

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DANDARA ALESSANDRA FONSECA ALVES

EFEITO DO TRITERPENÓ UVAOL SOBRE A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS

Maceió  
2020

DANDARA ALESSANDRA FONSECA ALVES

EFEITO DO TRITERPENO UVAOL SOBRE A ATIVAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à coordenação do curso de graduação em Ciências Biológicas, na modalidade Bacharelado, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, sob orientação da Professora Dr<sup>a</sup>. Karen Steponavicius Cruz Borbely.

Maceió

2020

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

A474e Alves, Dandara Alessandra Fonseca.  
Efeito do triterpeno uvaol sobre a ativação de células epiteliais / Dandara  
Alessandra Fonseca Alves. – Maceió, 2021.  
46 f. : il.

Orientadora: Karen Steponavicius Cruz Borbely.  
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) –  
Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde.  
Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 40-46.

1. Asma. 2. Inflamação. 3. Uvaol - Triterpeno. 4. Células epiteliais. I. Título.

CDU: 616.248

Ativar o Windows  
Acesse Configurações pa



## Agradecimentos

*Agradeço, primeiramente, a Deus, a Nossa Senhora, a Jesus, a Santa Terezinha do Menino Jesus, São José, a todos os Anjos e Santos, os quais eu recorri e, assim, me proporcionaram força, dedicação e sabedoria (advinda do Santo Espírito de Deus) ao longo da graduação e no desenvolvimento deste trabalho, bem como na regência da minha vida.*

*Aos professores Alexandre Urban Borbely e Karen Steponavicius Cruz Borbely, pela oportunidade de ser orientada por eles, como também pelo aprendizado que tive com ambos, além da atenção e disponibilidade que me proporcionaram ao longo do desenvolvimento das minhas atividades **(Muito obrigada)!!!!***

*Às mestres Eloiza Tanabe e Camilla Mendes, por aceitarem o convite de participarem da banca de defesa do presente trabalho.*

*Aos membros do LBC (todos os professores, mestrandos, doutorandos e amigos de iniciação científica) os quais compartilharam comigo todos os ensinamentos necessários para meu progresso nos experimentos e por dividirem bons momentos comigo.*

*Aos meus pais, Cláudia e Davis, irmãs, Dayana e Lígia por me apoiarem, incentivarem, e acolherem meus sonhos com todo amor do mundo. Além de entenderem meu espaço, minhas ausências e minha dedicação diante dos desafios a mim propostos, bem como das escolhas feitas por mim **(Amo vocês!!! Eterna gratidão)**! Às minhas avós, Arlete e Cicinha, e minha sobrinha, Dayara e cunhado (por acreditar em mim) por deixarem a minha caminhada –ao longo da graduação- mais leve. Ao meu voinho Osmar, tio Homar, Tio Man e Tia Consolata por mesmo de longe me incentivarem e por todo carinho! Gratidão também a minha segunda família: Tia Mônica, Tio Élio, e primos Eleiton, Elizabeth, Elielton, Elenilton e Clarinha.*

*À minha, amada, madrinha Denise Fonseca que sempre sonhou sonhos possíveis comigo, por me ensinar a ser uma boa pessoa, e que do céu manda sinais de seu imenso amor por mim. Aos meus tios Daniel e Dionei por sempre quererem meu bem. Gratidão ao mês tio Djair e tia Eunice por todo incentivo aos estudos e pelo carinho.*

*Aos meus amigos Ruan, Elisa, Elizabeth e Ald(b)eris que juntos comigo vivenciaram os altos e baixos da vida estudantil, na Ufal, e por serem mais do que amigos de turma e se tornarem meus irmãos, de vida, que comigo compartilham –como muita fé e amor- tudo aquilo que Deus nos permite **(Amo demais vocês)!!!***

*Ao, meu super, Raphael Silva que mesmo antes de ser meu namorado tem sido meu amigo de todas as horas que me apoiar nas minhas decisões e ser totalmente compreensível com minhas escolhas, e torcer tanto para que tudo ocorra da melhor maneira possível. Obrigada, por construir dias especiais ao meu lado **(Amo você)**!*

*À Rose Tavares, minha amiga, que sempre está intercedendo por mim, me encorajando e me levando para mais perto de Deus. Gratidão por tudo que você significa e representa na minha vida! À Ceci, minha índia, amiga de fé e de bons momentos... sou muito grata por ter você em minha vida deixando-a mais leve...amo você!*

*Ao, meu Gigante, Evandro Novaes pelo apoio constante e necessário –mesmo estando fisicamente distante- durante todos os dias de lutas e vitórias os quais até hoje sobrevivemos **(Muito obrigada por todo carinho, pelo seu coração enorme e por tantas horas me ajudando como podia. Bom conselheiro)!!!!***

*Aos meus amigos de classe e amigos de vida: Myrna, Dayse e Vinícius por todos os bons momentos que compartilhamos. À minha Bianca Bomfim, pela parceira de curso, de projetos, de vida religiosa, de bons momentos, meu muito obrigada por sempre lembra de*

*mim. Aos meus Dudu, Gi e Thâminha por construírem, comigo, lembranças especiais e por serem família acolhedora para mim.*

*À minha maravilhosa professora, anjo e amiga Liriane Freitas por tudo que aprendi acerca de Malacologia, pelas oportunidades a mim oferecidas. Nunca esquecerei dos dias compartilhados com a senhora (**Muito obrigada, Tia Liri! Amo demais a senhora!**)*

*À minha eterna professora Ludiana Bandeira, por me mostrar que sem os livros, sem a gramática e sem ser justa eu não chegaria a lugar algum. **Enorme gratidão, Ludi** por tudo que me ensinastes para vida e para conseguir passar nos vestibulares.*

*Ao professor Gilberto Costa e À minha querida Melba por sempre me auxiliarem, com muito carinho, nas questões acadêmicas ao longo de minha formação. Muito obrigada, pela disponibilidade e atenção.*

*Aos órgãos de fomento (PIBIC-UFAL; PIBITI; PROPEP; CNPq; FAPEAL) que contribuirão financeiramente e pedagogicamente para o desenvolvimento deste trabalho, como também à Universidade Federal de Alagoas por abrigar valores valiosos a mim oferecidos ao longo da minha graduação.*

## **Dedicatória**

*Dedico, especialmente, para você, meu priminho (irmãozinho) que me deixou sem saber como seguir a vida, diante de circunstâncias que só Deus sabe explicar. Obrigada por confiar em mim para compartilhava os seus sonhos de ser um Cientista, um Físico, um Cientista. Obrigada por me fazer feliz durante nesses 20 anos. AMO-TE INFINITO, MEU AMOR...( Meu Tubarazinho ). Minhas vitórias serão para sempre suas vitórias. Continue bem, aí no céu meu anjo, com a tia Denise, vó Ciça...*

*In memriam  
a minha madrinha Denise Fonseca da Silva,  
à minha avó Cícera Maria Fonseca da Silva., ao meu irmão  
Bruninho Gomes, vó Djacir e demais ente queridos amados.*

## Resumo

A inflamação exacerbada mostra-se envolvida na patogênese de diferentes doenças, incluindo a asma. A asma alérgica é um processo complexo envolvendo diferentes tipos de moléculas e células. Dentre estas células podemos destacar as células epiteliais que atuam como uma barreira física, separando o meio externo do meio interno pulmonar. Neste contexto, impedir a morte celular epitelial e a consequente liberação de mediadores pró-inflamatórios é de extrema importância para a redução de quadros de alergias e inflamação. Dentre as estratégias para encontrar novos fármacos para esta finalidade, produtos naturais vêm sendo estudados por suas ações biofarmacológicas. Um desses compostos, o uvaol, presente em diversos tipos de alimentos, possui atividade citoprotetora e anti-inflamatória em diferentes tipos de células. Neste cenário, o objetivo foi avaliar *in vitro* os efeitos do uvaol sobre a ativação de células epiteliais. Para isso, os efeitos do estímulo A23187 (1, 5 e 10  $\mu\text{M}$ ) e do tratamento com uvaol (10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) foram testados sobre a viabilidade celular de células epiteliais A549 por MTT. A morte celular por apoptose foi avaliada por citometria de fluxo. A produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e de oxigênio (ERO) foram quantificadas pela coloração de Griess e por DFCH-DA, respectivamente. Nossos resultados mostraram que o estímulo por 2 horas com 5  $\mu\text{M}$  de A23187 apresentou uma redução da viabilidade celular em 50%. O pré-tratamento com uvaol foi capaz de reverter parcialmente a redução da viabilidade celular na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . O estímulo com A23187 5  $\mu\text{M}$  teve uma tendência a aumentar a morte celular por apoptose, entretanto o uvaol não foi capaz de reverter este processo. Além disso, o uvaol não foi capaz de reverter a produção de ERN e ERO pelas células epiteliais A549. Portanto, nosso trabalho mostrou que o uvaol teve apenas efeitos citoprotetores parciais, mas mais experimentos são necessários para elucidar suas funções e mecanismos de ação.

**Palavras-chaves: Asma, Inflamação, Triterpeno, Uvaol, Células epiteliais.**

## **Abstract**

Exacerbated inflammation is involved in the pathogenesis of different diseases, including asthma. The allergic asthma is a complex process involving different types of molecules and cells. Among them, epithelial are major players since they act as a physical barrier, separating the external environment from the internal lung environment. In this context, preventing epithelial cell death and the consequent release of pro-inflammatory mediators is extremely important for reducing allergies and inflammation. Among the strategies to discover new drugs and compounds, several natural products have been studied for their biopharmacological actions. A such, uvaol is a compound found in several types of foods, and it has cytoprotective and anti-inflammatory activity in different cell types. Thus, our objective was to evaluate the effects of uvaol on the activation of epithelial cells in vitro. As results, the A23187 stimulus (1, 5 and 10  $\mu$ M) and the treatment with uvaol (10, 50 and 100  $\mu$ M) were tested on A549 epithelial cells and analyzed by MTT. Cell death by apoptosis was assessed through flow cytometry. The production of reactive nitrogen species (RNS) was quantified by Griess staining, while the production of reactive oxygen species (ROS) was measured by DFCH-DA. Our results showed that 2 hours stimulus with 5  $\mu$ M of A23187 displayed a 50% reduction in cell viability. Pre-treatment with uvaol was able to partially reverse the reduction in cell viability at a concentration of 10  $\mu$ M. The 5  $\mu$ M A23187 stimulus had a tendency to increase cell death due to apoptosis, although uvaol was not able to reverse this process. Also, uvaol unchanged RNS and ROS production. Therefore, our work showed that uvaol had only partial cytoprotective effects, but more experiments are needed to elucidate its functions and mechanisms of action.

