significantly declined with CA pretreatment ($p < 0.001$). *In vitro* analyzes revealed that pretreatment with *p*-coumaric acid was able to reduce the index of adhesion neutrophil to TNF-activated endothelial cells ($p < 0.001$), without interfering with neutrophil viability. These results show for the first time that CA when administered topically can suppresses the inflammation triggered by LPS-induced lung injury through reducing the production of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 and stimulating the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The anti-inflammatory effects of CA also extended to the lung tissue, since histopathological changes caused by LPS were also attenuated. In addition, CA was able to interfere with the adhesion of neutrophils to the endothelium. Taken together, these results suggested that CA might be useful in the therapy of acute lung injury.

Key words: Acute lung injury. *p*-coumaric acid. Inflammation. Neutrophils

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Alvéolo Normal..... | 22 |
| Figura 2 - | Recrutamento de neutrófilos para o pulmão..... | 24 |
| Figura 3 - | Dano tecidual na lesão pulmonar aguda..... | 26 |
| Figura 4 - | Representação da organização básica da estrutura do lipopolissacarídeo..... | 27 |
| Figura 5 - | <i>Pilocarpus microphyllus</i> (Rutaceae)..... | 30 |
| Figura 6 - | <i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae)..... | 31 |
| Figura 7 - | <i>Lafoensia pacari</i> (Lythraceae)..... | 32 |
| Figura 8 - | Estrutura química dos derivados hidroxicinâmicos..... | 33 |
| Figura 9 - | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico em infiltrado de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de animais com LPA..... | 40 |
| Figura 10 - | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre os níveis de IL-6 e IL-8 nas vias aéreas de animais com LPA..... | 41 |
| Figura 11 - | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre os níveis de IL-10 nas vias aéreas de animais com LPA..... | 42 |
| Figura 12 - | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre os níveis de IL-6 e IL-10 no pulmão de animais com LPA..... | 43 |
| Figura 13 - | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico no tecido pulmonar de animais com LPA..... | 44 |
| Figura 14 - | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre o índice de adesão de neutrófilos sobre células endoteliais..... | 46 |
| Figura 15 - | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a viabilidade de neutrófilos..... | 46 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Quadro 1 - | Definição da AECC – Limitações e Métodos abordados na Definição de Berlim..... | 19 |
| Quadro 2 - | Definição de Berlim da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo..... | 20 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| AC | Ácido <i>p</i> -cumárico |
| AECC | Conferência de Consenso Europeia-Americana |
| ANOVA | Análise de variância |
| AP-1 | Ativador de proteína 1 |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| CPAP | Pressão positiva contínua das vias aéreas |
| CXCL5 | Ligante de quimiocina 5 |
| DMEM | Meio de Eagle Modificado de Dulbecco |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EGb 761 | Extrato de <i>Ginkgo biloba</i> 761 |
| ENA-78 | Proteína epitelial de ativação de neutrófilos |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| ERK | <i>Extracellular-signal-regulated kinase</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FIO ₂ | Fração inspirada de oxigênio |
| Fr | Frequência respiratória |
| GRO | Oncogene regulada pelo crescimento |
| HCAs | Ácidos hidroxicinâmicos |
| IKβ- α | Inibidor de NF-kappa-β α |
| ICAM- 1 | <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> |
| IL- 1β | Interleucina 1- beta |
| IL- 6 | Interleucina- 6 |
| IL- 8 | Interleucina- 8 |
| IL- 10 | Interleucina- 10 |
| H ₂ O | Água |
| JAK/STAT | <i>Janus quinase/signal transducers and activators of transcription</i> |
| LBA | Lavado broncoalveolar |
| LPA | Lesão pulmonar aguda |
| LPS | Lipopolissacarídeo |

| | |
|--------------------|--|
| MCP- 1 | Proteína quimioatraente de monócitos- 1 |
| MIP | Proteína inflamatória de macrófagos |
| MMP- 9 | Metaloproteinase- 9 |
| MPO | Mieloperoxidase |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MTT | Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NF-KB | <i>Nuclear factor-kappa B</i> |
| NH ₄ Cl | Cloreto de amônio |
| NO | Óxido nítrico |
| PaO ₂ | Pressão parcial de oxigênio de arterial |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PEEP | Pressão positiva expiratória final |
| PI3K/AKT | <i>Phosphoinositide 3-kinase/protein quinase B</i> |
| POAP | Pressão de oclusão da artéria pulmonar |
| Rpm | Rotações por minuto |
| SDRA | Síndrome do desconforto respiratório agudo |
| Th ₁ | Células T <i>helper</i> 1 |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral α |
| VCAM | <i>Vascular cell adhesion molecule</i> |

OBS: As abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

| | | |
|------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 | Geral..... | 17 |
| 2.2 | Específicos..... | 17 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1 | Lesão pulmonar aguda: Definição e epidemiologia..... | 18 |
| 3.2 | Fisiopatologia..... | 21 |
| 3.3 | Modelo animal de lesão pulmonar aguda induzida por Lipopolissacarídeo..... | 26 |
| 3.4 | Estratégias terapêuticas na LPA..... | 28 |
| 3.5 | Produtos naturais no tratamento de inflamações pulmonares..... | 30 |
| 3.6 | Ácido <i>p</i> -cumárico..... | 33 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 | Animais..... | 35 |
| 4.2 | Indução da lesão pulmonar aguda..... | 35 |
| 4.3 | Tratamentos..... | 35 |
| 4.4 | Obtenção do lavado broncoalveolar..... | 35 |
| 4.5 | Quantificação de mediadores..... | 36 |
| 4.6 | Processamento histológico do pulmão..... | 36 |
| 4.7 | Análise histopatológica do pulmão..... | 36 |
| 4.8 | Preparo do tecido pulmonar para quantificação de citocinas..... | 37 |
| 4.9 | Isolamento de neutrófilos..... | 37 |
| 4.10 | Avaliação da viabilidade..... | 38 |
| 4.11 | Ensaio de adesão de neutrófilos em células endoteliais..... | 38 |
| 4.12 | Análise estatística..... | 39 |
| 5 | RESULTADOS | 40 |
| 5.1 | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre o infiltrado de células inflamatórias nas vias aéreas de animais com LPA..... | 40 |
| 5.2 | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a produção de citocinas nas vias aéreas de animais com LPA..... | 41 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5.3 | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a produção de IL-6 e IL-10 no tecido pulmonar de animais com LPA..... | 42 |
| 5.4 | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a histologia do tecido pulmonar de animais com LPA..... | 43 |
| 5.5 | Efeito <i>in vitro</i> do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a adesão de neutrófilos a células endoteliais..... | 45 |
| 5.6 | Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a viabilidade de neutrófilos <i>in vitro</i> | 46 |
| 6 | DISCUSSÃO | 47 |
| 7 | CONCLUSÃO | 51 |
| | REFERÊNCIAS | 52 |

1 INTRODUÇÃO

A lesão pulmonar aguda (LPA) caracteriza-se por uma resposta pulmonar a diversos tipos de estímulos nocivos que afetam diretamente ou indiretamente o pulmão (EACKLE et al., 2013). Dentre as principais condições que desencadeiam a LPA destacam-se a septicemia, pneumonia, trauma mecânico, inalação de produtos tóxicos, transfusões hematológicas maciças e pancreatites (BAE et al., 2012). Além de todas estas condições que propiciam a LPA é conhecido que a incidência é crescente com a idade, o que contribui para o impacto negativo desta condição no sistema de saúde, principalmente por apresentar alta taxa de mortalidade em pacientes críticos (SINGH et al., 2014).

Entre as características da LPA estão hipoxemia arterial severa e exacerbada, ativação e acúmulo de leucócitos em diferentes compartimentos dos pulmões, em conjunto com a liberação de citocinas e quimiocinas (EACKLE et al., 2013).

Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos revelaram que a cada ano ocorrem cerca de 200 mil casos de LPA, dos quais aproximadamente 74.500 casos evoluem para óbito (RUBENFELD et al., 2005). No Brasil, não existem estudos epidemiológicos capazes de revelar a extensão de ocorrência da LPA, mas uma análise prospectiva sobre a epidemiologia da insuficiência respiratória aguda demonstrou que a LPA acometeu 10% dos pacientes com insuficiência respiratória aguda (FRANCA et al., 2011).

Além dos danos imediatos que a LPA proporciona nos pacientes, os danos a longo prazo são bastante significativos. Um estudo recente que acompanhou por 5 anos sobreviventes de LPA, constatou que pacientes acometidos por LPA apresentaram uma diminuição na qualidade de vida por exibir sequelas físicas e psicológicas que limitavam a prática de atividades cotidianas. Em adição, estes mesmos pacientes, durante este período, passaram a apresentar um aumento por procura e custos de assistência em saúde (HERRIDGE et al., 2011).

Atualmente não há uma terapia específica para a LPA. O manejo consiste em eliminar o fator gerador da lesão, cuidados de suporte, e prevenção de infecções hospitalares (EACKLE et al., 2013). Assim, buscas por substâncias com potencial terapêutico para diminuir a inflamação pulmonar excessiva, ou mesmo melhorar a fase resolutiva da inflamação pulmonar, mostram-se estratégicas para o manejo terapêutico da inflamação pulmonar aguda.

Nos últimos anos vários compostos derivados de plantas, tais como eugenol, sinomenine, e tripterine, foram identificados como detentores de efeitos imunossupressores e são, na atualidade, utilizados no tratamento de desordens inflamatórias e doenças autoimunes (MAGALHÃES et al., 2010; FENG et al., 2007; ZANGH et al., 2006). Além destes compostos, merece destaque o ácido *p*-cumárico que é um ácido fenólico presente em diversas plantas e cereais como o milho, aveia, trigo e diferentes frutas (KONISHI et al., 2003). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a ação deste composto contra várias condições patológicas tais como a aterosclerose (ZANG et al., 2000), dano cardíaco oxidativo (SHIROMWAR; CHIDRAWAR, 2011), carcinogênese (HUDSON et al., 2000) e lesão neuronal na doença de Parkinson (VAUZOUR; CORONA; SPENCER, 2010).

Conhecido pelo seu potencial antioxidante, o ácido *p*-cumárico também tem sido relatado como possuidor de propriedades anti-ulcerogênicas (BARROS et al., 2008), antiplaquetárias (LUCERI et al., 2007), antimutagênicas (FERGUSON et al., 2003) e anti-inflamatórias (PRAGASAM; VENKATESAN; RASOOL, 2012). Apesar de todo este perfil farmacológico até o momento os efeitos anti-inflamatórios do ácido *p*-cumárico sobre a lesão pulmonar aguda em camundongos não foram caracterizados. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito anti-inflamatório do ácido *p*-cumárico na inflamação pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o efeito anti-inflamatório do ácido *p*-cumárico na lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- A) Avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre o acúmulo de leucócitos nas vias aéreas e no pulmão em animais com LPA.
- B) Avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico na produção de citocinas presentes nas vias aéreas e no pulmão dos animais com LPA.
- C) Analisar a ação do ácido *p*-cumárico na produção de citocinas presentes nos pulmões e nos parâmetros histopatológicos pulmonares característicos da LPA.
- D) Verificar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre a viabilidade e adesão de neutrófilos *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Lesão pulmonar aguda: Definição e epidemiologia

A lesão pulmonar aguda (LPA) e sua forma mais severa, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), são processos agudos inflamatórios pulmonares, que levam a edema pulmonar não hidrostático, rico em proteínas, causando hipoxemia refratária, diminuindo a complacência pulmonar e prejudicando a capacidade do pulmão de eliminar dióxido de carbono (REZOAGLI et al., 2017).

Em 1967, o termo SDRA foi descrito pela primeira vez, sendo caracterizado por um início agudo de taquipneia e dispneia; hipoxemia e cianose, não responsivas a oxigênio terapia; perda de complacência pulmonar e presença de infiltrado alveolar difuso, evidenciada por raio-X, com uma grande taxa de mortalidade (ASHBAUGH et al., 1967).

Posteriormente, tais agravos foram definidos pela Conferência de Consenso Europeia-Americana (AECC) e foram caracterizados como uma falha respiratória aguda, com infiltrado pulmonar bilateral, evidenciado por raio-X de tórax, por um índice de oxigenação {pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2)/fração inspirada de oxigênio (FiO_2)} menor que 300 para LPA e menor que 200 para SDRA e pela ausência de evidências clínicas de hipertensão atrial esquerda ou pressão de oclusão da artéria pulmonar (POAP) menor que 18 mmHg (BERNARD et al., 1994).

Após 18 anos da definição da AECC e com o avanço dos estudos acerca da LPA, surgiu a necessidade de nova definição para obter critérios mais específicos. Tal definição revisada e mais recente para SDRA foi proposta por uma força-tarefa aprovada pela Sociedade Europeia de Medicina de Cuidados Intensivos, denominada como Definição de Berlin (RANIERI et al., 2012). Esta revisão apontou algumas limitações para o conceito da AECC que são apresentados no quadro a seguir (Quadro 1, página 18):

Quadro 1 – Definição da AECC, limitações e métodos abordados na Definição de Berlim.

| | AECC | Limitações | Abordados na Definição de Berlim |
|----------------------------|--|---|--|
| Momento | Instalação aguda | Sem definição de aguda | Cronograma de tempo agudo especificado |
| Categorias de LPA | Todos os pacientes com $\text{PaO}_2/\text{Fio}_2 < 300$ | Mal interpretação, como $\text{PaO}_2/\text{Fio}_2 - 201-300$, levando a confundir os termos LPA/SDRA | 3 subgrupos exclusivos de SDRA por gravidade Termo LPA removido |
| Oxigenação | $\text{PaO}_2/\text{Fio}_2 < 300$ mmHg (independente da PEEP) | Inconsistência da relação $\text{PaO}_2/\text{Fio}_2$ devido ao efeito da PEEP e/ou Fio_2 | Nível mínimo de PEEP adicionado nos subgrupos Fio_2 menos relevante no grupo SRDA grave |
| Radiograma Torácico | Infiltrado bilateral observado em radiograma torácico frontal | Pouca confiabilidade da interpretação do radiograma torácico | Esclarecimento dos critérios radiográficos Exemplo de radiograma criado |
| POAP | $\text{POAP} \leq 18$ mmHg quando medido ou sem evidencia clínica de hipertensão atrial esquerda | POAP e SDRA podem coexistir Pouca confiabilidade Inter observador da POAP e avaliação clínica da hipertensão atrial esquerda | Requisito POAP removido Edema hidrostático não sendo a causa primária da insuficiência respiratória Pistas clinicas criadas para ajudar a excluir o edema hidrostático |
| Fatores de risco | Nenhum | Não incluído formalmente na definição | Incluído Quando não identificado, precisa excluir objetivamente o edema hidrostático |

Fonte: Adaptado de RANIERI et al., 2012.

