

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

FLÁVIO MARTINS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO SOBRE CÉLULAS DO
EPITÉLIO ALVEOLAR HUMANO: POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
ANTIOXIDANTE**

Maceió
2018

FLÁVIO MARTINS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO SOBRE CÉLULAS DO
EPITÉLIO ALVEOLAR HUMANO: POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
ANTIOXIDANTE**

Dissertação 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: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Broetto.

Maceió
2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

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

S237a Santos, Flávio Martins dos.
Avaliação dos efeitos do ácido *p*-cumárico sobre células do epitélio alveolar humano : possível envolvimento do sistema antioxidante / Flávio Martins dos Santos. – 2018.

50 f. : il.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Coorientador: Leonardo Broetto.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 43-49.

Apêndice: f. 50.

1. Ácido *p*-cumárico. 2. Célula epitelial. 3. Estresse oxidativo. I. Título.

CDU: 547.587.51

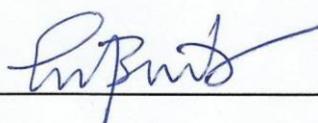
Folha de Aprovação

Flávio Martins dos Santos

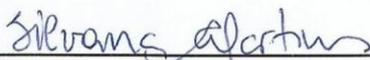
Avaliação dos efeitos do ácido p-cumárico sobre células do epitélio alveolar humano: possível envolvimento do sistema antioxidante

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 2 de abril de 2018.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador)



Prof.ª Dr.ª Sylvana Ayres Martins – (UFAL)



Prof.ª Dr.ª Cristiane Monteiro da Cruz - (CESMAC)

Aos meus pais, Cícero e Edneide.

*Por tudo, principalmente por combinarem
especificamente os genes que trago comigo.
Obrigado!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Emiliano de Oliveira Barreto, pela oportunidade oferecida, o voto de confiança e por toda contribuição substancial para minha formação;

Ao meu co-orientador, professor Dr. Leonardo Broetto, pelos ensinamentos e acompanhamento nessa caminhada;

A Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde, pela oportunidade de realizar pesquisa científica;

A banca, por disponibilizar-se a contribuir com este estudo;

A minha namorada, Keyla, pelo infindável companheirismo, pela compreensão, a contínua motivação, por sempre ter acreditado em mim e pela tranquilidade que me passava sempre que precisei;

Aos meus inestimáveis amigos do Laboratório de Biologia Celular, com destaque para Samário, Jordana, Noé, Lilian, Tácio, Julianderson e Marvin, que me acompanharam pelo menos em algum ponto de toda essa trajetória, pelo suporte e pelos conhecimentos compartilhados. Em especial a Janylle, que me deu suporte tanto teórico quanto prático que possibilitou a realização deste trabalho;

Aos técnicos de Laboratório de Biologia Celular, Alex e Juliane, pelo suporte técnico;

Aos meus amigos Alan, Luan, Emmanuel, Viviane e Thatianne por todo apoio;

Por fim, a minha família por todo o suporte cotidiano desde sempre, sem o qual eu provavelmente não seria capaz nem de fazer ensino superior.

*“Com quinze anos eu carregava saco de cimento”
(Cícero Martins)*

RESUMO

Introdução: O estresse oxidativo mostra-se como um dos principais componentes da patogênese da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), tanto que sua intensidade está diretamente associada à severidade da doença. O estresse oxidativo na DPOC contribui para amplificação da resposta inflamatória nas vias aéreas e no tecido pulmonar causando prejuízo à função de anti-proteases, redução da resposta a corticosteroides e indução de apoptose nas células epiteliais alveolares. Enfatiza-se que a DPOC, cujo principal fator de risco é a exposição à fumaça de cigarro, é a terceira causa de mortalidade e morbidade no mundo, principalmente devido a agravamentos súbitos dos sintomas, geralmente associados a infecções por patógenos oportunistas. Num contexto em que os tratamentos farmacológicos disponíveis estão atrelados a resultados insatisfatórios e/ou a diversos efeitos colaterais, produtos de origem natural permanecem como importante fonte para obtenção/desenvolvimento de novos fármacos. Dentre os produtos naturais, da classe de compostos fenólicos, emerge como molécula candidata, o ácido *p*-cumárico (AC), devido a várias de suas atividades farmacológicas, incluído suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Portanto, este estudo objetivou avaliar os efeitos do AC sobre células epiteliais submetidas à estimulação *in vitro*. **Métodos:** Células do epitélio alveolar humano (A549) foram pré-tratadas por 1 h com AC e estimuladas com extrato de fumaça de cigarro (EFC) combinado com lipopolissacarídeo (LPS) (EFC/LPS) ou ao TNF- α . A viabilidade celular após exposição ao AC ou EFC/LPS foi avaliada pelo ensaio de MTT. As espécies reativas de oxigênio (ERO) foram mensuradas por citometria de fluxo utilizando o ensaio do 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) e a expressão dos genes de enzimas antioxidantes foram medidos por sqRT-PCR. Os dados foram submetidos à ANOVA com pós-teste de Tukey no software Graphpad Prism. **Resultados:** Células epiteliais expostas ao EFC (5%) ou ao LPS (1 μ g/ml) não exibiram aumento nos níveis de ERO. Porém, a combinação EFC (5%)/LPS (1 μ g/ml) foi capaz de induzir significativo aumento nos níveis de EROs nas células A549. O estímulo combinado (EFC/LPS) ainda reduziu os níveis de mRNA da enzima catalase, que não foram restaurados com o pré-tratamento com o AC. Não obstante, o pré-tratamento com AC, independente da concentração, diminuiu os níveis de ERO em células epiteliais. O TNF- α não foi capaz de induzir estresse oxidativo, mas induziu um aumento nos níveis de mRNA da glutathiona peroxidase que foi restaurado com o pré-tratamento com AC, além disso, houve um aumento nos níveis de mRNA de SOD-1 e SOD-2 quando as células foram pré-tratadas com AC e estimuladas com TNF- α . **Conclusão:** Esses resultados suportam um papel antioxidante do AC frente às ERO geradas por células A549 expostas ao EFC combinado com LPS ou ao TNF- α por mecanismos que independem das enzimas antioxidantes que controlam o metabolismo oxidativo intracelular.

Palavras Chaves: Ácido *p*-cumárico, célula epitelial, estresse oxidativo

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress plays a role between the main mechanisms intricately with the pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and its intensity is directly associated with the severity of the disease. The participation of oxidative stress in COPD involves the amplification of the inflammatory response, impairment of anti-protease function, reduction of corticosteroid response and induction of apoptosis in alveolar epithelial cells. It is emphasized that COPD, whose main risk factor is exposure to cigarette smoke, is the third cause of mortality and morbidity in the world, mainly due to sudden worsening of symptoms (exacerbations), usually associated with opportunistic pathogen infections. In a context where the current pharmaceutical treatments are linked to various side effects, the *p*-coumaric acid (AC) emerges as a candidate molecule due to its antioxidant and anti-inflammatory properties. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of AC in human alveolar epithelial cells (A549) activated with cigarette smoke extract (CSE) combined with LPS or with TNF- α . **Methods:** A549 cells were pretreated with AC and exposed to the EFC combined with LPS or with TNF- α . Cell viability after exposure to AC or EFC / LPS was evaluated by MTT assay. Reactive oxygen species (ROS) were measured by flow cytometry using DCFH-DA assay and gene expression of antioxidant enzymes were measured by sqRT-PCR. The data were submitted to ANOVA with Tukey post-test in Graphpad Prism software. **Results:** The EFC 5% and LPS 1 μ g/ml alone were unable to increase A549 in the ROS, however combination of both made. The combined stimulus reduced the mRNA levels of catalase, that were not restored with pretreatment with the AC. However, pretreatment with AC decreased ROS independent of concentration. TNF- α was not able to induce oxidative stress but induced an increase in mRNA levels of glutathione peroxidase that was restored with CA pretreatment, in addition, there was an increase in the levels of SOD-1 and SOD- 2 when the cells were pretreated with CA and stimulated with TNF- α . **Conclusion:** These results support an antioxidant role of the AC in the face of ROS generated by exposed A549 cells to EFC combined with LPS or to TNF- α by mechanisms independent of antioxidant enzymes activation.

Keywords: *p*-Coumaric acid, epithelial cell, oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos tipos celulares alveolar.....	14
Figura 2. Patogênese da bronquite crônica.....	18
Figura 3. Esquema de pulmão com enfisema.....	19
Figura 4. Esquema da defesa enzimática contra espécies reativas de oxigênio.....	20
Figura 5. Estrutura do ácido trans-4-cinâmico (ácido <i>p</i> -cumárico).....	23
Figura 6. Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a viabilidade de células A549.....	29
Figura 7. Efeito do extrato de fumaça de cigarro (EFC) com/sem lipopolissacarídeo (LPS) sobre a viabilidade de células A549.....	30
Figura 8. Efeito do extrato de fumaça de cigarro com/sem LPS sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em células A549.....	30
Figura 9. Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas com extrato de fumaça de cigarro combinada com LPS.....	31
Figura 10. Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre os níveis de mRNA de genes envolvidos com o estado oxidativo celular, em células A549 estimuladas com extrato de fumaça de cigarro combinado com LPS.....	33
Figura 11. Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas com TNF- α	34
Figura 12. Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre os níveis de mRNA de genes envolvidos com o estado oxidativo celular, em células A549 estimuladas com TNF- α	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitro
μM	Micromolar
A549	Linhagem celular de adenocarcinoma humano
ABTS	2,2-diazino (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico)
AC	Ácido <i>p</i> -cumárico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
cDNA	DNA complementar
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EFC	Extrato de fumaça de cigarro
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GM-CSF	Fator de estimulação de colônias de macrófagos-granulócitos
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IL-1b	Interleucina-1b
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
MCP-1	Proteína-1 quimiotática de monócitos
mg/ml	miligramas por mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
LPS	Lipopolissacarídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SOD1	Superóxido dismutase-1
SOD2	Superóxido dismutase-2
SOD3	Superóxido dismutase-3
SP-A/B/C/D	Proteína A/B/C/D associada à surfactante
sqRT-PCR	Reação de Polimerase em Cadeia com Retrotranscrição semi quantitativa
TGF- β	Fator beta de transformação do crescimento
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Epitélio alveolar	14
2.2 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)	16
2.3 Patogênese da DPOC	17
2.4 Tratamento farmacológico da DPOC.....	21
2.5 Compostos Fenólicos	22
2.6 Ácido <i>p</i> -cumárico (AC).....	22
3 JUSTIFICATIVA	24
4 OBJETIVOS	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1 Cultura celular.....	26
5.2 Preparo do extrato de fumaça de cigarro (EFC).....	26
5.3 Avaliação da citotoxicidade	26
5.4 Mensuração das espécies reativas de oxigênio intracelular.....	27
5.5 Mensuração dos níveis de mRNA de enzimas antioxidantes	27
5.6 Análise estatística.....	28
6 RESULTADOS.....	29
6.1 Avaliação da viabilidade de células A549 após exposição ao ácido <i>p</i> -cumárico.....	29
6.2 Padronização do modelo in vitro de ativação de células epiteliais utilizando extrato da fumaça de cigarro (EFC)	29
6.3 Efeito do EFC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio por células A549	30
6.4 Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas por EFC/LPS	31
6.5 Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre os níveis de mRNA para enzimas do metabolismo oxidativo e fator transcricional Nfr2 em células A549 estimuladas por EFC/LPS	32
6.6 Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas por TNF- α	34
6.7 Efeito do ácido <i>p</i> -cumárico sobre os níveis de mRNA para enzimas do metabolismo oxidativo e fator transcricional Nfr2 em células A549 estimuladas por TNF- α	34
7. DISCUSSÃO	37
8 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS DOS PARES DE INICIADORES UTILIZADOS NAS PCRS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Os alvéolos são estruturas em forma de saco presente nas terminações dos bronquíolos com grande área de superfície que propicia a hematose. Devido ao contato direto com o meio externo, as células alveolares estão sujeitas constantemente a exposições a agentes agressores como poluentes e micro-organismos indesejáveis. Porém, mesmo frente a estas condições de estímulo, as próprias células do epitélio alveolar são responsáveis pela manutenção da homeostase no ambiente pulmonar. Logo, situações capazes de causar disfunções nessas células podem levar ao desenvolvimento de diferentes doenças, tais como a Doença Intersticial Pulmonar (DIP) e a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (YANG et al. 2018).