**Keywords:** Asthma, Inflammation, Triterpene, Uvaol, Epithelial cells.

## Lista de abreviaturas

**A23187:** Ionóforo de Cálcio.

**A549:** Células epiteliais basais alveolares humanas (Adenocarcinoma).

**AINEs:** Anti-inflamatórios não esteróides.

**AMPc (Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate):** Monofosfato cíclico de adenosina.

**CS:** Corticóides.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium.

**DCFH-DA:** 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio.

**ERN:** Espécies Reativas de Nitrogênio.

**FcεRI:** Receptor IgE de alta afinidade.

**IgE:** Imunoglobulina E.

**IL:** Interleucina.

**mg:** Miligramas.

**mL:** Mililitro.

**MFI:** Intensidade mediana de fluorescência.

**MTT:** brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium.

**nm:** Nanômetro.

**P.I:** Iodeto de Propídeo.

**Rpm:** Rotação por minuto.

**Th2:** T helper 2.

**TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral alfa.

**Uvaol:** urs-12-ene-3,28- diol.

**$\mu$ M:** Micro molar.

**$\mu$ L:** Microlitro.

## Sumário

<b>1. Introdução.</b>	<b>13</b>
<b>2. Revisão bibliográfica...</b>	<b>15</b>
<b>Epidemiologia da Asma</b>	<b>15</b>
<b>Asma.</b>	<b>16</b>
<b>Asma alérgica.</b>	<b>20</b>
<b>Envolvimento do epitélio na Asma.</b>	<b>21</b>
<b>2.2.3 Tratamento para a Asma.</b>	<b>22</b>
<b>Produtos naturais</b>	<b>23</b>
<b>Uvaol</b>	<b>24</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>26</b>
<b>4. Materiais e métodos</b>	<b>27</b>
<b>Cultura celular</b>	<b>27</b>
<b>Tratamento com Uvaol e estímulo com (A23187)</b>	<b>27</b>
<b>Ensaio de viabilidade celular</b>	<b>27</b>
<b>Ensaio de morte celular</b>	<b>28</b>
<b>Quantificação de espécies ERO e ERN</b>	<b>38</b>
<b>Análise estatística.</b>	<b>29</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>30</b>
<b>Efeito do A23187 sobre a viabilidade de células epiteliais</b>	<b>30</b>
<b>Efeito do uvaol sobre a viabilidade de células epiteliais</b>	<b>31</b>
<b>Avaliação da morte celular</b>	<b>32</b>
<b>Quantificação da produção de ERN</b>	<b>33</b>
<b>Quantificação da produção de ERO.</b>	<b>34</b>
<b>6. Discussão.</b>	<b>36</b>
<b>7. Conclusão.</b>	<b>39</b>
<b>8. Referências.....,</b>	<b>40</b>

## 1. Introdução

Atualmente a asma encontra-se entre as doenças inflamatórias crônicas com alta incidência e prevalência no mundo. Estima-se que 4,1% da população mundial seja acometida pela asma e que em 2025 haverá cerca de 100 milhões de indivíduos asmáticos no mundo (ONU, 2015; MASOLI et al., 2004). No Brasil, as doenças respiratórias afetam um grande número de pessoas causando elevados índices de internações e de óbitos, os quais vêm crescendo principalmente na região do Nordeste (DATASUS, 2016). No Estado de Alagoas foi registrado um grande número de internações, o qual gera elevados custos para o Sistema Único de Saúde (DATASUS, 2016).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas e apresenta-se heterogeneamente com diferentes manifestações clínicas e pode ser apresentada por distintos fenótipos, entre estes o mais comum é a asma alérgica. A asma alérgica é uma doença caracterizada por expressar uma resposta imunológica exacerbada aos diferentes agentes presentes no meio ambiente (SALAZAR E GHAEMMAGHAMI, 2013).

No contexto da asma alérgica, as células epiteliais do pulmão se localizam entre a interface do indivíduo e do ambiente, e estão diretamente expostas às partículas transportadas pelo ar, como os alérgenos. Os alérgenos podem causar danos às células epiteliais, através do aumento da entrada de cálcio intracelular, o qual é capaz de modular caspases e induzir apoptose (TESFAIGZI, 2006; SAMANTA E PAREKH, 2016). Ainda, diferentes alérgenos podem promover a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (QU et al., 2017) envolvidos na perpetuação da asma alérgica. Além disso, os alérgenos também podem desencadear resposta imunológica exacerbada produzindo mediadores pró-inflamatórios que desempenham um papel crucial no recrutamento de leucócitos para as vias respiratórias (HALL E AGRAWEL, 2014; WANG et al., 2008; GALLI E TSAI, 2012).

Embora existam medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento da asma, o uso crônico destes fármacos ou em elevadas doses proporcionam severos efeitos colaterais (PRASAD, 2016). Assim, é extremamente necessária a identificação de novas substâncias com potencial anti-inflamatório com a finalidade de desenvolver fármacos e/ou novas estratégias terapêuticas mais eficientes para o tratamento da asma (BARNES et al., 2015).

O uso de produtos derivados de plantas seja na profilaxia ou cura de doenças já vem sendo usado há séculos pelo homem (MUSZYNSKA et al., 2015). Dentre estes produtos, vários estudos reforçam que diversas moléculas apresentam efeitos farmacológicos

potencialmente úteis para o tratamento de diversas doenças (FERRARIS et al., 2011). Dentre estas moléculas o uvaol (urs-12-ene-3,28- diol) merece destaque tanto pela facilidade de obtenção, por estar em grandes quantidades no azeite de oliva (*Olea europaea* L.), quanto pelos relevantes efeitos terapêuticos (BOTELHO; TENÓRIO et al., 2019; GUINDA et al., 2010; MARQUEZ-MARTIN et al., 2006; AGRA et al., 2016). Foi observado que o uvaol foi capaz de proteger da morte células infectadas com *Streptococcus agalactiae* (BOTELHO; TENÓRIO et al., 2019). Além desse efeito, uvaol se apresentou capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatória em monócitos submetidos a estímulos inflamatórios (MARQUEZ-MARTIN et al., 2006). Outrossim, em um estudo recente, nosso laboratório demonstrou que o uvaol foi capaz de atenuar a resposta inflamatória eosinofílica em animais alérgicos no modelo de asma experimental (AGRA et al., 2016). Porém, quais tipos celulares que se mostram mais susceptíveis aos efeitos do uvaol, bem como as vias moleculares afetadas por este triterpeno ainda não se encontram descritos.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **Epidemiologia da Asma**

A asma é a doença crônica que pode afetar todas as idades, e mesmo que seja de caráter tratável possui uma elevada prevalência mundial, bem como altas morbidade e mortalidade as quais influenciam a sociedade (CARDOSO et. al., 2017). A maior incidência da asma está localizada nas populações de língua inglesa e na América latina. Nessas regiões, a dificuldade para o tratamento da asma é baseada no fato de que a oferta dos serviços de saúde, como um todo, é limitada quando comparada com a de determinadas regiões mais desenvolvidas (CARDOSO et. al., 2017). Essas diferentes incidências - de acordo com as variações geográficas- além de estarem envolvidas com a economia, também, estão vinculadas a outros fatores sociais os quais possuem relação, por exemplo, com a emissão de gases poluentes no ar atmosférico e por isso, há uma influência direta no desenvolvimento de casos respiratórios nas populações destas localidades. Em suma, os dados estatísticos revelam que aproximadamente mais de 50% da população adulta, bem como 80% das crianças desenvolvem a asma de caráter alérgico (TAKEJIMA et al., 2017).

Diante do exposto, a mortalidade devido à asma é alta e possui um grau crescente em vários países, e nas localidades com ascendência ao desenvolvimento a taxa de mortalidade teve um aumento de 5 a 10 % nos últimos dez anos. Nesse cenário, os óbitos relacionados às razões respiratórias são curiosamente relatados com uma alta proporção de mortes domiciliares (CARDOSO et. al., 2017) indicando que os indivíduos os quais (que) são acometidos por essas doenças nem chegam a ir às unidades hospitalares.

Dentro desse contexto, o Brasil – uma nação subdesenvolvida- que possui uma renda considerada média sobre os aspectos continentais, por conseguinte, é detentor da maior prevalência de asma em crianças, havendo constatações de que tal incidência seja referente à asma de fenótipo grave. Em concordância com isso, os levantamentos mostram que na região sul do país cerca de 20 % das crianças em níveis escolares possuem asma, o que mostra que ela ainda é observada como uma doença não controlável e por isso há muitas internações e gastos públicos que poderiam ser minimizados caso houvesse o correto tratamento e a máxima atenção básica à saúde da população (CARDOSO et. al., 2017). Já foi contabilizado em 2013 aproximadamente 2.047 óbitos devido à asma no Brasil. Ao longo dos anos o país vem direcionando uma boa parte da sua economia para as hospitalizações de pacientes com

asma, isso demonstra que ainda há pouca profilaxia e cuidados com quem sofre com a doença, como também para as pessoas que possam vir a desenvolvê-la (CARDOSO, 2017).

No Nordeste a incidência da asma ainda é considerada alta nas populações mais carentes devido à ausência de uma assistência pública gratuita mais efetiva em diminuir de alguma maneira as causas da asma alérgica, bem como tratá-la de modo seguro e eficiente, os casos já constatados e os suspeitos. É notável que há um crescente índice de hospitalizações por asma nessa região, isto evidencia que a população necessita conhecer o que de fato é asma, pois muitas vezes os indivíduos podem ter sintomatologias asmáticas e confundi-las com outras doenças respiratórias. As regiões as quais possuem os maiores índices de internações são os estados: Pará e Bahia (CARDOSO et al., 2017).

No estado de Alagoas a asma está no grupo de doenças de condições sensíveis à internação primária (ICSAP). Nos anos de 2007 e 2014 o percentual de casos de internação da população alagoana diagnosticada com a doença foi de 3,31 %. Já a taxa de mortalidade, nos anos citados, foi respectivamente de 14,22 % e 14,57 % (PLANO ESTADUAL DE SAÚDE DO ESTADO DE ALAGOAS, 2016-2019).

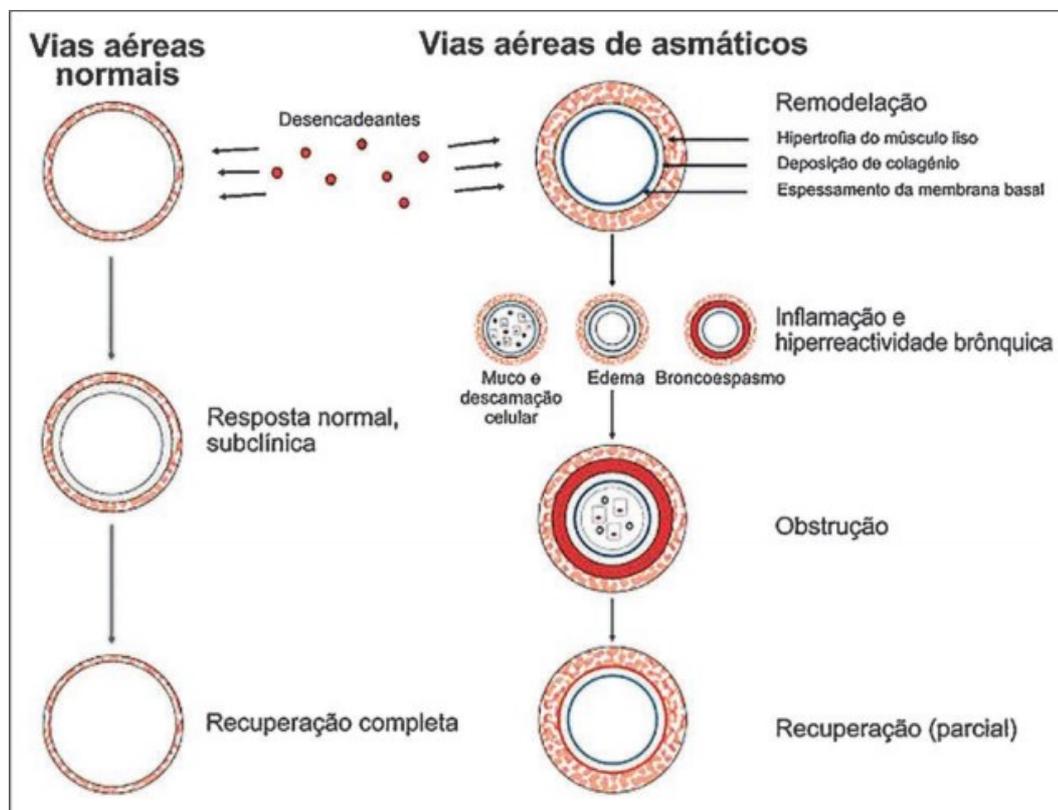
## **Asma**

O termo Asma foi mencionado pela primeira vez pelo filósofo Hipócrates em sua obra intitulada de "*Corpus Hippocratium*". A etimologia da palavra "Asma" possui origem grega e seu significado literal é descrito como "dificuldade em respirar" (PECHER, 2007).

