



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

LILIAN MARIANE PEREIRA DA SILVA NASCIMENTO

**Atividade anti-inflamatória do cinamato de metila no enfisema pulmonar
induzido por elastase em camundongos**

Orientador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

Maceió – AL

2021

LILIAN MARIANE PEREIRA DA SILVA NASCIMENTO

**Atividade anti-inflamatória do cinamato de metila no enfisema pulmonar
induzido por elastase em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.

Maceió – AL

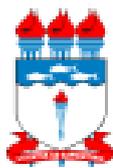
2021

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

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

- N244a Nascimento, Lilian Mariane Pereira da Silva.
Atividade anti-inflamatória do cinamato de metila no efisema pulmonar induzido por elastase em camundongos / Lilian Mariane Pereira da Silva Nascimento. – 2021.
101 f. : il., grafs., tabs. color.
- Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Tese (doutorado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2021.
- Bibliografia: f. 90-100.
Anexo: f. 101.
1. Cinamato de metila. 2. Fenilpropanoide. 3. Produtos naturais. 4. Doença pulmonar obstrutiva crônica. I. Título.

CDU: 547.638.1/3:616.24



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

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

Folha de Aprovação

Lilian Mariane Pereira da Silva Nascimento

Estudo da atividade anti-inflamatória do cinamato de metila no enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 25 de junho de 2021.

Banca Examinadora

Prof.a. Dra. Eurica Adélia Nogueira Ribeiro (UFAL)

Prof. Dr. Vinícius de Frias Carvalho (IOC/FIOCRUZ)

Prof.a. Dra. Ana Carolina de Carvalho Correia (UPE)

Documento assinado digitalmente

Marvin Paulo Lins
Data: 25/06/2021 15:02:18 -0300
CPF: 012.881.894-01
Verifique em <https://verificador.lic.br>

Prof. Dr. Marvin Paulo Lins (UNINASSAU)

À Deus, por me sustentar nos momentos em que achei que não conseguiria.

Ao meu Orientador Emiliano e a minha amiga de sempre e para sempre Jamylle Ferro, sem os quais eu não teria concretizado a realização deste sonho.

À minha família por sonhar junto e pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força para continuar a correr atrás dos meus sonhos...

Ao Professor Emiliano pela orientação, puxão de orelha e principalmente por sua compreensão...

À Janylle, minha amiga, que me conhece como ninguém e ainda assim consegue amar-me sem medidas...

À minha família, Alúzio e Marina, por aceitarem este projeto e sonharem comigo. Agradeço imensamente pela paciência e por todo amor...

Aos meus pais, Domingos e Sineide, alicerces da minha vida, pelo incentivo e por seu amor incondicional...

Aos meus irmãos, Lívia e Neto, pelas palavras de apoio...

Aos amigos por estarem sempre juntos, por ouvirem, acolher e dar ânimo...

Aos amigos e sofredores de laboratório, obrigada por tornarem os dias mais fáceis.

Meu Muito Obrigada!!!

RESUMO

O enfisema pulmonar é caracterizado pela destruição proteolítica e progressiva da parede alveolar decorrente da resposta inflamatória e remodelamento tecidual o que ocasiona perda da superfície respiratória e limitação do fluxo aéreo. O cinamato de metila (CM) é um derivado éster do ácido cinâmico encontrado em várias espécies vegetais, possuidor de vasta gama de efeitos farmacológicos, incluindo ações antioxidantes e anti-inflamatórias, entretanto, ainda não há registros de estudos que descrevam seus possíveis efeitos terapêuticos sobre o enfisema pulmonar. Neste estudo avaliamos os efeitos do CM na resposta inflamatória das vias aéreas e nas alterações estruturais do pulmão de camundongos com enfisema induzido por elastase, bem como os efeitos do CM sobre a ativação do epitélio das vias aéreas *in vitro*. Camundongos C57BL/6, de ambos os sexos, receberam injeção intratraqueal de elastase (ELA, 2 UI em 50 μ L) ou solução tampão fosfato-salina (PBS, controle). O tratamento ocorreu do dia 16 ao 20 pós-estímulo por meio de uma única instilação diária com CM (1, 10 e 50 μ mol/Kg). Vinte e quatro horas após o último tratamento, foram avaliados nas vias aéreas e no pulmão o perfil inflamatório a partir do lavado broncoalveolar (LBA) e das alterações histológicas do pulmão. As análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Newman-Kewls. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CEUA-UFAL nº 85/15. Os animais estimulados com elastase exibiram uma redução no peso corpóreo a partir do terceiro dia pós indução, quando comparados aos animais controles. Órgãos como baço, rim e fígado obtidos dos diferentes grupos experimentais não demonstraram alterações morfológicas evidentes. Animais com enfisema exibiram intensa infiltração de leucócitos, caracterizada por um aumento na contagem de macrófagos, linfócitos e neutrófilos. O tratamento com 1, 10 ou 50 μ mol/Kg de CM reduziu a contagem de todos os tipos celulares do infiltrado inflamatório. A análise histopatológica dos pulmões de animais com enfisema revelou destruição dos septos alveolares, aumento do espaço aéreo e infiltração de células inflamatórias, bem como maior deposição de colágeno peribronquiolar, entretanto, todas estas alterações foram marcadamente diminuídas após o tratamento com CM, principalmente nas duas maiores doses. O tratamento com CM reduziu no pulmão os níveis de IL-1 β e TNF- α , mas não os níveis de IL-10. Esses mesmos tratamentos também diminuíram os níveis de IL-6 no LBA de camundongos enfisematosos. Células do epitélio alveolar da linhagem A549 quando estimuladas *in vitro* com TNF- α produziram níveis elevados de IL-1 β e IL-6, fenômeno que foi inibido pelo tratamento com CM em concentrações que não induziram citotoxicidade. A produção de espécies reativas de oxigênio não foi afetada pelo tratamento com CM. Esses resultados demonstram que o CM inibiu a inflamação das vias aéreas e melhorou a lesão pulmonar induzida, o que mostra sua importância como um candidato ao tratamento do enfisema pulmonar.

Palavras-chave: Cinamato de Metila. Fenilpropanoide. Produtos naturais. DPOC.

ABSTRACT

SILVA, L.M.P. Anti-inflammatory activity of methyl cinnamate on elastase-induced pulmonary emphysema in mice [thesis]. Maceió: UFAL/PPGCS, 2021.

Pulmonary emphysema is characterized by proteolytic and progressive destruction of the alveolar wall resulting from the inflammatory response and tissue remodeling, which causes loss of the respiratory surface and airflow limitation. Methyl cinnamate (MC) is an ester derivative of cinnamic acid found in several plant species, possessing a wide range of pharmacological effects, including antioxidant and anti-inflammatory actions, however, there are still no records of studies describing its possible therapeutic effects about pulmonary emphysema. In this study, we evaluated the effects of MC on the inflammatory response of the airways and structural changes in the lungs of mice with emphysema induced by elastase, as well as the effects of CM on the activation of airway epithelium *in vitro*. C57BL/6 mice, of both sexes, received an intratracheal injection of elastase (ELA, 2 IU in 50 μ L) or phosphate-saline buffer solution (PBS, control). The treatment occurred from the 16th to the 20th post-stimulus by means of a single daily instillation with MC (1, 10 and 50 μ mol/Kg). Twenty-four hours after the last treatment, the inflammatory profile from bronchoalveolar lavage (BAL) and histological changes in the lung were evaluated in the airways and lung. Statistical analyzes were performed with one-way ANOVA, followed by Newman-Kewls post-test. All experimental procedures were approved by CEUA-UFAL n^o 85/15. Elastase-stimulated animals exhibited a reduction in body weight from the third day after induction, when compared to control animals. Organs such as spleen, kidney and liver obtained from different experimental groups did not show evident morphological changes. Animals with emphysema exhibited intense leukocyte infiltration, characterized by an increase in the count of macrophages, lymphocytes and neutrophils. Treatment with 1, 10 or 50 μ mol / Kg of MC reduced the count of all cell types of the inflammatory infiltrate. Histopathological analysis of the lungs of animals with emphysema revealed destruction of the alveolar septa, increased air space and infiltration of inflammatory cells, as well as greater deposition of peribronchiolar collagen, however, all these changes were markedly reduced after treatment with MC, mainly in both higher doses. Treatment with MC reduced the levels of IL-1 β and TNF- α in the lung, but not IL-10 levels. These same treatments also decreased the levels of IL-6 in the BAL of emphysematous mice. Cells from the A549 lineage alveolar epithelium, when stimulated *in vitro* with TNF- α , produced high levels of IL-1 β and IL-6, a phenomenon that was inhibited by treatment with MC at concentrations that did not induce cytotoxicity. The production of reactive oxygen species was not affected by treatment with MC. These results demonstrate that CM inhibited airway inflammation and improved induced lung injury, which shows its importance as a candidate for the treatment of pulmonary emphysema.

Keywords: Methyl cinnamate. Phenylpropanoid. Natural products. COPD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ranking das 10 primeiras causas de morte no mundo, 2019.....	20
Figura 2 -	Organização anatômica: capilares sanguíneos e alvéolo pulmonar.....	25
Figura 3 -	Células alveolares e homeostase pulmonar.....	26
Figura 4 -	Fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC.....	29
Figura 5 -	Fatores importantes na etiologia da DPOC.....	30
Figura 6 -	Mecanismos de estreitamento de pequenas vias aéreas.....	31
Figura 7 -	Aumento do espaço aéreo parenquimal no enfisema pulmonar.....	33
Figura 8 -	Alterações fisiopatológicas na instalação do processo enfisematoso.....	34
Figura 9 -	Bronquíolos: normal e enfisematosos centrolobular e panlobular.....	35
Figura 10 -	Recrutamento de células inflamatórias no desequilíbrio protease <i>versus</i> antiprotease no pulmão.....	41
Figura 11 -	Processo enfisematoso por estresse oxidativo.....	42
Figura 12 -	Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC.....	44
Figura 13 -	Rota do ácido chiquímico.....	48
Figura 14 -	Estrutura química do cinamato de metila.....	49
Figura 15 -	Esquema ilustrativo da obtenção do LBA em camundongos C57BL/6.....	54
Figura 16 -	Esquema ilustrativo da metodologia de quantificação de citocinas.....	56
Figura 17 -	Esquema ilustrativo do ensaio de MTT para avaliação da citotoxicidade do cinamato de metila em células A549.....	58
Figura 18 -	Ilustração do ensaio imunoenzimático para detecção de citocinas de IL-1 β , IL-6 e IL-10.....	59
Figura 19 -	Protocolo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase.....	61

Figura 20 - Efeito do cinamato de metila sobre o infiltrado inflamatório nas vias aéreas de animais estimulados com elastase.....	62
Figura 21 - Efeito do cinamato de metila sobre a produção de citocinas IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 no tecido pulmonar de camundongos enfisema induzido por elastase.....	63
Figura 22 - Parênquima pulmonar em um modelo de enfisema de camundongo induzido por elastase, corados com H&E.....	65
Figura 23 - Análise quantitativa do espaço alveolar nos pulmões enfisematosos de camundongos estimulados com elastase e tratados com cinamato de metila.....	66
Figura 24 - Histologia do pulmão evidenciando a deposição matriz extracelular pela marcação com tricômio de Masson em animais com enfisema induzido por elastase.....	68
Figura 25 - Análise quantitativa da deposição de matriz extracelular nos pulmões enfisematosos de camundongos estimulados com elastase e tratados com cinamato de metila.....	69
Figura 26 - Avaliação do cinamato de metila sobre o peso corporal de camundongos com enfisema induzidos por elastase.....	70
Figura 27 - Avaliação do peso relativo do baço, rim e fígado de animais com enfisema induzido por elastase.....	71
Figura 28 - Avaliação do consumo de ração e água nos animais com enfisema induzido por elastase.....	72
Figura 29 - Efeito do cinamato de metila sobre a viabilidade de células A549.....	73
Figura 30 - Efeito do cinamato de metila sobre a produção de citocinas em células A549 estimulados com TNF- α	75
Figura 31 - Efeito do tratamento com cinamato de metila sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas com TNF- α	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indicadores relacionados a bronquite, enfisema e outras doenças pulmonares obstrutivas crônicas em indivíduos atendidos pelo SUS no Brasil entre os anos de 2009 e 2020.....	22
Tabela 2 - Indicadores relacionados a bronquite, enfisema e outras doenças pulmonares obstrutivas crônicas em indivíduos atendidos pelo SUS nos Estados da Região Nordeste entre os anos de 2009 e 2020.....	23
Tabela 3 - Proteases envolvidas no desenvolvimento do DPOC.....	38
Tabela 4 - Inibidores de proteases no pulmão.....	40
Tabela 5 - Medicamentos comumente utilizados no tratamento da DPOC.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µmol/Kg	Micromols por quilograma
°C	Graus Célsius
α1-AT	α-1 Antitripsina
AS	Alvéolos
AD	Ducto Alveolar
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CM	Cinamato de Metila
Cm	Centímetro
DALY	Disability-Adjusted Life Year
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ELA	Elastase
EPM	Erro Padrão da Média
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
G	Gramas
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases
H	Horas
HDAC2	Histona Desacetilase 2
H&E	Hematoxilina-Eosina
IL-1β	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
i.n.	Intranasal
i.t.	Intratraqueal

Lm	Intercepto Linear Médio
LBA	Lavado Broncoalveolar
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
m ²	Metro quadrado
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
MEC	Matriz Extracelular
Mg	Miligramas
Min	Minuto
MIP-2	Proteína Inflamatória de Macrófagos-2
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MMP-1	Metaloproteinase de Matriz– 1
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz– 2
MMP-8	Metaloproteinase de Matriz– 8
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz– 9
MMP-12	Metaloproteinase de Matriz– 12
MMP-14	Metaloproteinase de Matriz– 14
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
n ^o	Número
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salina
PDE4	Fosfodiesterase-4
R\$	Custo Monetário em Reais
RB	Bronquíolo Respiratório
Rpm	Rotações por Minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Bronquíolo Terminal

TC	Tomografia Computadorizada
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador- β
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UI	Unidade Internacional
US\$	Custo Monetário em Doláres

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	Doença pulmonar obstrutiva crônica.....	20
2.1.1	Dados epidemiológicos.....	20
2.1.2	Estrutura pulmonar	24
2.1.3	Etiologia da DPOC.....	27
2.2	Enfisema pulmonar.....	32
2.2.1	Componentes envolvidos na resposta inflamatória e destruição tecidual do enfisema pulmonar.....	36
2.2.2	Mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão do enfisema pulmonar.....	39
2.2.2.1	Desequilíbrio Protease <i>versus</i> Antiprotease.....	39
2.2.2.2	Estresse Oxidativo.....	41
2.2.2.3	Apoptose.....	43
2.2.3	Aspectos gerais no tratamento do enfisema.....	44
2.3	Recursos vegetais como fonte de medicamentos.....	47
3	OBJETIVOS.....	51
3.1	Objetivo geral.....	51
3.2	Objetivo específicos.....	51
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1	Reagentes e soluções.....	52
4.2	Animais.....	52
4.2.1	Delineamento experimental - Modelo de enfisema.....	53
4.2.2	Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA).....	53
4.2.3	Análise histológica do pulmão.....	54
4.2.4	Quantificação de mediadores da resposta inflamatória no LBA e pulmões.....	56
4.2.5.	Avaliação da toxicidade do cinamato de metila sobre o peso corporal dos animais.....	56
4.2.6	Avaliação da toxicidade do cinamato de metila sobre o peso relativo dos órgãos.....	57

4.3	Cultura celular	57
4.3.1	Avaliação da viabilidade celular	57
4.3.2	Quantificação de mediadores da resposta inflamatória do sobrenadante de células A549, estimuladas com TNF α e tratadas com cinamato de metila.....	59
4.3.3	Quantificação das espécies reativas.....	59
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5	RESULTADOS	61
5.1	Modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos.....	61
5.2	Efeito do cinamato de metila sobre a inflamação das vias aéreas de camundongos com enfisema pulmonar induzido por elastase.....	61
5.3	Avaliação do efeito do cinamato de metila sobre os níveis de mediadores inflamatórios no pulmão de animais com enfisema induzido por elastase	62
5.4	Avaliação do efeito do cinamato de metila sobre a estrutura do tecido pulmonar de camundongos com enfisema induzido por elastase.....	64
5.5	Avaliação do efeito do cinamato de metila sobre a deposição de matriz extracelular peribronquiolar em camundongos com enfisema induzido por elastase.....	67
5.6	Efeito do cinamato de metila sobre as alterações sistêmicas induzidas pela condição enfisematosa nos camundongos.....	69
5.7	Efeito do cinamato de metila sobre a viabilidade de células epiteliais alveolares.....	73
5.8	Efeito do cinamato de metila sobre a produção de citocinas IL-6, IL-1β e IL-10 em células a549 estimuladas com TNF-α....	74
5.9	Efeito do cinamato de metila sobre a geração de espécies reativas de oxigênio	76
6	DISCUSSÃO	77

7	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXO A	101

1 INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença grave responsável por elevada morbidade na população, e se mantém como uma das principais causas de morte em muitos países, fazendo com que ocupe o terceiro lugar de causas de morte no mundo. No Brasil é estimado que ocorram cerca de 40 mil mortes por ano em decorrência da DPOC (THEODORO-JÚNIOR et al., 2017; GOLD, 2019; BARNES, 2019).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a DPOC como uma doença evitável, causada pela exposição a partículas sólidas ou gases nocivos que induzem alterações respiratórias persistentes, lentamente progressivas e que envolve limitação ao fluxo de ar nos pulmões (OMS, 2008). O hábito de fumar é um fator de risco primário para esta doença, visto que a exposição prolongada a fumaça de cigarro provoca inflamação das vias aéreas (bronquiolite obstrutiva) e destruição das estruturas alveolares (enfisema pulmonar), o que ocasiona o aumento do espaço aéreo e comprometimento das trocas gasosas (JOBSE et al., 2014; GOLD, 2019). Assim, o enfisema ocasiona a perda da superfície respiratória e da irrigação sanguínea, diminuição da elasticidade tecidual e da hiperextensão pulmonar, que culminam com a insuficiência respiratória crônica (ROULET et al., 2012; THEODORO-JÚNIOR et al., 2017).

Mesmo com todo avanço na atenção e cuidado aos pacientes com DPOC, a elevada morbidade de pacientes em todo o mundo ainda persiste, o que reforça a necessidade de se dispor de tratamentos farmacológicos eficazes para impedir a progressão da lesão pulmonar (THEODORO-JÚNIOR et al., 2017).

Atualmente, a abordagem terapêutica proposta para indivíduos afetados por DPOC tem por base a redução de fatores de risco, monitoramento da doença e controle das exacerbações. Sendo assim, objetiva-se a melhoria sintomática da obstrução do fluxo aéreo, sendo geralmente prescritos antagonistas muscarínicos, agonistas β -2 adrenérgicos e inibidores da fosfodiesterase-4 (PDE4) (TAKATA et al., 2015), tendo no roflumilaste, um inibidor da PDE4, eficácia anti-inflamatória significativa, porém com utilização restrita ao tratamento de estágios graves da DPOC associado a frequentes históricos de exacerbações (WEDZICHA et al., 2016).