A DPOC representa um sério problema de saúde pública em todo o mundo por causar sofrimento para os pacientes e altos custos econômicos e sociais para o sistema de saúde (CAMPOS, 2004). Relatos da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que cerca de 5% dos óbitos em todo o mundo estão relacionados à DPOC (GOLD, 2016). O tabagismo é responsável por cerca de 90% dos casos de DPOC registrados no sistema de saúde, sendo, portanto, o principal fator desencadeante da doença (BRASIL, 2010). A fumaça de cigarro é conhecida por ter vários efeitos prejudiciais sobre células epiteliais alveolares que incluem inibição da proliferação (JIAO; AO; XIONG, 2008), indução de apoptose (PLATAKI, et al., 2006), supressão da secreção de surfactante (WIRTZ; SCHIMIDT, 1996), estimulação da geração de mediadores pró-inflamatórios (VICTONI et al., 2014) e estresse oxidativo (BARNES, 2017).

O estresse oxidativo possui papel determinante dentre os mecanismos associados com a patogênese e fisiopatologia da DPOC. Níveis aumentados de moléculas pró-oxidantes e radicais livres está diretamente associado à severidade da doença, sendo capaz de amplificar a resposta inflamatória, prejudicar a função de anti-proteases, causar apoptose nas células epiteliais e reduzir a resposta a corticosteroides (ZINELLU et al., 2016). De fato, a inflamação da DPOC mostra-se resistente ao tratamento com corticosteroides, onde um dos mecanismos sugeridos para esta situação deve-se a redução dos níveis da enzima histona deacetilase 2 (HDAC2) por degradação oxidativa induzida pelas alterações no metabolismo oxidativo (BARNES, ITO e ADCOCK, 2004). Neste cenário, o tratamento de pacientes com DPOC que apresentam resistência a corticoterapia mantém-se como um desafio clínico. Outro fator importante a ser considerado na terapia usual, é que por se tratar de doença crônica há

necessidade de tratamento prolongado, que está associado a um aumento na incidência de candidíase orofaríngea, catarata, fraturas e pneumonia (CARDOSO, 2013; LIAPIKOU; TOUMBIS; TORRES, 2015). Portanto, estudos capazes de identificar substâncias com ações anti-inflamatórias e/ou antioxidantes em situações que envolvam a patogênese das doenças pulmonares, mostram-se úteis para prospectar moléculas que possam ser usadas no tratamento da DPOC.

Nesse contexto, os vegetais são importantes estoques de produtos biologicamente ativos. Vários fármacos atualmente disponíveis no mercado foram obtidos de plantas, sintetizados ou ainda modificados quimicamente após inspiração em compostos extraídos de plantas. Dentre esses produtos, o ácido trans-4-hidroxicinâmico, também conhecido como ácido *p*-cumárico, chama a atenção não apenas por ser um metabólito secundário encontrado em várias espécies comestíveis, mas também por apresentar efeitos farmacológicos de relevância clínica, tais como ações antioxidantes e anti-inflamatórias (ABDEL-HAWAB et al., 2003; PRAGASAM et al., 2013).

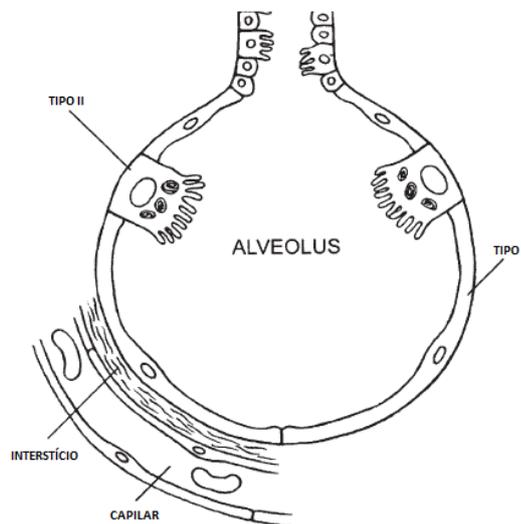
Portanto, considerando o interesse de caracterizar as propriedades farmacológicas de princípios ativos vegetais capazes de interferir na resposta inflamatória e no metabolismo oxidativo, bem como a importância das células do epitélio alveolar para o estabelecimento de diversas doenças das vias aéreas, como a DPOC, neste estudo foi avaliado o efeito do ácido *p*-cumárico sobre as células do epitélio alveolar humano submetidas a estímulos *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epitélio alveolar

O epitélio alveolar delimita os alvéolos e é composto basicamente por dois tipos celulares: células alveolares do tipo I e células alveolares do tipo II (Figura 1). As células do tipo I compreendem cerca de 8% das células pulmonares periféricas e ocupam aproximadamente 95% da superfície alveolar, enquanto que as células do tipo II compreendem cerca de 15% e ocupam uma superfície de 5% (MASON, 2006).

Figura 1. Esquema dos tipos celulares alveolar.



Fonte: Adaptado de ZEMANS, MATTHAY, 2004.

A própria distribuição e morfologia dessas células já sugerem uma especialização. Enquanto que as células do tipo I são planas e membranosas e estão relacionadas com o revestimento e às trocas gasosas, as células do tipo II são cuboide com corpos lamelares característicos e microvilosidades apicais e estão relacionadas com a defesa e reparação do ambiente alveolar (OCHS et al., 2016).

Dentre as funções típicas das células do tipo II podem-se citar o transporte de sódio do alvéolo para o interstício, a produção de surfactantes, a reparação do tecido danificado por meio da proliferação e diferenciação em células do tipo I, além de secretar uma variedade de substâncias anti-inflamatórias como as β -defensinas, citocinas e quimiocinas (MASON, 2006).

Em relação ao transporte de sódio do alvéolo para o interstício, esse também é realizado pelas células do tipo I, ainda que seja predominantemente função das células do tipo II. Esse transporte se dá no sentido lúmen alveolar – citoplasma – interstício – sangue, a primeira etapa ocorre por difusão a favor de um gradiente que é mantido pela expulsão de sódio para o interstício e conseqüentemente para o sangue através de canais de sódio/potássio que ficam nas membranas basolaterais dessas células (GUILLOT et al., 2013).

Esse transporte de sódio é importante tendo em vista que a superfície alveolar, que também funciona como uma barreira em relação ao meio externo, normalmente apresenta uma fina camada de líquido e componentes sanguíneos infiltrados devido a um gradiente de pressão. De forma que a geração do gradiente de sódio se torna uma estratégia para evitar acúmulo desnecessário de líquido, uma vez que esse tenderá a ser movido a favor do gradiente gerado pelo processo de osmose, impedindo assim edemas (GUILLOT et al., 2013).

Outro mecanismo que também impede a formação de edemas é a secreção de surfactantes pela região apical dessas células, substâncias que agirão diminuindo a tensão superficial alveolar. Além de prevenir edemas e otimizar as trocas gasosas por diminuir a tensão superficial, essas substâncias podem desempenhar também um papel na imunidade inata quando associadas a quatro proteínas relacionadas à colectina, sendo designadas como proteínas associadas à surfactantes: A (SP-A), B (SP-B), C (SP-C) ou D (SP-D), (MASON, 2006).

Ainda relacionado à secreção de substâncias relativas à imunidade inata, as células do tipo II também são capazes de secretar defensinas, pequenos peptídeos catiônicos e frequentemente anfifílicos que apresentam propriedades antimicrobianas, presentes também em outros animais e plantas (ORGEIG et al., 2010). Além disso, elas apresentam potencial para secretar várias citocinas como IL-1, TNF- α e IL-6 e várias quimiocinas como IL-8, MIP-2 e MCP-1(MASON, 2006).

Quando há comprometimento das funções do epitélio alveolar e os mecanismos citados tornam-se insuficientes para proteger as células é muito provável que haja dano tecidual, principalmente nas células do tipo I que são mais sensíveis. Nesse contexto, as células do tipo II, além de todas as funções já citadas, também são responsáveis pela reparação tecidual, proliferando-se e diferenciando-se em células do tipo I. Esse conjunto de funções a torna o principal regulador da homeostase pulmonar (MASON, 2006).

Dada tamanha importância para o epitélio alveolar é compreensível que o quadro de várias doenças inflamatórias pulmonares como a síndrome do desconforto respiratório agudo e a doença pulmonar obstrutiva crônica esteja relacionado às disfunções do epitélio (BUDINGER; SNAJDER, 2006; ZHAO et al., 2010).

A título de exemplo, um componente pivotal da patologia da síndrome do desconforto respiratório agudo é o edema, que está relacionado a prejuízos relativos ao transporte vetorial de sódio. Já na Doença Pulmonar obstrutiva Crônica (DPOC) pode-se citar a disfunção ou incapacidade de reparação do epitélio alveolar como o responsável por um dos seus sintomas mais característico: o enfisema (BUDINGER; SNAJDER, 2006; ZHAO et al., 2010).

2.2 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma doença progressiva caracterizada por limitação do fluxo de ar e associada com uma resposta inflamatória crônica nas vias aéreas e pulmões, cuja gravidade pode aumentar induzindo comorbidades (GOLD, 2016).

O principal fator de risco associado ao desenvolvimento da DPOC é o tabagismo, no entanto, podem-se citar também como fatores de risco a exposição ocupacional às partículas, vapores tóxicos, poluição do ar (LOPEZ-CAMPOS et al., 2016a; LOPEZ-CAMPOS et al., 2016b), fatores genéticos como a deficiência de α 1-antitripsina (ZUO et al., 2016; TURINO et al., 2016), fatores que afetam o crescimento dos pulmões durante a gestação e infecções respiratórias (GOLD, 2016).

Estima-se uma prevalência global de indivíduos com DPOC de aproximadamente 11,7% (ADELOYE et al., 2015), o que representa uma estimativa de 328 milhões de pessoas no mundo afetada pela doença. Devido a este elevado número de pacientes, a DPOC representa um importante problema de saúde pública causando sofrimento para os pacientes e altos custos econômicos e sociais em todo o mundo. Estima-se ainda que esta doença provoque cerca de 2,9 milhões de mortes anualmente, e as projeções para o ano de 2020 indicam um aumento nesse número para cerca de 4,7 milhões a cada 68 milhões de mortes no mundo (LOPEZ-CAMPOS et al., 2016a).

No Brasil, ela representa a terceira causa de morte entre as doenças crônicas não transmissíveis, com um aumento de 12% no número de óbitos entre os anos de 2005 e 2010

(RABAHI, 2013). O custo estimado anual associado a um paciente com DPOC é de US\$ 1.522,00, quase três vezes o custo associado a um paciente com asma (BRASIL, 2010). Segundo dados do DATASUS (2014), a cada hora três brasileiros morrem em decorrência da DPOC, atingido a faixa de cerca de 40 mil mortes por ano no país.

2.3 Patogênese da DPOC

A patogênese da DPOC envolve mecanismos que atuam nos brônquios/bronquíolos e mecanismos que atuam nos alvéolos, que culminam, respectivamente, nas duas manifestações marcantes dessa doença que limitam o fluxo de ar: a bronquite crônica e o enfisema.

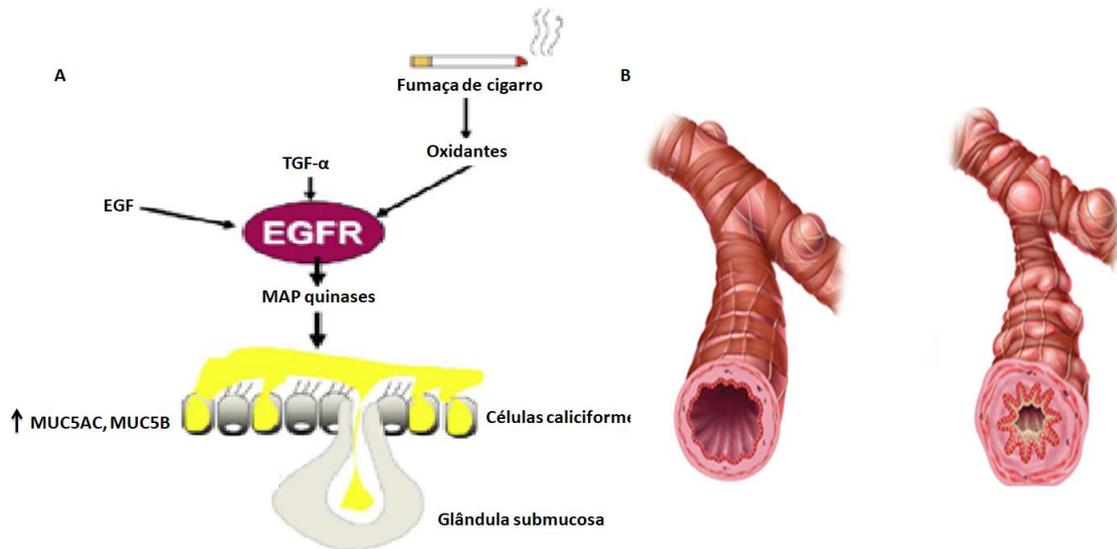
Tendo em vista a complexidade dos mecanismos que levam ao desenvolvimento da DPOC, é compreensível que sua patogênese não esteja totalmente elucidada mesmo diante de tantos esforços. No entanto, já se sabe que processos inflamatórios (com participação de células, proteólise e do stress oxidativo); alterações epigenéticas, variações na microbiota e autoimunidade são componentes que contribuem para a patogênese dessa doença (BAGDONAS et al., 2015).