Diante das limitações elencadas acima, a Definição de Berlim propôs as soluções apresentadas abaixo (Quadro 2):

Quadro 2 – Definição de Berlim da síndrome do desconforto respiratório agudo.

| Síndrome da Angustia Respiratória Aguda | |
|--|--|
| Momento | Dentro de uma semana de um insulto clínico conhecido ou novos ou piores sintomas respiratórios |
| Imagem Torácica | Opacidades bilaterais não justificadas por efusões, colapso pulmonar/lobar ou nódulos |
| Origem do Edema | Falha respiratória não justificada por insuficiência cardíaca ou sobrecarga hídrica Faz-se necessária avaliação objetiva (ex. ecocardiograma) para excluir edema hidrostático se não houver fator de risco presente |
| Oxigenação | |
| Leve | $200 < PaO_2/Fio_2 > 300$ com PEEP ou CPAP ≥ 5 cm H ₂ O |
| Moderada | $100 < PaO_2/Fio_2 > 200$ com PEEP ou CPAP ≥ 5 cm H ₂ O |
| Severa | $PaO_2 \leq 100$ com PEEP ou CPAP ≥ 5 cm H ₂ O |

Fonte: Adaptado de RANIERI et al., 2012.

Tanto a LPA quanto a SDRA possuem impactos negativos sobre o sistema de saúde e sobre o paciente. Nos Estados Unidos um estudo de base populacional envolvendo pacientes com LPA e SDRA, evidenciou, respectivamente, uma incidência de 78,9 e 58,7 casos a cada 100 mil pacientes por ano. Ainda nos Estados Unidos, estima-se que ocorram cerca de 190 mil novos casos por ano, e que esta incidência seja aumentada para 306 mil casos quando considerados os pacientes idosos (com idade entre 75 e 84 anos). Além disso, a LPA e SDRA são responsáveis por elevados índices de mortalidade, com valores variando entre 34% e 60% da população afetada (RUBENFELD, 2003; RANIERI et al., 2012). Em adição, estima-se ainda que estas condições se mostram associadas com 74.500 mortes por ano e por 3,6 milhões dias úteis de internação hospitalar considerando todos os pacientes afetados por ano (RUBENFELD et al., 2005).

O principal empecilho para determinação precisa da incidência e da taxa de mortalidade é a própria natureza intrínseca da LPA e da SDRA, visto que estas condições se mostram como uma síndrome e como tal requer um diagnóstico

multifacetado, determinado por diferentes causas, bem como por diferentes perfis clínicos (REZOAGLI et al., 2017).

No Brasil, um estudo prospectivo realizado em 14 unidades de terapia intensiva, avaliando 7.133 pacientes e comparando a AECC com a definição de Berlim, evidenciou uma incidência de 10,1 casos para cada 100 mil habitantes por ano, justificando a baixa incidência quando comparado com os valores identificados nos Estados Unidos (CASER et al., 2014).

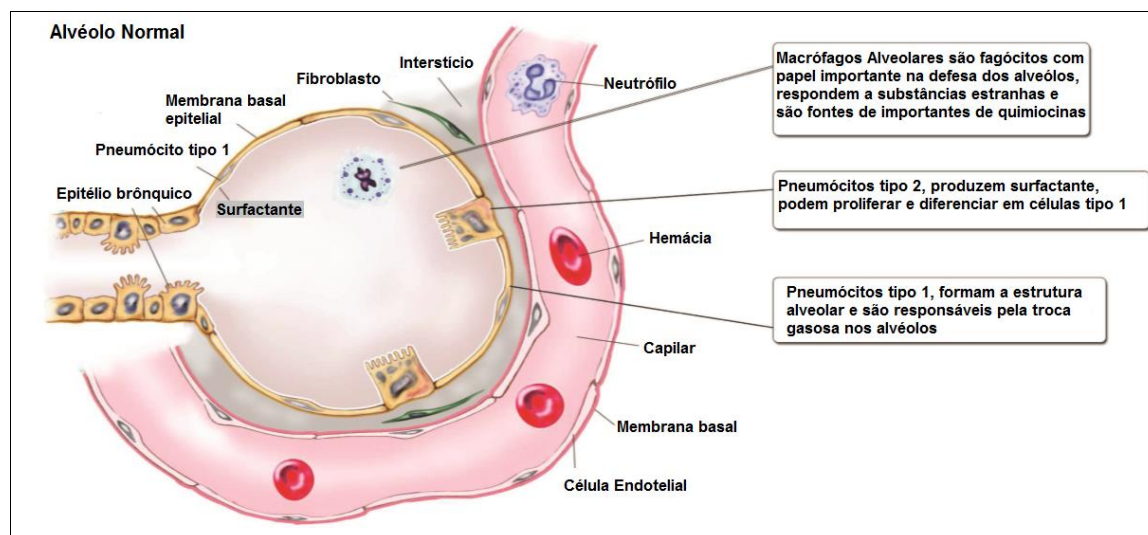
A LPA e SDRA podem ser classificadas de acordo com a origem do insulto podendo ser insultos diretos como pneumonias, aspiração de secreção, inalação de gases tóxicos, trauma pulmonar e ventilação não protetora, e insultos indiretos que incluem sepse não pulmonar, transfusões sanguíneas, trauma e pancreatites (REZOAGLI et al., 2017). As etiologias mais comuns são: pneumonia, entre 35% e 45% dos casos; sepse de origem não pulmonar, entre 30% e 35%; e por fim aspirações, traumas, pancreatites e múltiplas transfusões (HERNU et al., 2013).

3.2 Fisiopatologia

A LPA se caracteriza como um processo inflamatório agudo nos espaços aéreos e no parênquima pulmonar, acarretando em dano tecidual e perda da função, tanto da barreira do epitélio alveolar, como da barreira das células do endotélio capilar. Tais lesões alteram o equilíbrio do líquido pulmonar, culminando em edema, que por sua vez é um marco fisiopatológico da LPA (WARE, 2006).

O epitélio alveolar é composto por dois tipos característicos de células: as células do tipo 1 ou pneumócitos tipo 1; e, células do tipo 2, ou pneumócitos tipo 2. Os pneumócitos tipo 1 pavimentam a parede alveolar e representam 20% das células epiteliais. Já os pneumócitos tipo 2 constituem 80% das células alveolares e possuem a importante função de secretar surfactante, substância composta por fosfolípidios e proteínas, responsável por diminuir a tensão superficial dos alvéolos e promover a estabilidade alveolar, evitando seu fechamento. Cabe mencionar ainda que as células do tipo 2 podem atuar como células progenitoras, o que contribui para a capacidade regenerativa do tecido, além de poderem se diferenciar em células do tipo 1 após estímulos (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011), como visto na Figura 1, página 21.

Figura 1 – Alvéolo Normal.



Fonte: Adaptado de GROMMES; SOEHNLEIN, 2011.

O dano ao endotélio capilar pode ser observado em espaço de tempo que varia de minutos a horas após a indução da LPA, o que resulta no surgimento de lacunas intercelulares no endotélio. Tais lacunas são consideradas como base para o aumento da permeabilidade microvascular, permitindo o influxo de líquido para o interstício pulmonar (WARE, 2006).

Já o dano ao epitélio alveolar facilita o influxo de líquido, rico em proteínas e macromoléculas, para o espaço do alvéolo culminando na diminuição da função do surfactante. Conseqüentemente, há acúmulo de líquido nos alvéolos o que facilita sua obstrução, ocasionando hipoxemia e insuficiência respiratória (MANICONE, 2009).

A partir da lesão ao endotélio vascular e ao epitélio alveolar pode-se observar a formação de edema e influxo de polimorfonucleares, em especial neutrófilos, que migram do vaso para o interstício e depois para o espaço bronco alveolar. Tais células desempenham um papel fundamental no estabelecimento e progressão da LPA, uma vez que a ativação/transmigração de neutrófilos resultam em dano tecidual típico da progressão da lesão (ABRAHAM, 2003). Apesar da ativação de neutrófilos ser essencial para a defesa do organismo, a ativação exacerbada ocasiona dano as células do epitélio alveolar, através da liberação de agentes citotóxicos e ativadores de células imunes tais como proteinases, polipeptídeos catiônicos, citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROS) (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

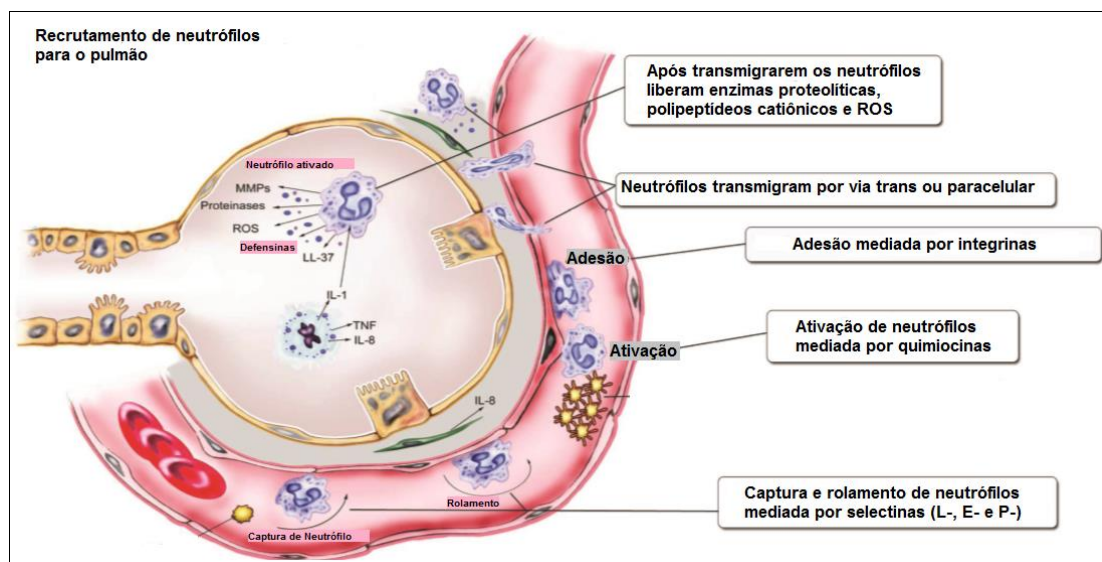
Há diferentes estudos demonstrando que em pacientes com SDRA, a concentração de neutrófilos no lavado broncoalveolar possui correlação direta com a

gravidade e desfecho da doença, de modo que quanto maior as contagens de neutrófilos nas vias aéreas mais grave e pior será o desfecho para o paciente (STEINBER et al., 1994). Seguindo este mesmo raciocínio, os danos causados pela LPA se mostram suprimidos quando prevenido o acúmulo de neutrófilos no tecido (ABRAHAM, 2000).

Os neutrófilos possuem quatro subconjuntos de grânulos: grânulos azurofílicos (primários), grânulos específicos (secundários), grânulos de gelatinase (terciários) e vesículas secretoras. Tais subconjuntos são secretados mediante a ativação dos neutrófilos e por diferentes estímulos. Inicialmente, as vesículas secretoras são mobilizadas após o contato inicial entre os neutrófilos e as células endoteliais dos capilares. Em sequência, os grânulos terciários são liberados durante a migração dos neutrófilos para o interstício pulmonar. Já os grânulos primários, secundários e os provenientes das vesículas secretoras são liberados quando o neutrófilo entra no tecido e contêm principalmente proteases, capazes de degradar a membrana basal e gerar danos ao epitélio alveolar e ao endotélio capilar (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune a serem recrutadas para o local da injúria ou inflamação. No leito capilar são capturados pelo endotélio, tal captura, ressalta-se, depende da interação de selectinas, moléculas transmembranares presentes em leucócitos e em células endoteliais ativadas. Dentre tais moléculas, a E-selectina e a P-selectina presentes nas células endoteliais interagem com L-selectina, presente nos neutrófilos, capturando-os, para que em seguida os neutrófilos rolem sobre o endotélio capilar. Tal rolamento depende de integrinas, dentre elas, as que mediam a adesão de neutrófilos são as integrinas- β_2 , responsáveis por proporcionar o rolamento e a adesão dos neutrófilos às células endoteliais. Após serem capturados, rolem e aderirem ao endotélio capilar, os neutrófilos transmigram para o interstício utilizando vias paracelulares ou transcelulares (LEY et al., 2007) conforme pode ser verificado na Figura 2 (página 23).

Figura 2 – Recrutamento de neutrófilos para o pulmão.



Fonte: Adaptado de GROMMES; SOEHNLEIN, 2011.

O recrutamento de neutrófilos para os pulmões é controlado por uma série de mediadores químicos liberados por células distintas. Dentre essas células, os macrófagos alveolares são as principais fontes de quimiocinas no espaço alveolar (Figura 1, página 20), são capazes de produzir IL (Interleucina) -6, IL-8, peptídeos relacionados com a oncogene regulada pelo crescimento (GRO) e CXCL (ligante de quimiocina) 5, também conhecido como proteína epitelial de ativação de neutrófilos (ENA)-78 (PUNEET; MOOCHHALA; BHATIA, 2005).

É importante ressaltar que a quimiocina IL-8, além de inibir a apoptose de neutrófilos, mostra-se relacionada com a patogênese, sendo usada como prognóstico da LPA. Tanto é que alguns estudos sugerem a utilização da IL-8 como biomarcador para monitorar a evolução da LPA e que altas concentrações desta quimiocina estão associadas com o aumento da mortalidade de pacientes com LPA (CALFEE et al., 2011; MCCLINTOCK et al., 2008).