Muitas são as reações adversas observadas nos pacientes durante os tratamentos farmacológicos a exemplo de dores de cabeça, tremores e agitação (HAN et al., 2009). Em razão disso, ainda se faz necessário a disponibilidade de novas terapias farmacológicas capazes de melhorar a condição clínica do paciente e que não induzam tantos efeitos adversos associados ao uso.

Dentre as inúmeras possibilidades para a identificação e desenvolvimento de novos fármacos, a biodiversidade ainda permanece como uma relevante opção para identificar substâncias químicas com potencial terapêutico (GAMES et al., 2016).

O cinamato de metila (CM) é um fenilpropanoide derivado do ácido cinâmico, encontrado em diversas plantas, frutas e cereais, sendo descrito como detentor de distintas atividades farmacológicas, tais como: antioxidante (MURAKAMI et al., 2018), anti-inflamatória (MURAKAMI et al., 2018), antimicrobiana (CHEN et al., 2012), antifúngica (DE VITA et al., 2016), vasodilatador (NUNES et al., 2017), antiespasmódico (LIMA et al., 2014) e outras. No entanto, até o momento não foram encontrados registros de estudos que tenham avaliado seu potencial em tratar doenças pulmonares de base inflamatória, tal como o enfisema pulmonar.

Cabe destacar que vários modelos animais vêm sendo extensamente utilizados para o melhor entendimento dos diversos mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao desenvolvimento de doenças inflamatórias, a exemplo: inalação de fumaça de cigarro e instilação de enzimas elastolíticas (elastase pancreática porcina, papaína ou elastase neutrofílica humana) (HENRIQUES et al., 2016).

O modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongo, é um modelo exequível em um curto período de tempo, econômico e que permite reproduzir fenômenos característicos da doença em humanos, como a inflamação local e o aumento do espaço aéreo pulmonar (ROULET et al., 2012; SZABARI et al., 2015).

Assim, partindo dos efeitos já atribuídos ao cinamato de metila por estudos prévios, avaliou-se o tratamento curativo com cinamato de metila (iniciado após a instalação do quadro enfisematoso), o que seria válido por mimetizar um cenário clínico, ou seja, o momento onde pacientes com a doença estabelecida procuram atendimento clínico. Tendo por base as informações apresentadas, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do cinamato de metila

no enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos, e com isso caracterizar seus efeitos sobre a inflamação e o remodelamento tecidual no enfisema pulmonar.

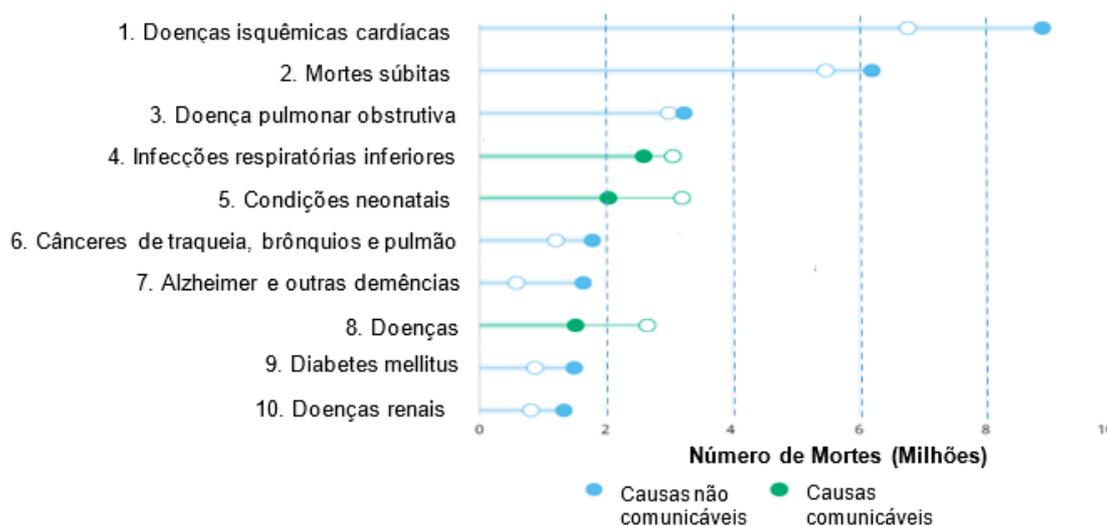
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica

2.1.1 Dados epidemiológicos

Doenças respiratórias são umas das principais causas de morte em todo o mundo (ANTUNES et al., 2014). Figurando em terceiro lugar dentre as dez doenças que mais matam mundialmente, ficando atrás apenas das doenças cardíacas isquêmicas e do acidente vascular encefálico (Figura 1), doença pulmonar obstrutiva crônica acomete mais de 300 milhões de pessoas em todos os continentes (BARNES, 2019). A DPOC é uma doença grave, de evolução lenta e progressiva, e não há até o momento um tratamento farmacológico disponível para combater sua etiologia ou impedir sua evolução (GAMES et al., 2016; BARNES, 2019).

Figura 1 – Ranking das 10 primeiras causas de morte no mundo, 2019.



Fonte: OMS, 2020.

A DPOC acarreta elevados custos para a saúde pública, podendo gerar perda significativa da capacidade produtiva, com conseqüente comprometimento econômico e social, bem como redução da qualidade de vida dos pacientes acometidos (GOLD, 2019).

Segundo dados da OMS, somente no ano de 2019, a DPOC causou em média o óbito de uma pessoa a cada 10 segundos. Projeta-se que o número de acometidos por esta doença aumente nas próximas décadas, em virtude do envelhecimento populacional e da exposição contínua a fatores de risco, fatos que levaram a OMS decretar a DPOC como epidemia (OMS, 2019). Neste cenário, mais de 4,5 milhões de mortes por DPOC e outras condições relacionadas são esperadas até o final desta década (GOLD, 2019). Estima-se ainda, que as mortes relacionadas ao tabagismo aumentem para 8,3 milhões por ano até 2030, destas, mais de 7 milhões por uso direto e aproximadamente 1,2 milhão de fumantes passivos (BRASIL, 2021).

De acordo com os critérios estabelecidos no *Disability-Adjusted Life Year* (DALY), ou “Esperança de Vida Corrigida pela Incapacidade”, que é um indicador usado pela OMS para estimar a expectativa de vida da população, a DPOC tem impacto negativo para o paciente. De acordo com este indicador, a relação de anos perdidos tanto pelas mortes prematuras, quanto de anos vividos com incapacidade equivale a perda de um ano de vida saudável, o que representa a denominação de 1 DALY (OMS, 2019).

Nesta perspectiva, a DPOC ocupou o sétimo maior DALY mundial no ano de 2019 dentre todas as classificações: doenças comunicáveis, materno-infantil e condições nutricionais; doenças não comunicáveis e injúrias acidentais; atingindo a quinta posição ao avaliar apenas as doenças sem causas notificáveis, gerando custos estimados entre US\$ 1.000 e 4.000/paciente/ano (RABAHI, 2013; OMS, 2019).

As doenças respiratórias representam um impacto negativo crescente na economia e nos serviços de saúde pelo mundo (BARNES et al., 2015). Na Europa, na última década, foram registrados mais de 600.000 mortes/ano e cerca de seis milhões de internações hospitalares, resultando num custo superior a 38,6 bilhões de euros por ano. Nos Estados Unidos, há custos estimados de 32 bilhões, somados a 20,4 bilhões de dólares em custos indiretos para estes tratamentos (GOLD, 2019).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), no Brasil aproximadamente 8 milhões de pessoas são portadoras de algum tipo de doença pulmonar obstrutiva (OPAS, 2014), segundo dados do DATASUS, a cada hora três brasileiros morrem em decorrência desta doença (BRASIL, 2020).

Apesar da pronunciada redução no número de internações hospitalares (cerca de 41%) e óbitos (cerca de 28%) relacionados a doenças pulmonares nos últimos cinco anos, entre 2016 e 2020, o número de pacientes afetados por estas doenças ainda permanecem elevados, e oneram financeiramente o Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro (BRASIL, 2021). Além disso, em todo Brasil o número de internações, a taxa de mortalidade e os gastos financeiros correspondem a índices elevados quando comparados ao total de casos das doenças do aparelho respiratório (Tabela 1).

Tabela 1 - Indicadores relacionados a bronquite, enfisema e outras doenças pulmonares obstrutivas crônicas em indivíduos atendidos pelo SUS no Brasil entre os anos de 2009 e 2020.

Região	Número de Internações	Número de óbitos	Taxa de mortalidade	Custo (R\$)
Norte	82.973	4.944	5,96	58.002.122,94
Nordeste	269.939	17.006	6,30	206.406.444,32
Sudeste	492.947	42.208	8,56	484.616.377,79
Sul	483.914	27.581	5,70	361.754.922,51
Centro-Oeste	127.135	7.003	5,51	91.588.857,63
Brasil	1.456.908	98.742	6,78	1.202.388.725,19

Fonte: BRASIL, 2021.

Doenças relacionadas ao aparelho respiratório foram responsáveis por um por cento de mais de um bilhão de reais no ano de 2019 quando se observa os valores totais de atendimentos eletivos e de urgência pelos sistemas de saúde públicos e privados. Cabe destacar que, deste montante, 99.976.902,11 milhões de reais foram para custear atendimentos de urgência com causas relacionadas a bronquite, enfisema e outras doenças pulmonares obstrutivas crônicas (BRASIL, 2019).

Destaca-se que, dentre os estados da região Nordeste, Alagoas ocupa a terceira posição no ranking em relação a taxa de mortalidade, ficando atrás apenas dos estados de Sergipe e do Rio Grande do Norte (Tabela 2, pág. 23); em se tratando do ranking nacional, Alagoas desponta em quinto lugar dentre as

27 unidades da federação. Isto pode ser em parte atribuído a uma atividade muito difundida no estado, a da colheita da cana de açúcar, na qual utilizam a queima da palha para facilitar o corte (ARBEX et al., 2000), no entanto, esta prática expõe diretamente muitos trabalhadores a inalação de gases e materiais particulados que podem afetar as vias aéreas e ocasionar sintomas respiratórios persistentes (PRADO et al, 2012), prejuízos no transporte mucociliar (FERREIRA-CECCATO, et al. 2011) e conseqüentemente, na função pulmonar (PRADO et al, 2012).

Tabela 2 - Indicadores relacionados a bronquite, enfisema e outras doenças pulmonares obstrutivas crônicas em indivíduos atendidos pelo SUS nos Estados da Região Nordeste entre os anos de 2009 e 2020.

Estados	Número de Internações	Número de óbitos	Taxa de mortalidade	Valor total gasto (R\$)
Maranhão	30.591	1.050	3,43	17.941.493,51
Piauí	14.060	642	4,57	8.168.758,54
Ceará	42.996	2.186	5,08	31.457.824,73
Rio Grande do Norte	6.592	803	12,18	5.868.695,97
Paraíba	30.965	1.683	5,44	21.684.386,58
Pernambuco	44.674	3.420	7,66	51.379.788,56
Alagoas	9.800	1.119	11,42	8.901.570,01
Sergipe	4.290	669	15,59	4.017.223,05
Bahia	85.971	5.434	6,32	56.886.703,37
Total	269.939	17.006	6,30	206.406.444,32

FONTE: BRASIL, 2021.

2.1.2 Estrutura pulmonar

O sistema respiratório pode ser dividido em porção de condução formada pelas cavidades nasais, a faringe, a laringe, a traqueia, os brônquios e os bronquíolos e porção respiratória que consiste nos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos, sendo esta porção localizada no interior do tecido pulmonar (OVALLE; NAHIRNEY, 2008).

Os pulmões são distintos, sendo o pulmão direito maior que o esquerdo, e constituído por três lobos e duas fissuras, oblíqua e horizontal, enquanto que o pulmão esquerdo possui dois lobos e somente uma fissura oblíqua (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Os pulmões são órgãos macios, possuem estrutura tridimensional complexa, da qual participa a traqueia que proporciona uma comunicação contínua até os alvéolos, sendo todo comprimento percorrido por fibras elásticas que permitem que as vias aéreas se expandam (CRAIG; SCOTT; MITZNER, 2016).

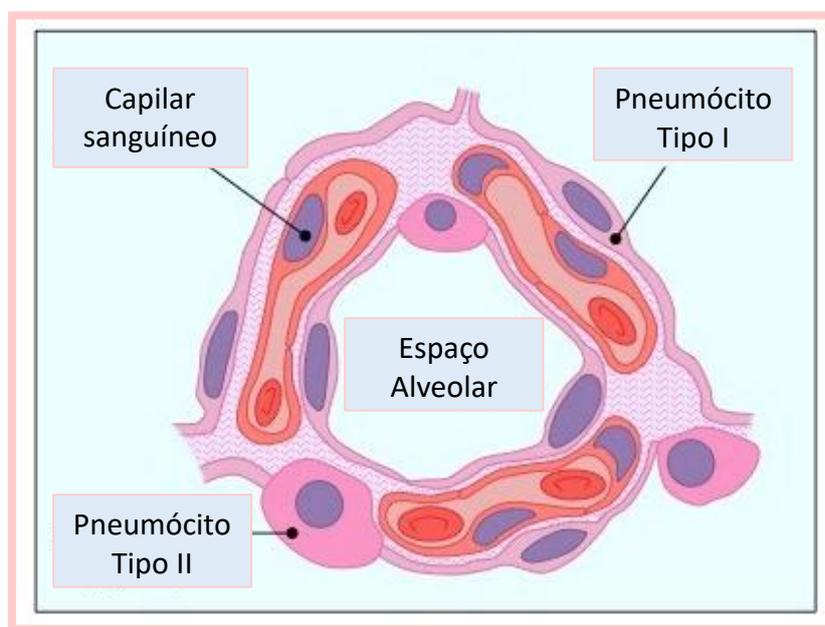
A estrutura pulmonar é composta por milhões de alvéolos, os quais representam 99% da área da superfície do pulmão. Este órgão é responsável por executar as trocas gasosas de maneira rápida e eficiente necessária para a manutenção do organismo (PERES-GIL, 2008; HSIA et al., 2010).

A superfície pulmonar possui a mais ampla interação direta com o ambiente externo. Diariamente efetuamos trocas de um volume aproximado de 10 a 12 mil litros de ar com o ambiente. Na inspiração, a superfície pulmonar pode chegar a aproximadamente 150 m², sendo possível em virtude da miniaturização de componentes alveolares, os quais são semelhantes a bolhas, em número de aproximadamente 500 milhões em um pulmão maduro (GUILLOT et al., 2013). O ar e o sangue devem estar próximos em escala de micrômetros, uma vez que, o pulmão deve atender às necessidades de oxigênio de todo o corpo (HSIA et al., 2010).

A organização anatômica do pulmão permite que capilares sanguíneos permeiem septos alveolares, o que proporciona que cada vaso sanguíneo tenha contato com dois alvéolos, uma de cada lado do septo, desta maneira, o sangue é espalhado sobre uma grande superfície alveolar, na qual, um mínimo de tecido forma uma barreira ar-sangue, permitindo elevada eficiência nas trocas gasosas (HSIA et al., 2010; GUILLOT et al., 2013).

O epitélio alveolar maduro é composto por células epiteliais alveolares, comumente denominadas pneumócitos, e podem ser classificadas em tipos I e II. Os pneumócitos tipo I perfazem aproximadamente 96% da superfície pulmonar, caracterizados por serem células planas, presentes nas superfícies finas dos alvéolos encontrados predominantemente sobre os capilares. As células tipo II correspondem a aproximadamente 4% da superfície pulmonar, são células maiores, cuboides, possuem corpos lamelares e microvilosidades apicais (Figura 2). As características morfológicas do epitélio alveolar permitem que o mesmo seja comprimido em uma camada plana de tecido (MASON, 2006).

Figura 2 – Organização anatômica: capilares sanguíneos e alvéolo pulmonar.



Fonte: CORNELL, 2016.

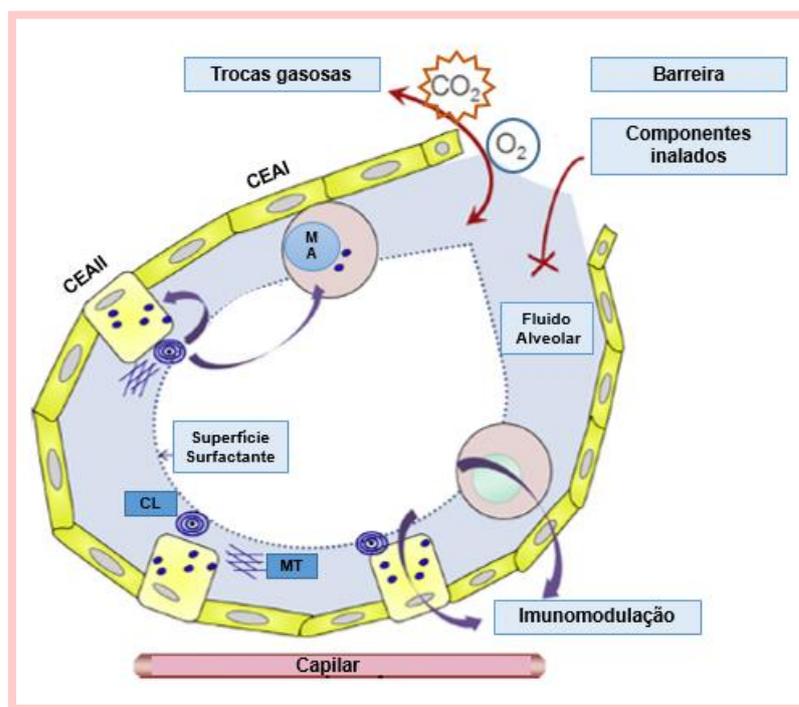
Para o adequado desempenho das funcionalidades dos alvéolos é necessário um contexto apropriado que se faz através de uma interface dinâmica composta por superfície surfactante (lipídios - 90% e proteínas -10%), fluido alveolar e ambiente (AGASSANDIAN; MALLAMPALLI, 2013).

O epitélio alveolar é uma estrutura celular essencial para a difusão de oxigênio e dióxido de carbono. Para efetuar adequadamente estas trocas gasosas, o pulmão precisa manter uma interface adaptável e dinâmica efetiva, capaz de responder a uma constante e diversificada exposição a estímulos químico, particulado e microbiano provenientes do ambiente. Normalmente

essas exposições não acarretam danos ao órgão, entretanto, alguns fatores exógenos podem oferecer níveis suficientes de perigo que justificam a ativação da resposta imune do indivíduo (GUILLOT et al., 2013; CRAIG; SCOTT; MITZNER, 2016).

O epitélio pulmonar também funciona como uma barreira física entre o lúmen e a submucosa subjacente, limitando o tecido de agentes exógenos. Essa função é determinada pelo fluido de revestimento alveolar, que é originado a partir da infiltração de componentes sanguíneos no espaço alveolar, e tem a secreção regulada pelo gradiente de pressão. Em condições fisiológicas normais, o epitélio pulmonar limita a difusão do soluto, permitindo, desta maneira, que os alvéolos permaneçam relativamente secos (Figura 3) (GUILLOT et al., 2013).