As células epiteliais, seja dos brônquios/bronquíolos ou dos alvéolos, estão entre as primeiras células a entrar em contato com os fatores agressores das vias respiratórias, já que constituem uma barreira que separa o meio externo do meio interno e assumem um importante papel na patogênese da DPOC (MASON, 2006). O estímulo persistente provocado pela fumaça de cigarro direta ou indiretamente sobre essas células é responsável pelo desenvolvimento das manifestações da DPOC.

Na bronquite crônica, os brônquios e bronquíolos de indivíduos com DPOC apresentam uma hipersecreção de muco devido à hiperplasia nas células caliciformes. Os receptores de fatores de crescimento epiteliais (EGFRs) contribuem para esse cenário, podendo ser ativados pelo estresse oxidativo (SHAO; NAKANAGA; NADEL, 2004), bem como pelo TGF- β , liberado como subproduto da elastase secretada por neutrófilos. O acionamento do EGFR ativa a via da MAP quinase, que resulta no aumento da expressão dos genes MUC5AC e MUCB (Figura 2A) (BURGEL; NADEL, 2004; BARNES, 2016).

Além disso, geralmente ocorre também um notável espessamento nas paredes dos brônquios e bronquíolos referente ao depósito de colágeno do tecido cicatricial, que se forma após ciclos constantes de lesão/reparo promovidos pela inflamação crônica (Figura 2B) (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2013).

Figura 2. Patogênese da bronquite crônica. A) hiperplasia de células caliciformes e hipersecreção de muco B) Representação de brônquio saudável e brônquio com espessamento em sua parede.

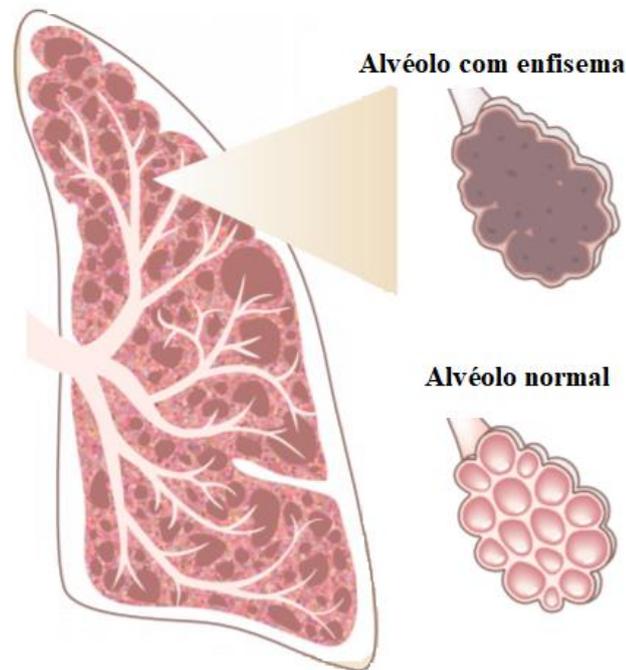


Fonte: A) adaptado de Barnes, 2016. B) adaptado de eMedMD.com

Na patogênese do ambiente alveolar, os pneumócitos do tipo II assumem um papel central, uma vez que, além de exercerem função de barreira física, contribuem para a proteção dos alvéolos devido à produção de uma barreira química que inclui a secreção de surfactantes, agentes antioxidantes, anti-proteases e defensinas (DE BOER et al., 2006), bem como atuam na reparação tecidual (MASON, 2006). Porém, quando submetidos a agentes agressores, como a fumaça de cigarro, essas funções são comprometidas e essas células produzem e secretam uma vasta gama de mediadores inflamatórios e fibróticos que incluem TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF e IL-8 (GAO et al., 2015).

O enfisema consiste na perda da integridade alveolar com diminuição do espaço alveolar (Figura 3). Suas causas ainda não foram totalmente elucidadas, mas sabe-se que há participação de proteases, de vários tipos celulares como macrófagos alveolares, linfócitos TCD8+, neutrófilos, e mecanismos como a apoptose e o estresse oxidativo (HOGG et al., 2004; MORISSETTE; PARENT; MILOT, 2009).

Figura 3. Esquema de pulmão com enfisema.



Fonte: Adaptado de American Thoracic Society, 2013.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) exerce um importante papel na manutenção da integridade das células do epitélio alveolar devido ao seu potencial de prevenir a apoptose nessas células. No entanto, em fumantes seus níveis mostram-se reduzidos sendo compensando pelo aumento nos níveis do fator de crescimento de hepatócitos (HGF). Não obstante, em indivíduos com DPOC este também se encontra diminuído, o que pode contribuir para o surgimento de enfisema (KANAZAWA et al., 2014).

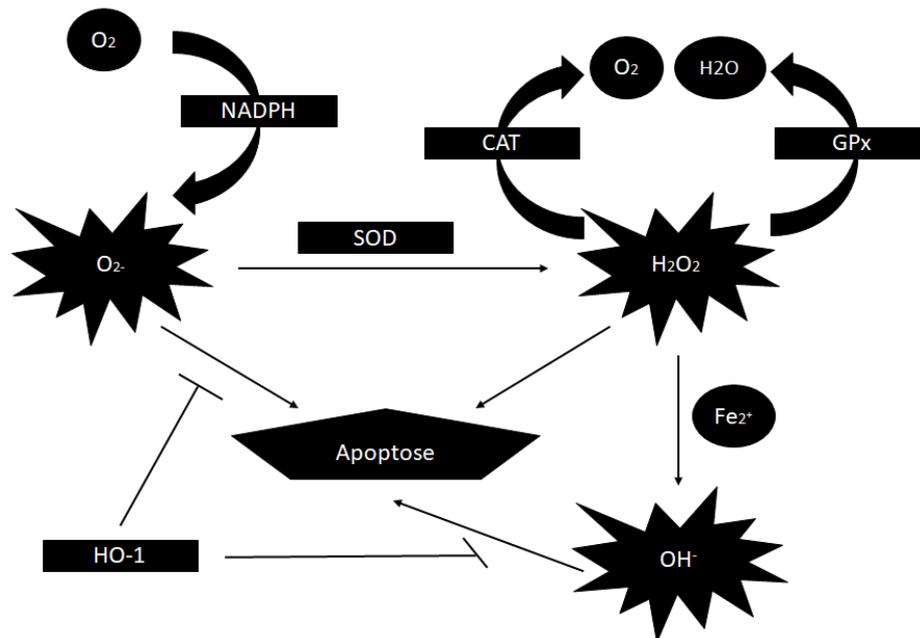
As células epiteliais ativadas podem contribuir ainda para o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes, ou seja, participação na indução do estresse oxidativo, o qual apresenta um papel crítico na DPOC (BARNES, 2017).

Normalmente, o ânion superóxido O_2^- gerado pela NADPH oxidase é convertido pelas enzimas superóxido dismutases a peróxido de hidrogênio que, por sua vez, é convertido em água pela catalase ou glutathiona peroxidase (Figura 4). No entanto, quando esses mecanismos antioxidantes são insuficientes, essas espécies reativas podem reagir com mais frequência, inclusive, produzindo outras espécies mais reativas como o radical hidroxila, o radical mais reativo de todos, capaz de reagir amplamente com aminoácidos, fosfolipídios e ácidos nucleicos (JÚNIOR et al., 2005).

A oxidação de aminoácidos induz alterações físicas nas proteínas que eles compõem, podendo levar a formação de proteínas antigênicas capazes de estimular a produção de anticorpos autoimunes, provável causa da persistência da inflamação (KIRKHAM et al., 2011). Já a oxidação de lipídeos pode levar a formação de isoprostanos, capazes de promover bronco-constricção e exsudação plasmática (MONTUSCHI et al., 2004). Enquanto que a oxidação de ácidos nucleicos pode levar a alterações de bases ou até mesmo a quebra da molécula (ROBERT et al., 1988).

Consequências do estabelecimento do estresse oxidativo no ambiente alveolar são a amplificação da resposta inflamatória, prejuízos na atividade de anti-proteases como a α -1 antitripsina, aceleração da quebra de elastina no parênquima pulmonar, além de resistência à corticóides e prejuízos na reparação tecidual (BARNES, 2017).

Figura 4. Esquema da defesa enzimática contra espécies reativas de oxigênio.



NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). SOD (superóxido dismutase). CAT (catalase). GPx (Glutationa peroxidase), HO-1 (heme oxigenase 1).

2.4 Tratamento farmacológico da DPOC

Atualmente, a escolha do medicamento utilizado no tratamento de pacientes com DPOC é baseada em características clínicas como a severidade dos sintomas, incluindo a intensidade e a frequência da limitação do fluxo de ar, a presença de comorbidades e o estado geral do indivíduo. Os principais fármacos utilizados na DPOC são: broncodilatadores, corticosteroides e inibidores de fosfodiesterase-4 (GOLD, 2016).

Os broncodilatadores atuam relaxando os brônquios e melhorando o fluxo de ar pelas vias respiratórias. Já os corticosteroides são utilizados para mitigar a inflamação nas vias aéreas (GOLD, 2016). Ainda levando em conta esse contexto inflamatório, encontram-se os inibidores da fosfodiesterase-4 (enzima que degrada nucleotídeos cíclicos que promovem a ativação celular), que por apresentarem mecanismos mais específicos induzem menos efeitos colaterais (CAMPOS et al., 2003).

Apesar da disponibilidade destas opções medicamentosas para o tratamento da DPOC, a efetividade do tratamento ainda não é alcançada. Estes fármacos promovem melhorias na função pulmonar em curto período de tempo. Logo, considerando a frequência e a intensidade dos sintomas da doença, o uso de terapias combinadas com estes fármacos mostra-se como uma estratégia terapêutica frequente, em especial utilizando corticosteroides em doses elevadas. Porém, o uso prolongado de corticosteroides por pacientes com DPOC em altas doses está associado a um aumento na incidência de pneumonia e diversos outros efeitos colaterais (CARDOSO, 2013).

Esse contexto fez surgir uma demanda por estudos que buscam alternativas terapêuticas para indivíduos com DPOC. Sob essa perspectiva, vários estudos têm abordado o uso de produtos naturais derivados de vegetais como uma potencial alternativa, buscando substâncias capazes de afetar aspectos centrais da fisiopatologia dessa doença como o estresse oxidativo e a inflamação (SANTANA et al., 2016).

A título de exemplo, substâncias derivadas de produtos naturais como a curcumina e o ácido cafeico podem induzir o aumento da expressão do fator de transcrição fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que por sua vez regula positivamente a expressão de genes do sistema antioxidante celular como a glutatona e a heme oxigenase-1 (DOMEJ; OETTL; RENNER, 2014).

2.5 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são substâncias que apresentam em sua constituição ao menos um anel aromático com um ou mais hidrogênio substituído por uma hidroxila, sendo o fenol a substância mais simples encontrada nesse grupo que se subdivide em várias classes, como os flavonoides, as xantonas, ligninas, cumarinas entre outras, dentre as quais se destaca aqui a classe do ácido hidroxicinâmico e seus derivados (GARCIA-SALES et al., 2010).