A asma está configurada como uma enfermidade de caráter inflamatório obstrutivo crônico e pode ser enquadrada como uma doença alérgica em alguns casos. Ela é caracterizada pelas respostas imunológicas que ocorrem nas vias aéreas inferiores e pela simultânea limitação inconstante ao fluxo de ar. Os indivíduos acometidos por ela têm sintomas característicos como: a falta de ar, a tosse, a opressão torácica somada ou não com eventos de chiados produzidos pelos pulmões. A sua manifestação é heterogênea, visto que ela é desencadeada pela soma da interação genética e da exposição ambiental aos alérgenos inalados (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006; MIMS, J. W., 2015; MASLAN, J.; MIMS, J. W., 2013).

A fisiopatologia da asma é entendida como o estreitamento das vias aéreas inferiores que ao entrarem em contato com quaisquer que sejam os estímulos alérgenos provocam obstrução do fluxo aéreo (SILVA; DIAS, 2013). Segundo o Manual MDS (Manual Merck de

Saúde, 2020), as manifestações fisiopatológicas envolvidas na asma são a broncoconstrição, edema, hiper-reatividade e reconfiguração das vias respiratórias (**Figura 1**).



**Figura 1.** Fisiopatologia da Asma elucidando as diferenças anatômicas e fisiológicas, básicas, que ocorrem nas vias aéreas normais e nas vias aéreas acometidas pelos mecanismos patológicos asmáticos. (PAPADOPOULOS, NG; ARAKAWA, H; CARLSEN, KH, CUSTOVIC, A; GERN, J; LEMANSKE, R et al., 2014. CONSENSO INTERNACIONAL EM ASMA PEDIÁTRICA- ICON.)

Há dois principais fenótipos consideráveis para a asma, são eles a asma alérgica e a não alérgica. A asma alérgica ocorre precocemente na vida do indivíduo, enquanto a asma não alérgica é documentada como uma manifestação de início tardio, ou seja, em adultos. Essa última relaciona-se com Polipose nasal e com a hipersensibilidade dessas pessoas ao AINEs (anti-inflamatórios não esteróides). Tanto na asma alérgica como na não alérgica ocorre inflamação do tipo eosinofílica nas vias aéreas, contudo observa-se que há maior incidência de infiltração neutrofílica no fenótipo não alérgico (TAKEJIMA et al., 2017). Além disso, a asma alérgica possui seus eventos fisiopatogênicos conhecidos e caracterizados, porém os

processos que englobam a asma não alérgica ainda não estão tão fundamentados. No entanto, estudos vêm sugerindo que o fenótipo não alérgico pode ser manifestado tanto por reações de hipersensibilidades ao alérgenos diversos, alguns ainda não identificados, como também por infecções frequentes ou insistentes, além de processos autoimunes (TAKEJIMA et al., 2017).

Outrossim, tratando-se da asma alérgica o seu início é descrito a partir da fase intrauterina e nos primeiros três a cinco anos de vida do indivíduo. Esse período de desenvolvimento fetal e adaptabilidade da criança ao ambiente externo é muito importante, já que alterações anatômicas, fisiológicas e funcionais nas vias aéreas inferiores podem ocorrer em detrimento aos fatores genéticos herdáveis, como também em virtude de fatores ambientais (CAMPOS, 2007).

O meio ambiente é o modulador dos tipos de asma sendo atuante sobre indivíduos que já possuem as predisposições genéticas aos indutores que desencadeiam os eventos asmáticos (CAMPOS, 2007). É relevante saber que cada fenótipo asmático terá induções de grupos de substâncias e moléculas próprias para seu desenvolvimento (GANGHI; VLIAGOFTIS, 2015). Neste contexto, a classificação ou quadro asmático desta fisiopatologia, vem sendo abordada a partir dos fatores como o tipo dos desencadeadores, da gravidade e da regularidade dos sintomas, bem como o fato do paciente responder aos tratamentos já disponíveis (CAMPOS, 2007); diante disso processos clínicos observáveis, no indivíduo, resultantes da condição heterogenia da doença são importantes para classificação desses fenótipos (FILHO, 2019, 2020). Além disso, esses tipos diversos de manifestações asmáticas possuem a possibilidade de mudar sua classificação durante a vida do indivíduo de acordo com o meio no qual ele vive e com o estilo de vida do mesmo (PAPADOPOULOS et al., 2012, 2014) (**Figura 2**).

	Asma Extrínseca		Asma Intrínseca
	Atópica	Não-Atópica	
<b>Início dos Sintomas</b>	Geralmente na Infância	Adulto	Após 25 anos
<b>Sintomas</b>	Variável com o ambiente e estação do ano	Associado ao trabalho	Flutuações, cronicidade
<b>Condições Associadas</b>	Rinite alérgica, dermatite atópica	Nenhuma	Pólipo nasal, bronquite, sinusite
<b>Histórias Familiar de Atopia</b>	Forte	Menor	Asma apenas
<b>Testes Cutâneos</b>	Vários positivos, relacionados à história	Negativos ou uma reação somente	Geralmente negativo
<b>IgE Total</b>	Alta	Geralmente Normal	Normal - ↑ em 30%
<b>Eosinofilia</b>	Alta durante a exposição ao alérgeno	Esporadicamente alta durante a exposição	Alta
<b>Prognóstico</b>	Bom, especialmente evitando-se o alérgeno desencadeante	Bom, especialmente evitando-se o alérgeno desencadeante	Remissões incomuns

**Figura 2.** Diferenciação dos fenótipos da Asma (FILHO, T. P. d'A. 2019, 2020); ([https://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos\\_de\\_asma\\_classifica.html](https://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_classifica.html))

Somado a essa abordagem classificatória, existe a classificação que divide a asma em intrínseca e extrínseca. A asma intrínseca pode ser entendida como hipersensibilidade do tipo tardia. Também é conhecida como asma criptogenética, ou seja, cuja origem não é definida por fatores atópicos (alérgicos). Esta manifestação inicia-se na vida adulta devido, por exemplo, ao uso prolongado e indiscriminado de fármacos broncodiladores (FILHO, 2019, 2020).

A asma extrínseca relaciona-se geneticamente aos mecanismos imunológicos exercidos por meio da hipersensibilidade imediata (tipo I), que acontece após a sensibilização da imunoglobulina IgE, no combate de um espectro variado de estímulos presentes no meio ambiente. No entanto, neste tipo de manifestação asmática pode haver desencadeamento de asma ocupacional (asma extrínseca não-atópica), sem a participação e mediação da IgE, designada dessa forma devido a exposição aos mais variados compostos causadores que o indivíduo possui contato no meio que o cerca (FILHO, 2019, 2020).

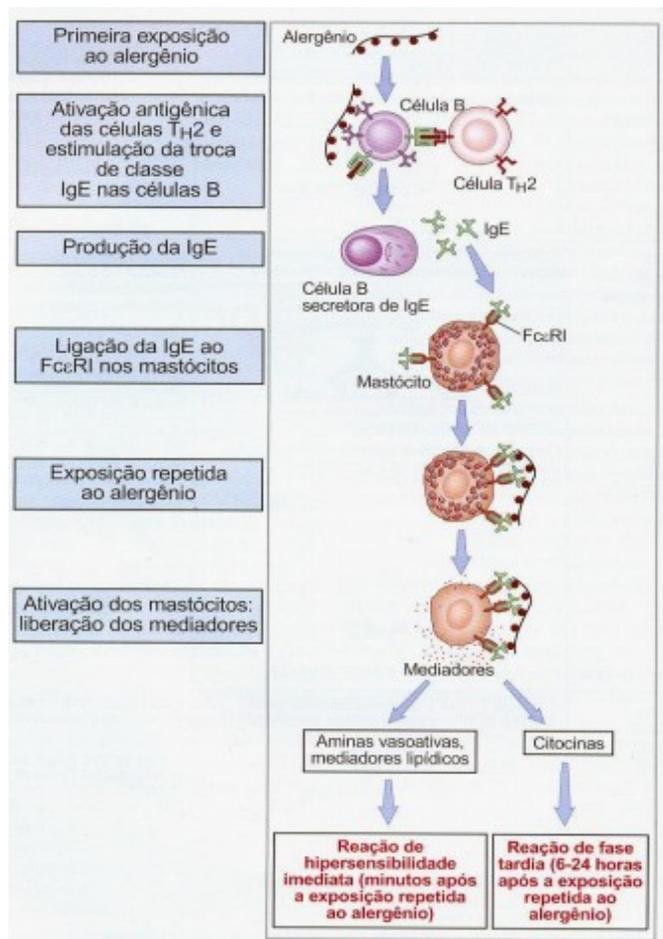
A asma alérgica possui seus princípios imunológicos baseados nas respostas das células Th2 com seus respectivos envolvimento com os constituintes celulares, moleculares e bioquímicos do sistema imune associados a esse subtipo de células T. Essas respostas inflamatórias, diante da exposição do indivíduo aos alérgenos desencadeadores da ativação dos mastócitos e basófilos, via ligação cruzada envolvendo as imunoglobulinas de classe IgE são os característicos desse tipo de asma (CAMPOS, 2007).

## **Asma alérgica**

A asma alérgica é caracterizada como uma doença complexa que se manifesta devido à associação de fatores genéticos, porém determinantes ambientais também são relevantes para o desenvolvimento dessa sensibilização alérgica (GANDHI; VLIAGOFTIS, 2015). Esta doença está inserida no contexto das doenças alérgicas ou atópicas que também são chamadas de reação de hipersensibilidade imediata (ou tipo I). Essa reação varia de acordo com o tipo de antígeno que irá desencadear respostas e manifestações clínicas patológicas próprias que cada doença possui (ABBAS; LICHTMAN; PIILLAI, 2009), **(Figura 3)**.

O fenótipo asma alérgica assim como o da não alérgica, normalmente, resultam em inflamação eosinofílica nas vias aéreas. A asma alérgica é precocemente desenvolvida antes dos 12 anos (entre 2 a 9 anos). Esse tipo de fisiopatologia pulmonar é associado de forma direta ao histórico pessoal e familiar os quais estão relacionados a outras atopias, e sua intensificação está associada à exposição aos aeroalérgenos presentes no ambiente. Indivíduos com esta atopia possuem a presença de IgE específica, como também o aumento sérico de IgE total circulantes a fim de combater a invasão dos antígenos inalados (TAKEJIMA et al., 2017).

Para este tipo de hipersensibilidade acontecer é necessária uma sensibilização prévia (SALAZAR E GHAEMMAGHAMI, 2013). Esse processo de sensibilização inicia-se quando os alérgenos penetram no organismo através da barreira de células epiteliais e são capturados e processados pelas células dendríticas (FROIDURE et al., 2015). Essas células irão apresentar os antígenos aos linfócitos T e, na presença de citocinas como interleucina IL-4 e IL-13, esses linfócitos T serão ativados e induzidos ao perfil Th2, secretando principalmente as citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. A presença de IL-4 induz a produção de IgE pelos linfócitos B, conseqüentemente as IgE produzidas irão interagir com seus receptores específicos de alta afinidade (FcεRI) na superfície de células alvo como basófilos e mastócitos (GALLI E TSAI, 2012). Em um segundo momento, após uma reexposição ao mesmo alérgeno, inicia-se a fase inicial da resposta alérgica, a qual envolve a ativação e a degranulação de mastócitos e basófilos, com liberação de mediadores pré-formados e neo-sintetizados (COCHRANE et al., 2015). A subsequente exposição ao alérgeno provoca a liberação de mediadores pró-inflamatórios que desempenham um papel crucial no recrutamento de leucócitos para as vias respiratórias na asma (GALLI E TSAI, 2012).