Outra citocina que exibe níveis elevados no lavado broncoalveolar de pacientes com LPA é a IL-6. Esta citocina possui marcadamente características pró-inflamatórias, e utiliza receptores associados a quinases para desencadear vias intracelulares de sinalização (CROSS; MATTHAY, 2011). O receptor de IL-6 quando apropriadamente ativado resulta em diferentes vias de sinalização incluindo ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*), JAK/STAT (*Janus quinase/signal transducers and activators of transcription*) e PI3-K/AKT (*phosphoinositide 3-kinase/protein*

quinase B). Estas vias de sinalização possuem importante papel na diferenciação e maturação de células β , na diferenciação de células T citotóxicas, bem como na função de monócitos e macrófagos (HIRANO; ISHIHARA; HIBI, 2000).

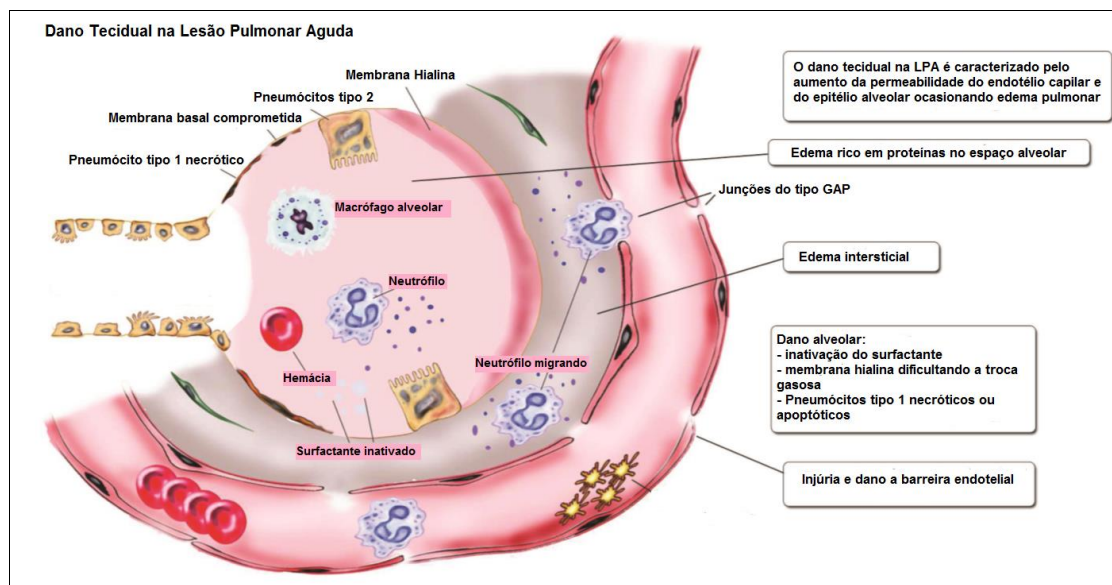
Ao avaliar o perfil de mediadores anti-inflamatórios, a IL-10 mostra-se como uma potente citocina imunossupressora, expressa constitutivamente pelos pulmões (BONFIELD et al., 1995). Como principais fontes de produção/secreção de IL-10 têm-se as células T-*helper* 2, monócitos e macrófagos. Esta citocina também é conhecida por reduzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e IL-8 (WU; LIN; YANG et al., 2009). Cabe destacar ainda que a IL-10 já foi reportada por sua função preventiva da inflamação em modelos de LPA, devido ao seu perfil anti-inflamatório capaz de inibir a diferenciação de células T-*helper* 1, além de suprimir a ativação de neutrófilos e regular negativamente a geração de quimiocinas pró-inflamatórias. Tais ações parecem acontecer devido a sua capacidade de desestabilizar o RNA mensageiro (mRNA) de quimiocinas pró-inflamatórias, e também de prevenir a degradação de I κ B (inibitor nuclear fator kappa β)- α , o que resultaria na inibição da via NF- κ B (nuclear fator kappa β), uma importante via de sinalização intracelular pró-inflamatória (SCHOTTELIUS; MAYO; SARTOR et al., 1999).

No curso da LPA podem ser observados três estágios característicos, sendo eles: exudativo, proliferativo e fibrótico. Insultos pulmonares diretos ou indiretos, iniciam a fase exudativa, marcada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, influxo de neutrófilos e dano a barreira endotelial. Tais eventos culminam em falha respiratória por acúmulo de líquido, rico em teor proteico, nas vias aéreas distais (alvéolos), bem como por diminuição da produção de surfactante, pelas células alveolares epiteliais (pneumócitos) do tipo 2.

Em torno de 7 dias após o início da lesão pulmonar, ocorre a proliferação de pneumócitos tipo 2, alterações fibróticas e espessamento da túnica íntima dos capilares alveolares, caracterizando a fase proliferativa. Por fim, alguns indivíduos evoluem com aumento na deposição de colágeno (fase fibrótica), além de longos períodos de alteração na relação de ventilação-perfusão e diminuição da complacência pulmonar (BELLINGAN, 2002; RANDHAWA et al., 2007).

Portanto, a LPA e sua forma mais severa, a SDRA, cursam com alterações fisiopatológicas importantes que causam severa disfunção respiratória. (Figura 3, página 25)

Figura 3 – Dano tecidual na lesão pulmonar aguda.



Fonte: Adaptado de GROMMES; SOEHNLEIN, 2011.

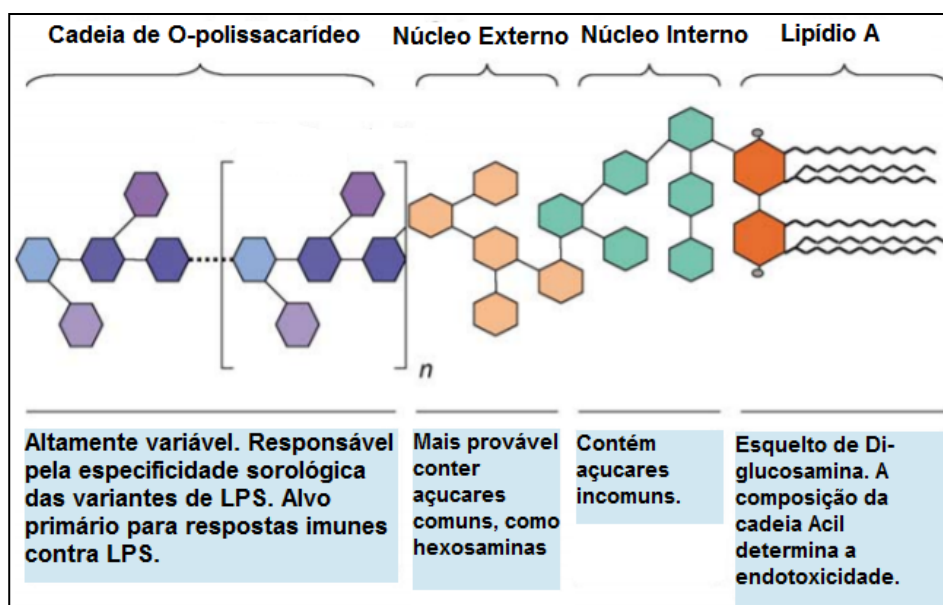
3.3 Modelo animal de lesão pulmonar aguda induzida por Lipopolissacarídeo

Os modelos animais permitem novas formas de explorar os mecanismos dos agravos humanos, possibilitando a identificação de novos biomarcadores, novas terapias e prognósticos, além de proporcionar novos direcionamentos para o desenvolvimento de medicamentos. As hipóteses motivadas por estudos em humanos, pela observação clínica e por resultados de estudos *in vitro* podem ser testadas em tais modelos. Para ser um bom modelo, o mesmo tem que ser capaz de mimetizar os mecanismos e as consequências dos agravos em humanos, incluindo suas características fisiológicas e patológicas. Portanto, um modelo animal, induzido por LPS, deve reproduzir a lesão aguda nas barreiras epiteliais e endoteliais dos pulmões, assim como a resposta inflamatória aguda no espaço aéreo (MATUTEBELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula glicolipídica presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas, sendo composta por três grupamentos: o lipídio A (primeiro grupamento), contendo uma parte hidrofóbica e uma parte ativa endotóxica, ligando-se covalentemente a parte central (segundo grupamento), que é dividida em núcleo interno, mais próximo ao lipídio A, e núcleo externo, que se estende a partir da superfície bacteriana, que por fim se liga, na maioria dos casos, a um

polímero de subunidades de sacarídeos repetidos (terceiro grupamento), chamado de O-polissacarídeo (ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002) (Figura 4, página 26).

Figura 4 – Representação da organização básica da estrutura do lipopolissacarídeo.



Fonte: Adaptado de ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002.

A LPA pode ser induzida em camundongos e ratos, por administração intranasal, intratraqueal, intraperitoneal ou intravenosa de LPS (CHEN; BAI; WANG, 2010). O LPS induz um desequilíbrio na secreção de diferentes mediadores pró-inflamatórios, dentre estes a IL-8 secretada pelas células endoteliais e epiteliais, aumenta a migração quimiotática de neutrófilos para o pulmão (REUTERSHAN; MORRIS; BURCIN et al., 2006). Além disso, a migração transendotelial de neutrófilos se inicia logo após a exposição ao LPS, com aumento de moléculas de adesão nos neutrófilos circulantes no vaso. Após migrarem para o interstício, nas 2 horas seguintes, ocorre a migração de neutrófilos do interstício para o espaço aéreo (REUTERSHAN; BASIT; GALKINA, 2005). Em adição, o estímulo com LPS, contribui com a ativação de macrófagos alveolares, que quando ativados são fontes de mediadores inflamatórios, dentre eles IL-6 e TNF- α , contribuindo com o desenvolvimento da LPA (DONG; WANG; CHEN et al., 2007). Assim, o modelo de LPA induzido por LPS mostra-se eficaz para os estudos acerca de sua fisiopatologia e tratamento.

3.3 Estratégias terapêuticas na LPA

Na atualidade, os tratamentos disponíveis para pacientes com LPA focam em atacar a etiologia subjacente ao dano. Por exemplo, antibióticos para pneumonias e sepse, cuidados de suporte para reduzir a progressão da lesão pulmonar combinado com o uso de ventilação pulmonar, aliado a terapia com restrição de fluidos, com o propósito de prevenir o avanço do edema pulmonar (SLUTSKY; RANIERI, 2013).

Segundo as diretrizes mais recentes que orientam a prática clínica, os pacientes com LPA que se encontram sob ventilação mecânica invasiva, devem ser ventilados mecanicamente com baixos volumes correntes (quantidade de ar que entra e sai dos pulmões em cada ciclo respiratório) e baixas pressões nas vias aéreas. O volume corrente deve ser mantido em torno de 6 ml por quilograma de peso corporal, podendo ser reduzido para 4 ml por quilo se as pressões de estabilidade pulmonar excederem 30 cm de água. A frequência respiratória (FR) deve ser aumentada para manter um volume minuto (volume corrente multiplicado pela FR em um minuto) aceitável, com propósito de auxiliar na remoção de CO₂.

Apesar de indicada, a ventilação mecânica pode trazer riscos ao paciente, visto que já foi observado que baixos níveis de pressão expiratória final positiva (PEEP, 16 cmH₂O) induzem a um aumento na mortalidade de pacientes com LPA. Entretanto, altos valores de PEEP também apresentam riscos, como lesões por distensão alveolar, aumento do *shunt* intrapulmonar, aumento do espaço morto pulmonar e maior resistência vascular pulmonar (FAN et al., 2017).

Embora a LPA seja definida pela presença de edema pulmonar não cardiogênico, 30% dos pacientes tem pressões de oclusão da artéria pulmonar superiores a 18 mmHg. A terapia hídrica conservadora, com uma pressão venosa central de 4 mmHg para pacientes com eliminação de urina adequada, diminuiu a duração de tempo de ventilação mecânica e melhorou a função pulmonar (WEIDEMANN; WHEELER; BERNARD, 2006).

O reposicionamento da posição supina (decúbito dorsal), para a posição prona (decúbito ventral) é outra estratégia utilizada, pois melhora a distribuição da ventilação e da complacência pulmonar, diminuindo a compressão pulmonar por estruturas mediastinais e pelos órgãos abdominais, além de redistribuir o edema em áreas pulmonares menos perfundidas, melhorando a oxigenação (PELOSI; BRAZIL; GATTIONI, 2002). Entretanto, a posição prona está associada a um maior risco de

úlceras de pressão, de obstrução do tubo endotraqueal e deslocamento acidental de cateteres e do próprio tubo endotraqueal (SUD; FRIEDRICH; TACCONI, 2010).

Vasodilatadores pulmonares inalatórios como o óxido nítrico e as prostaciclina são utilizados na prática clínica por induzirem uma vasodilatação pulmonar com propósito de melhorar a hipertensão pulmonar, o índice ventilação-perfusão e consequentemente a oxigenação. Porém, nos estudos de Adhikari e colaboradores (2007) foi demonstrado que o uso destes vasodilatadores inalatórios não interfere na taxa de mortalidade dos pacientes com LPA, aliado a tendência destes pacientes em apresentar disfunção renal (ADHIKARI; BURNS; FRIEDRICH, 2007). Portanto, fica evidente que apenas melhorar a ventilação pulmonar não se mostra suficiente para garantir um tratamento eficaz para os pacientes. Logo, o outro componente da LPA, a inflamação, também deve ser controlada.