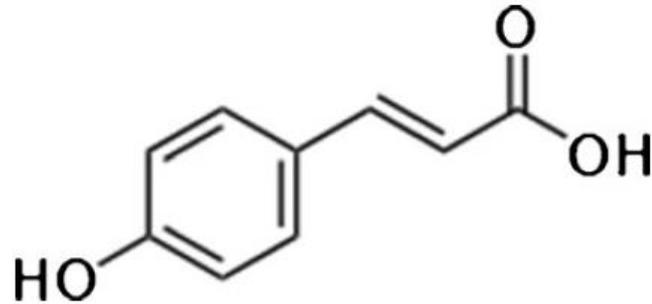
Esses compostos podem ser obtidos como resultado do metabolismo secundário de plantas e fungos, contribuindo para suas propriedades organolépticas, bem como na defesa frente a pragas e patógenos. No entanto, sua importância não se restringe às plantas e fungos, uma vez que através da alimentação os animais conseguem absorver e aproveitar essas substâncias, que em seus organismos podem apresentar diversas utilidades devido os seus potenciais efeitos farmacológicos como atividade anticancerígena, antimicrobiana, antiplaquetária, antioxidante e anti-inflamatória (GUTIÉRREZ-GRIJALVA, et al., 2018).

As substâncias pertencentes à classe do ácido hidroxicinâmico são sintetizadas a partir da via do chiquimato, que envolve o ácido chiquímico como precursor do composto inicial, a fenilalanina ou a tirosina. Esses aminoácidos aromáticos depois de desaminado pela fenilalanina-amônia-líase ou pela tirosina-amônia-líase produz o ácido cinâmico, que por ação da 4-hidroxilase cinamato é convertido em ácido *p*-cumárico ou ácido 4-hidroxicinâmico a partir do qual se derivam as demais substâncias pertencentes a essa classe, como o ácido ferúlico e o ácido caféico (KARAM et al., 2013; EL-SEEDI et al., 2012).

2.6 Ácido *p*-cumárico (AC)

O ácido *trans*-4-cinâmico (Figura 5), também conhecido pelo nome de ácido *p*-cumárico (AC), é um ácido fenólico que pode ser encontrado na composição de alimentos como o milho, aveia, trigo, feijão, pera, maçã, uva, laranja, tomate, batata, espinafre e cebola (PRAGASAM; RASOOL, 2013; PEI et al., 2016).

Figura 5. Estrutura do ácido trans-4-cinâmico (ácido *p*-cumárico).



Fonte: Pragasam et al., 2013.

Estudos relatam que o AC é possuidor de diversas atividades biológicas, incluindo ações antioxidantes e anti-inflamatórias (PRAGASAM et al., 2013; PEI et al., 2016). A atividade antioxidante do AC está associada ao grupamento fenol dessa substância. Mostrou-se em estudo *in vitro* que seu potencial para sequestrar radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e o 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico (ABTS), além do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, é relativamente baixo. Por outro lado, o AC apresentou um ótimo desempenho como sequestrador do radical hidroxila (MATHEW; ABRAHAM; ZAKARIA, 2015).

Ressalta-se que sua capacidade antioxidante em sistemas celulares parece ser significativamente aumentada, equiparando-se aos potenciais antioxidantes dos ácidos cafeico e ferúlico (ESPINOSA et al., 2015). Além disso, já foi relatado que o AC conseguiu eliminar espécies reativas de oxigênio de forma igual ou até superior ao ácido ferúlico em células A549 (BOUZAIENE et al., 2015). Em adipócitos da linhagem 3T3-L1 o AC aumentou os níveis das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutatona peroxidase (YEN et al., 2010).

Em relação a sua atividade anti-inflamatória, o AC diminuiu a expressão de TNF- α no modelo de artrite experimental em ratos (PRAGASAM; RASOOL, 2013), bem como os níveis de MCP-1 em adipócitos da linhagem 3T3-L1. (YEN et al., 2010). Cabe destacar ainda que o AC se mostrou capaz de inibir a produção de PGE₂, assim como a expressão de RNAm para COX-2 em macrófagos estimulados *in vitro* (SEO et al., 2013).

3 JUSTIFICATIVA

A DPOC mostra-se como uma doença responsável por um grande número de incapacitação para o trabalho e morte em todo o mundo, figurando como uma das doenças respiratórias que mais custam recursos financeiros para o sistema de saúde.

Apesar dos glicocorticoides mostrarem-se como o fármaco de primeira escolha para o tratamento da DPOC, seja sozinho, em elevada concentração, ou em combinação com β -agonistas, esta estratégia terapêutica ainda não impede o aparecimento de novas e severas manifestações clínicas, nem a progressão da doença. Além disso, como consequência deste protocolo de tratamento, é comum o aparecimento de efeitos secundários indesejáveis nestes pacientes. Por isso, este tipo de terapia tem sido questionado em especial devido à susceptibilidade à pneumonia.

Logo, as limitações de uso dos fármacos disponíveis impõem a necessidade de busca por substâncias detentoras de efeitos farmacológicos úteis no tratamento da DPOC. É consenso que os vegetais mostram-se como fontes para obtenção de substâncias biologicamente ativas. Assim, a avaliação destas substâncias de origem natural utilizando modelos experimentais é relevante para identificar potenciais fármacos úteis no tratamento de doenças. Pois, os modelos experimentais *in vitro* permitem compreender os processos moleculares e bioquímicos envolvidos no desenvolvimento de DPOC, além de possibilitar a elucidação das vias moleculares pelas quais princípios ativos de origem vegetal podem atingir seus efeitos farmacológicos.

Nesse contexto, o ácido trans-4-cinâmico, um metabólito secundário encontrado em várias espécies comestíveis, também conhecido como ácido *p*-cumárico, emerge como uma molécula candidata, devido às suas propriedades farmacológicas: antioxidante e anti-inflamatória, amplamente respaldadas pela literatura (PRAGASAM et al., 2013; PEI et al., 2016). Porém, apesar da descrição destes efeitos, até o momento ainda não se encontram caracterizados seus efeitos para o tratamento da DPOC.

4 OBJETIVOS

Avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre células do epitélio alveolar humano submetidas à estimulação *in vitro*.

ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre a viabilidade de células do epitélio alveolar humano;
- Padronizar modelo *in vitro* de ativação de células epiteliais com fumaça de cigarro combinada com LPS;
- Avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células do epitélio alveolar humano;
- Avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre o nível de expressão de genes relacionados à síntese de enzimas antioxidantes;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cultura celular

Células epiteliais alveolares do tipo II humanas da linhagem A549 foram mantidas em estufa à 37 °C com 5% de dióxido de carbono, em garrafas próprias para cultivo celular contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de L-glutamina e 0,01% de gentamicina. A subcultura das células foi realizada utilizando tripsina quando a monocamada atingia uma confluência de 70 – 80%.

5.2 Preparo do extrato de fumaça de cigarro (EFC)

Para o preparo do extrato de fumaça de cigarro, foi utilizada uma adaptação da metodologia utilizada por Holzer e colaboradores (2012). De tal forma que, forçou-se a dissolução da fumaça proveniente da queima de dois cigarros Marlboro (Philip Morris – Brazil) em 20 ml de meio RPMI-1640. O meio foi então filtrado, utilizando filtro de 0,2 µm, e teve sua absorvância medida utilizando um espectrofotômetro (320 nm).

Para efeito de padronização desse estímulo, o extrato de fumaça de cigarro foi considerado 100% apenas quando exibiu absorvância igual a 1,000. Nos experimentos, o extrato de fumaça de cigarro (100%) foi diluído para a concentração desejada imediatamente antes do uso com meio RPMI-1640 e adicionado LPS (1 µg/ml), combinação que foi utilizada como estímulo.

5.3 Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) (MOSMANN, 1983). 2×10^4 células/poço foram semeadas em placa de 96 poços e deixadas overnight à 37 °C e à 5% de dióxido de carbono. Em seguida, as células foram expostas a várias concentrações de ácido *p*-cumárico (Sigma) ou do EFC com ou sem LPS, ou ainda do veículo do ácido *p*-cumárico. Após 24 ou 48 horas as substâncias foram removidas e foi adicionado MTT (5 mg/ml) por 4 horas. Transcorrido esse tempo os cristais de formazan foram dissolvidos com adição de 150 µl de dimetilsulfóxido na sequência foi realizada a leitura da absorvância a 520 nm no espectrofotômetro.

5.4 Mensuração das espécies reativas de oxigênio intracelular

As espécies reativas de oxigênio intracelular foram mensuradas utilizando a sonda Diacetato de Diclorofluoresceína (DCFH-DA). Para este experimento, células A549 (1×10^5) foram semeadas em placas de 24 poços e colocadas na estufa a 37 °C e 5% de dióxido de carbono *overnight*, então as células foram pré-tratadas com o ácido *p*-cumárico em várias concentrações durante quatro horas e estimuladas com o extrato de fumaça de cigarro com ou sem LPS (1 µg/ml) ou TNF- α (30 ng/ml). Após 24 horas do estímulo, as células foram lavadas duas vezes com PBS, removidas mecanicamente dos poços e incubadas com DCFH-DA (5 µM) durante 30 minutos. Transcorrido esse tempo, as células foram submetidas à citometria de fluxo.

Para a realização da citometria de fluxo foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Foi delimitada uma população celular, excluindo debris e células anômalas, baseando-se nos parâmetros espalhamento frontal e espalhamento lateral de luz. Foram adquiridos de 10.000 a 20.000 eventos por leitura.

As espécies reativas de oxigênio foram acessadas através da fluorescência emitida pelo produto da oxidação do DCFH-DA, o DCF, culminando em um histograma de média de intensidade de fluorescência. Os dados foram analisados no software WinMDI 2.9.

5.5 Mensuração dos níveis de mRNA de enzimas antioxidantes

Para mensurar os níveis de mRNA das enzimas antioxidantes foi utilizada a técnica do PCR semi-quantitativo. Para tanto, células A549 (5×10^5) foram semeadas em placas de seis poços, colocadas na estufa a 37 °C e 5% de dióxido de carbono *overnight*, e tratadas com o ácido *p*-cumárico (20 µM) durante 4 horas. Em seguida, as células foram estimuladas com o EFC e LPS (1 µg/ml) ou TNF- α (30 ng/ml) por 24 horas. Após este período de tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e submetidas à extração de RNA total utilizando o kit TRI Reagent® (Sigma), segundo instruções do fabricante. A qualidade do RNA extraído foi avaliada pela relação dos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, obtidas no espectrofotômetro, e pela eletroforese em gel de agarose de alíquotas do RNA total.

A construção da biblioteca de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA pré-tratado com DNase (Invitrogen). Para tanto, ao RNA tratado adicionou-se o iniciador Oligo-dT e

dNTP (0,8 mM) no volume final de 12 μ l. Essa reação foi aquecida no termociclador à 65 °C durante 5 minutos, e em seguida, mantida em gelo. Posteriormente, foi adicionado na solução 4 μ l de tampão 5X, 10 mM de dTT e 1 U de RNaseOUT (Invitrogen), sendo a reação mantida à 37 °C durante 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 U de retro-transcriptase M-MLV (Invitrogen), sendo a reação mantida por mais 50 minutos à 37 °C. Ao final a reação foi inativada após aquecimento à 70 °C por 15 minutos.

A partir da biblioteca de cDNA, produto da reação do item 5.5.2, foram realizadas as reações de polimerase em cadeia (PCR) utilizando o tempo de 1 minuto para cada etapa dos ciclos. As amplificações das sequências de interesse, bem como do gene utilizado como normalizador foram realizadas utilizando *primers* específicos, cujas sequências encontram-se no apêndice A.

As fotos dos géis foram analisadas por meio do programa *Image J*, que permitiu avaliar a densidade dos pixels para cada marcação. As densidades de marcação para cada amostra foram ajustadas a partir de um marcador de peso molecular de precisão de quantidade de DNA (EZ Load, BioRad). Assim, foi possível calcular a quantidade aproximada de DNA das amostras, em nanogramas. Por fim, essas quantidades foram normalizadas usando β -actina como gene de referência.

5.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste *one way* ANOVA e o pós-teste de Tukey utilizando o software Graphpad Prism 6.01. Consideraram-se estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. N = 3.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da viabilidade de células A549 após exposição ao ácido *p*-cumárico

Inicialmente, avaliamos a influência do ácido *p*-cumárico sobre a viabilidade de células A549. Como apresentado na Figura 6, o ácido *p*-cumárico, em todas as concentrações avaliadas, (1-100 μ M), não foi capaz de alterar a viabilidade de células após os tempos de exposição de 24 h ou 48 h.