Fonte: ABBAS, LICHTMAN, 2009, p. 204

**Figura 3.** Sequência de eventos que ocorrem na hipersensibilidade imediata. (ABBAS, LICHTMAN et al., 2009).

### Envolvimento do epitélio na Asma

No contexto da asma alérgica, as células epiteliais do pulmão se localizam entre a interface do indivíduo e o ambiente e estão diretamente expostos às partículas transportadas pelo ar como os alérgenos (GANDHI; VLIAGOFTIS, 2015). Ainda, o tecido respiratório possui a capacidade de notar variações ambientais, que normalmente vêm com o contato com o alérgeno, e a partir disso há a preparação para responder imunologicamente a esse encontro (MATTILA et al., 2011).

Esses alérgenos podem causar danos às células epiteliais, ocasionando a liberação crônica e elevada dos mediadores pró-inflamatórios, os quais intermedeiam os efeitos

fisiopatológicos recorrentes na asma (GANDHI; VLIAGOFTIS, 2015; JAIRAMAN et al., 2016). É devido à progressão inflamatória que há um aumento da lesão do epitélio brônquico. Sabe-se que os danos celulares epiteliais brônquicos levam a síntese de mediadores que podem fazer ativação de fibroblastos, e com essa ativação há síntese de colágeno, bem como a resolução de fibrose sub-epitelial. Complementarmente, os alérgenos podem desencadear cascatas de sinalização nas células epiteliais que levam o aumento do cálcio intracelular (JAIRAMAN et al., 2016), o qual é capaz de modular caspases e induzir apoptose (TESFAIGZI, 2006; SAMANTA E PAREKH, 2016). Além disso, também foi observado que as vias de sinalização de cálcio interagem com outros sistemas de sinalização celular, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e com as espécies reativas de nitrogênio (ERN) (MOHAMED et al., 2010; GORLACH et al., 2015; ADAM-VIZIANDSTARKOV, 2010).

Assim, um evento importante na sinalização celular induzida por alérgenos é a elevação do cálcio intracelular (JAIRAMAN et al., 2016). O cálcio intracelular é liberado do retículo endoplasmático e pode ser causador do desencadeamento e modelação dos processos de morte celular programada, como a apoptose, pela via plasmática e via mitocondrial (HARRE DISTELHORST, 2010). Essa desregulação mitocondrial causada pelo aumento do cálcio intracelular pode, ainda, servir como fonte primária de ERO e de ERN (MOHAMED et al., 2010; GORLACH et al., 2015; ADAM-VIZIANDSTARKOV, 2010). Por exemplo, o aumento do cálcio na matriz mitocondrial pode levar a uma geração de ERO, desencadeando a abertura de poros de transição de permeabilidade, bem como a liberação do citocromo C, levando à apoptose celular (BROOKS et al., 2004). Além disso, vários estudos vêm mostrando uma correlação entre os efeitos causados por aumento do cálcio intracelular, apoptose e ERO/ERN, no desenvolvimento de lesão tecidual e disfunção da barreira epitelial observada na asma (KIM et al., 2014; RAO, 2008; MABALIRAJAN & GHOSH, 2013; LA ROVERSE et al., 2016; SEBAG et al., 2018).

### **Tratamento para a Asma**

Atualmente existem vários medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico para o tratamento da asma. No tratamento da asma são utilizados fármacos com ação agonistas de receptores adrenérgicos os quais relaxam a musculatura das vias aéreas, como também bloqueiam a ação dos mastócitos de liberar de mediadores broncoconstritores. Existe também o grupo dos beta-agonistas que estimulam a enzima adenilato ciclase, e aumentam a formação

do AMPc intracelular. Dentre esses fármacos destacam-se a Epinefrina, Efedrina, Isoproterenol (KATZUNG, 1992).

Além desses fármacos que são disponíveis no controle de doenças atópicas, como a asma alérgica, encontram-se também os corticoides (CS) seja os de uso oral ou inalado. Os corticoides são componentes químicos estabilizadores de mastócitos e de imunomoduladores (AGRA, 2014). A ação dos CS é baseada em inativar o grupo de genes inflamatórios os quais são ativados no decorrer da inflamação. Eles são muito eficientes devido ao fator de mimetizarem as moléculas de glicocorticosteróides naturais. No entanto, o uso prolongado deles causa efeitos colaterais nos indivíduos que fazem uso deles e isso se agrava porque seu uso, geralmente, é feito de forma bastante discriminada (AGRA, 2014). Quando entra na corrente sanguínea, os corticoides são transportados de forma sistêmica no corpo indivíduo e é justamente essa a preocupação de usá-los, visto que eles geram efeitos adversos como falhas na gliconeogênese no fígado, mudanças prejudiciais no metabolismo ósseo, além da mobilização de ácidos aminos e graxos e da supressão imunológica endógena (CAMPOS, 2007).

A maioria destes medicamentos não apenas suprime os eventos fisiopatológicos da asma, mas também tentam manter o quadro clínico asmático inibido sendo caracterizado como um tratamento por períodos prolongados. Assim, o uso contínuo dessas medicações -que possuem os CS- pode causar potenciais efeitos adversos, além dos altos custos e possíveis interações medicamentosas danosas ao organismo (HASEGAWA et al., 2013).

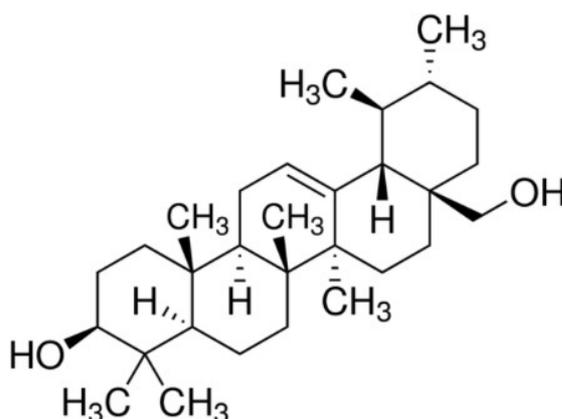
### **Produtos naturais**

O termo “produtos naturais” se refere aquelas moléculas sintetizadas por organismos vivos como plantas, fungos, bactérias, insetos e entre outros. Diante disso, sabe-se que as plantas são os compostos orgânicos mais usados para extração de produtos de ordem natural e que possuem grandes potenciais farmacológicos. É interessante notar que há uma grande diversidade de plantas existentes no mundo e ainda há uma ampla variedade de espécies a serem descritas e estudadas para usos medicinais. Sendo assim, a partir da descoberta dos compostos que podem ser extraídos das plantas, as indústrias farmacêuticas produzem medicamentos sintéticos, pois muitas vezes são mais fáceis de serem reproduzidos industrialmente do que fazer a extração dos compostos naturais da própria planta (ATANASOV et. al., 2015).

Ademais, recorrer às plantas para curar doenças, não é algo novo, é uma prática milenar que foi muito presente nas antigas civilizações. Durante um curto período, entre 2011 e 2013, foi documentado aproximadamente mais de 10 mil estudos científicos envolvendo o uso de plantas medicinais em todo o mundo (DUTRA, 2016). As plantas medicinais usadas na fitoterapia das diversas doenças é uma alternativa promissora para minimizar e, até mesmo, para acabar com os problemas causados pelos efeitos colaterais de muitos medicamentos (FERREIRA & PINTO, 2010). Sobre esses aspectos, as plantas são consideradas fontes ricas de inúmeras moléculas químicas algumas já conhecidas, e outras ainda não (KINJO et. al., 2016). Dentre essas diversas moléculas, conhecidas, podemos destacar o uvaol, um triterpeno pentacíclico, o qual possui bastante relevância e destaque frente aos tratamentos fitoterápicos em doenças de caráter inflamatório (FERRARIS et al., 2011).

### Uvaol

O uvaol (urs-12-ene-3,28-diol; **Figura 4**) é um de triterpeno pentacíclico presente em algumas espécies vegetais como a Oliveira (*Olea europaea* L.), árvore que produz a matéria base para a extração do azeite de oliva (ALLOUCHE et al., 2009). O uvaol pode ser encontrado nas folhas das Oliveira (GUINDA et al., 2010), mas também já foi encontrado na casca e no fruto da oliva e em sua semente (ALLOUCHE et al., 2010).



**Figura 4.** Estrutura estrutural química do uvaol, um triterpenopentacíclico – Fonte :Sigma-Aldrich. (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/u6628?lang=pt&region=BR>).

Atualmente o uvaol vem se destacando na área da saúde devido aos seus efeitos benéficos para indivíduos acometidos por alguma desordem fisiopatológica. Por exemplo, em modelo de infecção de células trofoblásticas por *Streptococcus agalactie*, o uvaol foi capaz de proteger estas células da morte celular (BOTELHO; TENÓRIO et al., 2019). Além disso, vários estudos que mostram que o uvaol possui propriedades antifibróticas (GUINDA et al., 2010) e antioxidantes (ALLOUCHE et al., 2010). Outros estudos revelaram que o uvaol mostra-se capaz de inibir a geração de fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-6 por monócitos em situações de estímulo inflamatório (MARQUEZ-MARTIN et al., 2006). Agra e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com uvaol por via oral em animais asmáticos resultou em uma redução do infiltrado de células inflamatórias, da produção de muco, bem como da produção de IL-5, além da redução no número de alvéolos em colapso no tecido pulmonar. Entretanto, quais os tipos celulares mostram-se mais susceptíveis aos efeitos do uvaol, bem como as vias moleculares afetadas por este triterpeno ainda não se encontram descritos.

Portanto, considerando que o uvaol possui interessantes efeitos biofarmacológicos, e como também há carência de estudos científicos capazes de demonstrar o potencial deste triterpeno para a prevenção asma alérgica, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do uvaol sobre a ativação de células epiteliais pulmonares. Com isso, pretende-se construir bases para futuras propostas no uso do uvaol na prevenção e/ou tratamento da asma alérgica.

### 3. *Objetivos*

- **Objetivo geral:**

- ? Avaliar *in vitro* os efeitos do uvaol sobre a ativação de células epiteliais pulmonares.

- **Objetivos específicos:**

- ? Avaliar o efeito do uvaol sobre a viabilidade das células epiteliais pulmonares;

- ? Avaliar o efeito do uvaol sobre a morte celular das células epiteliais pulmonares;

- ? Avaliar o efeito do uvaol sobre a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células epiteliais pulmonares;

- ? Avaliar o efeito do uvaol sobre a produção de espécies reativas de nitrogênio pelas células epiteliais pulmonares.

#### **4. Materiais e métodos**

##### **Cultura celular:**

A linhagem celular A549 (células epiteliais basais alveolares humanas) foi obtida a partir do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Essas células foram mantidas em meio DMEM (Sigma-Aldrich, Alemanha) o qual foi suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO by Life Technologies, EUA), Penicilina/Estreptomicina (0,5 %) (GIBCO™), Gentamicina (0,5 %) (GIBCO™), Anfotericina (0,31 %) (GIBCO™), e L-glutamina (1%) (Invitrogen™, EUA), resultando em meio DMEM 10 %, e com isso – as células- foram mantidas na estufa em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, em frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Em seguida, as células foram centrifugadas durante 10 minutos à 1200 Rpm, e após esse evento foi realizada a etapa de avaliação da viabilidade celular, considerando-se o mínimo de 90 % de células vivas para serem utilizadas em experimentos subsequentes.