A inflamação é o principal componente da lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Uma vez deflagrada a LPA há uma elevação significativa nos níveis de citocinas pró-inflamatórias nas vias aéreas que resultam no recrutamento de neutrófilos capazes de causar extenso dano tecidual, fator que leva a uma busca intensa por moléculas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios para o tratamento da LPA. Os glicocorticoides, uma classe de hormônios esteroides, têm a capacidade de inibir a expressão dos genes induzidos pela translocação do NF- κ B e de ativador de proteína (AP)-1. Como resultado, há uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , entre outras (BARNES, 2005). Apesar deste efeito benéfico, ainda há debate sobre a utilidade clínica destes hormônios para o tratamento da LPA, visto que alguns estudos de meta-análise revelaram que o tratamento com glicocorticoides não é capaz de reduzir a mortalidade dos pacientes (STEINBERG et al., 2006). Além disso, o uso dos glicocorticoides mostra-se associado a complicações que incluem dificuldade/atraso no reconhecimento de infecções, aumenta o risco de fraqueza muscular e se utilizado em altas dosagens é capaz de suprimir a síntese endógena de cortisol (MARIK; MEDURI; ROCCO, 2011).

Em adição, o tratamento com dexametasona mostrou-se capaz de suprimir a inflamação, diminuindo o influxo de neutrófilos para o LBA, bem como os níveis de IL-6, IL-1 β , KC e MIP-1 e 2. Porém, não foi capaz de proteger a barreira alveolar e capilar da injúria e danos em um modelo murino de LPA (HEGEMAN et al., 2013). Portanto, a busca por novas alternativas terapêuticas, mais eficazes e com menos efeitos

colaterais, para auxílio no tratamento de LPA e da SDRA, mostra-se de extrema importância.

3.4 Produtos naturais no tratamento de inflamações pulmonares

O uso de formulações medicamentosas a base de plantas medicinais vem sendo observado por vários anos em diferentes civilizações e ainda permanece sendo empregado em diferentes regiões do mundo. Historicamente, os produtos naturais têm sido uma fonte para descoberta de princípios ativos e desenvolvimento de novos fármacos (CHIN et al., 2006). Como exemplo de fármacos obtidos a partir de plantas pode-se mencionar a aspirina (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000), a digitoxina, a morfina, a quinina e a pilocarpina (BUTLER, 2004).

Tradicionalmente, a busca por produtos naturais envolve a identificação do material vegetal a partir da informação etnobotânica, baseada na seleção e triagem de plantas com base no conhecimento medicinal de povos antigos ou indígenas (GU et al., 2014). Um exemplo, presente em território brasileiro, mais especificamente na Amazônia brasileira, é o da árvore *Pilocarpus microphyllus* (Figura 5). Esta espécie é conhecida como jaborandi e é utilizada por tribos indígenas para o tratamento de úlceras bucais, resfriados e gripes. Teve seus primeiros relatos escritos, referentes às suas propriedades medicinais, datados no século XVI. Através de novos estudos, descobriu-se que a jaborandi induzia sudorese e salivação, este conhecimento levou ao desenvolvimento de alcalóides imidazólicos, dentre eles a pilocarpina, que é o principal constituinte do medicamento Timpilo[®], usado no tratamento de glaucoma (SKIRYCZ et al., 2016).

Figura 5 – *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae).



Fonte: <https://www.vegetall.com.br/jaborandi-pilocarpus-microphyllus>

Uma espécie que é tradicionalmente utilizada na cultura chinesa há mais de três mil anos, é a *Ginkgo biloba* (Figura 6). Suas folhas são usadas para o tratamento de doenças respiratórias como a asma e a bronquite (JARACZ; STRØMGAARD; NAKANISHI, 2002). Além deste relato popular, estudos experimentais também já demonstraram, no modelo animal de LPA induzido por isquemia/reperfusão intestinal, que o extrato derivado de folhas de *G. biloba* reduziu o acúmulo de neutrófilos e a geração de óxido nítrico (NO) no tecido pulmonar (LIU et al., 2007), além de reduzir os níveis de metaloproteinase (MMP)-9 no tecido pulmonar (HUANG et al., 2013).

Figura 6 – *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae)



Fonte: <https://www.greenme.com.br/usos-beneficios/3769-ginkgo-biloba-beneficios-efeitos-colaterais>

Outra planta de ocorrência no Brasil e de amplo uso popular é a *Lafoensia pacari* (Figura 7, página 31), cujo extrato é tradicionalmente usado no estado do Mato Grosso para o tratamento de inflamações e úlceras gástricas (SOLON et al., 2000).

Estudos utilizando modelos experimentais *in vivo* demonstraram que extratos obtidos desta planta se mostram capazes de inibir o recrutamento de eosinófilos e neutrófilos no lavado broncoalveolar de animais asmáticos (ROGERIO et al., 2008).

Figura 7 – *Lafoensia pacari* (Lythraceae)



Fonte: <http://flores.culturamix.com/informacoes/deladeiro-lafoensia-pacari>

Adicionalmente, o ácido elágico, um polifenol encontrado em grandes quantidades nos extratos de *L. pacari*, foi capaz de reduzir a permeabilidade vascular e o recrutamento de neutrófilos para o LBA e pulmão, além de reduzir os níveis de IL-6 e aumentar os de IL-10 no LBA de animais submetidos à LPA induzida por ácido clorídrico (FAVARIN et al., 2013).

Entre 1981 e 2010, aproximadamente 60% de todos os fármacos aprovados nos Estados Unidos da América foram derivados de produtos naturais cujo uso em pacientes foi autorizado pela agência reguladora federal (*Food and Drug Administration* – FDA) (OGBOURNE; PARSONS, 2014).

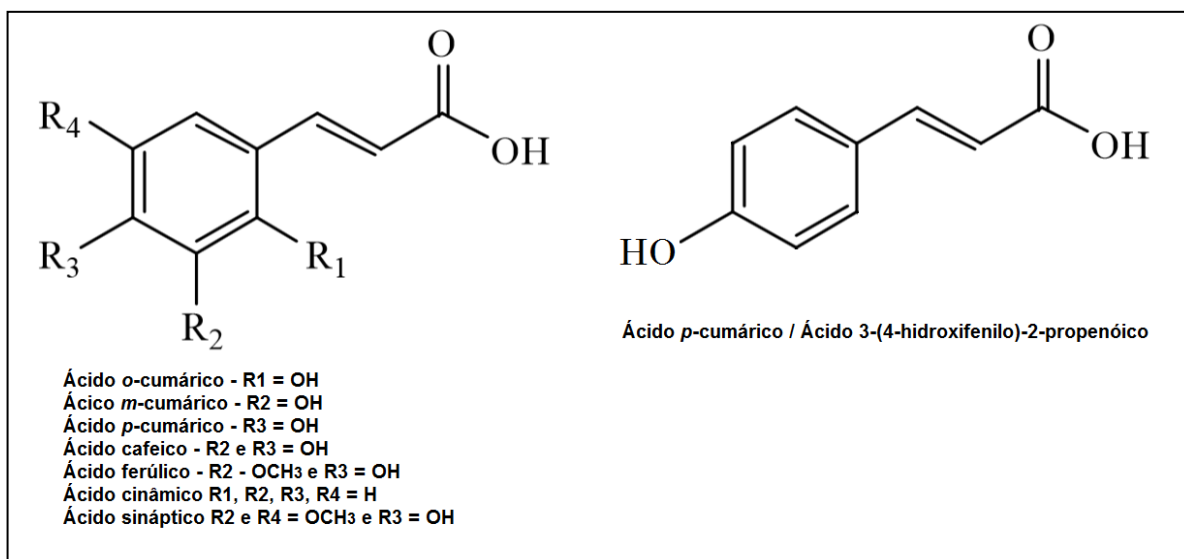
Na década de 2000 a 2010, trinta e oito medicamentos derivados de produtos naturais foram aprovados para uso em diversas indicações médicas, e dos mais de 100 medicamentos disponíveis no mercado oriundos de fontes naturais, 91 foram obtidos de espécies vegetais (KRAUSE TOBIN, 2013).

3.5 Ácido *p*-cumárico

O ácido *p*-cumárico (AC) é um ácido fenólico pertencente à família dos ácidos hidroxicinâmicos (HCAs), uma das principais classes de compostos fenólicos encontrados na natureza (HERRMANN, 1989; ADOM; LIU, 2002).

Esses compostos são metabólitos secundários, derivados dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, possuem um esqueleto de carbono C₆C₃ com uma ligação dupla na cadeia lateral e podem ter uma configuração *cis* ou *trans*. Entre os HCAs mais comuns e conhecidos estão o ácido cinâmico, o ácido *o*-cumárico, o ácido *m*-cumárico, o ácido *p*-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sináptico (EL-SEEDI; EL-SAID; KHALIFA, 2012) (Figura 8).

Figura 8 – Estrutura química dos derivados hidroxicinâmicos.



Fonte: Adaptado de EL-SEEDI; EL-SAID; KHALIFA et al., 2012.

O AC está presente em frutas, dentre elas maçã, pera, uva e laranja, e em vegetais, como a batata e a cebola, além de cereais, como a aveia e o trigo. Estudos mostraram suas atividades biológicas, como, antioxidante e anti-inflamatória (JOSHUA PRAGASAM; VENKATESAN; RASOOL, 2013), antimutagênica (FERGUSON et al., 2003), antiúlcera (BARROS et al., 2008), antiplaquetária (LUCERI et al., 2007) e anticâncer (HUDSON et al., 2000).

Cabe mencionar também que o AC possui capacidade de atenuar aterosclerose (ZANG et al., 2000), dano cardíaco oxidativo (SHIROMWAR;

CHIDRAWAR, 2011), dano ocular induzido por raio ultravioleta (LODOVICI et al., 2009), lesão neuronal na doença de Parkinson (VAUZOUR; CORONA; SPENCER, 2010) e neurodegeneração em diabetes tipo 2 (ABEDL-MONEIM et al., 2017).

Estudos recentes demonstram que o AC, em um modelo animal de artrite reumatoide, foi capaz de reduzir o edema de pata, o infiltrado de leucócitos e proliferação de fibroblasto (JOSHUA PRAGASAM et al., 2012), além de atenuar os níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, entre elas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MCP-1, tanto no sangue, como na articulação do tornozelo de camundongos que desenvolveram artrite reumatoide (NEOG et al., 2017). Desta forma, o perfil de efeitos biológicos obtidos até o momento sugere que este ácido fenólico possa ser utilizado para prevenir os danos inflamatórios causados pela LPA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (pesando entre 20-25 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e ração, com ventilação e temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) constantes e ciclo claro/escuro de 12 horas. Cada grupo experimental foi composto por 6 animais. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL com o número de protocolo 67/2014.

4.2 Indução da lesão pulmonar aguda

Camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina e estimulados com 10 μg /animal de LPS de *E. coli* (O55:B5 Sigma-Aldrich) por via intranasal (i.n.) diluído em salina estéril a um volume final de 30 μL . Animais controle receberam apenas solução salina (NaCl, 0,9%, 30 μL) também por via i.n. Após doze horas, os animais foram eutanasiados para coleta do lavado broncoalveolar (LBA) e dos pulmões. O LBA foi utilizado para contagem de células totais e o sobrenadante para quantificação de citocinas por ELISA. Em outro grupo experimental, os pulmões foram coletados para realização de análises histológicas e de citocinas.

4.3 Tratamentos

Os animais foram pré-tratados por via intranasal com ácido *p*-cumárico (Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 h antes da indução da inflamação pulmonar. Como fármaco de referência foi utilizado dexametasona (2,5 mg/kg) administrado por via intraperitoneal 1 h antes do estímulo com LPS.

4.4 Obtenção do lavado broncoalveolar

Doze horas após a instilação do LPS os animais foram eutanasiados, tiveram a traqueia exposta, canulada, e as vias respiratórias foram lavadas três vezes com 0,5 mL de PBS/EDTA 10 mM gelado para obter um volume final de 1 mL. Em seguida, o

LBA foi mantido a 4°C. Uma alíquota foi utilizada para contagem e identificação das células e o restante foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi aliquotado e armazenado a temperatura de -80 °C para posterior determinação de citocinas e quimiocinas. Para determinação do número total de células no LBA, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer, e para análise diferencial, foram utilizados citocentrifugados corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa, com contagem feita em microscópio óptico (100x).

4.5 Quantificação de mediadores

Para quantificação das interleucinas -6, -8 e -10 presentes no efluente inflamatório do LBA e no tecido pulmonar, foram utilizados kits de ELISA, seguindo as instruções do fabricante. (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay – ELISA Ready-Set-Go®* kit – eBioscience).

4.6 Processamento histológico do pulmão

Após a eutanásia, os pulmões dos animais foram perfundidos, utilizando solução salina contendo EDTA 10 mM, por meio da canulação do ventrículo direito do músculo cardíaco, até que o pulmão passasse a apresentar uma coloração esbranquiçada, condizente com a retirada de sangue do órgão. Em seguida, o pulmão esquerdo foi retirado, fixado com solução a 10% de formalina tamponada para posterior desidratação em diferentes concentrações de etanol, clarificação por xilol, e inclusão em parafina. Em seguida, o material parafinado foi cortado em micrótomo e os cortes desparafinados, foram reidratados e submetidos a coloração (hematoxilina-eosina) para avaliação morfológica (aumentos de 200x e 400x).

4.7 Análise histopatológica do pulmão

Para o estudo histológico os cortes foram examinados sob microscopia óptica, utilizando-se aumento de 200x e 400x. Dez campos microscópicos foram aleatoriamente selecionados em cada lâmina utilizando uma câmera digital adaptada ao microscópio para análises teciduais. O dano histopatológico foi quantificado seguindo a metodologia descrita por Matute-Bello e colaboradores (MATUTE-BELLO

et al., 2010). Foi realizado um escore de inflamação contendo cinco parâmetros, podendo cada um pontuar de 0 a 2: A) neutrófilos no espaço alveolar (0 = nenhum; 1 = 1-5 neutrófilos; 2 = >5 neutrófilos); B) neutrófilos no espaço intersticial (0 = nenhum; 1 = 1-5 neutrófilos; 2 = >5 neutrófilos); C) membrana hialina (0 = nenhum; 1 = 1 membrana; 2 = >1 membrana); D) “debris” proteicos preenchendo o espaço aéreo (0 = nenhum; 1 = 1 debri; 2 = >1 debri); E) espessamento dos septos alveolares (0 = sem espessamento; 1= 2x-4x mais espesso; 2 = >4x mais espesso). Após a pontuação, os parâmetros foram postos na seguinte fórmula para obtenção do escore:

$$Escore = \frac{[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)]}{Número\ de\ campos} \times 100$$

4.8 Preparo do tecido pulmonar para quantificação de citocinas

Para quantificação de citocinas no pulmão, o lobo direito de cada animal foi homogeneizado com uma solução de PBS suplementado com 0,05% de Tween-20 e 1% de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich®) no volume final proporcional de 1 ml para cada 100 mg de tecido pulmonar (Adaptado de PETERSON et al., 2012). Após homogeneizado, a amostra contendo o tecido foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi armazenado a temperatura -80 °C para posterior quantificação de citocinas.