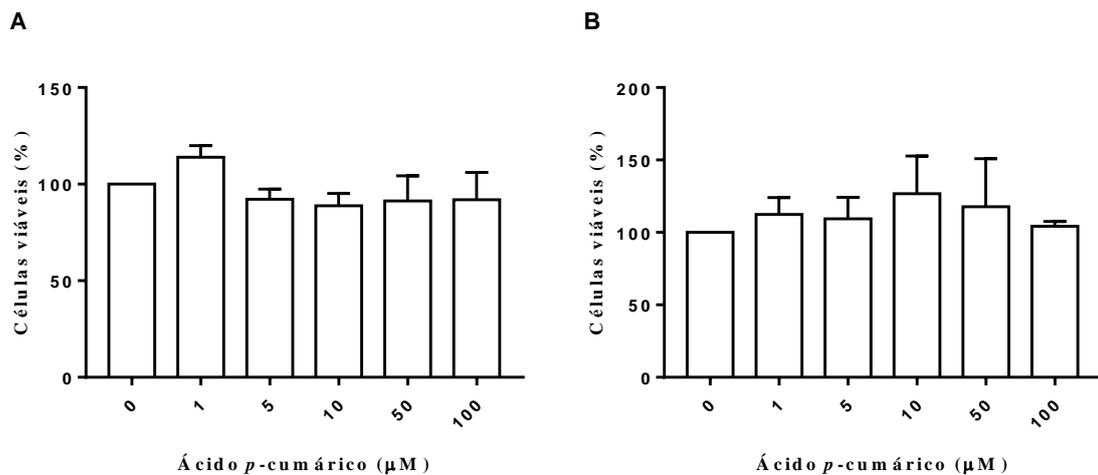


Figura 6. Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a viabilidade de células A549 após 24 h (A) ou 48 h (B) de exposição. A viabilidade foi mensurada pelo método do MTT.

6.2 Padronização do modelo *in vitro* de ativação de células epiteliais utilizando extrato da fumaça de cigarro (EFC)

Em seguida, com propósito de identificar qual concentração do extrato da fumaça de cigarro pode ser utilizada sem que houvesse redução na viabilidade celular, as células A549 foram expostas as concentrações de 2,5%, 5% e 10% de EFC (Figura 7A). Após 24 h de exposição, os extratos nas concentrações de 2,5% e 5% não foram capazes de alterar a viabilidade das células (Figura 7A). Entretanto, a concentração de 10% do EFC induziu efeitos citotóxicos, reduzindo a viabilidade celular em aproximadamente 50% (Figura 7A). Avaliou-se ainda o efeito da combinação de EFC (5%) com diferentes concentrações de LPS (1, 5 ou 10 μ g/mL) sobre a viabilidade celular. Como apresentado na Figura 7B, apenas a combinação EFC (5%)/LPS (1 μ g/mL) não foi capaz de interferir na viabilidade celular. As combinações de EFC (5%)/LPS (5 μ g/mL) e EFC (5%)/LPS (10 μ g/mL) reduziram a viabilidade das células em 15% e 22%, respectivamente (Figura 7B).

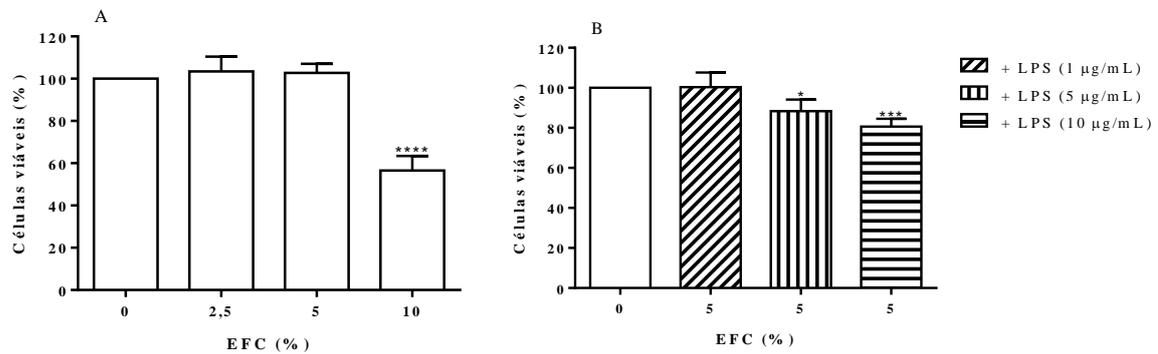


Figura 7. Efeito do extrato de fumaça de cigarro (EFC) associado ou não ao lipopolissacarídeo (LPS) sobre a viabilidade de células A549. Após 24 h (A) ou 48 h (B) de exposição a viabilidade foi mensurada pelo método do MTT.

6.3 Efeito do EFC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio por células A549

Uma vez identificada a condição de exposição da célula A549 ao EFC/LPS sem prejuízos na viabilidade de células, seguimos para verificar se esta condição seria capaz de induzir ativação celular mediante a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Para esta finalidade, a quantidade de ERO foi avaliada por citometria utilizando a sonda DCFH-DA. Como apresentado na Figura 8, células epiteliais expostas a EFC/LPS exibiram em 24 h níveis aumentados de EROs quando comparadas as células mantidas apenas em meio de cultivo RPMI-1640 (controle). A exposição de EFC (5%) ou LPS (1 µg/mL) não alterou de forma significativa os níveis basais de EROs nas células A549.

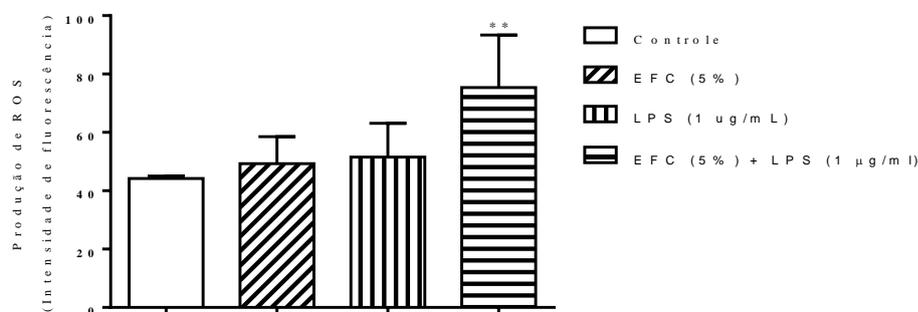


Figura 8. Efeito do extrato de fumaça de cigarro (5%) associado ou não ao LPS (1 µg/mL) sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em células A549. ****** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (sem estímulo).

6.4 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas por EFC/LPS

Após a constatação de que o tratamento com ácido *p*-cumárico não interferiu com a viabilidade das células, avaliamos qual seria o efeito do ácido *p*-cumárico sobre a geração de EROs em células submetidas ao estímulo EFC/LPS por 24 h. Como apresentado na Figura 9, células estimuladas com EFC/LPS por 24 h exibiram um aumento significativo na geração de ERO quando comparado ao grupo sem estímulo (controle). Quando as células A549 foram submetidas ao pré-tratamento com ácido *p*-cumárico em várias concentrações e expostas ao estímulo EFC/LPS por 24 h foi observado uma redução significativa na geração de ERO sem apresentar uma diminuição dependente de concentração.



Figura 9. Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas com extrato de fumaça de cigarro (EFC, 5%) combinada com LPS (1 μg/mL). +++ $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle (sem estímulo), * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo estimulado com EFC/LPS.

6.5 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre os níveis de mRNA para enzimas do metabolismo oxidativo e fator transcricional Nfr2 em células A549 estimuladas por EFC/LPS

Considerando os efeitos inibidores do ácido *p*-cumárico sobre a geração de ERO em células epiteliais expostas a EFC/LPS, seguimos para verificar se estes efeitos supressores se estenderiam para a expressão de mRNA de enzimas associadas ao metabolismo oxidativo celular, como as enzimas superóxido dismutase 1 e 2 (SOD 1 e SOD 2), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e hemioxigenase-1 (HO-1). Adicionalmente, também foi avaliado o efeito do tratamento com ácido *p*-cumárico sobre a expressão do fator transcricional Nfr2 em células estimuladas com EFC/LPS.

Conforme apresentado na Figura 10, células estimuladas com EFC/LPS não apresentaram alterações significativas na expressão de mRNA para SOD1, SOD2, GPx e HO-1. O tratamento das células com ácido *p*-cumárico também não modificou o perfil de expressão de mRNA das enzimas avaliadas. Nestas mesmas condições, a expressão de mRNA para o fator transcricional Nfr2 também não sofreu alterações significativas pelo tratamento com ácido *p*-cumárico ou mesmo pelo estímulo (EFC/LPS).

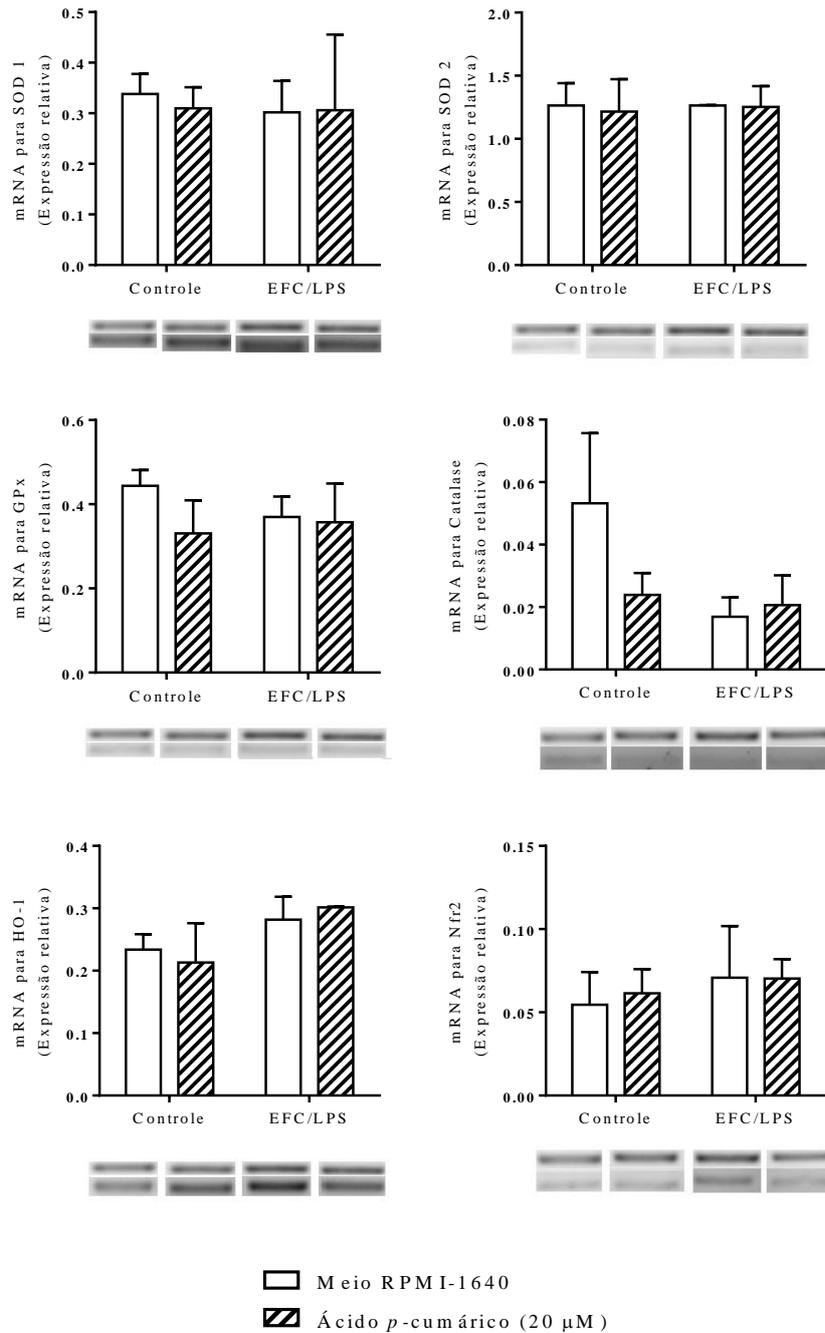


Figura 10. Efeito do ácido *p*-cumárico sobre os níveis de expressão relativa de mRNA para genes envolvidos no metabolismo oxidativo de células A549 estimuladas com extrato de fumaça de cigarro combinado com LPS (EFC/LPS). As densidades das bandas foram ajustadas em relação ao gene β -actina (bandas superiores). SOD1 = superóxido dismutase 1; SOD2 = superóxido dismutase 2; GPx = glutathiona peroxidase; HO-1 = hemioxigenase-1; Nfr2 = fatores transcricional 2.