Figura 3 - Células alveolares e homeostase pulmonar.



Na imagem observa-se a composição de um alvéolo pulmonar e interfaces estruturais e funcionais. Legenda: CEA I e II: Célula Epitelial Alveolar do tipo I e II; MA: Macrófagos Alveolares; CL: Corpos Lamelares; MT: Mielina Tubular. Fonte: Adaptado de GUILLOT et al., 2013.

As células pulmonares secretam substâncias antimicrobianas, enzimáticas, imunoglobulina A e muco, que conjuntamente, protegem e limitam o contato com o epitélio, apreendem partículas e microrganismos, os conduzindo a depuração mucociliar. Assim quando ocorre de antígenos atingirem os tecidos alveolares, estes em sua maioria, são eliminados por macrófagos e células dendríticas ou são transportados via vasos linfáticos para linfonodos de drenagem pulmonar (HASENBERG et al., 2013).

O conjunto formado pelas barreiras biofísicas e as defesas moleculares do pulmão é capaz de manter a eficiência da condução de ar pelas vias aéreas e as superfícies de troca de gases. Este conjunto desempenha estratégias de defesa únicas que neutralizam eficientemente os estímulos ambientais diários que chegam até os pulmões de maneira a evitar o desenvolvimento de uma inflamação crônica nesse tecido (CRAIG; SCOTT; MITZNER, 2016). Além de todas as funcionalidades descritas anteriormente, o tecido epitelial das vias aéreas também funciona como um sensor local para detecção de condições de perigo à exposição ambiental, sendo capaz ainda de ativar e regular a resposta imune, mais um mecanismo de defesa que confere a boa funcionalidade do sistema respiratório (WEITNAUER et al., 2016).

2.1.3 Etiologia da DPOC

O tecido pulmonar possui competência para lidar contra diferentes agentes agressores reagindo rapidamente, reparando pequenos danos celulares e se adaptando a perdas limitadas em sua funcionalidade. Entretanto, a exposição crônica a certos estímulos nocivos incita um desequilíbrio a esta capacidade de regulação, de modo que as células e os tecidos podem sofrer danos que não conseguem ser reparados adequadamente, podendo ocasionar uma perda duradoura e até permanente da função pulmonar (CRAIG; SCOTT; MITZNER, 2016).

As doenças inflamatórias pulmonares crônicas geralmente são originadas quando mecanismos reguladores falham ao tentar inibir respostas ocasionadas por traumas físicos repetitivos e/ou exposição persistente a agentes exógenos. A interrupção do equilíbrio (estímulo ambiental *versus* resposta tecidual) determina a natureza, a intensidade e a duração da inflamação, sendo causa

subjacente de muitas doenças pulmonares persistentes de diferentes magnitudes, desde leves a extremamente graves, podendo acarretar consequências devastadoras à funcionalidade desse sistema (CRAIG; SCOTT; MITZNER, 2016; AGGARWAL et al., 2018).

A DPOC abrange variados graus de bronquite crônica, de enfisema pulmonar e de remodelamento de pequenas vias aéreas, decorrendo principalmente da inalação prolongada de agentes nocivos, tais como gases e partículas tóxicas (GOLD, 2019). É de conhecimento que o hábito de fumar assumiu proporções de pandemia no último século, no qual vem sendo considerada pela OMS a principal causa de morte evitável no mundo (JOSE et al., 2017).

O histórico de tabagismo (dose cumulativa de pelo menos 20 unidades/ano) mostra-se como o mais importante fator de predisposição a DPOC. Além do tabagismo, o fator genético de deficiência de α -1 antitripsina (α 1-AT) também é incluído como fator de risco para a DPOC, porém esta condição apresenta um menor impacto quando comparado aos fatores ocupacionais, tais como a queima de combustíveis/biomassa e os poluentes gerados pela construção civil (Figura 4, pág. 29) (GOLD, 2019). A influência destes fatores associados com o aumento da expectativa de vida, fizeram com que a OMS considerasse a DPOC uma epidemia (ANTUNES; ROCCO, 2011; KIM et al., 2015).

Figura 4 – Fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC.

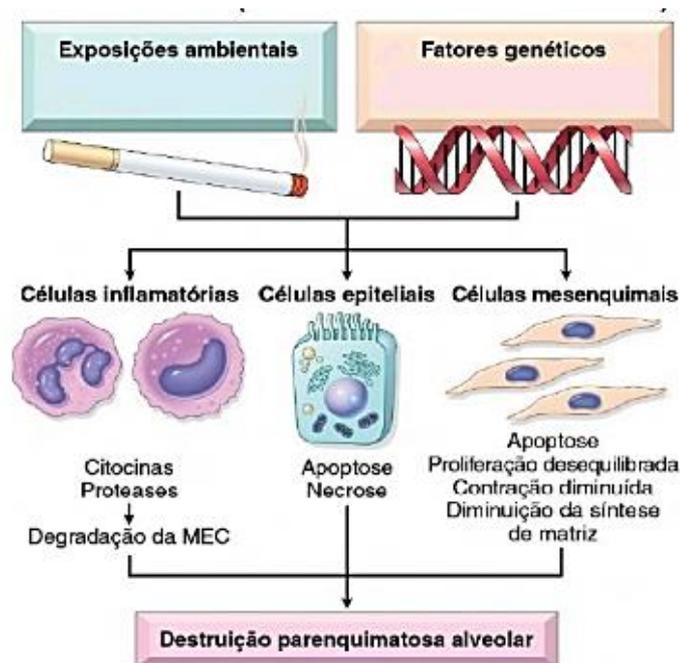


Fonte: Adaptado OMS, 2008.

No caso do tabagismo, a inalação da fumaça decorrente da combustão do cigarro induz uma hiperplasia e hipertrofia das glândulas secretórias das vias aéreas, além de aumentar a secreção de muco, características associadas a bronquite crônica, promover uma maior deposição de colágeno peribronquiolar e enfisema, que são fenótipos típicos da DPOC (AGGARWAL et al., 2018; GOLD, 2019; YAMASHITA et al., 2019).

A inalação crônica da mistura de aproximadamente 5.000 substâncias químicas complexas encontradas na fumaça do cigarro, bem como de uma elevada carga ambiental inalatória de diferentes espécies reativas de oxigênio, induz a inflamação e promovem desequilíbrios no metabolismo oxidativo e de enzimas (protease *versus* antiprotease), e ainda, desencadeiam mecanismos de morte celular nas células dos pulmões (Figura 5, pág. 30) (HENSON et al. 2006; GRABIEC; HUSSELL, 2016; BARROSO et al., 2017).

Figura 5 - Fatores importantes na etiologia da DPOC.



Fonte: MOLETA, 2017.

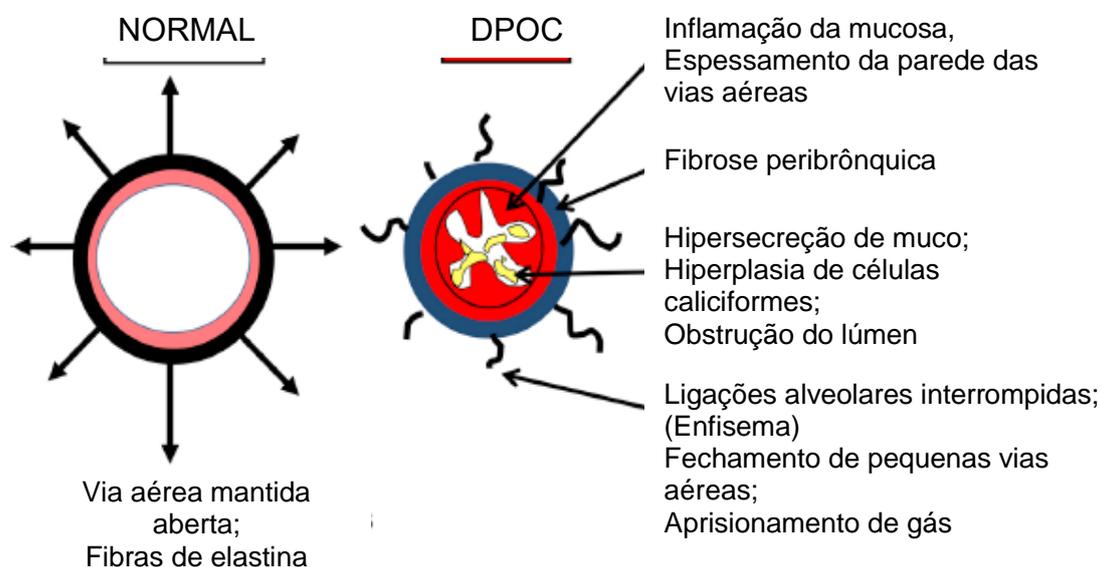
O desenvolvimento da DPOC, está relacionado, normalmente, a três tipos gerais de lesões: i) inflamação e fibrose das pequenas vias aéreas, ii) hiperplasia das glândulas mucosas e iii) enfisema. Estas lesões ocorrem geralmente em associação com comorbidades, a exemplo das doenças cardiovasculares e metabólicas, enfermidades estas que precisam ser levadas em consideração, principalmente, na progressão da doença (SENIOR, ANTHONISEN, 1998; BARNES, 2013).

A DPOC envolve inflamação crônica complexa que afeta, predominantemente, as vias aéreas periféricas e parênquima pulmonar. A instalação desta inflamação induz a um processo de lesão e reparo repetitivo, originando alterações na estrutura das vias aéreas pulmonares, processos estes que se autoperpetuam mesmo após o estímulo que desencadeou tais alterações, como a cessação do hábito tabagista, o que indica que a manutenção da inflamação é sustentada por mecanismos autônomos, ocasionando danos contínuos aos pulmões (GOLD, 2019; YAMASHITA et al., 2019).

A inalação de substâncias irritantes induz na mucosa respiratória uma redução na expressão/atividade da histona desacetilase 2 (HDAC2) nos pulmões e aumento do número de células envolvidas na patogênese da DPOC, como

macrófagos e células epiteliais, que resultam no aumento da expressão e ativação persistente de genes pró-inflamatórios (BARNES, 2013). Neste contexto, o parênquima pulmonar e a matriz extracelular estão alterados, em virtude de danos ocasionados por níveis aumentados de enzimas elastolíticas e do estresse oxidativo, fenômenos estes que afetam a mecânica das vias aéreas (DIJK et al., 2017). Por fim, a elastólise pode levar a perda de anexos alveolares, da elasticidade e, com isso, promover a distorção e estreitamento progressivo das vias aéreas (Figura 6) (SHAPIRO; INGENITO, 2005).

Figura 6 - Mecanismos de estreitamento de pequenas vias aéreas.



Fonte: BARNES, 2019.

Mesmo na forma menos grave da doença, há obstrução e perda de pequenas vias aéreas. A inflamação destas vias origina danos estruturais na parede alveolar, acarretando a perda dos ácinos distais (CRAIG; SCOTT; MITZNER, 2016). Com seus fechamentos, uma porção significativa do pulmão é bloqueada, entretanto, o volume de ar inspirado permanece inalterado, sendo assim, um pulmão menor recebe o mesmo volume de ar corrente, sobrecarregando-o (ITO et al., 2005).

A fibrose peribrônquica nas pequenas vias aéreas é um importante indicador da progressão da doença. Presume-se ser em consequência da

inflamação crônica persistente, através da ativação de fibroblastos por meio de mediadores fibrogênicos, como fator de crescimento transformador β (TGF- β) e endotelina, secretados por células epiteliais e macrófagos (BARNES, 2013).

No aspecto clínico, a progressão da DPOC proporciona limitação do fluxo de ar expiratório, levando a dispneia ao esforço, tosse crônica e enfisema. Em geral, estes sintomas coexistem, o que dificulta o diagnóstico clínico para diferenciar os fenótipos da DPOC, como a bronquite e o enfisema pulmonar, fazendo-se necessário exames de imagem tomografia computadorizada (TC) e raio X, testes de função pulmonar (oximetria e espirometria), e laboratoriais (hemograma e dosagem de alfa-1 antitripsina) (BRASIL, 2013; GOLD, 2019; YAMASHITA et al., 2019).

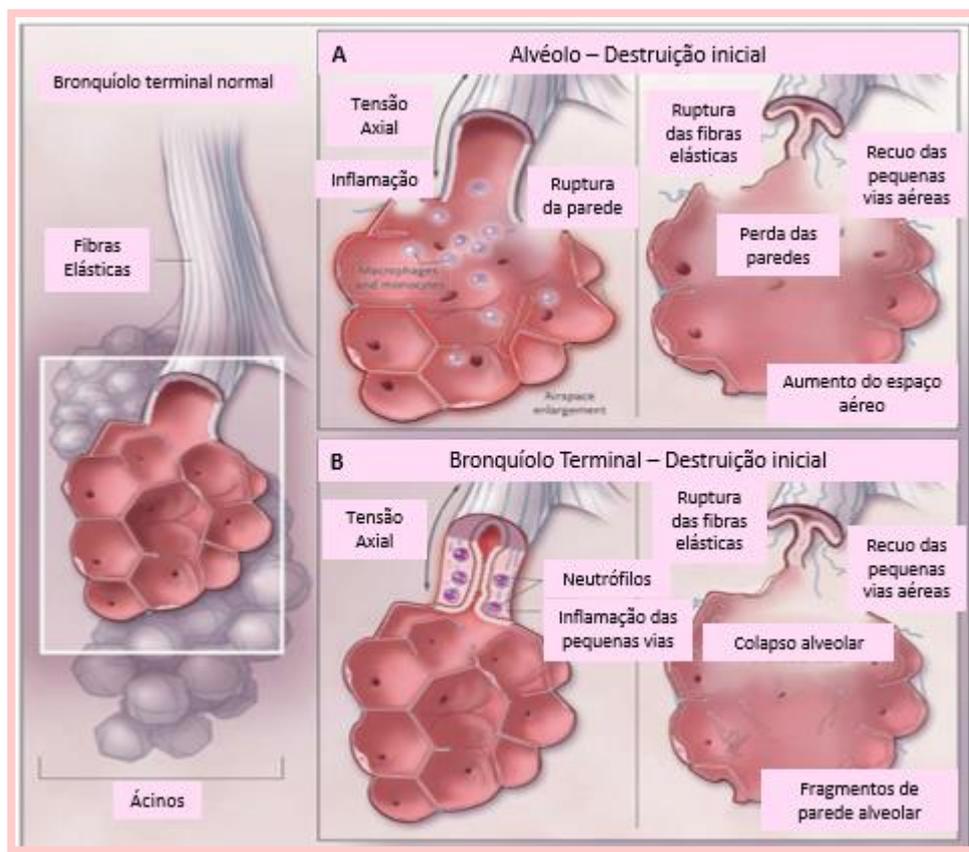
A manifestação clínica do enfisema pulmonar é bastante heterogênea, em razão disso, preconiza-se a realização de exames de imagem para diagnóstico, a exemplo do raio X de tórax, para avaliar nódulos pulmonares e ocorrência de bolhas enfisematosas, hipertransparência pulmonar e rebaixamento do diafragma. Considerando a característica progressiva da doença, é necessário realizar uma avaliação pulmonar periódica para monitorar a evolução da doença (PAMPLONA; MENDES, 2009).

As manifestações clínicas extrapulmonares são também observadas na progressão da DPOC, muito possivelmente em razão da presença de comorbidades no indivíduo que refletem manifestações sistêmicas, como perda de peso, disfunção musculoesquelética, além de aumento do risco de desenvolver outras doenças, como câncer de pulmão (GOLD, 2019; YAMASHITA et al., 2019).

2.2 Enfisema pulmonar

Tratado como um fenótipo da DPOC, o enfisema pulmonar é caracterizado como aumento anormal, progressivo e permanente dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais, denominados ácinos, com consequente destruição de paredes alveolares e obstrução de pequenas vias aéreas, sem fibrose evidente, refletindo em perda da superfície respiratória do recuo elástico e hiperexpansão pulmonar (Figura 7, pág. 33) (SENIOR; ANTHONISEN, 1998; DI PETTA, 2010).

Figura 7 – Aumento do espaço aéreo parenquimal no enfisema pulmonar.



Fonte: CRAIG; SCOTT; MITZNER, 2016.

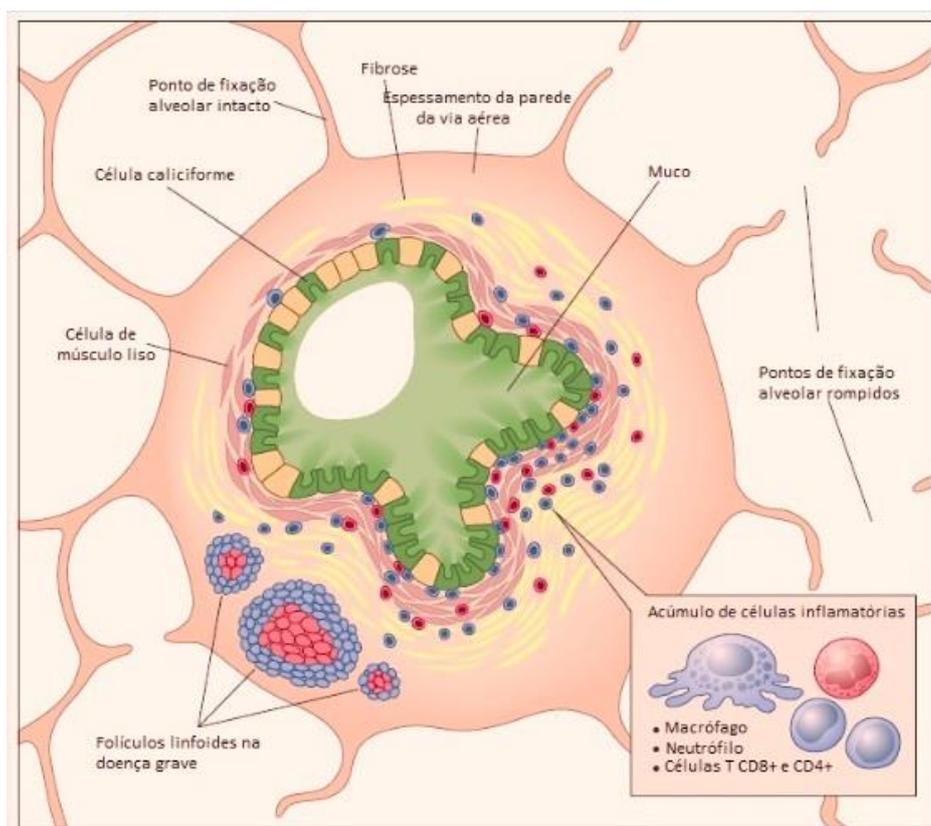
Frequentemente o enfisema é induzido por estresse oxidativo e resposta inflamatória resultante do desequilíbrio enzimático entre proteases e antiproteases, que por sua vez, levam a destruição tecidual, perda da capacidade de difusão, ventilação colateral, sua característica marcante (fluxo de ar exacerbado entre alvéolos comunicantes) e insuficiência respiratória crônica (KUHLE et al., 2014; TAGUCHI et al., 2015; TRAJANO et al., 2016).