##### **Tratamento com Uvaol e estímulo com Ionóforo de Cálcio (A23187):**

Para o ensaio com estímulo do ionóforo de cálcio (A23187; Sigma Aldrich, Alemanha), as células foram cultivadas em placas de 96 poços (JetBiofil, China) em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C. Assim, após 24 horas, as células foram estimuladas com A2387 nas concentrações de 1, 5 e 10 µM, durante 30 minutos, 1, 2 e 4 horas. Para a execução do ensaio utilizando o tratamento Uvaol (Sigma Aldrich; U6628, 5 % de pureza - HPLC), as células foram cultivadas nas mesmas condições, as quais as células estimuladas com ionóforo de cálcio foram submetidas, ambientais de temperatura e porcentagem de dióxido de carbono. Nesse processo de tratamento da células, as concentrações de Uvaol foram de 10, 50 e 100 µM, durante 1 hora e, em seguida, estimulados com A23187 (5 µM) e mantidas em cultivo, também em um período de 1 hora.

##### **Ensaio de viabilidade celular:**

A viabilidade das células A549, estimuladas com ionóforo de cálcio e/ou tratadas com uvaol, foi avaliada pelo método de MTT (ensaio colorimétrico para avaliar a atividade metabólica celular; Brometo (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo; Sigma

Aldrich). A linhagem celular foi distribuída em placa de 96 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço) e incubada a  $37^\circ\text{C}$  para adesão na placa, por um período de 24 horas. Após os tratamentos, foi adicionada 5 mg/mL de MTT o qual foi mantido por um período de 4 horas em ambiente escuro. Ao final dessa etapa, o sobrenadante foi descartado, e em seguida foi adicionado 150  $\mu\text{L}$ /poço solução de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich) para a formação de cristais de formazam. Em seguida, após 15 minutos, foi realizada a leitura da densidade óptica da placa por espectrofotometria (Celer/Polaris, Brasil) com comprimento de onda de 540 nm. Sendo assim, foram executados 3 experimentos independentes, de modo que cada experimento foi realizado em triplicata, assim, os resultados expressaram a porcentagem média de células viáveis. Portanto, para a análise dos resultados, o valor da média da densidade óptica do grupo controle foi considerado em 100 % de viabilidade celular, e os resultados dos demais grupos experimentais foram comparados a este valor.

### **Ensaio de morte celular**

Para o ensaio de morte celular foi utilizado o kit de Anexina V e de Iodeto de Propídeo (P.I.; Bioscience, EUA). Para esse ensaio as células epiteliais foram cultivadas em placas de 24 poços (JetBiofil, China) na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço, em meio de cultura DMEM 10%, e incubadas em atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$  a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida - após o estímulo e tratamento- como já descrito anteriormente, as células epiteliais foram retiradas da placa com 0,25 % de solução de tripsina (V/V) e incubadas em ambiente escuro durante 20 minutos com BD Binding Buffer (BD Biosciences), com 5  $\mu\text{L}$  de Anexina V e 5  $\mu\text{L}$  de P.I. Desse modo, depois da preparação dessa reação os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo (BD FACSCanto TM II, EUA) a partir do programa FACSDiva (BD FACSCanto<sup>TM</sup>II, EUA), e a análise dos dados foi realizada por meio do programa FlowJo versão 8.7 (Tree Stars Inc, EUA). Com isso, nessa análise foi avaliada a porcentagem de células positivas para Anexina V e um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra.

### **Quantificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio:**

Para a detecção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) utilizamos a coloração de Griess, e para a detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizamos a técnica de detecção por DCFH-DA (Sigma Aldrich).

O método de coloração por Griess é considerado de fácil execução, é realizado para experimentos que visam à quantificação de Nitrito. Diante disso, após o tratamento e o estímulo da linhagem celular epitelial A549, como descrito anteriormente, os sobrenadantes foram removidos e transferidos para uma nova placa, onde em todos os poços, incluindo amostras e curva, foram adicionados 100µL do Reagente de Griess, o qual consiste em uma mistura de Ácido Fosfórico e Sulfanilamida, juntamente com N-(1-naftil)-etilenodiamina, na proporção de 1:1, e o nitrito utilizado foi na concentração de 200 µM, e a partir disso, foi realizada a diluição serial, sendo esta a caracterização da curva de diluição do nitrito. Além disso, a densidade óptica de cada poço foi quantificada por meio do espectrofotômetro, o qual foi ajustado no comprimento de onda igual a 540 nm. E desse modo, os resultados das densidades ópticas -de cada poço- foram convertidos para concentração de nitrito usando o programa Graphpad Prisma 5 (GraphPad Software, EUA).

Enquanto o método de coloração por Griess tem por objetivo quantificar de Nitrito das amostras, a metodologia usando o DCFH-DA (corante de origem orgânica) (2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato) detecta a produção de Peróxido de Hidrogênio. O DCFH-DA é fotossensível, e devido a isso foi manipulado sem interferência luminosa. Assim, após o tratamento e estímulo as células epiteliais foram removidas das placas e em seguida foram marcadas com DCFH-DA durante 30 minutos. Após essa reação, os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo que por meio do programa FACSDiva foi realizada a análise por meio do programa FlowJo versão 8.7., e nesta análise foi avaliada a intensidade mediana de fluorescência (MFI) do DCFH-DA.

### **Análise estatística:**

Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o teste Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Enquanto que, para os ensaios de morte celular e detecção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio foram utilizadas o teste One-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

O nível de significância, para todos os experimentos, foi considerado valores de  $p < 0,05$ , e todos os testes foram realizados com o auxílio do programa Graphpad Prisma 5 (GraphPad Software, EUA).

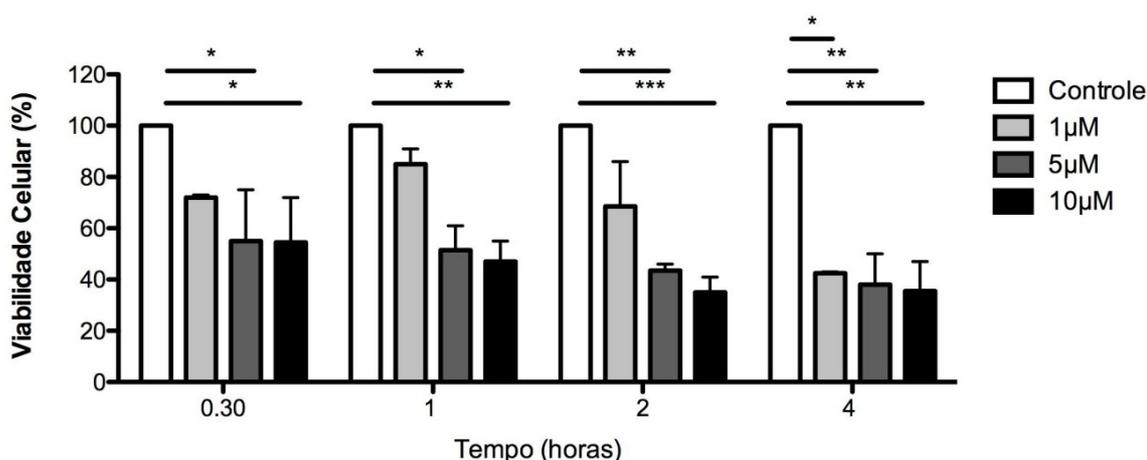
## 5. Resultados

### Efeito do A23187 sobre a viabilidade de células epiteliais

Inicialmente avaliamos a viabilidade das células A549 sobre o estímulo de A23187, em determinadas concentrações e tempos, a fim de saber qual a melhor dose e tempo de ação do estímulo nas mesmas, além de visar à otimização dos ensaios posteriores. Para isso as células foram cultivadas e incubadas por 24 horas e após esse período receberam o estímulo de A23187 nas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  (diluídos em DMEM puro), cultivadas e incubadas por 30 minutos, 1 hora, 2 e 4 horas. Em seguida as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular por MTT.

Nossos resultados mostraram que o estímulo com A23187, um conhecido indutor de aumento de cálcio intracelular, na concentração de 1  $\mu\text{M}$  nos períodos 30 minutos, 1 hora e 2 horas não apresentaram diferenças (**Figura 5**). As concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  foram capazes de diminuir a viabilidade das células em todos os tempos estudados quando comparado com seus respectivos controles (**Figura 5**).

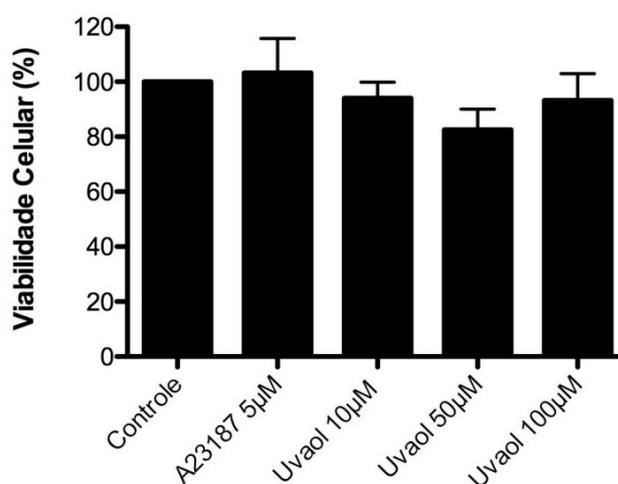
Entretanto, o tratamento por 2 horas com 5  $\mu\text{M}$  de A23187 mostrou ser a mais interessante, para a utilização dos ensaios seguintes, por apresentar uma viabilidade média de 50 % visto que a relação custo-benefício de concentração e tempo foram consideradas (**Figura 5**).



**Figura 5. Viabilidade da linhagem celular A549 sobre o estímulo do A23187 nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  nos períodos de 30 minutos, 1, 2 e 4 horas.** Barras indicam o erro padrão; (\*) indica  $p < 0,05$ , (\*\*) indica  $p < 0,01$ , (\*\*\*) indica  $p < 0,001$ .

## Efeito do uvaol sobre a viabilidade de células epiteliais

Após a escolha do tempo e concentração do A23187, foi verificado se o uvaol poderia ser citotóxico para as células epiteliais. Para isso, as células epiteliais foram cultivadas e incubadas por 24 horas e após esse período foram tratadas com uvaol nas concentrações de 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M durante 1 hora, e em seguida as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular por MTT. Nossos resultados mostraram que não houve diferenças significativas na viabilidade celular entre nenhum dos grupos estudados (**Figura 6**).

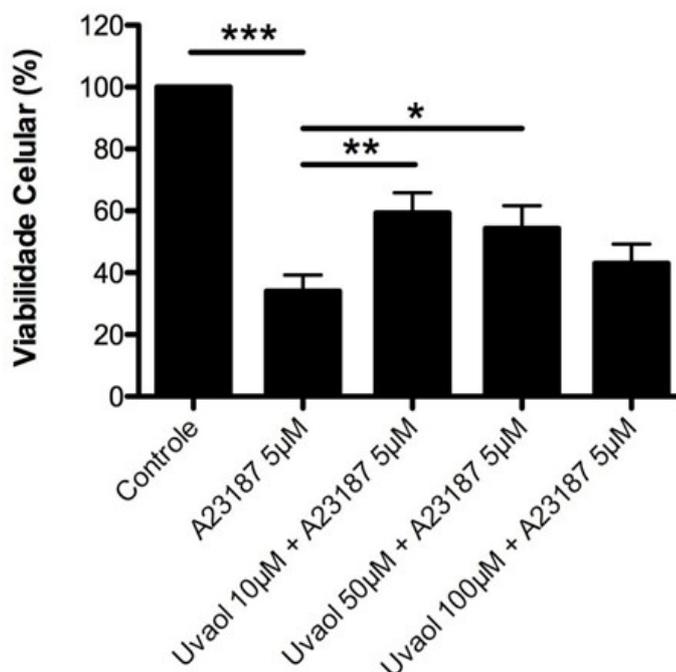


**Figura 6. Viabilidade da linhagem celular A549 sobre o tratamento do uvaol nas concentrações de 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M. Barras indicam o erro padrão.**

Em seguida foi verificado se o uvaol poderia ter um efeito citoprotetor na linhagem A549. Assim, as células epiteliais foram cultivadas e incubadas por 24 horas e após este período foram tratadas com uvaol nas concentrações de 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M por 1 hora seguida do estímulo de A23187 na concentração de 5  $\mu$ M e cultivadas em um período de 2 horas. Após esses procedimentos, as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular por MTT.