4.9 Isolamento de neutrófilos

Neutrófilos humanos foram obtidos a partir de punção venosa de doadores saudáveis e isolados utilizando-se diferentes concentrações (72%, 57% e 42%) de Percoll em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Para atingir o gradiente de isolamento, 3 mL de cada concentração de Percoll foi cuidadosamente adicionado em sequência a um tubo de 15 mL. Em seguida, o sangue total (4 mL) foi cuidadosamente adicionado na superfície do gradiente de 42% de Percoll. O material foi deixado por 8 min em repouso e logo após, centrifugado por 30 min a 23 °C (1.500 rpm, aceleração e desaceleração 6).

Após a centrifugação, o *pellet* formado entre os gradientes de 72% e 57% foi cuidadosamente retirado e transferido para um tubo de 15 mL. Neste tubo foram adicionados e gentilmente homogeneizados com 12 mL de solução de NH₄Cl, para

lise de possíveis contaminantes, como hemácias. Após 2 min de repouso, o material foi centrifugado por 8 min a 12 °C (1.300 rpm, aceleração e desaceleração 6), sendo o *pellet* resultante ressuspendido em PBS e novamente centrifugado por 8 min a 12°C (1300 rpm, aceleração e desaceleração 6).

Para finalizar, o *pellet* resultante foi ressuspendido em 1 mL de DMEM (100 mM L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina), para contagem de células totais (câmara de Neubauer por exclusão de azul de tripan) e preparação da lâmina diferencial para determinação da pureza de neutrófilos. Todos os experimentos foram realizados com pureza superior ou igual a 95% de neutrófilos.

4.10 Avaliação da viabilidade

O efeito do ácido *p*-cúmarico sobre a viabilidade de neutrófilos foi avaliado por meio da técnica de MTT {brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio}. Neutrófilos humanos (2×10^6 células/poço) mantidos em DMEM suplementado com soro fetal bovino (SBF 10%), L-glutamina (100 mM) e gentamicina (40 µg/mL) foram semeados em placa de 96 poços e incubados em estufa de CO₂ por 30 min. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico (1, 10, 50, 100 µM) por 8 h. Como controle, as células foram mantidas somente ao meio de cultura. Após o tempo de tratamento, o meio de cultivo foi substituído por novo meio contendo MTT (5 mg/mL) seguido de um período de incubação de 3 h. Após esta incubação, o sobrenadante foi removido, e sobre as células foi adicionado solução de DMSO (150 µL/poço) por 15 min a temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (540 nm), sendo a redução do MTT expressa como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle de acordo com a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left(\frac{\text{Densidade Óptica das células tratadas}}{\text{Densidade Óptica das células não tratadas}} \right) \times 100$$

4.11 Ensaio de adesão de neutrófilos em células endoteliais

A adesão celular foi avaliada pela metodologia descrita por Conte e colaboradores (2015) com modificações. Células endoteliais humanas Eahy.926 (6×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços com meio DMEM e

deixadas para aderir por 16 h em estufa de CO₂ a 37 °C. Após este tempo, as células foram estimuladas com TNF- α (30 ng/mL) durante 4 h. De maneira concomitante a este tempo, neutrófilos humanos (3 \times 10⁶ células/poço) foram tratados com ácido *p*-cumárico (1, 10 ou 100 μ M) ou 2,5 μ M de fucoidina (um inibidor da adesão/migração de neutrófilos que atua bloqueando as L- e P- selectinas) por 2 h antes de serem adicionados sobre as células endoteliais. Ao final do tempo de ativação das células endoteliais (4 h) o sobrenadante foi removido e os neutrófilos tratados com ácido *p*-cumárico foram adicionados à cultura na proporção de 50 neutrófilos para cada célula endotelial. Esta co-cultura (neutrófilos e células endoteliais) foi mantida em estufa de CO₂ a 37 °C por 1 h. Após este tempo, o sobrenadante foi removido e cada poço foi gentilmente lavado com PBS gelado para retirada das células não aderidas. As células que permaneceram aderidas foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa (1:5) e contadas em microscópio invertido (Olympus: IX70, aumento de 400X). O resultado foi expresso como índice de adesão (IA) de neutrófilos, calculado através da fórmula:

$$IA = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de célula endotelial com neutrófilos}}{n^{\circ} \text{ total de célula endotelial}} \times \frac{n^{\circ} \text{ de neutrófilo por célula endotelial}}{n^{\circ} \text{ total de célula endotelial}} \right) \times 100$$

4.12 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste t de Student e *one-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Newman–Keuls através do programa GraphPad Prism (versão 6.00, GraphPad Prism Software, Inc.). Os valores são representados pela média \pm erro padrão da média e considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

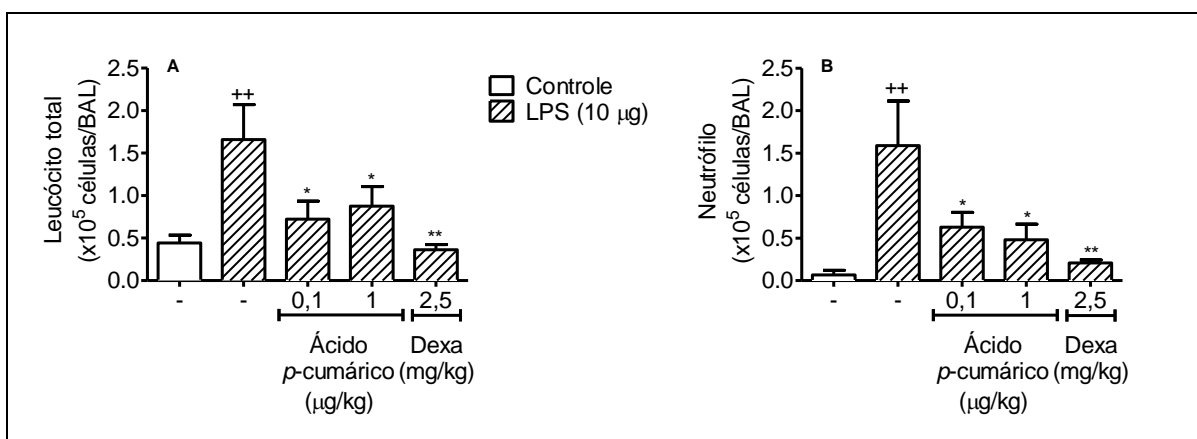
5 RESULTADOS

5.1 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre o infiltrado de células inflamatórias nas vias aéreas de animais com LPA

Como mostrado na Figura 9(A), após estímulo intranasal com LPS houve um aumento na contagem de células nas vias aéreas evidenciado pelo grande número de leucócitos totais no lavado broncoalveolar quando comparado com os animais do grupo controle (estimulado com salina). A análise diferencial destes leucócitos demonstrou a presença de um grande número de neutrófilos, Figura 9(B).

O pré-tratamento com ácido *p*-cumárico (0,1 e 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) reduziu o número de leucócitos totais (Figura 9A), assim como o número de neutrófilos (Figura 9B). O tratamento dos animais com o fármaco referência, dexametasona (Dexa 2,5 mg/kg), também inibiu o acúmulo de leucócitos totais e neutrófilos no LBA de animais estimulados com LPS.

FIGURA 9 - Efeito do ácido *p*-cumárico em infiltrado de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de animais com LPA

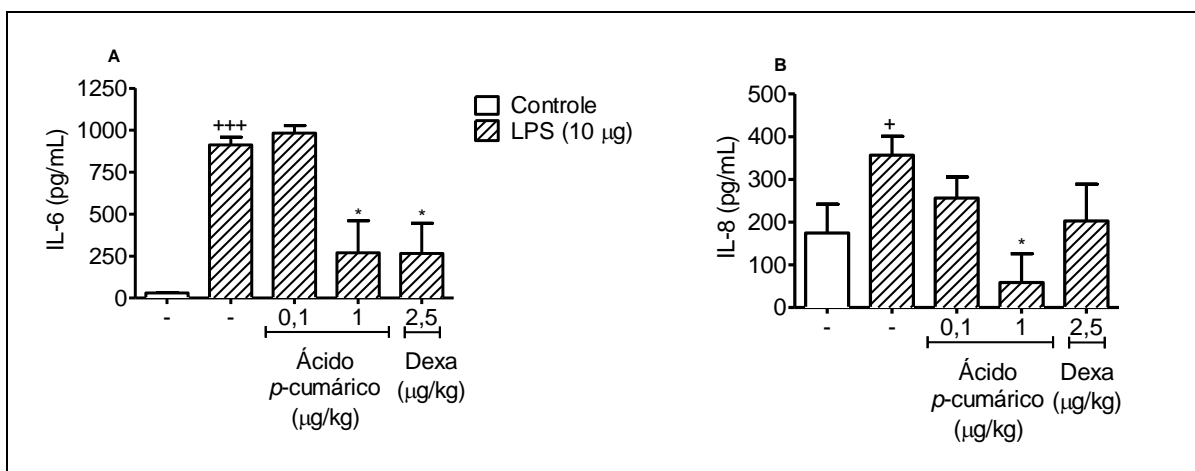


(A) Efeito do tratamento do AC no acúmulo de leucócitos totais para as vias aéreas. (B) Efeito do tratamento do AC no acúmulo de neutrófilos para as vias aéreas. Os animais foram tratados com AC e após 1h foram estimulados com LPS. Seguindo o tempo de 12 h o lavado broncoalveolar foi realizado para avaliação do perfil leucocitário. As barras representam a média \pm E.P.M de 6 animais. ++p < 0,001, comparado com o grupo controle. *p < 0,05 e **p < 0,001 quando comparado ao grupo LPS e analisado por One-way ANOVA seguido pelo teste Newman-Keuls.

5.2 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a produção de citocinas nas vias aéreas de animais com LPA

A Figura 10 detalha os níveis de citocinas pró-inflamatórias presentes no LBA de animais com LPA. Pode-se observar que os níveis de IL-6 (A) e IL-8 (B) aumentaram significativamente no LBA de animais estimulados com LPS quando comparado com o grupo controle (Figura 10). O pré-tratamento com ácido *p*-cumárico (1 µg/kg) e dexametasona (Dexa 2,5 mg/kg) reduziram os níveis de IL-6 em comparação com o grupo exposto a LPS (Figura 10A, página 40). Quando se avaliou os níveis de IL-8 no lavado broncoalveolar após estímulo com LPS, apenas a maior concentração de ácido *p*-cumárico (1 µg/kg) foi capaz de reduzir os níveis desta quimiocina (Figura 10B).

FIGURA 10 - Efeito do ácido *p*-cumárico sobre os níveis de IL-6 e IL-8 nas vias aéreas de animais com LPA.

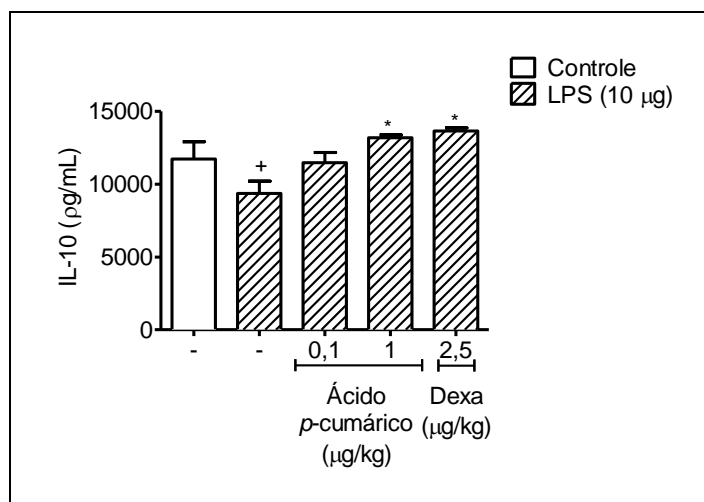


Efeito do tratamento do AC sobre os níveis de IL-6 (A) e IL-8 (B) nas vias aéreas. Os animais foram tratados com AC e após 1h foram estimulados com LPS. Avaliação do pré-tratamento de AC sobre os níveis de IL-6 (A) e IL-8 (B) presentes no LBA, 12 h após estímulo intranasal com LPS. As barras representam a média ± E.P.M de 6 animais. +p < 0,05, comparado com o respectivo grupo controle. *p < 0,05 quando comparado ao respectivo grupo LPS e analisado por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Conforme demonstrado na Figura 11 (página 41), o estímulo intranasal com LPS induziu uma significativa redução nos níveis de IL-10, uma citocina com perfil anti-inflamatório, fenômeno que se mostrou sensível ao tratamento com ácido *p*-cumárico. No entanto, apenas a maior dose de ácido *p*-cumárico foi capaz de restaurar os níveis de IL-10 a patamares equivalentes aos observados nos animais do grupo controle tratados com solução salina. O tratamento com dexametasona (Dexa 2,5

mg/kg) foi capaz de aumentar significativamente os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 no LBA (Figura 11).

FIGURA 11 - Efeito do ácido *p*-cumárico sobre os níveis de IL-10 nas vias aéreas de animais com LPA.