Além dos fatores diversos de indução ao enfisema pulmonar, também devem ser considerados fenômenos celulares, moleculares e autoimunes, os quais, em conjunto ou isoladamente, contribuem para a compreensão da fisiopatologia da doença (DI PETTA, 2010). Dentre as alterações evidenciadas nas vias aéreas durante instalação do processo enfisematoso, é possível destacar: i) inflamação das vias aéreas que induz destruição da parede alveolar e regeneração prejudicada que culmina com deformação do lúmen aéreo; ii) fibrose e hipertrofia da musculatura lisa com espessamento das paredes

pulmonares e obstrução do lúmen; iii) metaplasia e hiperplasia das células caliciformes, que secretam elevada quantidade de muco que obstruem o lúmen aéreo, além de alterar a tensão superficial do fluido de revestimento das vias aéreas periféricas, facilitando o colapso das pequenas vias aéreas; iv) apoptose de células epiteliais e endoteliais (ANTUNES; ROCCO, 2011; KUHL et al., 2014; BARNES, 2019).

Em resumo, estas alterações causam estreitamento luminal por excesso de secreção de muco, edema e infiltração de células inflamatórias; pode ocorrer fibrose; elastólise e destruição de pequenas vias aéreas contribuem diretamente para o aumento da resistência ao fluxo de ar (Figura 8) (SHAPIRO; INGENITO, 2005).

Figura 8 - Alterações fisiopatológicas na instalação do processo enfisematoso.



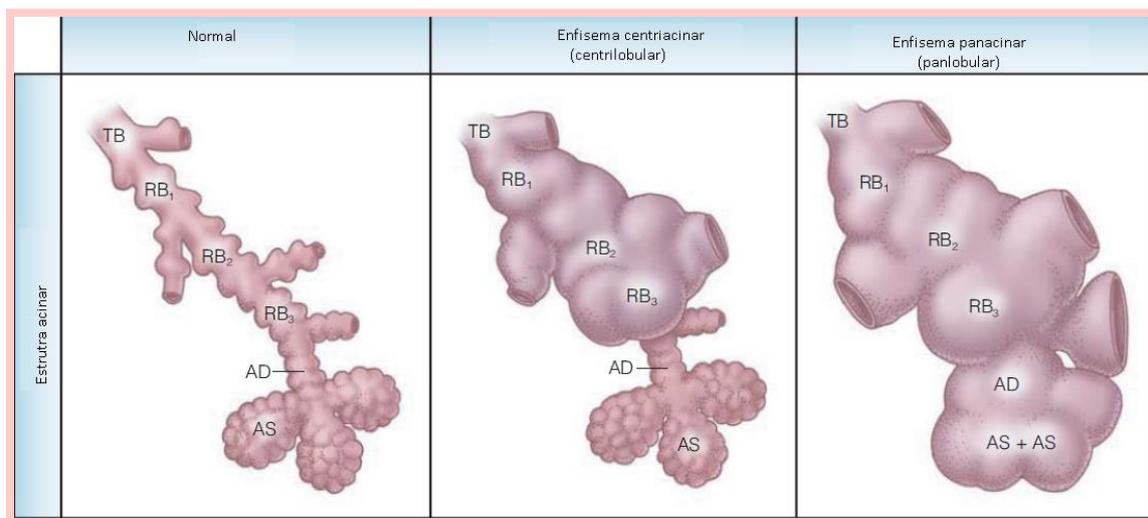
Fonte: SENIOR; SILVERMAN, 2011.

O enfisema pulmonar pode ser classificado como panlobular e centrolobular. No enfisema panlobular há destruição de toda a estrutura acinar, enquanto que no enfisema centrolobular nota-se a destruição de apenas uma

parte do tecido pulmonar. Essas alterações anatômicas podem indicar a etiologia e o comportamento fisiopatológico da doença (DI PETTA, 2010; KUHL et al., 2014).

O enfisema panlobular, ou também chamado de panacinar, exibe uma destruição uniforme das paredes alveolares, envolvendo predominantemente as bases pulmonares nos lobos inferiores com hipertransparência contínua, resultante da destruição dos lóbulos secundários, é característico de pacientes que desenvolveram a patologia precocemente na vida e em portadores de deficiência de alfa-1-antitripsina. O enfisema centrolobular, apresenta-se com dilatação e destruição restrita aos bronquíolos e centro dos ácinos pulmonares rodeados por parênquima normal, mais acentuado nos lobos superiores, sob a forma de múltiplas áreas pequenas e esféricas com maior extensão da inflamação das vias aéreas periféricas e associado tipicamente ao tabagismo (Figura 9) (HOGG; SENIOR, 2002; DI PETTA, 2010; CAMPOS, 2013).

Figura 9 – Bronquíolos: normal e enfisematosos centrolobular e panlobular.



Legenda: TB: Bronquíolo Terminal; RB: Bronquíolo Respiratório; AD: Ducto Alveolar; AS: Alvéolos. Fonte: SENIOR; SILVERMAN, 2011.

Tanto o enfisema panlobular quanto o centrolobular podem ser observados em indivíduos afetados por DPOC, destes, cerca de 25% são acometidos apenas por um tipo, em contrapartida, aproximadamente 50% dos indivíduos desenvolvem ambas as formas. Outro fator consiste na susceptibilidade genética do indivíduo, o que incluem pacientes com deficiência

da antiprotease α 1-AT responsável pela inibição de proteases, o que torna pacientes portadores desta deficiência propícios a desenvolver enfisema grave (DI PETTA, 2010).

A elastase produzida por neutrófilos e macrófagos e outras proteases elastolíticas, como a catepsina G, são apontadas como importantes causadoras de dano tecidual. A elastase de leucócitos induz apoptose, o que pode culminar com a destruição de septos alveolares e o desenvolvimento do enfisema pulmonar (AGGARWAL et al., 2018).

O enfisema se desenvolve em aproximadamente 15% a 20% dos tabagistas e 1% em não fumantes, com incidência equivalente entre homens e mulheres; uma vez que sua progressão é lenta, seu diagnóstico geralmente é mais tardio, predominantemente em pacientes na faixa etária superior aos 40 anos (GOLD, 2019; YAMASHITA et al., 2019; OMS, 2019).

2.2.1 Componentes envolvidos na resposta inflamatória no enfisema pulmonar

O tecido epitelial uma vez ativado por estímulos exógenos passa a sintetizar/secretar mediadores químicos capazes de iniciar e amplificar a resposta inflamatória (COSTA; RUFINO; LAPA E SILVA, 2009). Na inflamação há o envolvimento de diversas células como os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, que são ativados e amplificam a inflamação por secretarem outros mediadores químicos. O acúmulo destas células e seus mediadores no trato respiratório geram danos teciduais que acarretam o recrutamento de mais células inflamatórias, e com isso, há o estabelecimento da exacerbação do processo inflamatório (MONTUSCHI et al., 2000; GAMES et al., 2016).

As células epiteliais produzem mediadores pró-inflamatórios como citocinas, que são proteínas envolvidas na interação celular, que atuam em células-alvo de forma parácrina, endócrina e/ou autócrina (COSTA; RUFINO; LAPA E SILVA, 2009).

As citocinas são reguladores conhecidos da resposta inflamatória, elas podem amplificar ou suprimir a inflamação, sendo conhecidos como mediadores pró- ou anti-inflamatórios, como a interleucina-1beta (IL-1 β) e a interleucina-10 (IL-10), respectivamente. Há outros moduladores da inflamação produzidas

pelas células epiteliais, como os fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), que influenciam na proliferação de células estruturais como fibroblastos e células da musculatura lisa das vias aéreas. Já as quimiocinas, citocinas com papel quimioatraente, são capazes de recrutar eosinófilos, monócitos e linfócitos T para o pulmão durante as diferentes fases da DPOC (COSTA; RUFINO; LAPA E SILVA, 2009).

As citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias participam da fisiopatologia da DPOC, e reconhecidamente estão envolvidas na produção do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), IL-1 β , proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), além de fatores de crescimento que induzem alterações estruturais, como o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (TAGUCHI et al., 2015; GOLD, 2019).

Macrófagos são células de defesa envolvidas no desenvolvimento de diferentes doenças que afetam o sistema respiratório. Em pacientes portadores de enfisema pulmonar há um intenso acúmulo nos espaços alveolares, nas paredes das vias aéreas, no parênquima pulmonar, e em outros compartimentos pulmonares, o que pode ser explicado pelo aumento do tempo de permanência dos macrófagos no tecido pulmonar, bem como pelo aumento do recrutamento de suas células precursoras na circulação, os monócitos (CHRUSCIEL et al., 2016; GOLD, 2019).

O aumento no número de macrófagos demonstrou contribuir para gênese e progressão da doença, o que é explicado por possuírem a capacidade de secretar metaloproteinases (MMP-1, MMP-9 e MMP-12), que são enzimas que degradam proteínas de matriz extracelular e promovem o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão. Esta ação, facilita a infiltração leucocitária nos tecidos lesados o que acarreta na amplificação do perfil pró-inflamatório associado à DPOC. O número de macrófagos pode ser diretamente relacionado à gravidade da enfermidade (COSTA; RUFINO; LAPA E SILVA, 2009; DI PETTA, 2010).

Outra célula importante no desenvolvimento do enfisema são os neutrófilos, uma vez que o número desta célula se encontra aumentado no tecido pulmonar de pacientes com enfisema. Neste tecido, com a produção de fatores quimiotáticos como IL-8 e leucotrieno B₄ (LTB₄) por células residentes, o

acúmulo de neutrófilos favorece a secreção de oxidantes e proteases, contribuindo também para o desequilíbrio estabelecido entre proteases e antiproteases. Neutrófilos secretam MMP-9, catepsina G e elastase que são marcadores de lesão no enfisema, capazes de promover dano tecidual e, portanto, o número aumentado destas células nas vias aéreas pode indicar a gravidade da lesão na doença (Tabela 3) (COSTA; RUFINO; LAPA E SILVA, 2009; MORICHIKA et al., 2019). O papel da elastase de neutrófilos na patogênese do enfisema pode ser atribuído a sua capacidade de degradar a elastina nas fibras elásticas (HOGG; SENIOR, 2002).

Tabela 3 - Proteases envolvidas no desenvolvimento do DPOC.

Classe	Representantes	Origem	Papel no desenvolvimento do enfisema
Serinas	Elastase Proteinase 3 Catepsina G	Polimorfonucleares e Monócitos	Destruição do parênquima pulmonar
Cisteínas	Catepsina S Catepsina L	Macrófagos	Secreção de muco Degradação da matriz celular
Metaloproteínas	MMPs 1, 2, 9, 12 e 14	Macrófagos	Degradação das fibras colágenas e elásticas Secreção de muco

Fonte: THEODORO-JÚNIOR et al., 2017.

Outro fator relacionado com o dano tecidual são as MMPs, que estão envolvidas no remodelamento tecidual. Os macrófagos podem sintetizá-las, enquanto que, os neutrófilos que concluíram seu desenvolvimento na medula óssea não, mas carregam em seus grânulos MMP-8 (colagenase de neutrófilos) e MMP-9 (gelatinase B), que são prontamente liberadas quando estas células são ativadas; a MMP-1, normalmente é produzida por fibroblastos (HOGG; SENIOR, 2002). No enfisema, a expressão de MMP-9 e MMP-12 está aumentada, relacionadas não apenas a destruição de componentes da matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno tipo IV e elastina como também com o recrutamento de mais macrófagos (TAGUCHI et al., 2015; ALMEIDA-REIS et al., 2017).

O aumento da atividade elastolítica e da degradação das fibras de elastina culminam com a diminuição da parede torácica, complacência e expansão do alvéolo (PIERRE et al., 2019). A MMP-12 também estimula a secreção de TNF- α , o que intensifica a reação inflamatória (ABBOUD; VIMALANATHAN, 2008).

2.2.2 Mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão do enfisema pulmonar

Diferentes mecanismos participam da fisiopatologia do enfisema pulmonar, particularmente, o excesso da expressão/atividade de proteases no pulmão, devendo incluir também o progressivo processo inflamatório, com aumento da elastase neutrofílica e MMPs, as quais desenvolvem um papel crítico na instalação do quadro do enfisema, além do estresse oxidativo e apoptose (ROULET et al., 2012; ROBERTONI et al., 2015).

2.2.2.1 Desequilíbrio protease *versus* antiprotease

Descrito como o principal mecanismo para explicar a patogênese desta doença, o desequilíbrio entre enzimas proteases e antiproteases favorece a atividade proteolítica, sendo responsável pela destruição pulmonar e progressão do enfisema. De acordo com esta hipótese, a fumaça do cigarro, apontado como o principal agente causador desta enfermidade, induz inflamação e promove aumento dos números de macrófagos e neutrófilos no tecido pulmonar com conseqüente aumento da liberação, constante ou episódica, de proteases e espécies reativas de oxigênio (EROs) (THEODORO-JÚNIOR et al., 2017).

Os tabagistas têm acúmulo de macrófagos nos bronquíolos respiratórios, sendo este o local onde o enfisema normalmente começa (SENIOR, ANTHONISEN, 1998). Alguns mediadores pró-inflamatórios podem induzir a secreção de MMPs, sem induzir o aumento da secreção de seu Inibidor tecidual, TIMP, ocasionando um possível desequilíbrio protease-antiprotease (tabela 4, pág. 40) (ABBOUD; VIMALANATHAN, 2008).

Tabela 4 – Inibidores de proteases no pulmão.

Inibidor	Fonte Celular	Protease inibida
α 1-AT	Hepatócito, macrófago*	Serina
SLPI	Pneumócitos tipo II	Serina
α 2-macroglobulina	Hepatócitos, fibroblastos	Metaloproteinase serina e cisteína
TIMPS	Macrófagos, células do parênquima	Metaloproteinase
Cistatina C	Epitélio das grandes vias aéreas, macrófagos*	Cisteína

Legenda: α 1-AT: alfa-1 antitripsina; SLPI: Inibidor de protease secretado por leucócito; TIMPS: Inibidor tecidual de metaloproteinases.

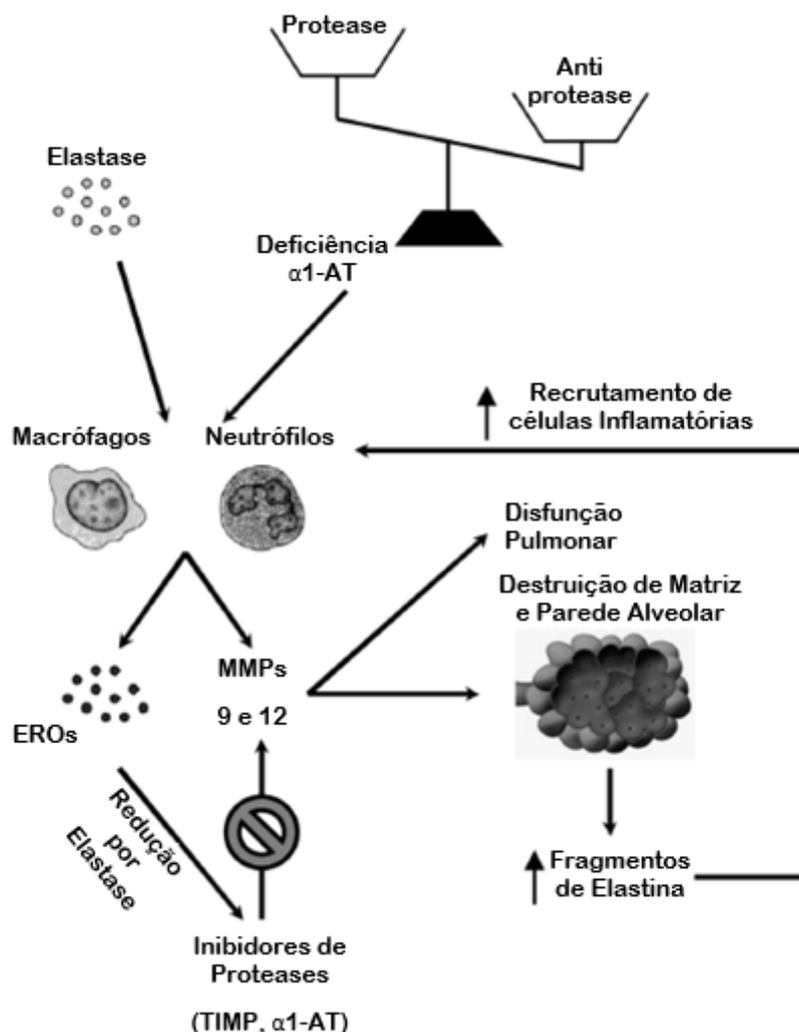
* Fontes celulares menores. Fonte: SENIOR, ANTHONISEN, 1998.

No enfisema, a elastase secretada por neutrófilos e macrófagos não é completamente inibida pelas antiproteases teciduais, o que leva a degradação de proteínas de sustentação da estrutura pulmonar, principalmente fibras colágenas e elásticas. Este desequilíbrio culmina com a destruição de fibras do parênquima pulmonar e promovem a perda da elasticidade do tecido (Figura 10, pág 41) (GAMES et al., 2016; THEODORO-JÚNIOR et al., 2017).

O processo de destruição e reparação tecidual em resposta a inflamação e estresse oxidativo resultam numa remodelação deficiente, caracterizada por aumento da deposição de colágeno anormalmente arranjado e ruptura das fibras elásticas que se desdobram e reorientam, comprometendo a mecânica pulmonar (COSTA; RUFINO; LAPA E SILVA, 2009; GAMES et al., 2016).

A destruição e o reparo do parênquima pulmonar ocorrem simultaneamente no enfisema, podendo, ao menos em parte, a destruição ser consequência de reparos equivocados (TAGUCHI et al., 2015).

Figura 10 – Mecanismo de recrutamento de células inflamatórias no desequilíbrio protease versus antiprotease no pulmão.