6.6 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas por TNF- α

Após observar os efeitos do ácido *p*-cumárico em células epiteliais estimuladas com EFC, estendemos nossas análises para verificar se outra condição de estímulo, como a induzida por citocina, seria sensível ao tratamento com ácido *p*-cumárico. Considerando que os níveis de TNF- α , encontram-se elevados em indivíduos com DPOC, sendo inclusive um marcador da gravidade dessa doença, decidimos avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas com TNF- α . Para este conjunto de experimentos, utilizamos uma concentração de TNF- α (30 ng/mL) reconhecidamente demonstrada pela literatura científica como capaz de induzir ativação de células epiteliais (CHEN et al., 2000). Como representado na figura 11, células A549 mantidas sob tratamento com TNF- α (30 ng/ml) por 24 h não exibiram alterações significativas na geração de EROs.

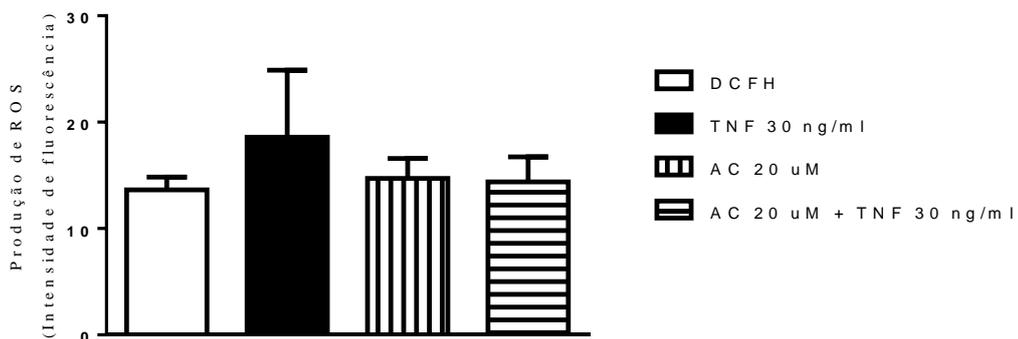


Figura 11. Efeito do ácido *p*-cumárico sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas com TNF- α (30 ng/ml).

6.7 Efeito do ácido *p*-cumárico sobre os níveis de mRNA para enzimas do metabolismo oxidativo e fator transcricional Nfr2 em células A549 estimuladas por TNF- α

Ainda que o TNF- α não tenha sido capaz de induzir estresse oxidativo em células A549, consideramos a possibilidade do ácido *p*-cumárico estar modulando genes relativos ao estado oxidativo das células nesta condição. Na figura 12 podemos notar que o estímulo com TNF- α durante 24 horas induziu um aumento significativo nos níveis de mRNA glutathione peroxidase (GPx) nas células A549, fenômeno que foi inibido pelo tratamento com ácido *p*-cumárico. Verificou-se ainda que o tratamento das células A549 com ácido *p*-cumárico

induziu um aumento significativo nos níveis de mRNA das enzimas superóxido dismutase 1 e 2 (SOD1 e SOD2). Além disso, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de mRNA do fator de transcrição NRF2 ou das demais enzimas catalase e HO-1.

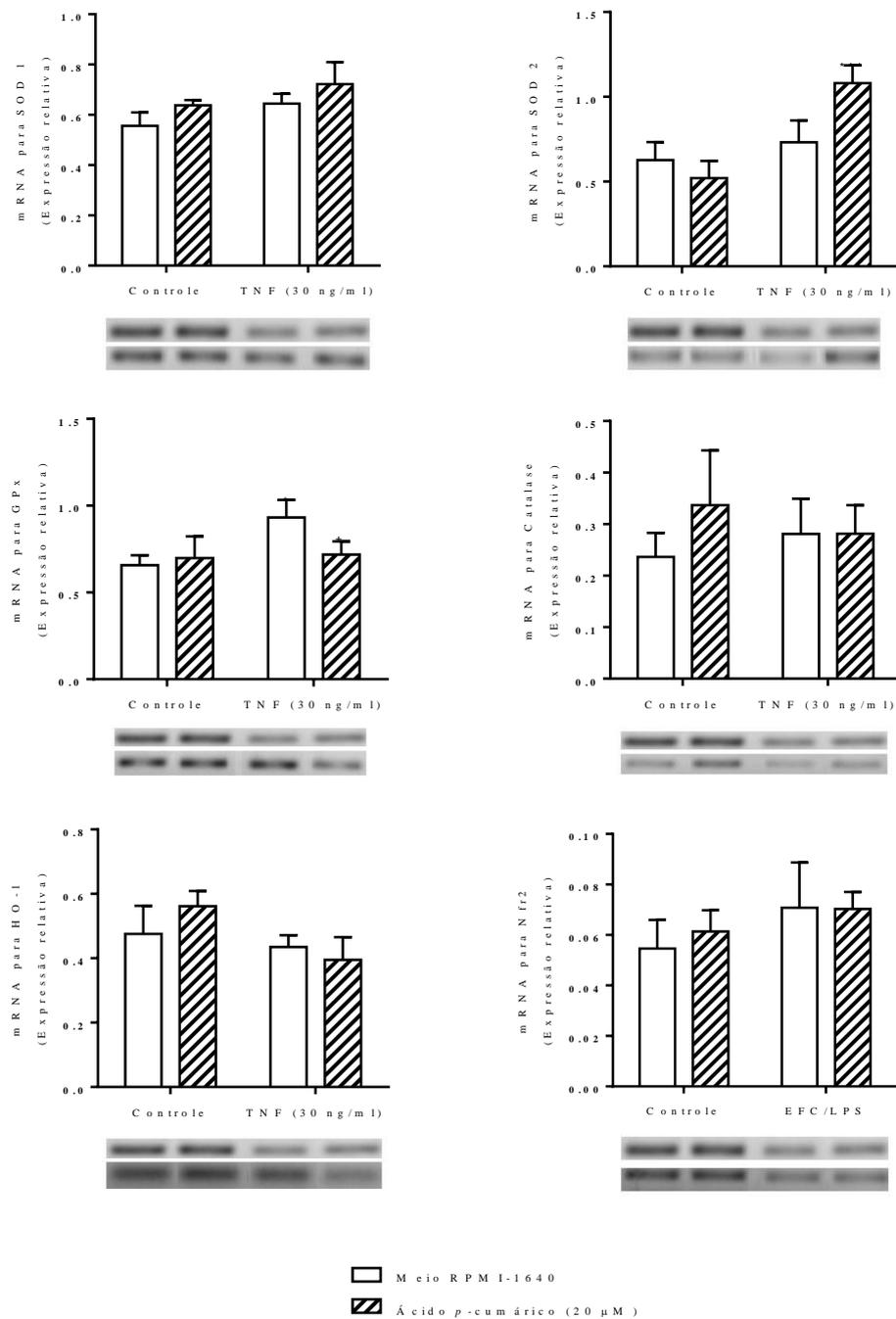


Figura 12. Efeito do ácido *p*-cumárico sobre os níveis de expressão relativa de mRNA para genes envolvidos no metabolismo oxidativo de células A549 estimuladas com TNF- α (30 ng/ml). As densidades das bandas foram ajustadas em relação ao gene β -actina (bandas superiores). SOD1 = superóxido dismutase 1; SOD2 = superóxido dismutase 2; GPx = glutationa peroxidase; HO-1 = hemioxigenase-1; Nfr2 = fatos transcricional 2.

7. DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos são encontrados em diversas espécies de plantas e compõem um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados do catabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Devido aos diversificados efeitos biológicos os compostos fenólicos, como carotenos e cumarinas, mostram-se como fontes para o desenvolvimento de produtos úteis para aplicações na área de saúde e alimentos. Diversos trabalhos demonstram que os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes por várias vias, seja pela eliminação de radicais livres, pela absorção de radicais de oxigênio ou como quelantes de íon metálicos (SU e CHIEN, 2007).

O ácido *p*-cumárico é um composto fenólico abundante no reino vegetal, sendo amplamente encontrado em frutas e vegetais consumidos pelo homem. Recentes estudos têm reportado que o ácido *p*-cumárico possui efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, cardioprotetores e antiplaquetário (CHACKO et al., 2015; LUCERI et al., 2007). Além disso, foi também demonstrado que este composto reduz o crescimento de células tumorais por suprimir a expressão de fatores angiogênicos (KONG et al., 2012). Portanto, motivados por todos estes efeitos benéficos deste composto fenólico, e também pela ausência de estudos que demonstrem as ações do ácido *p*-cumárico sobre a ativação de células do epitélio alveolar humano, decidimos avaliar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre células epiteliais humanas.

Inicialmente, investigamos o potencial citotóxico do ácido *p*-cumárico sobre células do epitélio alveolar. Nós constatamos que as células A549 não foram sensíveis ao tratamento com diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico por não exibirem alterações significativas na viabilidade quando expostas por 24 ou 48 h. O que sugere ausência de efeito citotóxico deste composto fenólico sobre este tipo celular. Em sintonia com estes resultados, Liao e colaboradores também já reportaram que o ácido *p*-cumárico foi incapaz de induzir efeitos citotóxicos em células epiteliais (LIAO et al., 2014).

Apesar da DPOC possuir um impacto negativo considerável na saúde da população produtiva em todo mundo, e que vários aspectos da fisiopatologia dessa doença já se encontram estudados, ainda não se encontram completamente esclarecidos a participação das células epiteliais como alvos celulares para a modulação da progressão da doença. É conhecido que a fumaça de cigarro se mostra como um aerossol complexo composto por diferentes agentes pró-oxidantes, e que cerca de 5600 componentes químicos distintos estejam presentes na fumaça (VAN DER TOORN et al, 2009). Estudos prévios demonstraram que a

exposição à fumaça de cigarro mostra-se capaz de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, tal como TNF- α , o que contribui para o agravamento do quadro clínico do paciente, dentre elas a perda de peso e redução da função pulmonar em pacientes com DPOC (DI FRANCA et al., 1994). Além disso, foi recentemente reportado que a exposição aguda a fumaça de cigarro compromete a organização das proteínas que constituem as junções de adesão intercelular (*tight junctions*) entre células do epitélio brônquico, comprometendo a estrutura física e funcional deste tipo celular (SCHAMBERGER et al, 2014). Portanto, dispor de um sistema de cultivo celular capaz de mimetizar as alterações induzidas pela fumaça de cigarro em células do epitélio alveolar permite melhor compreender as alterações funcionais, bioquímicas e moleculares, como também para análise de alvos farmacológicos e avaliação de novos fármacos potencialmente úteis para o tratamento da DPOC. Em especial, pelo fato destes sistemas *in vitro* mostrarem-se úteis para identificar princípios ativos capazes de afetar as alterações induzidas pela fumaça de cigarro.

Existe uma grande variedade de modelos *in vitro* disponíveis para estimulação celular com fumaça de cigarro (THORNE e JASON, 2013). Dos vários sistemas caracterizados pela literatura científica, a aerolização da fumaça de cigarro no meio de cultivo celular utilizado para manutenção das células é amplamente empregado (VICTONI et al., 2014). No entanto, quanto ao método para obtenção do extrato de fumaça de cigarro ainda há um grande debate na literatura científica (WIRTZ; SCHMIDT, 1996; HOLZER et al., 2012; MILARA et al., 2014; VICTONI et al., 2014; CHEN et al., 2015), pois diferentes variáveis no protocolo de obtenção da fumaça, incluindo tipo de cigarro utilizado, presença ou ausência de filtro no cigarro durante a queima, tempo de queima do cigarro, volume em que a fumaça do cigarro foi borbulhada, resulta em variações no produto final da combustão que interfere na intensidade do estímulo sobre a célula. Em nossas condições, contornamos tal situação utilizando a densidade óptica (D.O) dos extratos de fumaça de cigarro como parâmetro para padronizar a intensidade do estímulo sobre as células. As medidas foram realizadas no comprimento de onda de 320 nm, onde o extrato de fumaça de cigarro apresenta absorção máxima (WIRTZ; SCHMIDT, 1996).