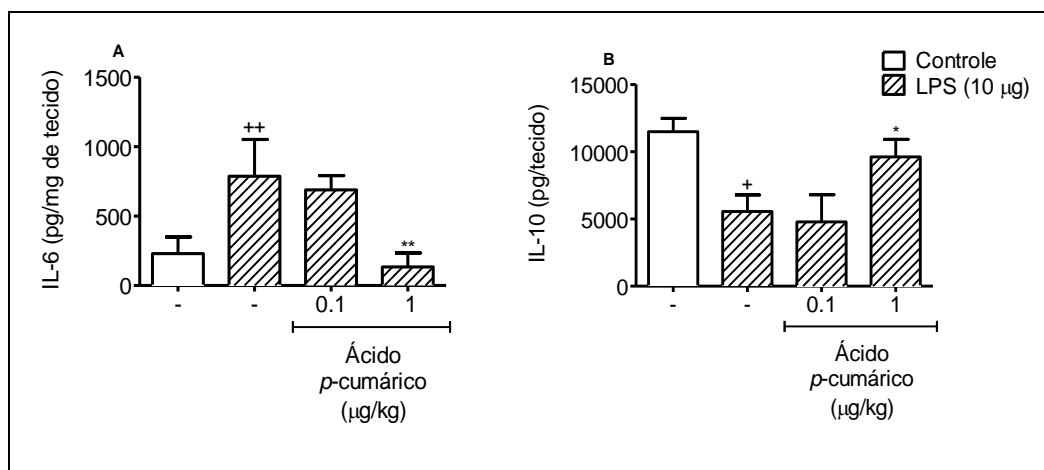


Efeito do tratamento do AC sobre os níveis de IL-10 nas vias aéreas. Os animais foram tratados com AC e após 1h foram estimulados com LPS. Avaliação do pré-tratamento de AC sobre os níveis de IL-10 presentes no LBA, 12 h após estímulo intranasal com LPS. As barras representam a média \pm E.P.M de 6 animais. + $p < 0,05$, comparado com o respectivo grupo controle. * $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo LPS e analisado por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.3 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a produção de IL-6 e IL-10 no tecido pulmonar de animais com LPA

Com o propósito de verificar se as alterações observadas no LBA também se estendiam ao tecido pulmonar, seguiu-se para avaliar os níveis de IL-6 e IL-10 no parênquima pulmonar após tratamento com ácido *p*-cumárico e estímulo com LPS. Os níveis de IL-6 aumentaram significativamente no pulmão de animais estimulados com LPS quando comparado com o grupo controle. O pré-tratamento com ácido *p*-cumárico (1 μ g/kg) reduziu os níveis de IL-6 em comparação com o grupo exposto a LPS, Figura 12A (página 42). Como observado na Figura 12B (página 42), quando os animais foram expostos somente a LPS, houve uma diminuição nos níveis de IL-10 no tecido pulmonar quando comparado com o grupo controle estimulado com salina. Porém, apenas o grupo tratado com ácido *p*-cumárico (1 μ g/kg) foi capaz de aumentar significativamente os níveis desta citocina.

FIGURA 12 - Efeito do ácido *p*-cumárico sobre os níveis de IL-6 e IL-10 no pulmão de animais com LPA.

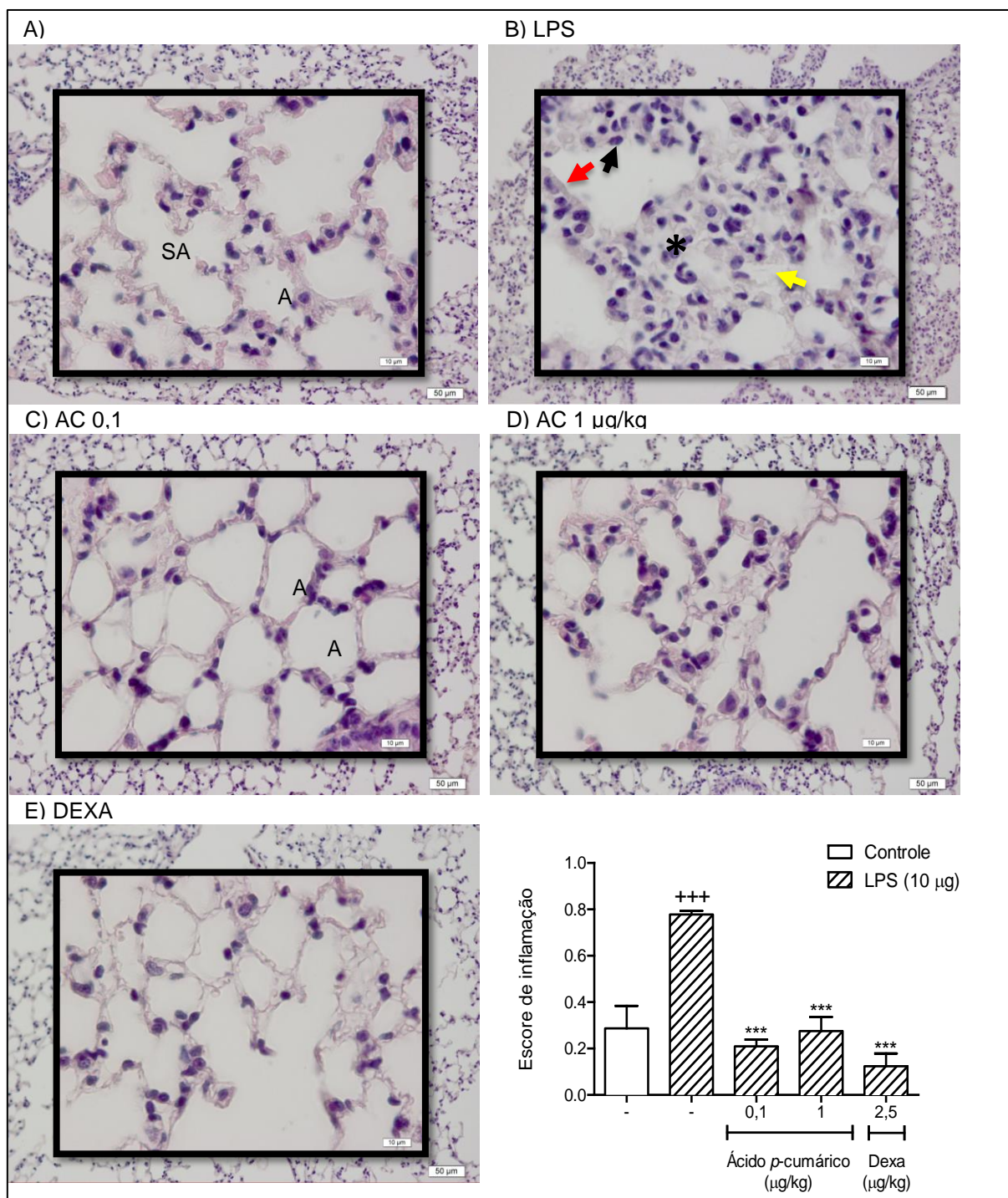


Efeito do tratamento do AC sobre os níveis de IL-6 (A) e IL-10 (C) no pulmão. Os animais foram tratados com AC e após 1h foram estimulados com LPS. Avaliação do pré-tratamento de AC sobre os níveis de IL-6 (A) e IL-10 (B) presentes no pulmão, 12 h após estímulo intranasal com LPS. As barras representam a média \pm E.P.M de 6 animais. + $p < 0,05$, comparado com o respectivo grupo controle. * $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo LPS e analisado por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.4 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a histologia do tecido pulmonar de animais com LPA

Para avaliar o impacto do AC nas alterações histopatológicas pulmonares na LPA, foi realizada a análise histológica das secções pulmonares obtidas de animais estimulados com LPS. As análises histológicas dos cortes corados com H&E revelaram que os pulmões dos animais estimulados com LPS apresentaram espessamento septal causado pela infiltração de leucócitos e pelo edema pulmonar, além de *debris* proteicos nos espaços aéreos e membrana hialina. Tanto o pré-tratamento com ácido *p*-cumárico (0,1 e 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) quanto com dexametasona foram capazes de inibir todos estes parâmetros (Figura 12A-E, página 43).

Com propósito de quantificar os parâmetros histopatológicos a redução do infiltrado inflamatório foi realizado o escore de inflamação. No grupo estimulado com LPS, o escore de inflamação foi significativamente aumentado quando comparado com o grupo controle. Em contrapartida, o pré-tratamento com ácido *p*-cumárico e dexametasona reduziu tal escore quando comparado com o grupo controle (Figura 13F página 43).

FIGURA 13 - Efeito do ácido *p*-cumárico no tecido pulmonar de animais com LPA.

As imagens de A-E são Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do pulmão corados com H&E, x200, aproximados x1000. Asterisco indicam o espessamento septal e colapso alveolar, setas pretas os neutrófilos, setas vermelhas a membrana hialina e a seta amarela o debrí proteico. A – alvéolos; SA – saco alveolar. F) Avaliação do pré-tratamento de AC no escore de inflamação de pulmões corados por H&E, 12 h após estímulo intranasal com LPS. As barras representam a média ± E.P.M de 6 animais. +++ $p < 0,001$, comparado com o grupo controle. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo LPS e analisado por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

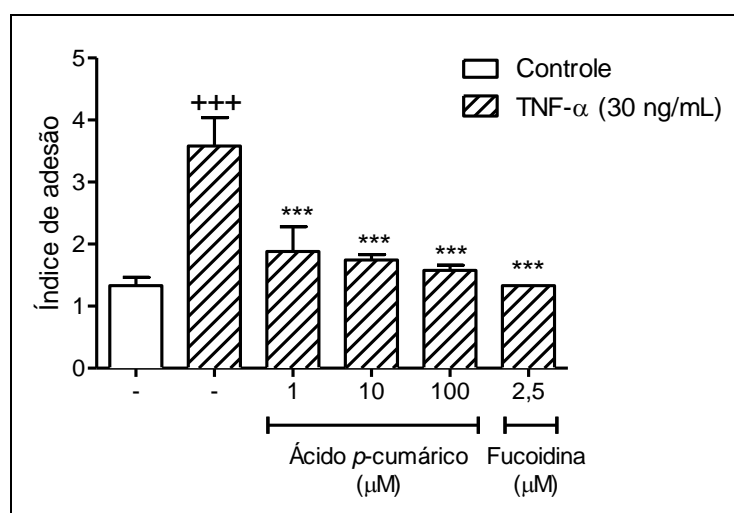
5.5 Efeito *in vitro* do ácido *p*-cumárico sobre a adesão de neutrófilos a células endoteliais

Até esta fase verificou-se que o ácido *p*-cumárico mostra-se capaz de prevenir a chegada de neutrófilos nas vias aéreas e pulmão. É conhecido que o acúmulo leucocitário no sítio inflamatório se mostra como uma consequência de etapas anteriores que envolvem a interação entre o neutrófilo e o endotélio vascular. Dentre estas etapas, a interação entre o neutrófilo e o endotélio ativado resulta na adesão entre estas células e na posterior transmigração de neutrófilos para o interstício tecidual (ROBINS; CONTRAN, 2010). Portanto, decidiu-se avaliar se o tratamento de neutrófilos com ácido *p*-cumárico poderia interferir de forma direta com a etapa de adesão de neutrófilos sobre o endotélio.

Conforme observado na Figura 14 (página 43), quando neutrófilos humanos são colocados sobre uma cultura de células endoteliais ativadas com TNF- α pode ser observado um aumento significativo do índice de adesão destes neutrófilos quando comparado as células colocadas sobre endotélio (linhagem de células Eahy.926) não ativado (controle).

Quando os neutrófilos foram tratados com diferentes concentrações de AC e postos a aderir sobre o endotélio ativado, constatou-se uma redução significativa no índice de adesão entre neutrófilos e endotélio em todas as concentrações de AC testadas. Como controle experimental, observou-se também que neutrófilos pré-tratados com fucoidina (um bloqueador da adesão/migração de leucócitos) e submetidos a adesão sobre o endotélio ativado reduziram de forma significativa o índice de adesão celular (Figura 14, página 45).

FIGURA 14 - Efeito do ácido *p*-cumárico sobre o índice de adesão de neutrófilos sobre células endoteliais.

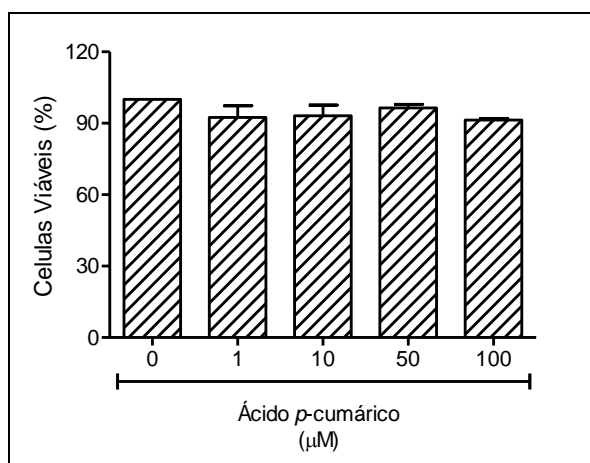


Avaliação do pré-tratamento com ácido *p*-cumárico sobre neutrófilos postos a aderir sobre células endoteliais estimuladas com TNF- α . Dados representados como média \pm E.P.M de 3 poços de 3 experimentos independentes. +++ p <0,001, comparado com o grupo controle. *** p <0,001 quando comparado ao grupo TNF- α e analisado por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.6 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a viabilidade de neutrófilos *in vitro*

Como demonstrado na Figura 15, o tratamento de neutrófilos com AC por 8 h não afetou a viabilidade celular quando comparado com células tratadas apenas com meio de cultura DMEM (controle), indicando ausência de efeitos citotóxicos nas concentrações testadas.

FIGURA 15 - Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a viabilidade de neutrófilos



Avaliação do tratamento por 8 horas de diferentes concentrações de AC sobre a viabilidade de neutrófilos. Barras representam a porcentagem de células viáveis quando expostas ao AC. Dados representados como média \pm E.P.M de 4 poços de 3 experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

A lesão pulmonar aguda é ocasionada por insultos diretos ou indiretos aos pulmões que resulta em dispneia, hipoxemia grave e edema pulmonar não cardiogênico, fazendo com que esta patologia apresente altos índices de morbidade e mortalidade (WALKEY et al., 2012). Na sua fase inicial a LPA caracteriza-se pela grande liberação de citocinas pró-inflamatórias, pelo influxo de neutrófilos e comprometimento da barreira celular endotelial (BELLINGAN, 2002).