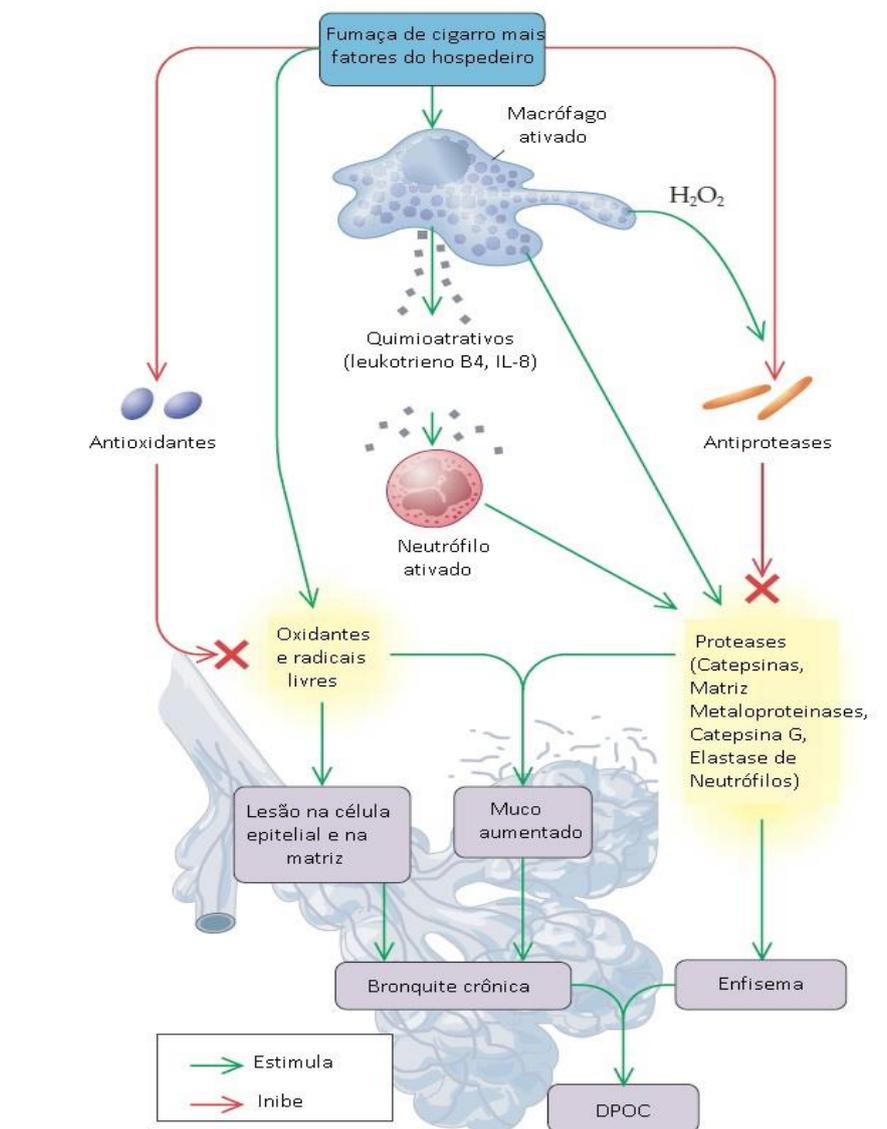


Fonte: ANTUNES E ROCCO, 2011.

2.2.2.2 Estresse oxidativo

Está bem consolidado que o hábito tabagista é responsável por induzir um aumento na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) nas vias aéreas quando comparado aos indivíduos não fumantes (HUSARI et al., 2016). No tabagismo a produção excessiva de EROs acarreta aumento da oxidação de antiproteases, o que ativa as MMPs, causando danos nas estruturas celulares e teciduais (Figura 11, pág. 42) (ANTUNES; ROCCO, 2011; BARNES, 2003).

Figura 11 – Processo enfisematoso por estresse oxidativo.



Fonte: SENIOR; SILVERMAN, 2011.

Estima-se que em cada sopro de fumaça de cigarro contenha cerca de 10^{15} radicais livres que são capazes de destruir antioxidantes endógenos, o que favorece o estresse oxidativo (BARNES, 2013). Apesar das EROs não degradarem diretamente a MEC, elas podem promover alterações em seus componentes, como na elastina, tornando-a mais suscetível à clivagem proteolítica o que contribui para o dano tecidual (SHAPIRO; INGENITO, 2005). Este mecanismo observado no enfisema se assemelha ao observado na senescência celular, uma vez que situações de estresse podem ocorrer gradualmente com a idade em decorrência do aumento dos níveis de

lipoperoxidação e de enzimas antioxidantes eritrocitárias, em detrimento a redução dos níveis plasmáticos de antioxidantes nutricionais (DI PETTA, 2010).

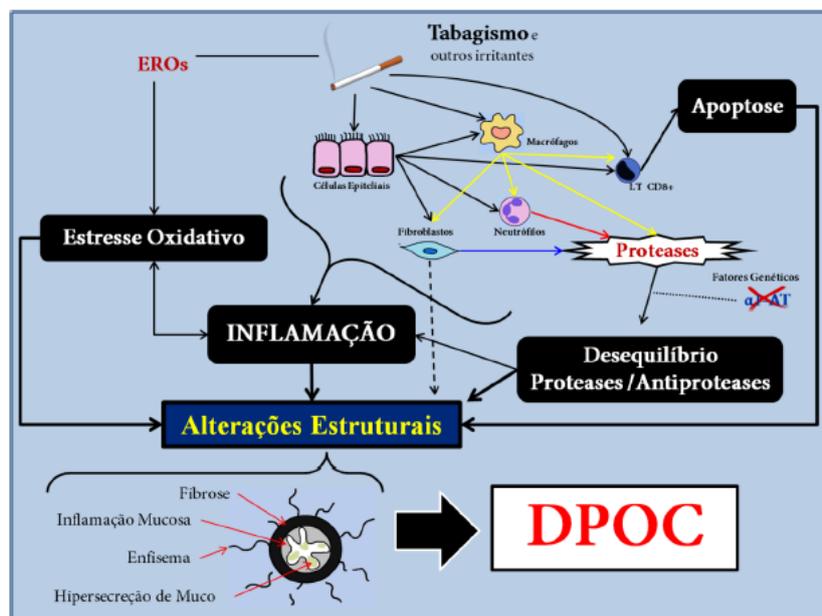
2.2.2.3 Apoptose

A exposição aos agentes nocivos, como a fumaça do cigarro, interfere em mecanismos como proliferação celular, quimiotaxia e remodelamento dos componentes da matriz por fibroblastos, pois induz o estresse oxidativo e a apoptose nestas células (ANTUNES; ROCCO, 2011).

Níveis elevados de compostos pró-oxidantes desencadeiam eventos associados à apoptose. Um ciclo apoptose-estresse oxidativo pode ser originado, uma vez que células apoptóticas apresentam aumento do estresse oxidativo, o que por sua vez contribui para maiores níveis de apoptose. No endotélio alveolar, a apoptose desorganiza a estrutura dos septos e, por isso, pode aumentar a propensão a lesões celulares adicionais em células epiteliais alveolares ou miofibroblastos septais (TUDER et al., 2003).

Ser exposto à fumaça de cigarro apenas uma única vez pode ser capaz de inibir a proliferação de fibroblastos, células essenciais ao reparo pulmonar. A exposição frequente ao estímulo danoso acarreta um estado irreversível de senescência dos fibroblastos, que por sua vez, são incapazes de reparar os danos do parênquima pulmonar e, como consequência, contribuem para o desenvolvimento do enfisema (DI PETTA, 2010). O estresse oxidativo provocado pela apoptose pode aumentar a expressão e a ativação de proteases que agiram concomitantemente ao estresse oxidativo e a apoptose na destruição dos septos alveolares (Figura 12, pag. 44) (TUDER et al., 2003).

Figura 12 – Esquema ilustrativo dos mecanismos envolvidos na patogênese da DPOC.



Fonte: ROBERTONI et al., 2015.

2.2.3 Aspectos gerais no tratamento do enfisema

Parar de fumar é a única ação capaz de favorecer a sobrevivência dos pacientes acometidos por enfisema pulmonar. Os fumantes, portadores de DPOC possuem padrão ventilatório diferente quando comparados a outros fumantes, devido as alterações nas estruturas alveolares (PAMPLONA; MENDES, 2009). Em razão disso, integrado a qualquer plano de tratamento para o paciente com DPOC, a primeira orientação ao paciente é parar de fumar. O fim do hábito tabagista traz benefícios que incluem alívio sintomático, melhora da qualidade de vida, previne a progressão da doença e reduz a mortalidade (PAMPLONA; MENDES, 2009; GOLD, 2019). Apesar da enorme demanda não atendida acerca de medicina respiratória, ainda são poucas as opções terapêuticas seguras e eficazes disponíveis no mercado nos últimos 40 anos (BARNES et al., 2015).

A terapia medicamentosa recomendada para pacientes com DPOC, aliada a técnicas de reabilitação pulmonar envolvem dois objetivos principais: i) controle sintomático por broncodilatação, na tentativa de melhorar o fluxo de ar, reduzindo a frequência e gravidade das exacerbações, uma das causas mais

comuns de internações hospitalares; ii) a melhoria da qualidade de vida do paciente acometido (SENIOR, ANTHONISEN, 1998; TAGUCHI et al., 2015; YAMASHITA et al., 2019).

Os broncodilatadores são a primeira linha de escolha para o tratamento da DPOC, pois reduzem a broncoconstrição e obstrução do fluxo aéreo através do relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas. Têm-se utilizado terapias combinadas entre agonistas β -2 adrenérgicos de ação prolongada e anticolinérgicos de ação prolongada, a interação entre diferentes fármacos pode levar a uma sinergia, resultando em uma melhoria sintomática (Tabela 5). Estas associações demonstraram ter efeitos aditivos sobre a broncodilatação, no entanto, os resultados clínicos ainda são limitados e há a mesma falha em tratar o agente inflamatório subjacente a doença (BARNES, 2013; DJIK et al., 2017).

Tabela 5 - Medicamentos comumente e utilizados no tratamento da DPOC.

CLASSE FARMACOLÓGICA	FÁRMACOS
β 2-Agonista de ação curta	Fenoterol, Levalbuterol, Salbutamol, Terbutalina
β 2-Agonista de ação prolongada	Arformoterol, Formoterol, Indacaterol, Olodaterol, Salmeterol
Anticolinérgico de ação curta	Ipratrópio, Oxitrópio
Anticolinérgico de ação prolongada	Acidínio, Glicopirrônio, Tiotrópio, Umeclidínio
Metilxantina	Aminofilina, Teofilina
Inibidores da fosfodiesterase-4	Roflumilaste

Fonte: GOLD, 2019.

Anti-inflamatórios esteroidais orais, não seletivos, geram efeitos colaterais frequentes, como náuseas, diarreia, tremores, arritmias cardíacas e convulsões, em virtude da ampla distribuição dos alvos intracelulares. O desenvolvimento de formulações inalatórias pode assegurar que os fármacos sejam retidos localmente nos pulmões, reduzindo o surgimento de efeitos colaterais, os níveis de mediadores inflamatórios no pulmão, bem como prevenindo manifestações sistêmicas (BARNES, 2013).

Registros médicos revelam que uma parcela significativa dos pacientes com DPOC necessitam de doses elevadas de anti-inflamatórios esteroidais

inalatórios para apresentar uma evolução clínica satisfatória frente ao quadro clínico, o que geralmente acarreta efeitos adversos indesejados (SENIOR, ANTHONISEN, 1998; GOLD, 2019).

O roflumilaste, um inibidor da PDE4, é o medicamento que melhor possui eficácia anti-inflamatória, porém sua utilização restringe-se ao tratamento de estágios graves da DPOC associados a frequentes históricos de exacerbações e em complementação ao tratamento com broncodilatadores (WEDZICHA et al., 2016).

Embora existam muitos estudos clínicos e experimentais sobre a fisiopatologia do enfisema, ainda não há tratamentos que aliviem completamente os sintomas, preservem a função pulmonar, regenerem o tecido pulmonar ou inibam a progressão da doença e que tenham efeito substancial na redução no número de exacerbações, hospitalizações e ainda, nos percentuais de morte em razão desta enfermidade (LOURENÇO et al., 2014; PADILHA, et al., 2015; MORICHIKA et al., 2019).

A maioria dos tratamentos atualmente disponíveis para doenças respiratórias referem-se apenas de melhorias nas classes farmacológicas. Houve melhorias na terapêutica medicamentosa utilizada com agonistas dos receptores β 2-adrenérgicos e antagonistas dos receptores muscarínicos no tocante a posologia, cujos só necessitam ser administrados em dose única diária; ademais, o uso de corticosteroides de inalatórios e antimicrobianos de ação mais facilitou o esquema terapêutico desses pacientes (BARNES, 2013; BARNES et al., 2015).

O mercado mundial de medicamentos para asma e DPOC foi de US\$ 34 bilhões em 2012, em 2017 superou a marca de US\$ 40 bilhões e a expectativa é de crescimento contínuo até 2023, em virtude do aumento da prevalência global dessas doenças (BARNES et al., 2015). A seguir são enumeradas algumas dificuldades a serem vencidas para o desenvolvimento de tratamentos anti-inflamatórios para a DPOC (BARNES, 2013):

1. Os mecanismos inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da doença ainda não tão bem elucidados. A diversidade de mediadores inflamatórios em níveis aumentados nos pulmões de pacientes com DPOC dificulta identificar quais destes mediadores são os alvos terapêuticos mais promissores;

2. A heterogeneidade da doença. Existem vários fenótipos clínicos da DPOC, dificultando prever as respostas à terapia medicamentosa;
3. A inexistência de um "padrão ouro" que permita uma comparação terapêutica na DPOC para medicamentos anti-inflamatórios, em virtude, de uma fraca resposta aos medicamentos corticosteroides.

2.3 Recursos vegetais como fonte de medicamentos

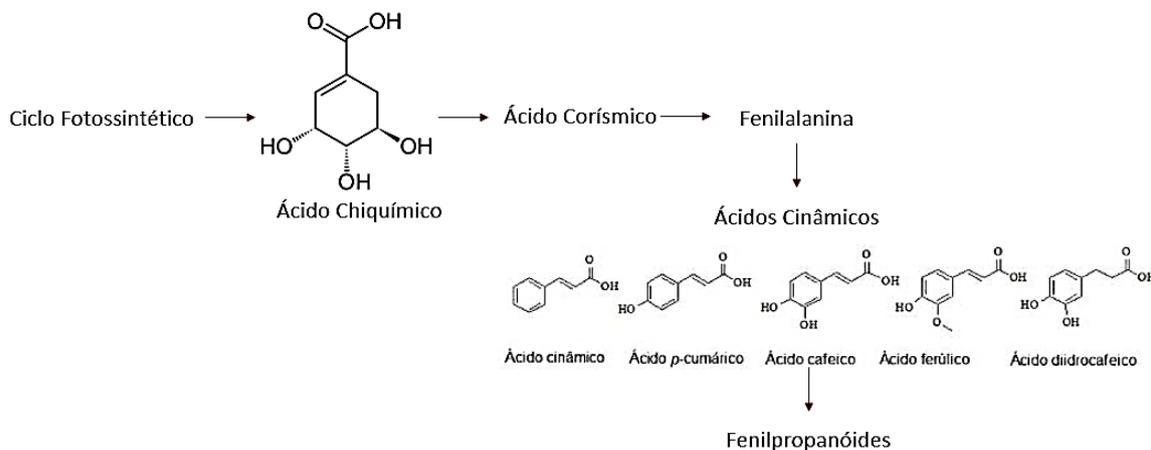
A utilização de produtos de origem natural tem se mostrado fundamental para o descobrimento e obtenção de novas substâncias com potencial terapêutico. As plantas são de grande relevância para o desenvolvimento de novos fármacos, pois constituem fonte de uma grande diversidade de substâncias bioativas, protótipos para obtenção de fármacos e ainda compostos modelos que podem ser modificados estruturalmente, sintética ou semi-sinteticamente, visando aprimorar suas atividades biológicas. Estima-se que aproximadamente 25% dos medicamentos atuais são derivados diretos ou indiretos das plantas (BRANDÃO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2019). Dentre os produtos ativos derivados de plantas e que possuem propriedades terapêuticas relevantes, destacam-se compostos fenólicos, flavonoides e quinonas (TAGUCHI et al., 2015).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico são amplamente encontrados no reino vegetal e constituem uma classe com grande diversidade de estruturas, mas que preservam o anel aromático ligado a um grupamento hidroxila. Os vegetais possuem capacidade de metabolizar estes produtos e a partir dele, por metabolismo secundário, produzem uma vasta gama de metabólitos secundários biologicamente ativos (SIMÕES et al., 2004).

O ácido cinâmico é um monofenol, precursor de vários difenóis e polifenóis, bem como de seus derivados substituídos; amplamente encontrado na natureza, presente, por exemplo, na canela, no cravo, em cramberries e ameixas (NUNES et al., 2017; SHUAB et al., 2019). Os ácidos cinâmicos são precursores de fenilpropanóides que são compostos obtidos a partir da rota do chiquimato e lignina. A unidade molecular básica dos fenilpropanóides possui a estrutura C6-C3 que representa um anel aromático ligado a uma cadeia lateral

composta de três átomos de carbono, com uma ligação dupla na cadeia lateral, que alterna em configuração *cis* ou *trans* (Figura 13) (SIMÕES et al., 2004).

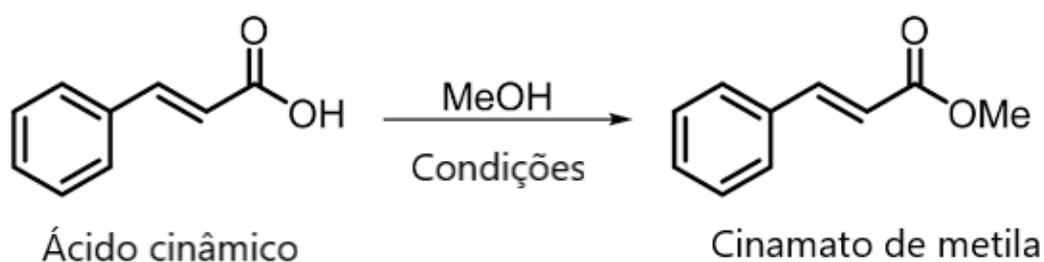
Figura 13 – Rota do ácido chiquímico.



Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2004.

O cinamato de metila é um éster metílico derivado do ácido cinâmico que possui fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_2$ e peso molecular de 162,19 g (Figura 14, pág. 49). Este composto detém várias atividades biológicas relevantes, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, estimulador da secreção de insulina (MURAKAMI et al., 2018), antimicrobianos (CHEN et al., 2012), antifúngicos (DE VITA et al., 2016), antiadipogênico (GUIA et al., 2018), gastroprotetor (LIMA et al., 2014), vasodilatador (NUNES et al., 2017) e antiespasmódico (LIMA et al., 2014). Nesta classe de moléculas encontramos também outros derivados do ácido cinâmico, dos quais fazem parte os ácidos ferúlico, caféico, *p*-cumárico e sinápico e seus respectivos cinamatos naturais: 4-hidroxi-3-metoxicinâmico, 3,4-di-hidroxicinâmico, *p*-hidroxicinâmico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinâmico (SAAVEDRA et al., 2015).

Figura 14 – Precursor e estrutura química do cinamato de metila



Fonte: SHARMA, 2011.

O cinamato de metila exerce importantes funções para o organismo vegetal, tais como: i) defesa por inibir a ação de patógenos; ii) contribui para polinização e dispersão, pois seu odor nas flores atrai polinizadores, e nos frutos atrai animais que ajudam na dispersão de sementes (LUNKENBEIN et al., 2006; ZHANG et al., 2019).

O cinamato de metila é encontrado abundantemente em frutas como morango, abacate, amora, cacau, goiaba, carambola, abacaxi e ameixa, espécies de flores como orquídeas e narcisos (*Narcissus Jonquilla* L.), cereais e diversas plantas como canela (*Cinnamomum*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), melaleuca (*Myrtaceae Juss.*), espinheiro da montanha (*Crataegus pinnatifida*), eucalipto (*Eucalyptus*), ishpingo (*Ocotea quixos*), em óleos essenciais como na *Alpinia malaccensis* e *Gastrochilus panduratum*, em rizomas de *Galgant*, *Ocimum canum Sims.*, *Ocimum basilicum* L. e em fungos *Tricholoma matsutake* e outras espécies (FINK et al., 2004; BALLABENI et al., 2010; CASTRO et al., 2004; ZHANG et al., 2019).