Quanto ao estímulo, Wu e colaboradores (2014) induziram a produção de espécies reativas de oxigênio em células A549 com extrato de fumaça de cigarro a 5%. No entanto, ressalta-se aqui a utilização de cigarros de pesquisa (3R4F, com filtro Kentucky Tobacco Research and Development Centre na Universidade de Kentucky, Lexington, KY). Além

disso, os 5% a que se referem diz respeito a uma solução diluída a partir de uma solução a 10% cuja D.O. foi de 0,740, o que permite inferir que essa solução tinha uma D.O. de aproximadamente 0,370, uma vez que a D.O. respeita uma função linear. Transpondo estas informações para nossas condições experimentais, teríamos a disposição uma solução a 37%, considerando que se estabeleceu 100% como a solução com D.O. de 1 (um), o que seria uma concentração elevada para estimular as células. Adicionalmente, ressalta-se o fato de que Wu e colaboradores (2014) relataram que esse estímulo apresentava uma citotoxicidade estatisticamente significativa, reduzindo a viabilidade a aproximadamente 50%.

No presente estudo, buscamos por um estímulo capaz de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio sem induzir toxicidade nas células epiteliais. Com esse propósito, seguimos a metodologia previamente descrita por Victoni e colaboradores (2014) que utiliza a combinação do EFC com LPS. No trabalho de Victoni e colaboradores, foi descrito que baixas concentrações do extrato de fumaça de cigarro combinado com LPS, mas não ambos separados, promoviam a indução da ativação das vias JAK/STAT e ERK 1/2, o que se mostrou capaz de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células A549. Situação, que, segundo os autores, reflete os acontecimentos nas vias aéreas nos casos de exposição à fumaça de cigarro em indivíduos com DPOC.

Em nossas condições experimentais, observamos que baixas concentrações de EFC combinadas com LPS foram capazes de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), situação que não foi observada quando ambos os estímulos foram expostos separadamente sobre as células. Tal fenômeno deve-se, provavelmente, a baixa intensidade de estímulos aliadas a mecanismos protetores da célula que, em conjunto, possibilitam que as células epiteliais suportem os estímulos sem sofrerem prejuízos em sua viabilidade.

Após a identificação desta condição de ativação celular, seguimos para verificar o efeito do ácido *p*-cumárico sobre este perfil de estimulação. Nas células epiteliais submetidas a estimulação com EFC/LPS e pré-tratadas com o ácido *p*-cumárico observou-se uma atenuação, independente de concentração, na produção de EROs. Com propósito de avaliar se estes efeitos sobre o conteúdo de ERO poderia se relacionar a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidante da célula, observamos que a expressão de mRNA para o fator transcricional Nfr2 e enzimas superóxido dismutase 1 e 2 (SOD1 e SOD2), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT) e hemioxigenase -1 (HO-1) frente ao tratamento com o ácido *p*-cumárico não sofreram alterações significativas quando comparadas as células

controle. Porém, merece ser ressaltado que neste estudo não foi realizado uma análise temporal do efeito do ácido *p*-cumárico sobre a expressão destes mRNAs, o que impossibilita a observação de alguma possível modulação sobre a produção de mRNAs em tempos mais agudos. Além disso, não se pode descartar que a própria estrutura química do ácido *p*-cumárico possa funcionar como um agente quelante de ERO. Logo, estudos necessitam ser realizados para melhor esclarecer se estes efeitos decorrem de ação direta ou indireta destes compostos sobre a célula, ou mesmo se há alguma regulação sobre mRNAs em tempos mais agudos de tratamento.

Importante ressaltar que os efeitos do ácido *p*-cumárico sobre o conteúdo de ERO em células estão em sintonia com os achados prévios na literatura científica, como os obtidos por Bouzaiene e colaboradores (2015), que demonstraram que o ácido *p*-cumárico também reduziu a geração de ERO em células A549. Cabe destacar que o potencial antioxidante do ácido *p*-cumárico mostrou-se independente da concentração, fenômeno que foi observado tanto em nossos resultados quanto por outros pesquisadores, o que sugere o potencial do próprio composto fenólico em interferir com a disponibilidade de ERO na célula. Sustentando esta hipótese, estudos espectroscópicos acerca da atividade antioxidante do ácido *p*-cumárico relataram o potencial deste composto em diminuir a peroxidação lipídica e sequestrar radicais DPPH, bem como o íon ferro, peróxido de hidrogênio e superóxido independente da concentração utilizada (KILIÇ; YESILOGLU, 2013).

Considerando a hipótese onde o ácido *p*-cumárico mostra-se capaz de reduzir a quantidade de ERO de uma maneira inespecífica, decidimos avaliar se em outra condição de estímulo em células epiteliais também sofreriam influência deste composto fenólico. Neste sentido, submetemos as células A549 à ativação por um estímulo endógeno utilizando o TNF- α . Entretanto, nas nossas condições experimentais, as células estimuladas com TNF- α não exibiram aumento significativo nos níveis intracelulares de ERO. Porém, quando foi avaliado os níveis de expressão de mRNA para glutathiona peroxidase (GPx), observamos um significativo aumento, fato que poderia sustentar a ausência de espécies reativas no momento de sua quantificação. Fenômeno semelhante a este também foi descrito na literatura previamente, visto que a supressão da enzima GPx foi capaz de facilitar a indução de ERO em células endoteliais ativadas por TNF- α (LUBOS et al, 2011). Além disso, os níveis de mRNA das enzimas SOD1 e SOD2 foram reguladas positivamente quando as células foram pré-tratadas com ácido *p*-cumárico e estimuladas com TNF- α . Ressalta-se que aumentos nos

níveis de SOD promovidos pelo ácido *p*-cumárico foram relatados em estudos com animais expostos à cisplatina (AKDEMIR et al., 2017) ou a doxorubicina (SHIROMWAR e CHIDRAWAR et al., 2011).

Cabe destacar ainda que a diferença no perfil de ativação das células epiteliais para expressão de mRNA quando ativadas por EFC/LPS ou TNF- α pode ser devido a composição e a natureza do estímulo. Nesse contexto, supõe-se que o estímulo com TNF- α é suficiente para gerar uma resposta antioxidante com aumento nos níveis da glutathiona peroxidase-1, que não ocorre quando a célula é pré-tratada com o ácido *p*-cumárico, provavelmente por inibir a produção de peróxido de hidrogênio, que é substrato da glutathiona peroxidase-1, seja por agir diretamente sequestrando as espécies reativas de oxigênio como já sugerido em estudos prévios com essa molécula (CHACKO et al., 2015; PANDA et al., 2016), seja através da regulação das enzimas SOD1 e SOD2 que atuam na etapa anterior a formação de peróxido de hidrogênio.

8 CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo suportam a proposição de que o ácido *p*-cumárico parece desempenhar um papel antioxidante do frente às espécies reativas de oxigênio geradas por células A549 tanto quando expostas ao EFC combinado com LPS, e quanto expostas ao TNF- α . Dessa maneira, o ácido *p*-cumárico mostra-se como um candidato para regular o estresse oxidativo, que é um dos principais mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC. Porém, mais estudos são necessários para determinar o mecanismo exato e as vias pelas quais o ácido *p*-cumárico apresenta seus efeitos. Por fim, sugerimos como possível mecanismo tanto o seu potencial em sequestrar espécies reativas de oxigênio quanto sua propriedade de modular a expressão (seja direta ou indireta) de algumas enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo das células.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, M.H.; EL-MAHDY, M.A.; ABD-ELLAH, M.F.; HELAL, G.K.; KHALIFA, F.; HAMADA, F.M.A. **Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart.** *Pharmacological Research* 48 (2003) 461–465.

ADELOYE, D.; CHUA, S.; LEE, C.; BASQUILL, C.; PAPANA, A.; THEODORATOU, E.; NAIR, H.; GASEVIC, D.; SRIDHAR, D.; CAMPBELL H.; CHAN, K.Y.; SHEIKH, A.; RUDAN I.; GHERG. COPD prevalence: systematic review and meta-analysis. **Journal of global health.** 2015. 5(2).

AKDEMIR, F.N.E.; ALBAYRAK, M.; CALIK, M.; BAYIR, Y.; GÜLÇİN, I. The Protective Effects of *p*-Coumaric Acid on Acute Liver and Kidney Damages Induced by Cisplatin. **Biomedicines.** 2017. 5(2).

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Patient information series. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). **Am J Respir Crit Care Med.** 2013, 17, 3-4.

BAGDONAS, E.; RAUDONIUTE, J.; BRUZAUSKAITE, L.; ALDONYTE, R. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms of COPD. **International Journal of COPD.** 2015, 15, 995-1013.

BARNES, P.J.; ITO, K.; ADCOCK, IM. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. **The Lancet.** 2004, 363: 731-733.

BARNES, P.J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **J allergy clin immunol.** 2016, 138(1), 16-27.

BARNES, P.J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. **Clinical Science.** 2017, 131, 1541-1558.

BOUZAIENE, N.B.; JAZIRI, S.K.; KOVACIC, H.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K.; LUIS, J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. **Eur J Pharmacol.** 2015, 766, 99–105.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. **Doenças Respiratórias Crônicas.** Brasília-DF, 2010.

BURDINGER, G.R.S.; SZNAJDER, J.I. The Alveolar-Epithelial Barrier: A Target for Potential Therapy. **Clin Chest Med.** 2006, 655-669.

BURGEL, P. R.; NADEL, J. A. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. **Thorax**. 2004, 59, 992-996.

CAMPOS, H.; XISTO, D.; ZIN, W.A.; ROCCO, P.R.M. Phosphodiesterase inhibitors: new perspectives on an old therapy for asthma? **J pneumol**. 2003, 29(6), 405-412.

CAMPOS, H.S. Asma e DPOC: vida e morte. **Bol. Pneumol. Sanit**, 2004, 12(1):37-53.

CARDOSO, A.P. Exacerbação da DPOC. **Pulmão RJ**, 2013, 22(2):60-64.

CHACKO, S.M.; NEVIN, K.G.; DHANYAKRISHNAN, R.; KUMAR, B.P. Protective effect of p-coumaric acid against doxorubicin induced toxicity in h9c2 cardiomyoblast cell lines. **Toxicology Reports**. 2015, 2, 1213-1221.

CHEN, C.C.; SUN, Y.T.; CHEN, J.J.; CHIU, K.T. TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C-gamma 2, protein kinase C-alpha, tyrosine kinase, NF-kappa B-inducing kinase, and I-kappa B kinase 1/2 pathway. **J Immunol**. 2000, 1;165(5), 2719-2728.

CHEN, M.; YANG, T.; MENG, X.; SUN, T. Azithromycin attenuates cigarette smoke extract-induced oxidative stress injury in human alveolar epithelial cells. **Molecular Medicine Reports**. 2015, 11, 3414-3422.

DE BOER, W. I.; HAY, C. M.; VAN SCHADEWIJK, A.; STOLK, J.; VAN KRIEKEN, J. H.; HIEMSTRA, P. S. expression of epidermal growth factors and their receptors in the bronchial epithelium of subjects with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Clin Pathol**. 2006, 125, 184-192.

DATASUS. Bronquite crônica causa 40 mil mortes a cada ano, revela dados do DATASUS. <<http://datasus.saude.gov.br/nucleos-regionais/alagoas/noticias-alagoas/565-bronquite-cronica-causa-40-mil-mortes-a-cada-ano-revela-dados-do-datasus>>. 2014. Acesso em 16/10/2016.

DI FRANCIA M.; BARBIER D.; MEGE J. L.; OREHEK J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**. 1994. 150. 1453-1455.

DOMAJ, W.; OETTL, K.; RENNERT, W. Oxidative stress and free radicals in COPD – implications and relevance for treatment. **International Journal of COPD**. 2014, 9, 1207-1224.

ESPINOSA, R.R.; INCHINGOLO, R.; ALENCAR, S.M.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; CASTRO, I.A. Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. **Food Chem**. 2015, 182, 95-104.

EL-SEEDI, H. R.; EL-SAID, A.; KHALIFA, S.; GORANSSON, U.; BOHLIN, L.; BORG-KARLSON, A-K.; VEPOORTE, R. Biosynthesis, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of hydroxycinnamic acids. **J. Agricultural and Food Chem.** 2012. 60(40), 10877-10895.

GAO, W.; LI, L.; WANG, Y.; ZHANG, S.; ADOCK, I. M.; BARNES, P. J. et al. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?. **Respirology.** 2015, 20, 722-729.