As estratégias terapêuticas para a LPA enfatizam em tratar a etiologia subjacente e prover cuidados de suporte que reduzam a progressão da lesão pulmonar. Acredita-se que a inflamação é o desencadeador primário da lesão pulmonar, assim a terapia com corticosteroides é utilizada com o intuito de conter a exacerbação da resposta inflamatória, porém sua eficácia ainda se encontra questionada (AGARWAL et al., 2007). Dessa forma, com propósito de caracterizar a atividade farmacológica de princípios ativos que possam ser usados no tratamento da LPA, o presente estudo utilizou um modelo de LPA em camundongos para avaliar os efeitos anti-inflamatórios do ácido *p*-cumárico almejando identificar potenciais opções terapêuticas para tal agravo.

Modelos animais de inflamação pulmonar são amplamente utilizados para entender as alterações fisiopatológicas que ocorrem no pulmão provocadas por diferentes estímulos. O LPS, componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, é comumente utilizado como estímulo inflamatório em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. A administração local de LPS induz infiltrado de leucócitos, principalmente de neutrófilos nas vias aéreas e pulmão, além da liberação de mediadores pró-inflamatórios no pulmão o que ocasiona inflamação pulmonar aguda (FAFFE et al., 2000).

Os resultados obtidos neste estudo revelam que a administração intranasal de LPS induziu extenso acúmulo leucocitário para as vias aéreas e pulmão e que o tratamento com ácido *p*-cumárico promoveu redução na migração destas células inflamatórias, em especial uma redução no acúmulo de neutrófilos, indicando um efeito protetor do ácido *p*-cumárico na LPA. Apesar da ativação de neutrófilos ser essencial para a defesa no sítio inflamatório, sua ativação excessiva pode liberar substâncias com potencial para gerar dano tecidual, incluindo enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, citocinas e fatores de crescimento.

Portanto, acredita-se que os neutrófilos e seus fatores quimiotáticos contribuam significativamente para progressão da LPA (ANDREW et al., 2014; PARK et al., 2016). Diferentes estudos demonstram que a concentração de neutrófilos no LBA de pacientes com LPA/SDRA está relacionada com sua severidade e com um mal prognóstico (ABRAHAM, 2003; AGGARWAL et al., 2000). Em consequência, é proposto que a inibição da migração de neutrófilos para os pulmões reduza o dano tecidual em diferentes modelos experimentais.

Logo, fica evidente que a inibição do acúmulo neutrofilico é um aspecto importante para o controle da LPA. Já foi demonstrado que nesta patologia os neutrófilos requerem a ativação do fator de transcrição NF- κ B para atingir seus efeitos lesivos nas vias aéreas e pulmão. No entanto, estudos prévios também já reportaram que o ácido *p*-cumárico mostra-se capaz de reduzir a ativação da subunidade p65 do NF- κ B, e consequentemente, sua translocação para o núcleo e a posterior ativação celular (SRISOOK et al., 2017). Tal inibição poderia responder pelos efeitos inibidores deste composto fenólico sobre os neutrófilos.

É de conhecimento que durante a LPA vários mediadores inflamatórios são liberados e orquestram a ativação e recrutamento leucocitário, sendo responsáveis pela manutenção e perpetuação do dano tecidual causado pela inflamação. Por conta disso, partiu-se para determinar se o ácido *p*-cumárico seria capaz de afetar a quantidade de mediadores inflamatórios, como a IL-6, IL-8 e IL-10, liberados após estímulo intranasal com LPS. Os resultados revelaram que o pré-tratamento com ácido *p*-cumárico diminuiu a quantidade de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 no lavado broncoalveolar de animais com LPA. Apesar de não haver estudos, até o momento, sobre os efeitos do ácido *p*-cumárico na LPA, os efeitos atenuadores deste composto fenólico sobre a produção de IL-6 e IL-8 já foram reportados por diferentes autores (GRANICA et al., 2015).

De maneira interessante, quando foram mensurados os níveis de IL-10 no fluido broncoalveolar de animais tratados com ácido *p*-cumárico e estimulados com LPS verificou-se um significativo aumento no montante desta citocina que possui características anti-inflamatórias. Portanto, o ácido *p*-cumárico não apenas suprime o montante de mediadores anti-inflamatórios, quanto também atua promovendo a liberação da citocina anti-inflamatória, o que pode justificar suas ações em suprimir os danos causados pela LPA induzida por LPS. Importante mencionar que a capacidade

do ácido *p*-cumárico em induzir a produção de IL-10 em esplenócitos e macrófagos já foi reportada em estudos anteriores (LIU; LIN, 2013).

Nas doenças de base inflamatória, a produção de citocinas é fundamental para o estabelecimento e manutenção da patologia. Dentre as citocinas liberadas no sítio inflamatório após estímulo com LPS, a IL-6, produzida por células endoteliais, contribui fortemente para ativação leucocitária (SCHELLER et al., 2011). Além desta, a IL-8, que é produzida por macrófagos, células epiteliais e fibroblastos, é um potente quimioatraente para neutrófilos (NAKAMURA et al., 2000). É importante ressaltar também, que o processo inflamatório se mostra autorregulado devido a participação de mediadores anti-inflamatórios. Dentre os mediadores com este perfil de regulação pode-se destacar a citocina IL-10, visto que esta citocina possui importante papel no controle da inflamação por modular as respostas celulares e os danos teciduais (GOODMAN et al., 2003).

Portanto, foi dada sequência aos estudos quantificando o montante de IL-10 no lavado broncoalveolar de animais com LPA. Os resultados revelaram que os níveis de IL-10 no LBA de animais com LPA foram elevados após tratamento com ácido *p*-cumárico, sugerindo o potencial anti-inflamatório deste composto fenólico não apenas por reduzir citocinas pró-inflamatórias, mas também por elevar níveis da citocina anti-inflamatória IL-10.

Em seguida, após constatar que o ácido *p*-cumárico mostrou-se capaz de reduzir a inflamação nas vias aéreas (LBA), decidiu-se avaliar se esta inibição da resposta inflamatória das vias aéreas também se estendia ao tecido pulmonar, visto que, estudos prévios já reportaram que o estímulo com LPS causa intenso infiltrado leucocitário no tecido pulmonar, espessamento dos septos alveolares e aumento nos níveis IL-6 (LI e WU, 2015; JING et al., 2015). Logo, ao avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre o montante de citocinas presentes no tecido pulmonar e sobre as alterações histopatológicas induzidas por LPS, observou-se inicialmente que o ácido *p*-cumárico reduziu os níveis de IL-6 e aumentou de IL-10 no tecido pulmonar, resultados que demonstram o forte efeito anti-inflamatório deste composto. Além disso, ao se observar o perfil de células inflamatórias no parênquima pulmonar, observou-se que o ácido *p*-cumárico atenuou o infiltrado leucocitário para o interstício e para os septos alveolares, além de diminuir a formação de membranas hialinas e diminuir a quantidade de debris proteicos nos espaços aéreos. Todas estas alterações

são capazes de revelar o potencial deste composto fenólico em reduzir o dano causado pelo LPS ao tecido pulmonar.

Em sintonia com este resultado, Pragasam e colaboradores (2012), utilizando vários modelos de artrite, demonstrou que após a administração de ácido *p*-cumárico, houve uma diminuição significativa do edema de pata, sugerindo que o ácido *p*-cumárico possivelmente inibiu a produção e liberação de citocinas, diminuindo a ativação e migração de leucócitos, reforçando o potencial anti-inflamatório desse composto (PRAGASAM et al., 2012).

Uma vez demonstrado que o ácido *p*-cumárico reduz parâmetros da inflamação pulmonar em um modelo *in vivo*, por diminuir o recrutamento de neutrófilos e alterar a quantidade de citocinas no sítio inflamatório, buscou-se avaliar se o ácido *p*-cumárico possui um efeito direto sobre neutrófilos que justificaria a redução no influxo desta célula para o sítio inflamatório. Esta hipótese mostra-se suportada por estudos prévios que demonstram os efeitos de compostos fenólicos em inibirem a expressão de moléculas de adesão (MANNA et al., 2009; CALABRISO et al., 2016). No presente estudo verificou-se que neutrófilos humanos tratados com ácido *p*-cumárico e postos a aderir sobre células endoteliais humanas (Eahy.926) estimuladas com TNF- α possuem uma menor capacidade de adesão, sugerindo um efeito direto deste composto fenólico sobre os neutrófilos, podendo ser pela inibição na função e/ou pela expressão de moléculas de adesão neste tipo celular.

Em adição, o tratamento de neutrófilos com ácido *p*-cumárico não interferiu na viabilidade destas células, sustentando a hipótese de que a redução na capacidade de adesão dos neutrófilos não se deve a eventos relacionados a efeitos citotóxicos. Resultados semelhantes foram descritos por estudos prévios que revelam o potencial do ácido *p*-cumárico em inibir a expressão de ICAM (*intercelular adhesion molecule*)-1 em monócitos (MANNA et al., 2009), bem como a expressão de VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) em células endoteliais (SPILIOTI et al., 2014). Em conjunto, os resultados sugerem o ácido *p*-cumárico como uma molécula promissora para o tratamento da lesão pulmonar aguda, por apresentar atividade anti-inflamatória, tanto em um modelo de inflamação *in vivo*, modulando citocinas pró e anti-inflamatórias nas vias aéreas e pulmão, quanto por afetar diretamente a adesão de neutrófilos *in vitro*.

7 CONCLUSÃO

O conjunto de resultados neste estudo permite concluir que o ácido *p*-cumárico:

- a) Inibe o recrutamento leucocitário, em especial de neutrófilos, para as vias aéreas e pulmão na LPA.
- b) Reduz, nas vias respiratórias, a quantidade de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 após estímulo com LPS no modelo de LPA.
- c) Aumenta, nas vias respiratórias, a quantidade da citocina anti-inflamatória IL-10 após estímulo com LPS no modelo de LPA.
- d) Diminui o infiltrado de células inflamatórias e o dano tecidual no pulmão após estímulo com LPS no modelo de LPA.
- e) Inibe a adesão de neutrófilos às células endoteliais ativadas indicando um efeito direto sobre neutrófilos *in vitro*.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o ácido *p*-cumárico modula negativamente a resposta inflamatória típica da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A.; YOUSEF, A.I.; ABD EL-TWAB, S.M. et al. Gallic and *p*-coumaric acid attenuate type 2 diabetes-induced neurodegeneration in rats. **Metab Brain Dis.** v. 32(4), p. 1279-86, 2017.
- ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Crit Care Med.** v. 31(4), p.s195-9, 2003.
- ABRAHAM, E.; CARMODY, A.; SHENKAR, R. et al. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage-or endotoxemia-induced lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 279, p. L1137-45, 2000.
- ADHIKARI, N.K.; BURNS, K.E.; FRIEDRICH, J.O. et al. Effect of nitric oxide on oxygenation and mortality in acute lung injury: systematic review and meta-analysis. **BMJ.** v. 334(7597):779, 2007.
- AGARWAL, R.; NATH, A.; AGARWAL, A. N. et al. Do glucocorticoids decrease mortality in acute respiratory distress syndrome? A meta-analysis. **Respirology.** v. 12, p.585-590, 2007.
- AGGARWAL, A.; BAKER, C.S.; EVANS, T.W. et al. G-CFS and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. **Eur Respir J.** v.15, p.895-901, 2000.
- ASHBAUGH, D.G.; BIGELOW, D.B.; PETTY, T.L. et al. Acute Respiratory Distress in Adults. **Lancet.** p. 319-23, 1967.
- BAE, H.; KIM, R.; KIM, Y. et al. Effects of *Schisandra chinensis* Baillon (Schizandraceae) on lipopolysaccharide induced lung inflammation in mice. **Journal of Ethnopharmacology.** v.142, p. 41-47, 2012.
- BARNES, P.J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. **Br J Pharmacol.** v.148(3), p. 245-54, 2005.
- BARROS, M.P.; LEMOS, M.; MAISTRI, E.L. et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **J Ethnopharmacol.** v. 120(3), p. 372-77, 2008.

BELLINGAN, G.J. The pulmonary physician in critical care * 6: the pathogenesis of ALI/ARDS. **Thorax**. v. 57, p.540-546, 2002.

BERNARD, G.R.; ARTIGAS, A.; BRIGHAM, K.L. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 149, p. 818-24, 1994.

BONFIELD, T.L.; KONSTAN, M.W.; BURFEIND, P.; PANUSKA, J.R.; HILLIARD, J.B.; BERGER, M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 13: 257–261, 1995.

BUTLER, M.S. The role of natural products chemistry in drug discovery. **J Nat Prod**. v. 67(12), p. 2141-53, 2004.

CALFEE, C.S.; WARE, L.B.; GLIDDEN, D.V. et al. Use of risk reclassification with multiple biomarkers improves mortality prediction in acute lung injury. **Crit Care Med**. v. 39(4), p. 711-17, 2011.

CASER, E.B.; ZANDONADE, E.; PEREIRA, E. et al. Impact of Distinct Definitions of Acute Lung Injury on Its Incidence and Outcomes in Brazilian ICUs: Prospective Evaluation of 7,133 Patients. **Crit Care Med**. v. 42(3), p. 574-82, 2014.

CHEN, H.; BAI, C.; WAN, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Rev Resp Med**. v. 4(6), p. 773-83, 2010.

CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B. et al. Drug discovery from natural sources. **AAPS J**. v. 8(2), p. E239-53, 2006.

CONTE, F.P.; FERRARIS, F.K.; COSTA, T.E.M.M. et al. Effect of gedunin on acute articular inflammation and hypernociception in mice. **Molecules**. v. 20, p. 2636-2657, 2015.

CROSS, M.K.; MATTHAY, M. Biomarkers in Acute Lung Injury: Insights into the Pathogenesis of Acute Lung Injury. **Crit Care Clin**. v. 27(2), p. 355-77, 2011.