Este composto é considerado seguro para o consumo humano, sendo utilizado em grande escala nas indústrias alimentícia como aromatizante, tendo seu odor definido como balsâmico-frutado, corante e antioxidante de alimentos; e cosmética utilizado em perfumes e produtos de higiene e limpeza, em virtude de exalar aromas de frutas ou flores (LIMA et al., 2014; SAAVEDRA et al., 2015; FUJIWARAA et al., 2017). Em todo o mundo, estima-se que sua produção seja de 10-100 toneladas/ano (BATHIA et al., 2007). O cinamato de metila tem atraído atenção para o desenvolvimento de nutracêuticos, bem como despertado interesse no ramo da fitomedicina em virtude de seus benefícios à saúde (GUOA et al., 2019).

Considerando os efeitos farmacológicos apresentados pelo cinamato de metila, em especial suas ações anti-inflamatórias, antioxidantes e sobre a musculatura lisa, é possível propor que este derivado do ácido cinâmico mostre-se potencialmente útil para tratamento de patologias nas quais os eventos inflamatórios iniciais são determinantes para o agravamento e progressão da doença, como no caso do enfisema. Seguindo este racional, este estudo buscou caracterizar os efeitos do tratamento tópico com cinamato de metila no enfisema pulmonar, utilizando para isso um modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a atividade anti-inflamatória e anti-enfisematosa do cinamato de metila em um modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar na Universidade Federal de Alagoas o modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos.
- Estudar o efeito do cinamato de metila sobre o recrutamento de leucócitos e mediadores inflamatórios para as vias aéreas de animais com enfisema pulmonar induzido por elastase.
- Caracterizar o efeito do tratamento com cinamato de metila sobre as modificações histopatológicas no pulmão de animais com enfisema induzido por elastase.
- Avaliar em células da linhagem do epitélio alveolar A549 estimuladas por TNF- α o efeito do cinamato de metila sobre a geração de citocinas inflamatórias.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Reagentes e soluções

Cinamato de metila (CID:637520, CM), elastase (Type I/E 1250, ELA), tampão fosfato salina (PBS), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich, MTT), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, MO, EUA). RPMI-1640 (Gibco), dimetilsulfóxido (Synth, DMSO). Soro fetal bovino (SBF), L-glutamina, tripsina adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Gentamicina fabricada por novafarma. Kits para quantificação de IL-6 e IL-10 foram adquiridos da eBioscience e IL-1 β e TNF- α da BD Bioscience.

4.2 Animais

Camundongos C57BL/6 provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), de ambos os sexos, pesando de 20 a 25g, foram mantidos em ciclo claro e escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água. Os animais foram randomicamente divididos em cinco grupos experimentais, cada grupo composto de cinco animais por gaiola e mantidos em gabinetes para biotérios (Insight®) com condições ambientais de temperatura (22 ± 2 °C) e umidade controladas. Os grupos foram denominados: GRUPO PBS: para se referir a animais instilados com solução tampão fosfato salina e tratados por via intranasal (i.n.) com PBS; GRUPO Elastase: para se referir a animais injetados por via intratraqueal (i.t.) com elastase (2 UI) e tratados por via intranasal com PBS; Grupo elastase + cimanato de metila: para se referir a animais injetados por via intratraqueal com elastase (2 UI) e tratados com cinamato de metila por via intranasal (i.n) nas doses de 1, 10 ou 50 $\mu\text{mol/Kg}$.

Para a execução deste estudo houve a aprovação do uso dos animais pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas, sob CEUA nº 85/2015 (Anexo A). Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes de cuidados com os animais de laboratório e com as diretrizes éticas para investigação de dor experimental em animais sencientes.

Todos os procedimentos foram executados no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL.

4.2.1 Delineamento do modelo experimental de enfisema

Para a indução do enfisema pulmonar por elastase os camundongos foram anestesiados por inalação com isoflurano (2%) em sistema de anestesia inalatória (Insight®) e a traqueia foi cirurgicamente exposta através de uma incisão ventro-cervical de comprimento aproximado de 1 cm. Posteriormente, com auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha 1,3x0,45 cm e por meio de uma única injeção intratraqueal (i.t.) foi administrado 50 µL de PBS (grupo controle não enfisematoso) ou elastase (2 UI). Em seguida, a incisão foi suturada com fio mononylon 6-0 e os animais permaneceram em observação durante o tempo necessário para se evidenciar o retorno de seus movimentos normais, retornando as suas gaiolas em condições ambientais controladas citadas. O dia do estímulo intratraqueal com elastase ou PBS foi denominado dia zero (Dia 0) do experimento. No dia 16 pós-estímulo, foi iniciado o tratamento dos animais com instilação intranasal de 30 µL de cinamato de metila nas concentrações de 1, 10 ou 50 µmol/Kg ou mesmo volume de PBS nos grupos controle. Este procedimento para o tratamento ocorreu uma vez ao dia, por cinco dias consecutivos, ou seja, até o 20º dia após estímulo com elastase. Após 24 h do último tratamento (21º dia pós-elastase), os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico através da inalação de isoflurano, sucedendo-se os procedimentos para obtenção dos materiais necessários a realização das análises e obtenção dos resultados (Adaptado de ANTUNES et al., 2014).

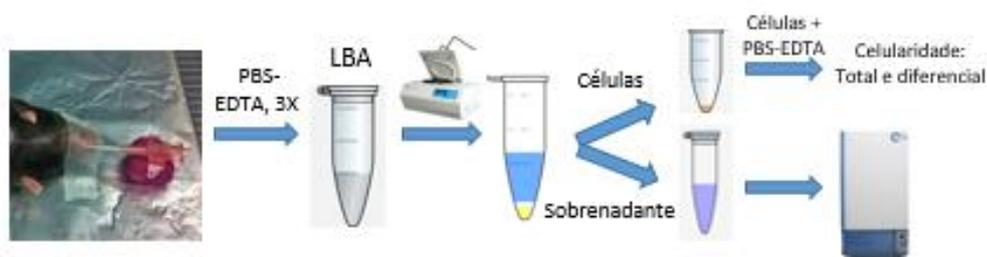
4.2.2 Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)

Após a eutanásia, os animais tiveram suas traqueias expostas, dissecadas e canuladas para obtenção do LBA. Os pulmões foram lavados 3 vezes com 0,8 mL de PBS/EDTA (10 mM) e o fluido do LBA foi coletado de cada animal. O lavado foi centrifugado (centrífuga HealForce®) a 1.000 rpm por 10 minutos a 4 °C a fim de se recolher o sobrenadante e armazená-lo a -80 °C, para

posteriores análises de quantificação de mediadores inflamatórios. Aos pellets celulares foi-se adicionado 1 mL de PBS/EDTA (10 mM) sendo ressuspensos para contagem de células do infiltrado pulmonar.

O número total de células viáveis foi determinado em uma câmara de Neubauer sob microscopia de luz (Olympus BX41), utilizando solução de Turk diluída em alíquotas do ressuspensão (1:10). Para contagem diferencial do perfil celular foram preparados citoesfregaços com aproximadamente 3×10^5 células em citocentrífuga a 450 rpm durante 5 min (CT-2000, Cientec), corados com May-Grunwald-Giemsa, e posteriormente avaliados no microscópio óptico (Olympus CX40) na objetiva de $\times 100$.

Figura 15 - Esquema ilustrativo da obtenção do LBA em camundongos C57BL/6.



Fonte: Autora.

4.2.3 Análise histológica do pulmão

Para a realização das análises histológicas, um outro conjunto de experimentos foram realizados. Os tecidos pulmonares foram retirados dos animais submetidos ao modelo experimental descrito. Os órgãos retirados foram imersos em paraformaldeído 10% por um período de 12 horas e submetidos ao histotécnico (MOD 808) para processamento histológico em gradiente alcoólico (70%, 80%, 90% e 100%), clarificação em xilol I e II, e inclusão em parafinas com pontos de fusões crescentes, 56 - 58 °C e 58 - 62 °C, respectivamente, para posteriores cortes histológicos.

Após o processamento, cortes histológicos pulmonares com 5 μ m de espessura foram feitos utilizando o micrótomo (SLEE/CUT 5062). As lâminas histológicas obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e tricômio de Masson, colorações que melhor destacam as estruturas de interesse:

parênquima pulmonar e deposição de colágeno, respectivamente. As análises foram realizadas em microscópio óptico (Olympus BX51) e as imagens obtidas por uma câmera digital acoplada, priorizando-se o mesmo aumento óptico e iluminação em todas as amostras analisadas.

A quantificação dos espaços alveolares foi realizada utilizando uma análise morfométrica através do cálculo do Intercepto Linear Médio (Lm) que permite determinar o nível de gravidade do enfisema pulmonar (DAVIS; THANE; HOFFMAN, 2017). Para esta quantificação, as imagens foram adquiridas digitalmente e parametrizadas utilizando-se o retículo de Weibel de 168 pontos (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE, 1966), onde o cálculo do Lm foi feito a partir da contagem do número de pontas da seta que tocam a parede alveolar. A partir desta contagem, o Lm foi calculado através da seguinte fórmula:

$$Lm = \frac{L_{total}}{NI}$$

Onde, NI é a quantidade de extremidades do retículo que tocam a parede alveolar, e L_{total} é o somatório de extremidades de cada seta do retículo.

Considerando a fórmula do cálculo do Intercepto Linear Médio é possível afirmar que quanto maior o índice de Lm, maior a degradação do tecido, ou seja, mais grave é o enfisema. Pelo fato da quantidade de vezes que as setas tocam o tecido ser o denominador da equação, verifica-se que quanto maior o número, menor será o Lm, o que indica a presença de mais paredes alveolares (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE, 1966).

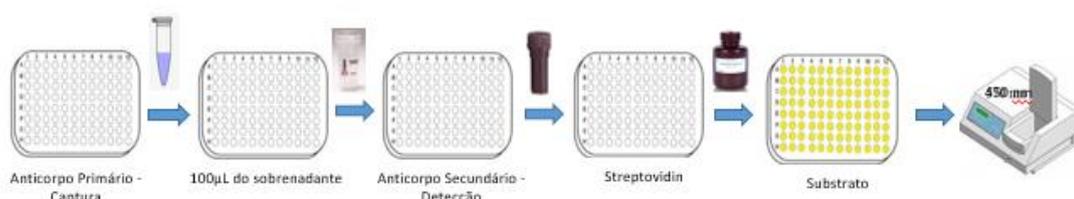
No método de coloração do tricrômio de Masson são utilizados três corantes: solução de escarlata de Biebrich, solução ácida fosfotúngstica-fosfomolibdica, solução de azul de anilina. Esta metodologia baseia-se na diferença de permeabilidade entre as fibras de colágeno e os demais tecidos circundantes (FERRO et al., 2006). Foi avaliada a quantidade total da deposição de matriz extracelular, neste método observa-se que as fibras de colágeno recém-sintetizadas podem corar em vermelho, enquanto a deposição de MEC destaca-se em azul, sendo um método bastante seletivo para corar tecido conjuntivo (GOLDNER, 1938; WU et al., 2020). Para esta análise, cinco diferentes campos de cada grupo amostral foram escolhidos aleatoriamente,

num aumento de 200x, e as estruturas coradas em azul foram localizadas (MAN-HUI et al., 2016). Para quantificação, utilizou-se o cálculo da área média das estruturas coradas em azul, usando software imageJ, a intensidade da cor azul representava o conteúdo colágeno.

4.2.4 Quantificação de mediadores da resposta inflamatória no LBA e nos pulmões

Para quantificação dos níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 presentes no LBA ou no tecido pulmonar dos camundongos foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as instruções dos protocolos dos fabricantes.

Figura 16 - Esquema ilustrativo da metodologia de quantificação de citocinas.



Fonte: Autora.

4.2.5 Avaliação da toxicidade do cinamato de metila sobre o peso corporal dos animais

Para avaliar as repercussões sistêmicas que possam retratar uma possível toxicidade associada ao tratamento com cinamato de metila, as variações do peso corporal foram quantificadas ao longo do protocolo experimental e expressas como porcentagem de variação de peso (%) de acordo com a equação proposta por Ozawa e colaboradores (2016):

$$\text{Variação de peso (\%)} = \left(\frac{\text{Peso corporal no dia pós indução (g)}}{\text{Peso corporal no dia 0 (g)}} \right) \times 100$$

A medida da variação percentual dos pesos animais foi calculada a cada três dias até o 15º dia, antes de iniciarem os tratamentos. Durante os dias em

que os animais receberam tratamento com diferentes doses cinamato de metila, o peso foi medido diariamente até o final do experimento. As medidas foram relacionadas com o peso corporal do dia 0.

4.2.6 Avaliação da toxicidade do cinamato de metila sobre o peso relativo dos órgãos

Para avaliar a toxicidade do tratamento com cinamato de metila sobre diferentes órgãos do animal, foi utilizada a medida da variação percentual dos pesos relativos dos órgãos calculada mediante o peso de cada órgão (baço, rim e fígado) extraído no dia da eutanásia em relação ao peso corporal do animal correspondente, avaliado 24 h após o último tratamento (21º dia). A quantificação do peso foi realizada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Peso relativo (\%)} = \left(\frac{\text{Peso absoluto do órgão (g)}}{\text{Peso corporal de cada animal no dia análise (g)}} \right) \times 100$$

4.3 Cultura celular

A linhagem de células A549 (célula epitelial alveolar de adenocarcinoma humano) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF, 1% de L-glutamina e 0,1% de gentamicina. As culturas celulares foram mantidas em estufa de CO₂ (5%) a uma temperatura de 37 °C. Os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata para avaliar a viabilidade celular e a produção de mediadores inflamatórios.

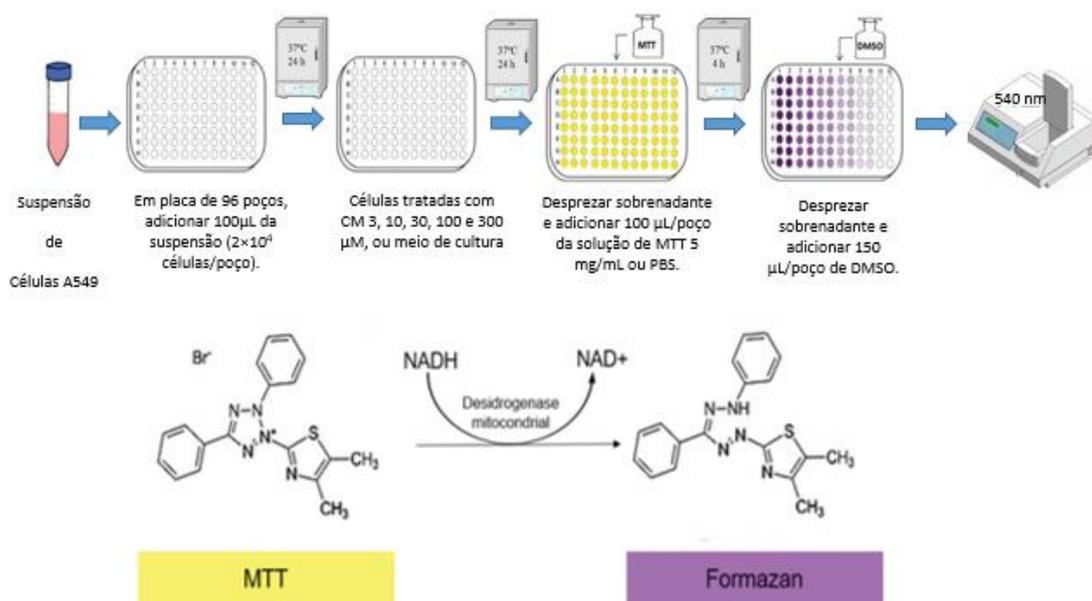
4.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar o efeito do tratamento com cinamato de metila sobre a viabilidade das células A549 foi utilizado o ensaio colorimétrico por redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, comumente denominado MTT, adaptado de Mosmann (1983). Células A549 (2×10⁴ células/poço) foram semeadas em placa de 96 poços com meio RPMI suplementado e mantidas em estufa de CO₂ (37 °C) por 24 h. Em seguida, as células foram expostas ao

cinamato de metila nas concentrações de 3, 10, 30, 100 ou 300 μM , ou meio de cultura (grupo controle), e mantidas por mais 24 h em estufa. Após este período, as células foram incubadas com MTT (5 mg/mL) por 4h. Passado este período, o sobrenadante foi retirado, e aos poços foi adicionado 150 μL de DMSO e incubados por 15 minutos, em temperatura ambiente, para revelação dos cristais de formazan e realizada a leitura em espectrofotômetro (Celer Biotecnologia S.A.) a 540 nm (Figura 15). O resultado foi expresso como porcentagem de células viáveis em relação ao grupo exposto apenas ao meio de cultura.

$$\text{Células viáveis (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbância de células tratadas}}{\text{Absorbância de células não tratadas}} \right) \times 100$$

Figura 17 - Esquema ilustrativo do ensaio de MTT para avaliação da citotoxicidade do cinamato de metila em células A549.

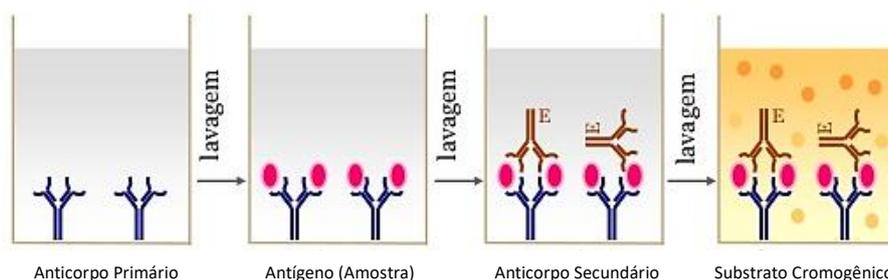


Fonte: Autora.

4.3.2 Quantificação de citocinas no sobrenadante de células A549 estimuladas com TNF- α .

Células A549 (5×10^5 células/poço) foram semeadas em placa de 12 poços em 1 mL de meio RPMI suplementado e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C por 24 h. Após este período, o sobrenadante foi substituído por 250 μ l de meio de cultura RPMI (2% SBF) contendo cinamato de metila (3, 10 ou 30 μ M) ou apenas meio de cultura RPMI (2% SBF) por 1 h. Após este tempo, cada poço foi estimulado com 250 μ l de uma solução contendo TNF- α (30 ng/mL) e mantidas por 24 h em estufa. Ao final deste tempo, os sobrenadantes foram recolhidos e utilizados em realização do ensaio imunoenzimático para detecção de IL-1 β , IL-6 e IL-10 de acordo com as instruções dos fabricantes eBioscience e BD Bioscience (Figura 18).

Figura 18 – Ilustração do ensaio imunoenzimático para detecção de citocinas de IL-1 β , IL-6 e IL-10.



Fonte: MORAES, 2013.