GARCIA-SALES, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules.** 2010, 15, 8813-8826.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P.; PICO-SALAS, M. A.; LEYVA-LÓPEZ, N.; CRIOLLO-MENDOZA, M. S.; VAZQUEZ-OLIVO, G.; HEREDIA, J. B. Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. **Plants.** 2018. 7, 2.

GLOBAL INIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE (GOLD). Pocket guide to COPD diagnosis, management, and prevention: a guide for health care professionals. Updated 2016.

GUILLOT, L.; NATHAN, N.; TABARY, O.; THOUVENIN G.; LE ROUZIC P.; CORVOL, H.; AMSELEM, S.; CLEMENT, A. Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 2013.

HOGG, J. C.; CHU, F.; UTOKAPARCH, S.; WOODS, R.; ELIOTT, W. M.; BUZATU, L. ET AL. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J med.** 2004, 350, 2645-2653.

HOLZER, N.; BRAUN, K.F.; EHNERT, S.; EGAÑA, J. T.; SCHENCK, T. L.; BUCHHOLZ, A.; SCHYSCHKA, L.; NEUMAIER, M.; BENZING, S.; STÖCKLE, U.; FREUDE T.; NUSSLER, A. K. Green tea protects human osteoblasts from cigarette smoke-induced injury: possible clinical implication. **Langenbecks Arch Surg.** 2012. 397(3), 467-474.

JIAO, Z.; AO, Q.; GE, X.; XIONG, MI. Cigarette Smoke Extract Inhibits the Proliferation of Alveolar Epithelial Cells and Augments the Expression of P21WAF1. **J Huazhong Univ Sci Technol.** 28 (1), 2008.

JÚNIOR, D.R.A.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. Bras. Pneumol.** 2005, 31(1), 60-68.

KANAZAWA, H.; TOCHINO, Y.; ASAI, K.; HIRATA, K. Simultaneous assessment of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in epithelial lining fluid from patients with COPD. **Chest.** 2014, 146, 1159-1165.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; DE FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Rev. Bras. Pl. Med.** 2013. 15(2), 280-286.

KILIÇ, I.; YEŞİLOĞLU, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.** 2013. 115, 719-724.

KIRKHAM, P. A.; CARAMORI, G.; CASLARI, P.; PAPI, A.; EDWARDS, M.; SHAMJI, B et al. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of COPD. **Am J Respir Crit Care Med.** 2011, 184, 796-802.

KONG, C.S.; JEONG, C.H.; CHOI, J.S.; KIM, K.J.; JEONG, J.W. Antiangiogenic effects of p-coumaric acid in human endothelial cells. **Phytother Res.** 2013, 27(3), 317-323. doi: 10.1002/ptr.4718. Epub 2012 May 14.

LIAO, C. R.; KUO, Y. H.; HO, Y. L.; YANG, C. S.; LIN, C. W.; CHANG, Y. S. Studies on cytotoxic constituents from the leaves of *Elaeagnus oldhamii* Maxim. in non-small cell lung cancer A549 cells. **Molecules.** 2014. 19(7), 9515-9534.

LIAPIKOU, A.; TOUMBIS, M.; TORRES, A. Managing the safety of inhaled corticosteroids in COPD and risk of pneumonia. **Expert Opin Drug Staf.** 2015, 14(8): 1237–1247.

LOPEZ-CAMPOS, J.L.; TAN, W.; SORIANO, J.B. Global burden of COPD. **Asian Pacific Society of Respiriology.** 2016a, 21, 14-23.

LOPEZ-CAMPOS, J.L.; MARQUEZ-MARTIN E.; SORIANO, J.B. The role of air pollution in COPD and implications for therapy. **Asian Pacific Society of Respiriology.** 2016b.

LUBOS, E.; KELLY, N. J.; OLDEBEKEN, S. R.; LEOPOLD, J. A.; ZHANG, Y. Y.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 deficiency augments proinflammatory cytokine-induced redox signaling and human endothelial cell activation. **J. Biol. Chem.** 2011. 286(41), 35407-35417.

LUCERI, C.; GIANNINI, L.; LODOVICI, M.; ANTONUCCI, E.; ABBATE, R.; MASINI, E.; DOLARA, P. p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. **Br J Nutr.** 2007, 97(3), 458-463.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T.E.; ZAKARIA, Z.A. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. **J Food Sci Technol.** 2015.

MASON, R.J. Biology of alveolar type II cells. **Respirology.** 2006, 11, S12-S15.

MILARA, J.; PEIRÓ, T.; SERRANO, A.; ARTIGUES, E.; APARICIO, J.; TENOR, H.; SANZ, C.; CORTIJO, J. Simvastatin increases the ability of roflumilast n-oxide to inhibit cigarette smoke-induced epithelial to mesenchymal transition in well-differentiated human bronchial epithelial cells in vitro. **Journal of chronic obstructive pulmonary disease.** 2014, 1-12.

MONTUSCHI, P.; BARNES, P. J.; ROBERTS, L. J. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. **FASEB J.** 2004, 18, 1791-1800.

MORISSETTE, M.C.; PARENT, J.; MILOT, J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: what we know and what we need to know. **International Journal of COPD**. 2009, 4, 19-31.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. 1983, 65(1-2), 55-63.

OCHS, M.; KNUDSEN, L.; HEGERMANN, J.; WREDE, C.; GROTHAUSMANN, R.; MÜHLFELD, C. Using electron microscopes to look into the lung. **Histochem Cell Biology**. 2016.

OGREIG, S.; HIEMSTRA, P.S.; VEIDHUIZEN, E.J.A.; CASALS, C.; CLARK, H.W.; HACZKU, A.; KNUDSEN, L.; POSSMAYER, F. Recent advances in alveolar biology: Evolution and function of alveolar proteins. **Respir Physiol Neurobiol**. 2010, 173, S43-S54.

PANDA, V.; LADDHA, A.; NANDAVE, M.; SRINATH, S. Dietary phenolic acids of *Macrotyloma uniflorum* (horse gram) protect the rat heart against isoproterenol-induced myocardial infarction. **Phytotherapy Research**. 2016.

PEI, K.; OU, J.; HUANG, J.; OU, S. *p*-coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **J Sci Food Agric**. 2016, 96, 2952-2962.

PLATAKI, M.; TZORTZAKI, E.; RYTIKA, P.; DMOSTHENES, M.; KOUTSOPOULOS, A.; SIAFAKAS, N. M. Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**. 2006. 1(2), 161–171.

PRAGASAM, S.J.; RASOOL, M. Dietary component *p*-coumaric acid suppresses monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. **Inflamm. Res**. 2013, 62, 489-498.

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**. 2013, 36(1), 169-176.

RABAHI, M.F. Epidemiologia da DPOC: Enfrentando Desafios. **Pulmão RJ**, 2013, 22(2), 4-8.

ROBERT, A.; SAUL, R. L.; AMES, B. N. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate life span. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. 1988, 85, 2706-2708.

SANTANA, F.P.R.; PINHEIRO, N.M.; MERNAK, M.I.B.; RIGHETTI, R.F.; MARTINS, M.A.; LAGO, J.H.G.; LOPES, F.D.T.Q.S.; TIBÉRIO, I.F.L.C.; PRADO, C.M. Evidences of herbal medicine-derived natural products effects in inflammatory lung diseases. **Mediators of inflammation**. 2016.

SEO, C.S.; LIM, H.S.; JEONG, S.J.; HA, H.; SHIN, H.K. HPLC-PDA analysis and anti-inflammatory effects of mori cortex radices. **Nat Prod Commun**. 2013, 8(10), 1443-1446.

SCHAMBERGER, A. C.; MISE, N.; JIA, J.; GENOYER, E.; YILDIRIM AÖ.; MEINERS, S.; EICKELBERG, O. Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor-beta. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 2014. 50(6), 1040–1052.

SHAO, M. X.; NAKANAGA, T.; NADEL, J. A. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin over-production via tumor necrosis factor- α converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2004, 287, 420-427.

SHIROMWAR, S. S.; CHIDRAWAR, V.R. Combined effects of p-coumaric acid and naringenin against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Pharmacogony Res.** 2011, 3(3), 214-219.

SU, M-S.; CHIEN, P-J. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. **Food Chem.** 2007. 104(1), 182-187.

THORNE, D.; JASON, A. A review of *in vitro* cigarette smoke exposure systems. **Experimental and Toxicologic Pathology.** 2013. 65(7–8), 1183-1193.

TURINO, G.M.; MA, S.; CANTOR, J.O.; LIN, Y.Y. Biomarkers in alpha-1-antitrypsin deficiency chronic obstructive pulmonar disease. **AnnalsATS.** 2016, 13(4). 336-340.

VAN DER TOORN, M.; REZAYAT, D.; KAUFFMAN, H. F.; BAKKER, S. J.; GANS, R. O.; KOËTER, G. H.; CHOI, A. M.; VAN OOSTERHOUT, A. J.; SLEBOS, D. J. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 2009. 297(1), 109-114.

VICTONI, T.; GLEONNEC, F.; LANZETTI, M.; TENOR, H.; VALENÇA, S.; PORTO, L.C.; LAGENTE, V.; BOICHOT, E. Roflumilast N-Oxide Prevents Cytokine Secretion Induced by Cigarette Smoke Combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 Inhibition in Airway Epithelial Cells. **PLoS ONE** 9(1): e85243. doi: 10.1371 / jornal pone.0085243, 2014.

WIRTZ, H.R.W.; SCHMIDT, M. Acute influence of cigarette smoke on secretion of pulmonary surfactant in rat alveolar type II cells in culture. **Eur Respir J.** 1996, 9, 24-32.

WU, J.; XU, H.; WONG, P.F.; XIA, S.; XU, J.; DONG, J. Icaritin attenuates cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells via activation of pi3k-akt and nrf2 signaling. **Food and Chemical Toxicology.** 2014, 64, 307-313.

YANG, C. Y.; CHEN, C. S.; YIANG, G. T.; CHENG, Y. L.; YONG, S. B.; WU, M. Y.; LI C. J. New Insights into the Immune Molecular Regulation of the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. **Int J Mol Sci.** 2018. 16;19(2).

YEN, G.C.; CHEN, Y.C.; CHANG, W.T.; HSU, C.L. Effects of Polyphenolic Compounds on Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-Induced Changes of Adipokines and Oxidative Stress in 3 T3-L1 Adipocytes. **J Agric Food Chem.** 2010, 59(2), 546–551.

ZEMANS, R.L.; MATTHAY, M.A. Bench-to-beside review: The role of the alveolar epithelium in the resolution of pulmonary edema in acute injury. **Critical Care.** 2004, 8(6), 469-477.

ZHAO, C-Z.; FANG, X-C.; WANG, D. et al. Involvement of type II pneumocytes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Respir Med.** 2010,104, 1391-1395.

ZINELLU, E.; ZINELLU, A.; FOIS, A.G.; CARRU, C.; PIRINA, P. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. **Respiratory Research.** 2016, DOI 10.1186/s12931-016-0471-z.

ZUO, L.; PANNEL, B.K.; ZHOU, T.; CHUANG, C-C. Historical role of alpha-1-antitrypsin deficiency in respiratory and hepatic complications. **Gene.** 2016, 589, 118-122.

APÊNDICE A – Sequências dos pares de iniciadores utilizados nas PCRs

Gene	Iniciador	
β-Actina	ACTB F	ACACAGTGCTGTCTGGTGGT
	ACTB R	GTACTTGCGCTCAGGAGGAG
Fator Nuclear Eritróide 2 relativo ao fator 2	NRF2 F	AGGACATGGAGCAAGTTTGG
	NRF2 R	TCTGTCAGTGTGGCTTTCTGG
Catalase	CAT F	CGACGCTCAGCTTTTCATTC
	CAT R	TTGTCCAGAAGAGCCTGGAT
Glutationa Peroxidase	GPX1 F	GTTTCCCGTGCAATCAGTTC
	GPX1 R	ACCAGGTCCGGACGTACTIONTGA
Superóxido Dismutase 1	SOD1 F	TGTCCATTGAAGATCGTGTGA
	SOD 1 R	CACCTTTGCCCAAGTCATCT
Superóxido Dismutase 2	SOD2 F	CAGATTGCTGCCTGCTCTAA
	SOD2 R	GTAGTAAGCGTGCTCCCACA
Heme Oxigenase 1	HO-1 F	CTCACAGATGGCGTCACTTC
	HO-1 R	AGTGCTGATCTGGGGTTTCC