Em nosso modelo observamos que o pré-tratamento com uvaol foi capaz de reverter parcialmente à redução da viabilidade celular na concentração de 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M. Assim, a dose de 10  $\mu$ M de mostrou ser a mais interessante em relação custo-benefício (**Figura 7**). Portanto, o uvaol se mostrou capaz de exercer um efeito citoprotetor, diminuindo a morte das

células epiteliais frente ao estímulo do A23187, um conhecido indutor de aumento de cálcio intracelular.

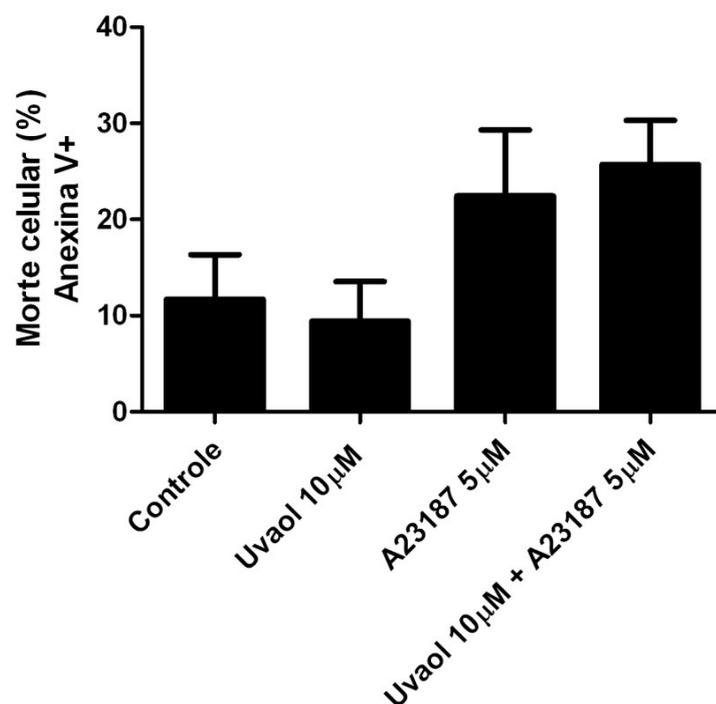


**Figura 7. Viabilidade da linhagem celular A549 sobre o tratamento do Uvaol seguido do estímulo de A23187.** Barras indicam o erro padrão; (\*) indica  $p < 0,05$ , (\*\*) indica  $p < 0,01$ , (\*\*\*) indica  $p < 0,001$ .

### **Avaliação da morte celular**

Para confirmação dos resultados de morte celular utilizamos uma técnica mais sensível e específica a qual possui os compostos, Anexina V e o P.I. Essa técnica foi realizada por meio da citometria de fluxo que revelou a combinação (característica duplo positiva) dessas substâncias, permitindo a análise percentual das células A549 em estado apoptótico (em fase tardia) e necrótico.

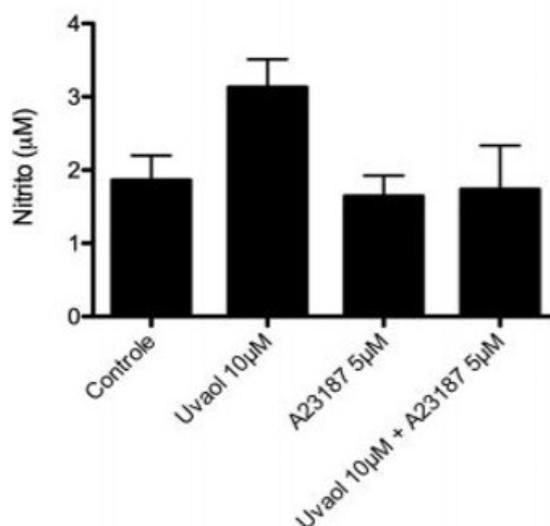
Diante disso, nossos resultados mostraram que houve aumento, embora não significativo, na porcentagem de células mortas no grupo apenas com o estímulo A23187 5 µM ao ser comparado com o grupo controle. Entretanto, no grupo Uvaol 10 µM + A23187 5 µM não foi observada diferença na porcentagem de células mortas quando comparada com o grupo controle(**Figura 8**).



**Figura 8. Porcentagem de células mortas da linhagem celular A549 sobre o tratamento do Uvaol seguido do estímulo de A23187.** Porcentagem de células mortas por apoptose nos grupos: Controle (apenas as células epiteliais A549); Uvaol 10 µM (A549 5 µM + Uvaol 10 µM); A23187 5 µM (A549 + A23187 5 µM); Uvaol 10 µM + A23187 5 µM (A549 5 µM + Uvaol 10 µM + A23187 5 µM). Barras indicam o erro padrão.

### **Quantificação da produção de espécies reativas de nitrogênio**

O óxido nítrico é uma espécie reativa de nitrogênio de curta meia vida, devido a sua rápida oxidação em nitrito e em nitrato (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). O método de Griess é capaz de detectar a produção de nitrito. Com relação aos nossos resultados observamos que as células A549 estimuladas com A23187 tiveram uma produção de nitrito similar ao grupo controle. No entanto, no grupo que foi tratado apenas com o Uvaol foi possível observar um aumento na produção de nitrito, embora não significativo, ao ser comparado com o grupo controle. Já com relação às células submetidas ao tratamento com Uvaol e em seguida estimuladas com A23187 mostraram uma produção de nitrito similar ao grupo controle e ao grupo A23187 5 µM (**Figura 9**).

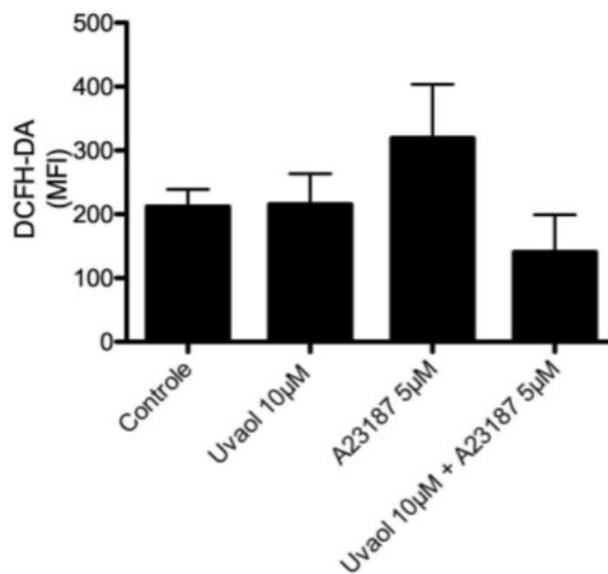


**Figura 9. Produção de nitrito pelas células epiteliais A549 sobre o tratamento do Uvaol seguido do estímulo de A23187.** As Barras indicam o erro padrão. Produção de nitrito em µM nos grupos: Controle (apenas as células epiteliais A549); Uvaol 10 µM (A549 5 µM + Uvaol 10 µM); A23187 5 µM (A549 + A23187 5 µM); Uvaol 10 µM + A23187 5 µM (A549 5 µM + Uvaol 10 µM + A23187 5 µM).

### Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio

O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio (ERO), com a utilização do DCFH-DA foi possível mensurar as quantidades de peróxido de hidrogênio produzidas por cada grupo de células nos experimentos. O DCFH-DA é permeável às células que estão em processo de oxidação o que as torna altamente fluorescente e esta fluorescência é medida através do MFI (Intensidade mediana de fluorescência) detectada por citometria de fluxo.

A produção de ERO é rápida, por isso o tempo de incubação das células- com A23187 em período de 2 horas foi reduzido para 30 minutos. Sendo assim, nas células estimuladas pelo A23187 quando comparada ao controle, os resultados mostraram-se com uma produção aumentada, embora não significativa, de peróxido de hidrogênio. Além disso, no grupo Uvaol 10 µM + A23187 5 µM foi observada uma redução, também não significativa, na produção de peróxido de hidrogênio quando comparada com o grupo controle (**Figura 10**).



**Figura 10. Produção de espécie reativa de oxigênio (ERO) marcada com DCFH-DA pelas células epiteliais A549 sobre o tratamento do Uvaol seguido do estímulo de A23187.** Barras indicam o erro padrão. Produção de ERO detectada através da Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) nos grupos: Controle (apenas as células epiteliais A549); Uvaol 10 µM (A549 5 µM + Uvaol 10 µM); A23187 5 µM (A549 5 µM + A23187 5 µM); Uvaol 10 µM + A23187 5 µM (A549 5 µM+ Uvaol 10 µM + A23187 5 µM).

## 6. Discussão

A asma alérgica é um processo complexo envolvendo diferentes tipos de moléculas e células. Dentre estas células podemos destacar as células epiteliais que se localizam entre a interface do indivíduo e do ambiente. Em estudos sobre a asma existem evidências que a barreira e a função do epitélio das vias aéreas são prejudicadas devido a sua capacidade de se moldarem de acordo com as variações ambientais, causadas por exemplo, pelos alérgenos, e a partir disso podem responder de diferentes maneiras a esse encontro.

São diversas as maneiras as quais os alérgenos podem causar danos às células epiteliais e, assim, resultar na produção de vários sinais que podem propagar e amplificar as respostas inflamatórias e remodeladoras características da asma (JAIRAMAN et al., 2016; JACQUETA., 2010). Na asma muitos desses sinais são gerados em resposta à abertura dos canais de cálcio na membrana plasmática (JAIRAMAN et al., 2016; SAMANTA; PAREKH, 2016). Em estudo realizado por Jairaman e colaboradores (2016) foi observado que os aeroalergenos aumentam o cálcio intracelular e desempenham um papel importante na indução das citocinas inflamatórias.

Ademais, um conhecido indutor de aumento de cálcio intracelular é o ionofóro de cálcio (A23187) (FLEISCH; HAISCH, 1982) o qual, inclusive, foi utilizado no presente trabalho. Chander e colaboradores (2003) mostraram que o A23187 facilita o aumento da estimulação da secreção de surfactante por células epiteliais das vias aéreas. Assim, inicialmente foi verificado a viabilidade das células A549 sobre o estímulo de A23187 pela técnica de MTT a qual é uma metodologia de triagem para otimizar dos ensaios posteriores. Em nosso estudo observamos que o tratamento por 2 horas com 5  $\mu$ M de A23187 mostrou ser a mais interessante para a utilização dos ensaios seguintes por apresentar uma viabilidade média de 50 % visto que a relação custo-benefício de concentração e tempo. Corroborando com nossos dados, um estudo prévio utilizando cardiomiócitos mostrou que a viabilidade celular foi significativamente reduzida em 40 % quando tratadas com 5  $\mu$ M de A23187 por um período de 3 horas (PRZYGODZKI et al., 2005).

Ao ser determinada a dose e o tempo do A23187 fomos verificar se o uvaol, um composto derivado do azeite de oliva, poderia ser tóxico para as células epiteliais A549. Em nosso estudo o teste de viabilidade celular por MTT foi realizado com diferentes concentrações de uvaol (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M), e os resultados mostram que o tratamento com 1 hora uvaol não alterou significativamente a viabilidade celular. Esse resultado foi

similar a outro estudo do nosso grupo mostrando que células trofoblásticas tratadas com uvaol nas mesmas concentrações não diminuíram sua viabilidade (BOTELHO; TENÓRIO et al., 2019). Assim, neste trabalho mostramos que o uvaol não foi tóxico para as células epiteliais A549.