4.3.3 Quantificação das espécies reativas

O efeito do cinamato de metila sobre a produção de espécies reativas *in vitro* foi realizado utilizando o ensaio de redução do NBT - Nitro Blue Tetrazolium, adaptado de Cruz et al. 2016. Células A549 ($1,5 \times 10^4$ células/poço) foram mantidas em microplaca de 96 poços com meio RPMI suplementado a 37 °C em estufa de CO₂ (5%) por 12 h. Após este tempo, o sobrenadante foi substituído por 200 μ L de meio RPMI contendo cinamato de metila (10, 30, 100 e 300 μ M) e mantidos por 4 h em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C). Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram mantidas com o respectivo

tratamento com cinamato de metila e estimuladas ou não com TNF- α (30ng/mL) por 24 h. As células do grupo controle foram tratadas apenas em meio RPMI e mantidas por 24 h também em meio RPMI. Ao término deste período, os sobrenadantes foram descartados e aos poços foram adicionados 200 μ L de meio RPMI contendo NBT (0,1%), por mais 1 h em estufa CO₂. Após este tempo, os sobrenadantes foram removidos, e adicionado em cada poço 200 μ L da solução contendo hidróxido de potássio (90 μ L) e DMSO (110 μ L) para revelação dos cristais de formazan formados. A quantidade de NBT reduzido foi quantificado em leitor de microplaca (Celer Biotecnologia S.A.) a 630 nm, e expresso como densidade óptica (DO).

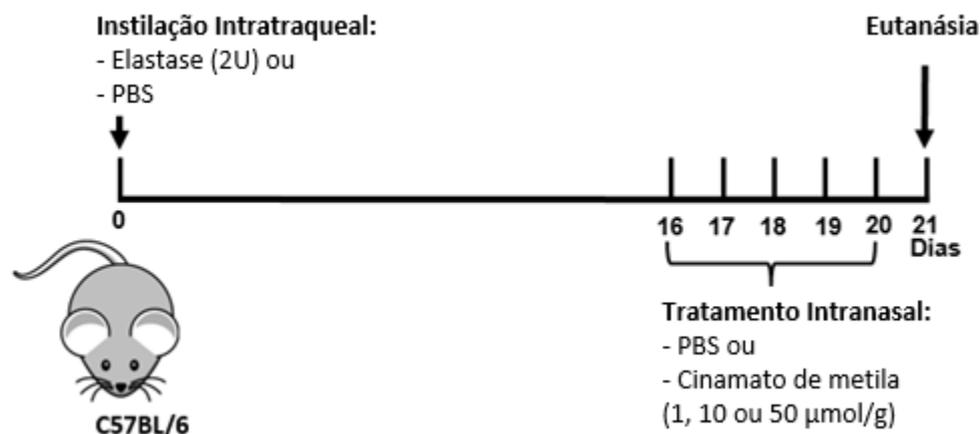
4.4 Análise estatística

Os resultados foram representados como média e erro padrão da média (EPM), e avaliados estatisticamente através da análise de variância e do t de Student, seguido do teste de comparações múltiplas ANOVA e Newman-Kewls, através do programa GraphPad Prism (versão 5.00, GraphPad Prism Software, Inc.). O nível de significância foi selecionado para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase em camundongos

Figura 19 – Protocolo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase.

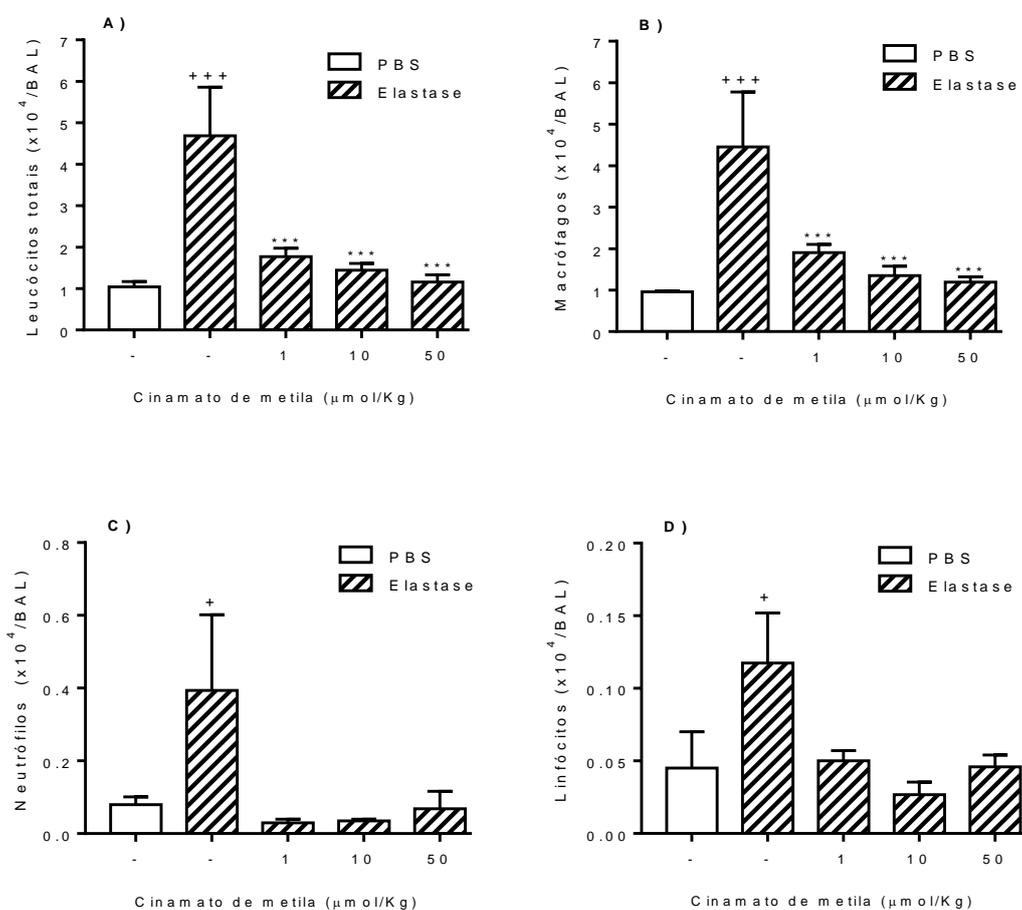


Legenda: Cronologia do protocolo experimental de enfisema induzido por elastase em camundongos com duração de 21 dias. Fonte: Autora.

5.2. Efeito do cinamato de metila sobre a inflamação das vias aéreas no enfisema pulmonar induzido por elastase

Como apresentado na Figura 20 (pág. 62), após 21 dias da instilação de elastase observou-se um aumento significativo no número de leucócitos totais no LBA comparado ao grupo controle instilado com PBS (Figura 20A). Ao se avaliar as subpopulações de leucócitos presentes no LBA, constatou-se também um aumento significativo nessas subpopulações que compõem a população de células, tais como macrófagos (Figura 20B), neutrófilos (Figura 20C) e linfócitos (Figura 20D). O tratamento com cinamato de metila iniciado no dia 16 pós estímulo, e mantido por cinco dias consecutivos, foi capaz de inibir de forma significativa, em todas as doses avaliadas, o infiltrado inflamatório nas vias aéreas.

Figura 20 – Efeito do cinamato de metila sobre o infiltrado inflamatório nas vias aéreas de animais estimulados com elastase.



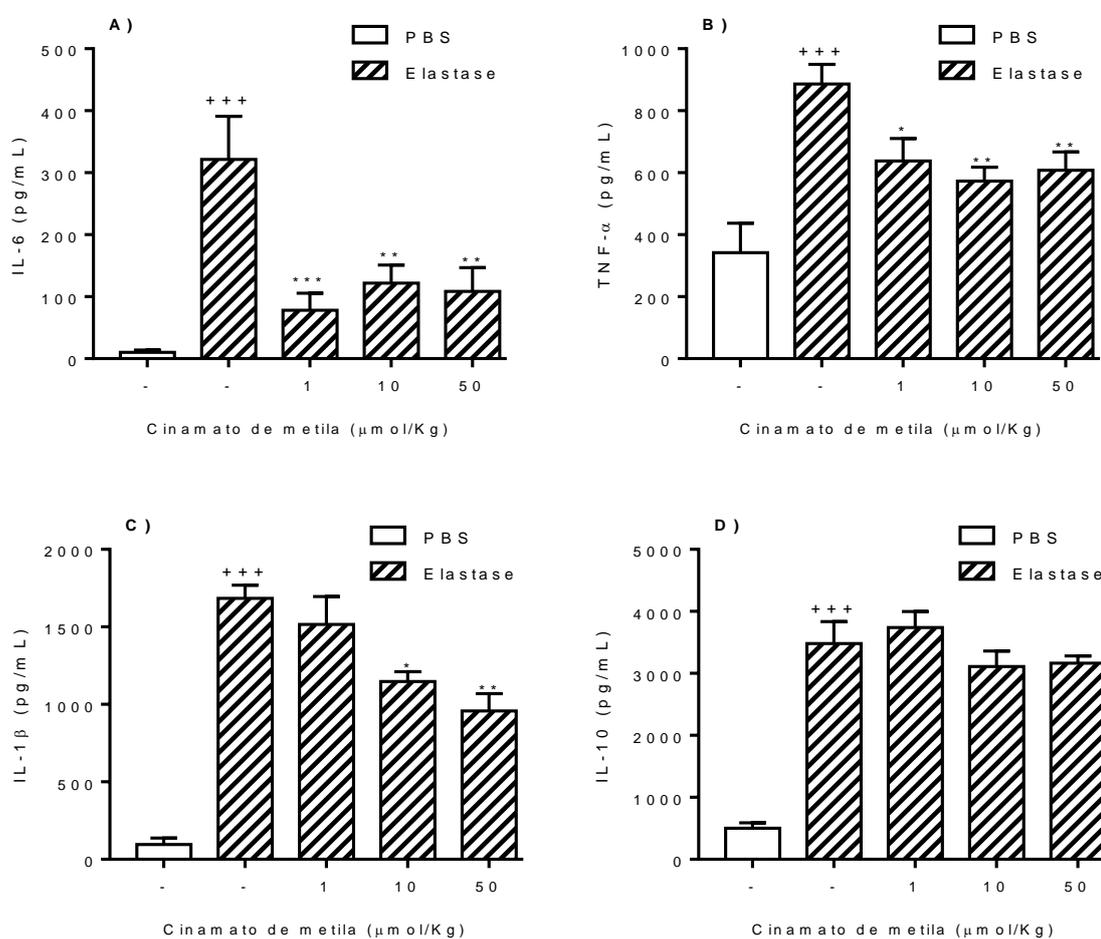
As barras representam a média \pm EPM (n=5), e as análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, sendo $+++p < 0,001$ e $+p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (animais estimulados com PBS); $***p < 0,001$ e $**p < 0,01$ quando comparado ao grupo de animais estimulados com elastase sem tratamento.

5.3 Efeito do cinamato de metila sobre os níveis de mediadores inflamatórios no pulmão de animais com enfisema induzido por elastase

Os animais que receberam a injeção de elastase (2U, i.t.) exibiram um aumento significativo nos níveis das citocinas inflamatórias no tecido pulmonar quando comparado aos animais do grupo controle que receberam PBS. O

tratamento com cinamato de metila por cinco dias consecutivos, nas três doses testadas, foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 e TNF- α (Figura 21A e 21B). Porém, este mesmo tratamento inibiu os níveis de IL-1 β (Figura 21C) apenas nas duas maiores doses, e não foi capaz de estimular o aumento nos níveis de IL-10 induzido por elastase (Figura 21D).

Figura 21 – Efeito do cinamato de metila sobre a produção de citocinas IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 no tecido pulmonar de camundongos enfisema induzido por elastase.

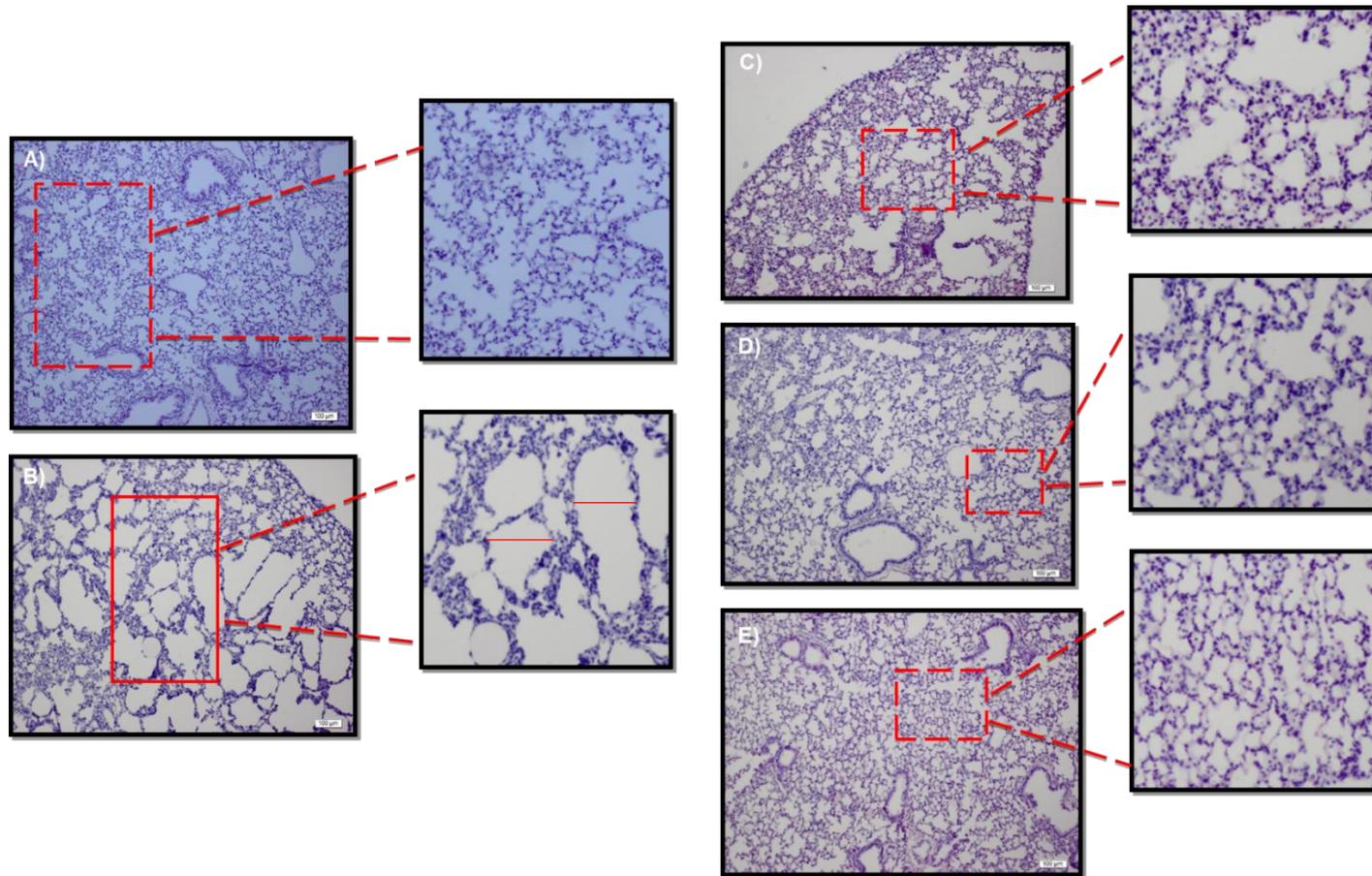


As barras representam a média \pm EPM (n=5), e as análises estatísticas foram avaliadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, sendo +++p<0,001 quando comparado ao grupo controle (animais estimulados com PBS); ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05 quando comparado ao grupo de animais estimulados com elastase sem tratamento.

5.4 Avaliação do efeito do cinamato de metila sobre a estrutura do tecido pulmonar de camundongos com enfisema induzido por elastase

Para avaliar o papel do cinamato de metila nas alterações do tecido pulmonar induzidas pela elastase em camundongos, foi realizada a análise histológica de secções pulmonares obtidas a partir de animais dos diferentes grupos experimentais. A Figura 22 (pág. 64) mostra um aumento dos espaços aéreos decorrente da destruição das paredes dos alvéolos no grupo dos animais que receberam elastase comparado ao grupo controle, bem como um aumento do infiltrado celular no parênquima tecidual.

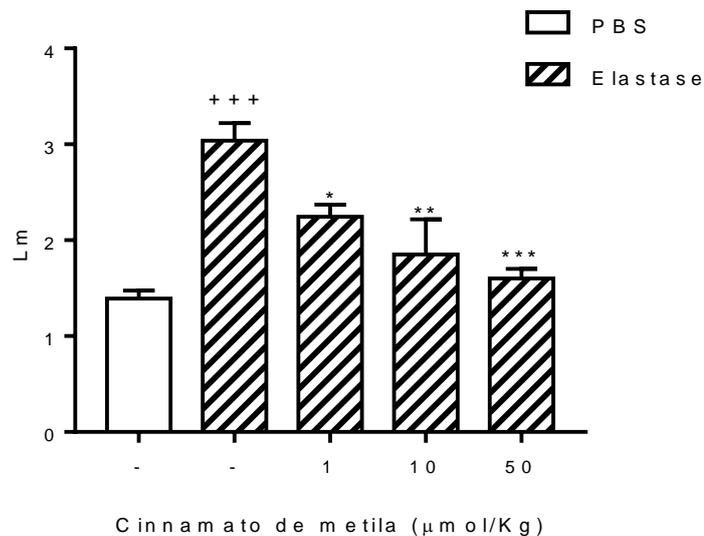
Figura 22 - Parênquima pulmonar em um modelo murino de enfisema induzido por elastase, corados com H&E.



Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar obtido de animais que receberam injeção intratraqueal de PBS (A) ou elastase (B), e de animais que foram tratados com cinamato de metila nas doses de 1 $\mu\text{mol/Kg}$ (C), 10 $\mu\text{mol/Kg}$ (D), 50 $\mu\text{mol/Kg}$ (E). Aumento de $\times 100$ (quadro A e B) e $\times 200$ (quadro C, D e E), coloração H&E.

A quantificação do dano alveolar causado pela administração de elastase bem como o efeito do cinamato de metila foi realizada por meio de análise morfométrica calculando-se o valor do Intercepto Linear Médio (Lm). Como mostrado na Figura 23, o estímulo com elastase provocou um aumento, cerca de 1,6 vezes, nos valores de Lm representando uma redução na quantidade de paredes alveolares, quando comparados com o grupo controle PBS. No pulmão de animais com enfisema submetidos ao tratamento com cinamato de metila nas duas maiores doses, 10 ou 50 $\mu\text{mol/Kg}$, observou-se uma semelhança no parênquima pulmonar com os animais do grupo controle PBS, sugerindo uma capacidade de restaurar a morfologia do tecido pulmonar estimulado por elastase. Os dados demonstraram com isso o efeito do cinamato de metila em reverter o dano tecidual causado pela elastase.

Figura 23 – Análise quantitativa do espaço alveolar nos pulmões enfisematosos de camundongos estimulados com elastase e tratados com cinamato de metila.