DONG, L.; WANG, S.; CHEN, M. et al. The Activation of Macrophage and Upregulation of CD40 Costimulatory Molecule in Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury. **J Biomed Biotechnol**. v. 2008, 2008.

EACKLE, T.; BRODSKY, K.; BONNEY, M. et al. HIF1A reduces acute lung injury by optimizing carbohydrate metabolism in the alveolar epithelium. **PLOS Biology**. v. 11, 2013.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes Infect**. v. 4, p. 837-51, 2002.

FAFFE, D.S.; SEIDL, V.R.; CHAGAS, P.S.C. et al. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. **Eur Respir J**. v. 15, p.85-91, 2000.

FAN, F.; DEL SORBO L.; GOLIGHER, E.C. et al. An Official American Thoracic Society/European Society of Intensive Care Medicine/Society of Critical Care Medicine Clinical Practice Guideline: Mechanical Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 195(9), p. 1253-63, 2017.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**. v. 5, p. 1317-27, 2003.

FAVARIN, D.C.; TEIXEIRA, M.M.; ANDRADE, E.L. et al. Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. **Mediators Inflamm**. v. 2013(164202), p. 1-13, 2013.

FENG, H.; YAMAKI, K.; TAKANO, H. et al. Effect of sinomenine on collagen-induced arthritis in mice. **Autoimmunity**. v. 40(7), p. 532-539, 2007.

FERGUSON, L.R.; LIM, I.F.; PEARSON, A.E. et al. Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls. **Mutation Research**. v. 542, p. 49-58, 2003.

FRANCA, A.S.; TOUFEN, C.; HOVNANIAN, A.L. et al. The epidemiology of acute respiratory failure in hospitalized patients: a Brazilian prospective cohort study. **J Crit Care**. v. 26(3), p. 330.e1-8, 2011.

GOODMAN, R. B.; PUNGIN, J.; LEE, J.S. et al. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine Growth Factor Rev**. v. 14(6), p. 523-535, 2003.

GRANICA, S.; PIWOWARSKI, J.P.; RANDAZZO, A.; SCHNEIDER, P.; ŻYŻYŃSKA-GRANICA, B.; ZIDORN, C. Novel stilbenoids, including cannabis piradienone

glycosides, from *Tragopogon tommasinii* (Asteraceae, Cichorieae) and their potential anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**. 117: 254-66, 2015.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. **Mol Med**. v. 17, p. 293-307, 2011.

GU, R.; WANG, Y.; LONG, B. et al. Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. **Biol Pharm Bull**. 37(6), p. 903-15, 2014.

HEGEMAN, M.A.; HENNUS, M.P.; COLEBENS, P.M. et al. Dexamethasone Attenuates VEGF Expression and Inflammation but Not Barrier Dysfunction in a Murine Model of Ventilator-Induced Lung Injury. **PLoS One**. v. 8(2):e57374, 2013.

HERNU, R.; WALLET, F.; THIOILLIERE, F. et al. An attempt to validate the modification of the American-European consensus definition of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome by the Berlin definition in a university hospital. **Intensive Care Med**. v. 39, p. 2161-70, 2013.

HERRIDGE, M.S.; TANSEY, C.M.; MATTE, A. et al. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. **The New England Journal of Medicine**. v. 364, p. 1293-1304, 2011.

HIRANO, T.; ISHIHARA, K.; HIBI, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. **Oncogene**. v. 19, p. 2548-56, 2000.

HUANG, C.H.; YANG, M.L.; TSAI, C.H. et al. Ginkgo biloba leaves extract (EGb 761) attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and NF- κ B-dependent matrix metalloproteinase-9 pathway. **Phytomedicine**. v. 20(3-4), p. 303-309, 2013.

HUDSON, E.A.; DINH, P.A.; KOKUBUN T. et al. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 9(11), p. 1163-70, 2000.

JARACZ, S.; STRØMGAARD, K.; NAKANISHI, K. Ginkgolides: selective acetylations, transacetylation, and biological evaluation. **J Org Chem**. v. 67, p. 4623-26, 2002.

JING, W.; CHUNHUA, M.; SHUMIN, W. Effects of acteoside on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via regulation of NF- κ B pathway in vivo and in vitro. **Toxicol Appl Pharmacol.** v.285(2), p.128-135, 2015.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S.; SHIMIZU, M. Transepithelial transport of *p*-coumaric acid and gallic acid in caco-2 cell monolayers. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 67, p. 2317-2324, 2003.

KRAUSE, J.; TOBIN, G. Discovery, development, and regulation of natural products. **Natural Drug Discovery in 21st century.** p. 3-35, 2013.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol.** v. 7, p. 678-89, 2007.

LI, J.W.; WU, X. Mesenchymal stem cells ameliorate LPS-induced acute lung injury through KGF promoting alveolar fluid clearance of alveolar type II cells. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v. 19(13), p. 2368-2378, 2015.

LIU, K.X.; WU, W.K.; HE, W. et al. Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: roles of oxidative stress and nitric oxide. **World J Gastroenterol.** v. 13(2), p. 299-305. 2007.

LIU, C.J.; LIN, J.Y. Anti-inflammatory effects of phenolic extracts from strawberry and mulberry fruits on cytokine secretion profiles using mouse primary splenocytes and peritoneal macrophages. **Int Immunopharmacol.** 16(2): 165-70, 2013

LODOVICI, M.; CALDINI, S.; MORBIDELLI, L. et al. Protective effect of 4-coumaric acid from UVB ray damage in the rabbit eye. **Toxicology.** v. 255(1-2), p.1-5, 2009.

LUCERI, C.; GIANNINI, L.; LODOVICI, M. et al. *p*-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. **Br J Nutr.** v. 97(3), p. 458-63, 2007.

LUCERI, C.F.; GUGLIELMI, M.; LODOVICI, L. et al. *p*-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. **Br J Nutr.** v. 97, p.458-463, 2007.

MAGALHÃES, C.B.; RIVA, D.R.; DEPAULA, L.J. et al. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. **J Appl Physiol.** v. 108(4), p.845-841, 2010.

MANICONE, A.M. Role of the pulmonary epithelium and inflammatory signals in acute lung injury. **Expert Rev Clin Immunol**. v. 5, p. 63-75, 2009.

MANNA C, NAPOLI D, CACCIAPUOTI G, PORCELLI M, ZAPPIA V. Olive oil phenolic compounds inhibit homocysteine-induced endothelial cell adhesion regardless of their different antioxidant activity. **J Agric Food Chem**. 13;57(9):3478-82. 2009

MARIK, P.E.; MEDURI, G.U.; ROCCO, P.R. et al. Glucocorticoid treatment in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Clin**. v. 27(3), p. 589-607, 2011.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C.W.; MARTIN, T.R. Animal models of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 295(3), p. L379-399, 2011.

MCCLINTOK, D.; ZHOU, H.; WICKERSHAM, N. et al. Biomarkers of inflammation, coagulation and fibrinolysis predict mortality in acute lung injury. **Critical Care**. v. 12(2), R41, 2008.

MYOU, S.; LEFF, A.R.; MYO, S. et al. Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT. **J Exp Med**. v.198(10), p.1573-1582, 2003.

NAKAMURA, M.; FUJISHIMA, S.; SAWAFUJI, M. et al. Importance of interleukin-8 in the development of reexpansion lung injury in rabbits. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 161, p. 1030-1036, 2000.

NEOG, M.K.; JOSHUA PRAGASAM, S.; KRISHNAN, M. et al. p-Coumaric acid, a dietary polyphenol ameliorates inflammation and curtails cartilage and bone erosion in the rheumatoid arthritis rat model. **Biofactors**. 2017.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep**. v. 17(3), p. 215-34, 2000.

OGBOURNE, S.M.; PARSONS, P.G. The value of nature's natural products library for the discovery of New Chemical Entities: the discovery of ingenol mebutate. **Fitoterapia**. v. 98, p. 36-44, 2014.

PARK, J.R.; LEE, H.; KIM, S.I. et al. The tri-peptide GHK-cu complex ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Oncotarget**. 2016.

PELOSI, P.; BRAZII, L.; GATTINONI, L. Prone position in acute respiratory distress syndrome. **Eur Respir J**. v. 20, p. 1017-28, 2002.

PRAGASAM, S.J.; MURUNIKKARA, V.; SABINA, E.V. et al. Ameliorative effect of *p*-coumaric acid, a common dietary phenol, on adjuvant-induced arthritis in rats. **Rheumatol Int**. v. 33(2), p. 325-34, 2013.

PRAGASAM, S.J.; VENKATESAN, V.; RASOOL, M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of *p*-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. **Inflammation**. v. 36, p 169-176, 2012.

PUNEET, P.; MOOCHHALA, S.; BHATIA, M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 288, p. L3-L15, 2005.

RANIERI, M.D.; RUBENFELD, G.D.; THOMPSON, B.T. et al. Acute Respiratory Distress Syndrome. The Berlin Definition. **JAMA**. v. 307(23), p.2526-33, 2012.

REUTERSHAN, J.; BASIT, A.; GALKINA, E.V. et al. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 289, p. L807-L815, 2005.

REUTERSHAN, J.; MORRIS, M.A.; BURCIN, T.L. et al. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. **J Clin Invest**. v. 116(3), p. 695-702, 2006.

REZOAGLI, E.; FUMAGALLI, R.; BELLANI, G. Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome. **Ann Transl Med**. v.5(14), p. 1-12, 2017.

ROGERIO, A.P.; FONTANARI, C.; BORDUCCHI, E. et al. Anti-inflammatory effects of Lafoensia pacari and ellagic acid in a murine model of asthma. **Eur J Pharmacol**. v. 580(1-2), p. 262-70, 2008.

RUBENFELD, G.D. Epidemiology of acute lung injury. **Crit Care Med**. v. 31(4), p. S276-84, 2003.

RUBENFELD, G.D.; CALDWELL, E.; PEABODY, E. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N Engl J Med**. v. 353(16), p. 1685-93, 2005.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**. v. 1813(5), p. 878-888, 2011.

SCHOTTELIUS, A.J.G.; MAYO, M.W.; SARTOR, R.B. et al. Interleukin-10 Signaling Blocks Inhibitor of $\kappa\beta$ Kinase Activity and Nuclear Factor κB DNA Binding. **J Biol Chem**. v. 274(45), p. 31868-74, 1999.

SHIROMWAR, S.S.; CHIDRAWAR, V.R. Combined effects of p-coumaric acid and naringenin against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Pharmacognosy Res**. v. 3(3), p. 214-19, 2011.

SINGH, G.; GLADDY, G.; CHANDY, T.T.; SEN, N. Incidence and outcome of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the surgical intensive care unit. **Indian Journal of Critical Care Medicine**. v. 18, p 659-665, 2014.

SLUTSKY, A.S.; RANIERI, M.D. Ventilator-Induced Lung Injury. **N Eng J Med**. v. 369, p.2126-36, 2013.

SOLON, S.; LOPES, L.; TEIXEIRA DE SOUZA JR, P. et al. Free radical scavenging of Lafoensia pacari. **J Ethnopharmacol**. v. 72(1-2), p. 173-78, 2000.

SPILIOTI, E.; JAAKKOLA, M.; TOLONEN, T.; LIPPONEN, M.; VIRTANEN, V.; CHINO, I.; KASSI, E.; KARABOURNIOTI, S.; MOUTSATSOU, P. Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. **PLoS One**. 21;9(4):e94860, 2014.

SRISOOK, E.; PALACHOT, M.; MANKHONG, S.; SRISOOK, K. Anti-inflammatory Effect of Etlingera pavieana (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizomal Extract and Its Phenolic Compounds in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. **Pharmacogn Mag**. 13: S230-S235, 2017

STEINBERG, K.P.; MILBERG, J.A.; MARTIN, T.R. et al. Evolution of Bronchoalveolar Cell Populations in the Adult Respiratory Distress Syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 150, p. 113-22, 1994.

STEINBERG, K.P.; HUDSON, L.D.; GOODMAN, R.B.; HOUGH, C.L.; LANKEN, P.N.; HYZY, R.; ARBOR, A.; THOMPSON, T.; ANCUKIEWICZ, M. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**. 354(16):1671-84, 2006.

SUD, S.; FRIEDRICH, J.O.; TACCONI, P. Prone ventilation reduces mortality in patients with acute respiratory failure and severe hypoxemia: systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Med.** v. 36, p. 585-99, 2010.

SWEATT, A.J.; LEVITT, E.J. Evolving Epidemiology and Definitions of the Acute Respiratory Distress Syndrome and Early Acute Lung Injury. **Clin Chest Med.** v. 35, p. 609-24, 2014.

THOMPSON, B.T.; CHAMBERS R.C.; KATHLEEN, D.L. Acute Respiratory Distress Syndrome. **N Engl J Med.** v. 377(10), p. 562-72, 2017.

VAUZOUR, D.; CORONA, G.; SPENCER, J.P. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. **Arch Biochem Biophys.** v. 501(1), p. 106-11, 2010.

WALKEY, A.J.; SUMMER, R.; HO, V. et al. Acute respiratory distress syndrome: epidemiology and management approaches. **Clinical Epidemiology.** v. 4, p. 159-169, 2012.

WARE, L.B.; Pathophysiology of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. **Semin Respir Crit Care Med.** v. 27(4), p. 337-49. 2006.

WEIDEMANN, H.P.; WHEELER, A.P.; BERNARD, G.R. et al. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. **N Engl J Med.** v. 354(24), p. 2564-75, 2006.

WILLIAMS, A.E.; CHAMBERS, R.C. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 306(3), p. L217-230, 2013.

WU, C.; LIN, L.; YANG, J. et al. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by treatment with IL-10. **Respirology.** v. 14, p. 511-21, 2009.

ZANG, L.Y.; COSMA, G.; GARDNER, H. et al. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 279(4), 2000.

ZANGH, D.H.; MARCONI A.; XU, L.M. et al. Tripterine inhibits the expression of adhesion molecules in activated endothelial cells. **J Leukoc Biol.** v. 80(2), p. 309-319, 2006.