Visto que a exposição a aeroalérgenos podem diminuir a viabilidade de células epiteliais do pulmão ao induzir a morte celular (TSAI et al., 2018; LIN et al., 2015) fomos verificar se o uvaol poderia ter um efeito citoprotetor na linhagem A549 e qual seria a dose para tal efeito. Em nosso modelo observamos que pré-tratamento com uvaol foi capaz de reverter parcialmente a redução da viabilidade celular na concentração de 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M. A dose escolhida para os próximos ensaios foi de 10  $\mu$ M a qual se mostrou ser a mais interessante em relação custo-benefício. Portanto, o uvaol mostrou ser capaz de exercer um efeito citoprotetor, diminuindo a morte das células epiteliais frente ao estímulo do A23187.

O ensaio de MTT é uma metodologia muito utilizada para a triagem de citotoxicidade de moléculas na qual se faz a mensuração de atividade mitocondrial que eventualmente podem conduzir a morte celular (TOLOSA et al., 2015). Uma outra metodologia para analisar a morte celular é através da citometria de fluxo utilizando por exemplo os compostos Anexina V e P.I. Esta metodologia é muito mais sensível e específica, pois pode distinguir o tipo de morte celular: apoptose (anexina V positivo) ou necrose (P.I. positivo) (WLODKOWIC et al., 2011). Em nosso estudo verificamos a apoptose pela porcentagem de marcação positiva por anexina V. Diante disso, nossos resultados mostraram que houve uma tendência, embora não significativa, que no grupo pré-tratado com uvaol e estimulado com A23187 a porcentagem de células mortas por apoptose foi similar quando comparado ao grupo só com estímulo. Evidências científicas mostraram que o uvaol possui efeitos pró-apoptóticos em miofibroblastos cardíacos (MARTIN et al., 2012) entretanto em altas concentrações.

Ainda, muitos processos fisiológicos tenham sido implicados na patogênese da asma, evidências mostram que ERN e EROS podem modular a função das vias aéreas e induzir a asma (SUGIUR; ICHINOSE, 2011; ZUO et al., 2014; QU et al., 2017; CHAN et al., 2017). Em nosso estudo observamos que não houveram diferenças significativas da produção de nitrito entre nenhum dos grupos. Concordando com os nossos resultados Chan e colaboradores (2017) mostraram que embora os níveis de nitrito produzidos por células epiteliais brônquicas tenham aumentado frente à exposição a concentrações crescentes de aeroalérgenos, eles não foram capazes de atingirem um nível significativo de nitrito. Uma possível explicação para tais resultados seria um tempo longo de estímulo: em nosso estudo

analisamos após 2 horas e no estudo de Chan e colaboradores (2017) a análise foi realizada após 6 horas. Em um estudo utilizando queratinócitos foi possível verificar a produção de óxido nítrico de maneira dose-dependente em um período de 1 hora estimulados por diversos alérgenos (MEHROTRA et al., 2005). Sendo assim, é necessária a realização de mais experimentos com um tempo de estímulo reduzido, para a detecção de nitrito e o possível efeito do uvaol sobre as células epiteliais A549.

Baseado em tais resultados e que também EROs são produzidas de forma rápida, diminuimos o tempo em que as células ficaram sob ação do estímulo A23187, passando de 2 horas para 30 minutos. A partir disso, foi possível observar no grupo estimulado com A23187 um aumento, embora não significativo, da produção ERO ao ser comparado ao grupo controle. Somado a isso, vários estudos mostram que diferentes aeroalérgenos são capazes de induzir a produção de ERO em diferentes tipos celulares epiteliais das vias respiratórias (BOLDOGH et al., 2005, QU et al., 2017). Em nosso estudo quando pré-tratamos as células A549 com uvaol e depois estimulamos com A23187 não foi observada uma diferença estatisticamente significativa na produção ERO quando comparada com o grupo estimulado apenas com A23187. Corroborando com os nossos resultados, o estudo realizado por Agra e colaboradores (2016) utilizando um modelo *in vivo* de alergia mostrou que o uvaol não foi capaz de interferir na produção de ERO em leucócitos.

Portanto, impedir ou reduzir o dano de células epiteliais das vias respiratórias e a consequente secreção de moléculas inflamatórias é uma boa maneira para realizar uma possível redução dos efeitos causados pela asma alérgica. Embora em nosso estudo o uvaol não apresentou grandes efeitos, ainda é preciso que sejam realizados mais estudos para descobrir quais são os possíveis alvos do uvaol com a finalidade de obter melhor entendimento acerca da ação deste fitonutriente.

## **7. Conclusão**

O presente trabalho buscou avaliar *in vitro* os efeitos do uvaol sobre a ativação de células epiteliais A549. Foi possível concluir que o estímulo A23187 na concentração de 5  $\mu\text{M}$  por 2 horas diminuiu quase pela metade a viabilidade das células epiteliais e que o uvaol na concentração de 10  $\mu\text{M}$  foi capaz de restaurar em parte essa viabilidade celular. Além disso, o uvaol não foi capaz de interferir na morte celular por apoptose e na produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio pelas células epiteliais A549.

## 8. Referências

- AGRA, C.L. **Efeito anti-inflamatório do Triterpeno Uvaol em modelos de inflamação alérgica em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas. Ano: 2014.
- AGRA, L.C., LINS, M.P., DA SILVA MARQUES, P., SMANIOTTO, S., BANDEIRA DE MELO, C., LAGENTE, V., BARRETO, E. **Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice.** European Journal of Pharmacology. Ano: 2016, 5 June. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.03.056.
- ABBAS, K. A., LICHTMAN, H. A., PIILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology.** Ano: 2007 e 2009 (Page: 204).
- ADAM-VIZI, V., STARKOV, A. A. **Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts.** IOS Press Content Library. Ano: 2010, April. doi: 10.3233/JAD-2010-100465.
- ALLOUCHE, Y., BELTRAN, G., GAFORIO, J.J., UCEDA M., MESA, M.D. **Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids.** Food and Chemical Toxicology. Ano: 2010, October. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.022.
- ATANASOV, G. A., WALTENBERGER, B., PFERSCHY-WENZIG, EM., LINDER, T., WAWROSCHE, C., UHRIN, P., TEMML, V., WANG, L., SCHWAIGER, S., HEISS, H. E., ROLLINGER, M. J., SVHUSTER, D., BREUSS, M. J., BOCHKOV, V., MIHOVILOVIC, D. M., KOPP, B., BAUER, R., DIRSCH, M. V., STUPPER, H. **Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review.** Biotechnology Advances. Ano: 2015, 8 December. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.
- BARNES, P. J.; BONINI, S.; SEEGER, W.; BELVISI, M. G.; WARD, B.; HOLMES, A. **Barriers to new drug development in respiratory disease.** European Respiratory Journal. Ano: 2015, May. doi: 10.1183/09031936.00007915.
- BOTELHO, R. M., TENORIO, L. P. G., SILVA, A. L. M., TANABE, E. L. L., PIRES, K. S. N.; GONÇALVES, C. M., SANTOS, J. C., MARQUES, A. L. X., ALLARD, M. J., BERGERON, J. D., SÉBIRE, G., SILVA, E. C. O., SOUZA, S. T., FONSECA, E. J. S., BORBELY, A., BORBELY, K. S. C. **Biomechanical and functional properties of trophoblast cells exposed to Group B Streptococcus in vitro and the beneficial effects of uvaol treatment.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. Ano: 2019, September. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.06.012.
- BOLDOGH, I., BACSI, A., CHOUDHURY, K. B., DHARAJIYA, N., ALAM, R., HAZRA, K. T., MITRA, S., GOLDBLUM, M. R., SUR, S. **ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation.** The Journal of Clinical Investigation. Ano: 2005, August. doi: 10.1172/JCI24422.
- BROOKES, S. P., YOON, Y., ANDERS, W. M., SHEU, S. S., **Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle.** American Journal of Physiology. Ano: 2014, October. doi: 10.1152/ajpcell.00139.2004.

BÁRTHOLO, P. T., CHAUVET, R. P., BESSA, C. J. E., PIO, E. J., SILVA, F. C. E., DIAS, C. A. G., SOUZA, O. I. L., CÂMARA, S. V., SOARES, V. AP. **Patogenia da asma**. Revista HUPE. Ano: 2013. doi: 10.12957/rhupe.2013.8491.

CHAN, K. T., TAN, D.S.W., PEH, Y. H., WONG, F. S. W. **Aeroallergens Induce Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage and Dampen Antioxidant Responses in Bronchial Epithelial Cells**. The Journal of Immunology. Ano: 2017, July. doi: 10.4049/jimmunol.1600657.

CHANDER, A., SEN, N., NAIDU D. G., SPITZER, A. R. **Calcium ionophore and phorbol ester increase membrane binding of annexin a7 in alveolar type II cells**. Cell Calcium. Ano: 2003 July. doi: 10.1016/s0143-4160(02)00177-X.

COCHRANE, A. S., ARTS, E. H. J., EHNES, C., HINDLE, S., HOLLNAGEL, M. H., POOLE, A., SUTO, H., KIMBER, I. **Thresholds in chemical respiratory sensitisation**. Toxicology. Ano: 2015, 3 July. doi: 10.1016/j.tox.2015.04.010.

CAMPOS, S. H. **Asthma: its origins, inflammatory mechanisms and the role of the corticosteroid**. Revista Brasileira de Pneumologia Sanitária. Ano: 2007.

CARDOSO, A. T., RONCADA, C., SILVA, R. E., PINTO, A. L., JONES, H. M., STEIN, T. R., PITREZ, M. P. **Impacto of asthma in Brazil: longitudinal analysis of data extracted from a Brazilian government database**. Jornal Brasileiro de Pneumologia. Ano: 2017. doi: 10.1590/s1806-37562016000000352.

**DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (DATASUS) – Número de internações, no Nordeste com Doenças respiratórias**. Ano: 2016. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabacgi.exe?sih/cnv/niuf.def>.

**IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA**. Ano: 2006. doi: 10.1590/S1806-37132006001100002.

DUTRA, C.R., CAMPOS, M. M., SANTOS, S. R. A., CALIXTO, B. J. **Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives**. Pharmacological Research. Ano: 2016, October. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.021.

FERRARIS, F. K., RODRIGUES, R., SILVA, V. P., FIGUEIREDO, R., PENIDO, C., HENRIQUES, M. D. G. M. O. **Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetra no triterpenoids isolated from Carapa Guianensis Aublet**. International Immunopharmacology. Ano: 2011. doi: 10.1016/j.intimp.2010.09.010.

FERREIRA, F. V., PINTO, C. A. **Phytotherapy in today's world**. Química Nova. Ano: 2010. doi: 10.1590/S0100-40422010000900001.

FILHO, T. D'A. P. **Bronchial asthma/ Types of asthma**. Informações médicas. Ano: 1997 à 2020. Disponível em: [https://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos\\_de\\_asma\\_classifica.html](https://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_classifica.html).

FROIDURE, A., MOUTHUY, J., DURHAM, R. S., CHANEZ, P., SIBILLE, Y., PILETTE, C. **Asthma phenotypes and IgE responses.** Ano: 2016, 31 December. doi: 10.1183/13993003.01824-2014.

FILHO, F. R., ZILBERSTEIN, B. **Nitric oxide: the simple Messenger traveling through complexity. Metabolism, synthesis and functions.** Revista da Associação Médica Brasileira. Ano: 2000, September. doi: 10.1590/s0104-42302000000300012.

FLEISCH, J. H., HAISCH, K. D., SPAETHE, S. M. **Slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) release from guinea-pig lung parenchyma during antigen- or ionophore-induced contraction.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Ano: 1982. Volume 221.

GANDHI, D. V., VLIAGOFTIS, H. **Airway Epithelium Interactions with Aeroallergens: Role of Secreted Cytokines and Chemokines in Innate Immunity.** Frontiers in Immunity. Ano: 2015, 2 April. doi: 10.3389 /fimmu.2015.00147.

GUINDA, Á., RADA, M., DELGADO, T., GUTIÉRREZ-ADÁNEZ, P., CASTELLANO, M. J. **Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Ano: 2010. doi: 10.1021/jf102039t.

GALLI, S. J., TSAI, M. **IgE and mast cells in allergic disease.** Nature Medicine. Ano: 2012, 4 May. doi: 10.1038/nm.2755.

GÖRLACH, A., BERTRAM, K., HUDECOVA, S., KRIZANOVA, O. **Calcium and ROS: A mutual interplay.** Redox Biology. Ano: 2015, December. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.010.

HALL, S., AGRAWAL, K. D. **Key mediators in the immune pathogenesis of allergic asthma.** Ano: 2014, November. International Immunopharmacology. doi: 10.1016/j.intimp.2014.05.034.

HARR, W. M., DISTELHORST, W. C. **Apoptosis and Autophagy: Decoding Calcium Signals that Mediate Life or Death.** Ano: 2010, October. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. doi: 10.1101/cshperspect.a005579.

HASEGAWA, T., KOYA, T., SAKAGAMI, T., KAGAMU, H., ARAKAWA, M., GEJYO, F., NARITA, I., SUZUKI, E., THE NIIGATA ASTHMA TREATMENT STUDY GROUP. **The Asthma Control Test, Japanese Version (ACT-J) as a Predictor of Global Initiative for Asthma (GINA) Guideline-Defined Asthma Control: Analysis of a Questionnaire-Based Survey.** Allergology International. Ano: 2013. doi: 10.2332/allergolint.13-OA-0535.

JAIRAMAN, A., MAGUIRE, H. C., SCHLEIMER, P. R., PRAKRIYA, M. **Allergens stimulate store-operated calcium entry and cytokine production in airway epithelial cells.** Scientific reports. Ano: 2016, 8 September. doi: 10.1038/srep32311.

JACQUET, A. **Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response.** *Clinical & Experimental Allergy*. Ano: 2010, December. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03661.x.

KIM, R. S., KIM, I. D., KIM, H.S., LEE, S. K., CHO, H. S., LEE, C. Y. **NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial ROS in bronchial epithelial cells is required for allergic inflammation.** *Cell Death & Disease*. Ano: 2014, 30 October. doi: 10.1038/cddis.2014.460.

KINJO, J., NAKANO, D., FUJIOKA, T., OKABE, H. **Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants extracts.** *Journal of Natural Medicines*. Ano: 2016. doi: 10.1007/s11418-016-0992-2.

KATZUNG, G. B., TREVOR, J. A., HALL-KRUIDERING, M. M., MASTERS, B. S. **Pharmacology; Examination & Board Review.** Lange. Ano: 1992.

LA ROVERE, L. M. R., ROEST, G., BULTYNCK, G., PARYS, B. J. **Intracellular Ca(2+) signaling and Ca(2+) microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy.** *Cell Calcium*. Ano: 2016, August. doi: 10.1016/j.ceca.2016.04.005.

LIN, C-H., HONG, Y-C., KAO, S-H. **Aeroallergen Der p 2 induces apoptosis of bronchial epithelial BEAS-2B cells via activation of both intrinsic and extrinsic pathway.** *Cell & Bioscience*. Ano: 2015, December. doi:10.1186/s13578-015-0063-5.

MABALIRAJAN, U., GHOSH, B. **Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome and asthma.** *Journal of Allergy (Cairo)*. Ano: 2013. doi: 10.1155/2013/340476.

MOHAMED, T., GINNAN, R., SINGER, A. H., JOURD'HEUIL, D. **Interplay Between Calcium and Reactive Oxygen/Nitrogen Species: An Essential Paradigm for Vascular Smooth Muscle Signaling.** *Antioxidants & Redox Signaling*. Ano: 2010, 2 February. doi: 10.1089/ars.2009.2842.

MIMS, W. J. **Asthma: definitions and pathophysiology.** *International Forum of Allergy & Rhinology (IFAR)*. Ano: 2015, 3 September. doi: 10.1002/alr.21609.

MASLAN, J.; MIMS, J. W. **What is asthma? Pathophysiology, demographics, and health care costs.** *Otolaryngologic Clinics of North America*. Ano: 2014, February; doi: 10.1016/j.otc.2013.09.010.

**MANUAL MERCK DE SAÚDE (MANUAL MDS)- Distúrbios pulmonares/ Asma e doenças relacionadas,** por ORTEGA, E. V. & GENESE, F. Disponível: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/dist%C3%BArbiospulmonares/asma-e-doen%C3%A7as-relacionadas/asma>. Ano: 2020.

MATTILA, P., JOENVÄÄRÄ, S., RENKONEN, J., TOPPILA-SALMI, S., RENKONEN, R. **Allergy as an epithelial barrier disease.** *Clinical and Translational Allergy*. Ano: 2011, 10 June. doi: 10.1186/2045-7022-1-5.

MUSZYNSKA, B., ŁOJEWSKI, M., ROJOWSKI, J., OPOKA, W., SUŁKOWSKA-ZIAJA, K. **Natural products of relevance in the prevention and supportive treatment of depression.** *Psychiatria Polska*. Ano: 2015, May - June. doi: 10.12740/PP/29367.

MASOLI, M., FABIAN, D., HOLT, S., BEASLEY, R. **The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report.** *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Ano: 2004, 6 April. doi: 10.1111/j.1398-9995.2004.00526.x.

MARQUEZ-MARTIN, A., DE LA PUERTA, R., FERNANDEZ-ARCHE, A., et al. **Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil human mononuclear cells.** *Cytokine*. Ano: 2006, December. doi: 10.1016/j.cyto.2006.12.007.

MARTIN, R., MIANA, M., JURADO-LÓPEZ, R., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E., GÓMEZ-HURTADO, N., DELGADO, C., BARTOLOMÉ, V. M., ROMÁN, S. A. J., CORDOVA, C., LAHERA, V., NIETO, L. M., CACHOFEIRO, V. **DIOL Triterpenes Block Profibrotic Effects of Angiotensin II and Protect from Cardiac Hypertrophy.** *Plos One*. Ano: 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0041545.

MEHROTRA, P., MISHRA, P. K., BANERJEE, G., RAMAN, G. **Differential Regulation of Free Radicals (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) by Contact Allergens and Irritants in Human Keratinocyte Cell Line.** *Toxicology Mechanisms and Methods*. Ano: 2005. doi: 10.1080/15376520500191490.

**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (ONU).** Disponível em: <https://news.un.org/pt/tags/asma>.

PRASAD, B. N. B. M. **Refractory asthma - An old disorder: Novel approaches foreffective control.** *Medical Journal Armed Forces India*. Ano: 2016, July. doi: 10.1016/j.mjafi.2016.04.006.

PAPADOPOULOS, G. N., MAKRIS, M., GUIBAS, V. G. **Acute asthma exacerbations in childhood: risk factors, prevention and treatment.** *Expert review of respiratory medicine*. Ano: 2014, January. doi: 10.1586/ers.12.68.

PAPADOPOULOS, N.G; ARAKAWA, H; CARLSEN, K.H, CUSTOVIC, A; GERN, J; LEMANSKE, R. , et al. **CONSENSO INTERNACIONAL EM ASMA PEDIÁTRICA (ICON).** *Revista Portuguesa de Imunologia* . Ano: 2014.

**PLANO ESTADUAL DE SAÚDE DO ESTADO DE ALAGOAS.** Ano 2016-2019.

PECHER, A. S. **Bronchial asthma in elderly.** *Revista Paraense de Medicina*. Ano: 2007, September.

PRZYGODZKI, T., LAPSHINA, E., ZAVODNIK, I., SOKAL, A., BRYZIEWSKA. **2,3-Butanedione monoxime does not protect cardiomyocytes under oxidative stress.** *Wiley Online Library*. Ano: 2005, September. doi:10.1002/cbf.1277.

QU, J., LI, Y., ZHONG, W., GAO, P., HU, C. **Recent developments in the role of reactive oxygen species in allergic asthma.** Journal of Thoracic Disease. Ano: 2017, January. doi: 10.21037/jtd.2017.01.05.

RAO, R. **Oxidative stress induced disruption of epithelial and endothelial tight Junctions.** Frontiers in Bioscience. Ano: 2008, 1 May. doi: 10.2741/3223.

SEBAG, C. S., KOVAL, M. O., PASCHKE, D. J., WINTERS, J. C., COMELLAS, P. A., GRUMBACH, M. I. **Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter prevents IL-13 and allergen-mediated airway epithelial apoptosis and loss of barrier function.** Ano: 2017. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.12.003.

SUGIURA, H., ICHINOSE, M. **Nitrative stress in inflammatory lung diseases.** Nitric Oxide. Ano: 2011, August. doi: 10.1016/j.niox.2011.03.079.

SAMANTA, K., PAREKH, B., A. **Store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in airway epithelial cell function and implications for asthma.** Philosophical transactions of the royal society B. Ano: 2016, 5 August. doi: 10.1098/rstb.2015.0424.

SALAZAR, F., GHAEMMAGHAMI, A.M. **Allergen Recognition by Innate Immune Cells: Critical Role of Dendritic and Epithelial Cells.** Frontiers in Immunology. Ano: 2013, 3 November. doi: 10.3389/fimmu.2013.00356.

TAKEJIMA, P., AGONDI, C. R., RODRIGUES, H., AUN, V. M., KALIL, J., GIAVINA-BIANCHI, P. **Allergic and non-allergic asthma have different phenotypic and genotypic characteristics.** Associação Brasileira de Alergia e Imunologia (ASBAI). Ano: 2017. doi: 10.5935/2526-5393.20170011.

TSAI, Y.M., CHIANG, K.H., HUNG, J.Y., CHANG, A.W., LIN, P.H., SHIEH, M.J., CHONG, W.I., HUS LY. **Der f1 induces pyroptosis in human bronchial epithelia via the NLRP3 inflammasome.** International Journal of Molecular Medicine. Ano: 2018. doi: 10.3892/ijmm.2017.3310.

TESFAIGZI, Y. **Roles of Apoptosis in Airway Epithelia.** American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. Ano: 2006, 29 January; doi: 10.1165/rcmb.2006-0014OC.

TOLOSA, L., DONATO, T. M., GÓMEZ-LECHÓN, J. M. **General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay.** Methods in Molecular Biology. Ano: 2014, November. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7\_26.

ZUO, L., KOOZECHIAN, M., CHEN, L. L. **Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma.** Annals of Allergy, Asthma & Immunology. Ano: 2014, January. doi: 10.1016/j.anai.2013.10.007.

WLODKOWIC, D., TELFORD, W., SKOMMER, J., DARZYNKIEWICZ, Z. **Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death.** Methods in cell biology. Ano: 2011. doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00004-8.

WANG, Z., PORRECA, F., CUZZOCREA, S. GALEN, K., LIGHTFOOT, R., MASINI, E., MUSCOLI, C., MOLLACE, V., NDENGELE, M., ISCHIROPOULOS, H., SALVEMINI, D. **A newly identified role for superoxide in inflammatory pain.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Ano: 2004, 1 June. doi: 10.1124/jpet.103.064154.