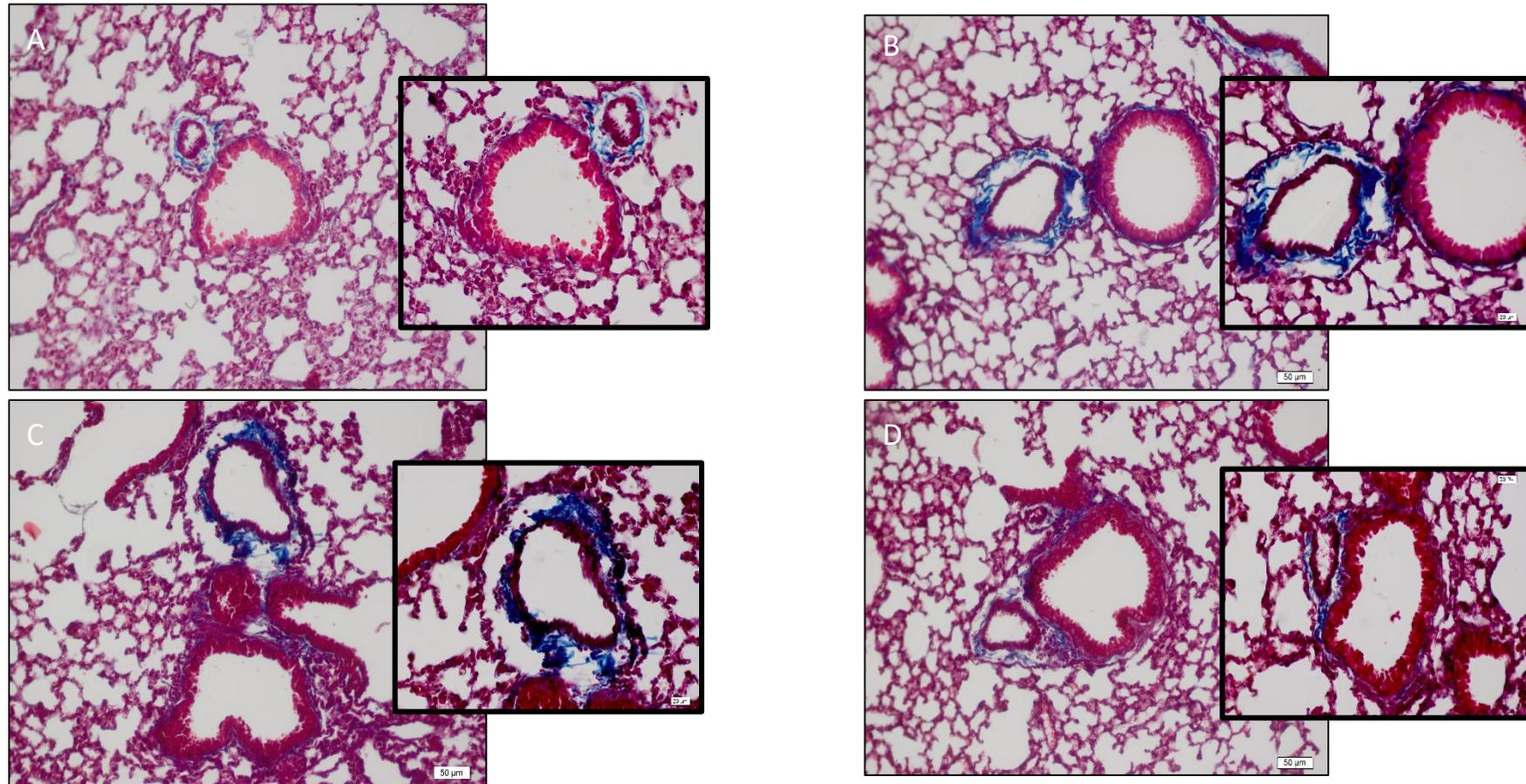


As barras representam a média \pm EPM ($n=3$) e as análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, sendo +++ $p<0,001$ quando comparado ao grupo controle (animais estimulados com PBS); * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ quando comparado ao grupo de animais estimulados com elastase sem tratamento.

5.5 Avaliação do efeito do cinamato de metila sobre deposição de matriz extracelular peribronquiolar em camundongos com enfisema induzido por elastase

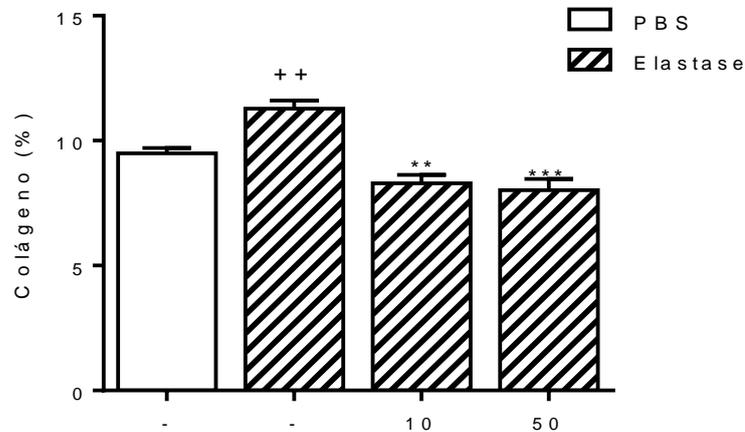
Para avaliar o efeito do cinamato de metila na deposição de MEC induzida pela administração de elastase em camundongos, os cortes histológicos de pulmões dos diferentes grupos experimentais foram submetidos a coloração com o corante tricômio de Masson. Esta coloração permite identificar a deposição de matriz extracelular no tecido pela coloração em azul. Na Figura 24 (pág.67) pode ser evidenciado uma maior deposição de MEC localizada na aérea ao redor dos brônquios pulmonares no grupo dos animais que receberam elastase comparado ao grupo controle PBS. Ao passo que, nos grupos tratados com as maiores doses de cinamato de metila, 10 ou 50 $\mu\text{mol/kg}$, houve uma redução nesta marcação, ao compararmos com o grupo controle elastase induzido.

Figura 24 – Histologia do pulmão evidenciando a deposição de matriz extracelular pela marcação com tricômio de Masson em animais com enfisema induzido por elastase.



Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar obtido de animais que receberam injeção intratraqueal de PBS (A) ou elastase (B), e de animais que foram tratados com cinamato de metila nas doses de 10 µmol/Kg (C), 50 µmol/Kg (D). Aumento de x200 (quadros A, B, C e D) e x400 (destaque), coloração tricômio de Masson.

Figura 25 – Análise quantitativa da deposição de matriz extracelular nos pulmões enfisematosos de camundongos estimulados com elastase e tratados com cinamato de metila.



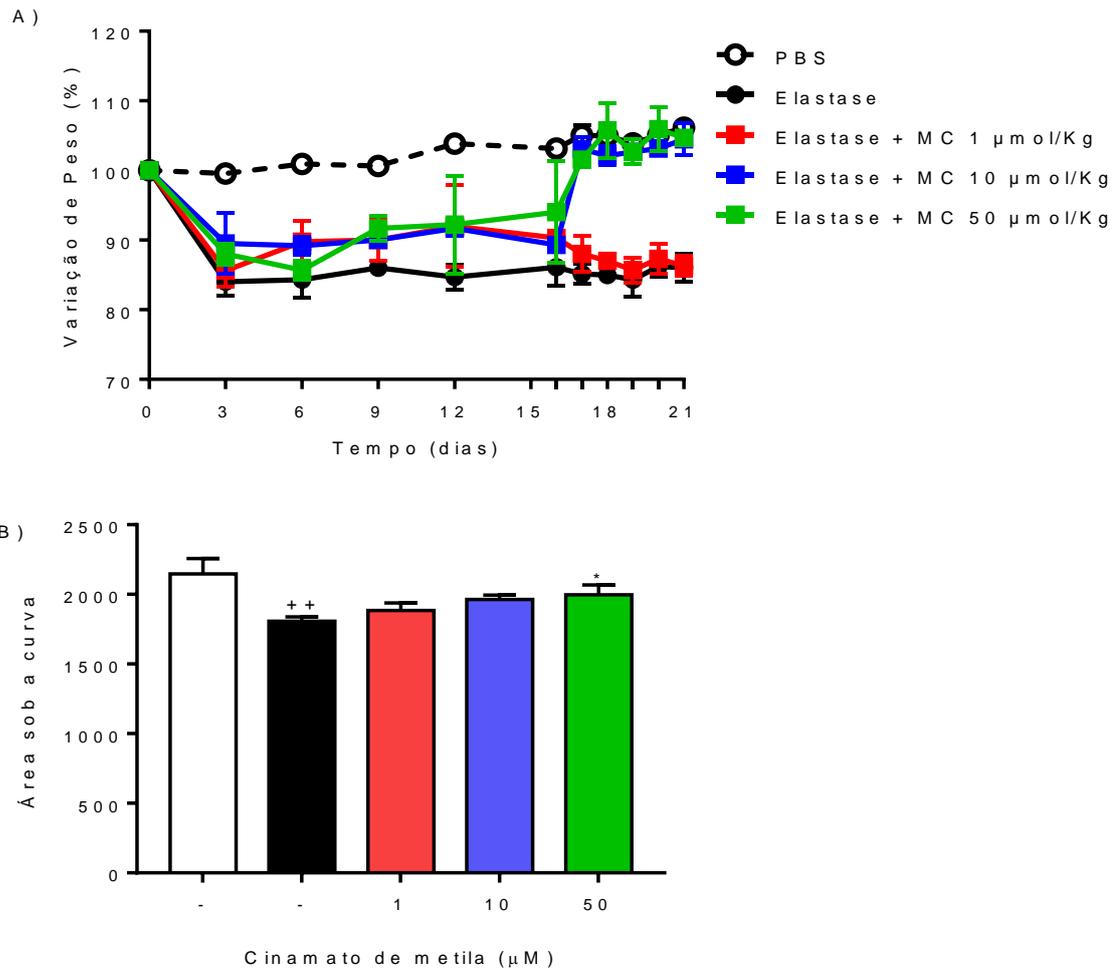
As barras representam a média \pm EPM (n= 5 campos/animal). ++p<0,05 quando comparado ao grupo controle (animais estimulados com PBS); *p<0,05 quando comparado ao grupo de animais estimulados com elastase sem tratamento.

5.6 Efeito do cinamato de metila sobre as alterações sistêmicas induzidas pela condição enfisematosa nos camundongos

Após a indução do enfisema pela elastase, os animais foram avaliados periodicamente para obter parâmetros sistêmicos como peso corpóreo e de órgãos como baço, fígado e rim. A Figura 26 (pág. 69) demonstra a variação de peso dos animais nos diferentes grupos experimentais. O peso dos animais do grupo controle (estimulados com PBS) mantiveram, ao longo de todo período experimental, uma constante na variação do peso corpóreo. Já os animais estimulados com elastase exibiram, na primeira semana pós-estímulo, uma redução no peso corpóreo a partir do terceiro dia após a administração da elastase. Esta redução permaneceu até o vigésimo primeiro dia pós-estímulo (último dia do experimento). O tratamento com cinamato de metila, nas doses de 10 ou 50 $\mu\text{mol/Kg}$, foi capaz de reverter a redução no peso dos animais após o décimo sexto dia (Figura 26, pág. 69). A Figura 26B representa a análise de área sob a curva obtida a partir da variação de peso dos animais ao longo dos dias do experimento. As áreas sob as curvas deixam ainda mais

evidente a redução de peso nos animais com enfisema, e que o tratamento com o cinamato de metila na dose de 50 $\mu\text{mol/Kg}$ foi capaz de reverter (Figura 26B).

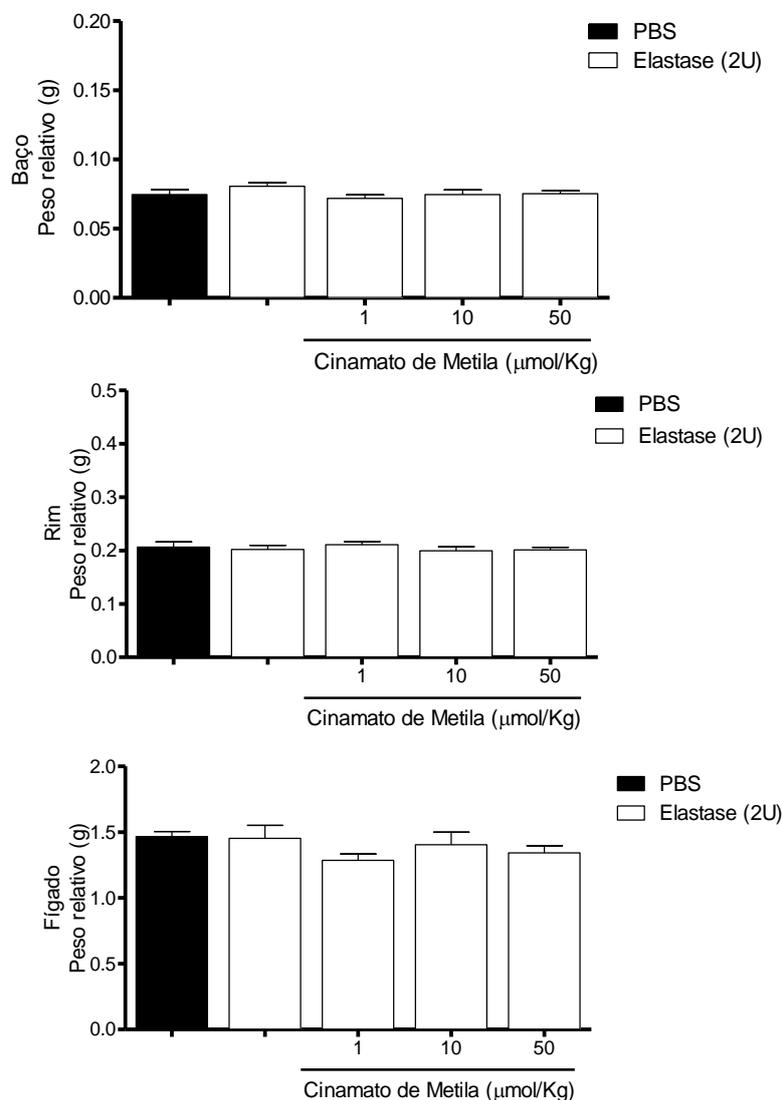
Figura 26 – Avaliação do cinamato de metila sobre o peso corporal de camundongos com enfisema induzidos por elastase.



Em (A) as linhas representam o perfil do peso dos animais ao longo do experimento. Os animais foram estimulados com elastase (2UI) no dia zero (0) e submetidos ao tratamento com uma dose diária de cinamato de metila (1, 10 e 50 $\mu\text{mol/kg}$) do dia 16 ao dia 20 pós-estímulo. Em (B) as barras representam a média \pm EPM (n=5) dos valores de área sob a curva obtidos a partir do dia 0 até o dia 21 pós-estímulo. A análise estatística foi detectada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, sendo ++ $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (animais estimulados com PBS); * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo de animais estimulados com elastase sem tratamento.

Ao exame macroscópico, os órgãos, baço, rim e fígado obtidos dos animais dos diferentes grupos experimentais, e observado ao longo dos dias do experimento, não demonstraram alterações morfológicas evidentes. Além disso, no dia 21 pós-estímulo com elastase o baço, rim e fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais também não exibiram variações significativas no peso relativo (Figura 27).

Figura 27 – Avaliação do peso relativo do baço, rim e fígado de animais com enfisema induzido por elastase

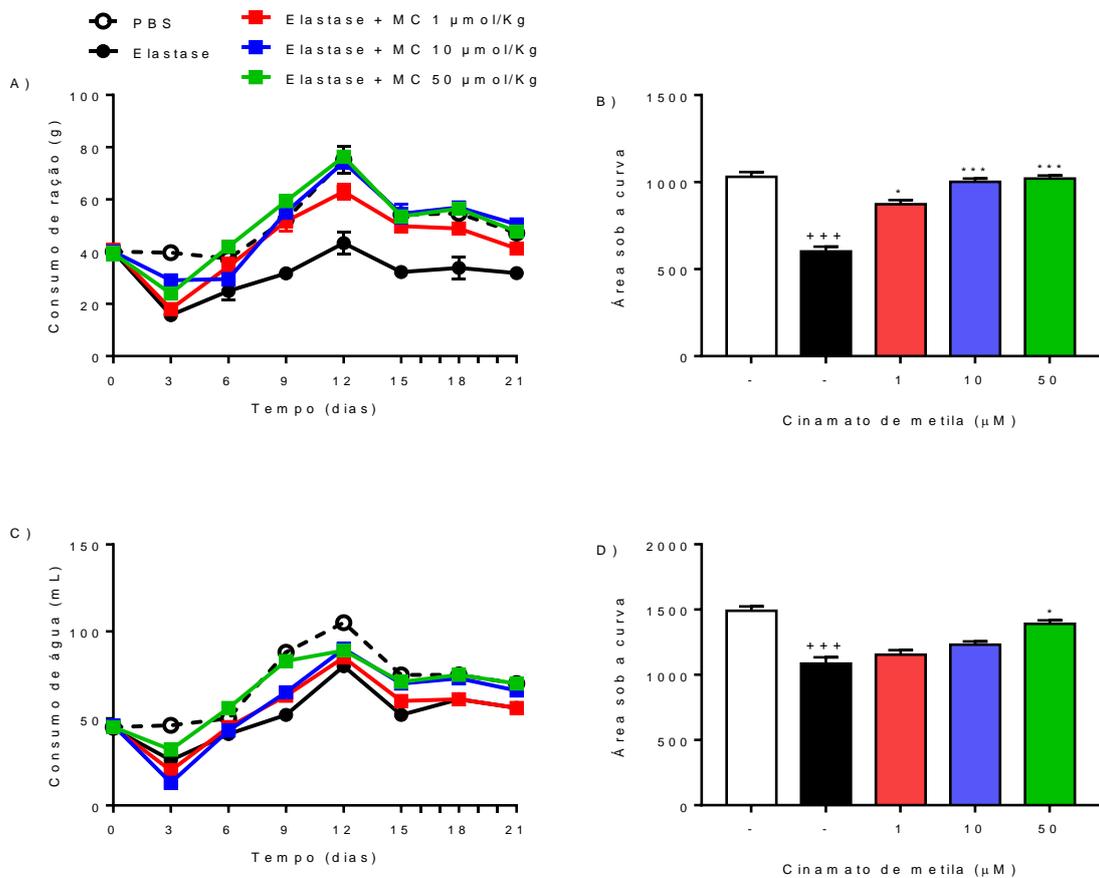


As barras representam a média \pm EPM (n=5).

Ao ser avaliado a ingestão de ração e água dos animais ao longo do período experimental (Figura 28), constatou-se que os animais estimulados com elastase exibiram uma redução no consumo de ração ao longo de todo período experimental

(Figura 28 A-B). Quando foi avaliado o consumo de água verificou-se que os animais com enfisema também apresentaram uma redução em sua ingestão (Figura 28 C-D). Os animais submetidos ao tratamento com cinamato de metila com enfisema exibiram uma recuperação tanto para a ingestão de ração quanto para o consumo de água.

Figura 28 – Avaliação do consumo de ração e água nos animais com enfisema induzido por elastase.



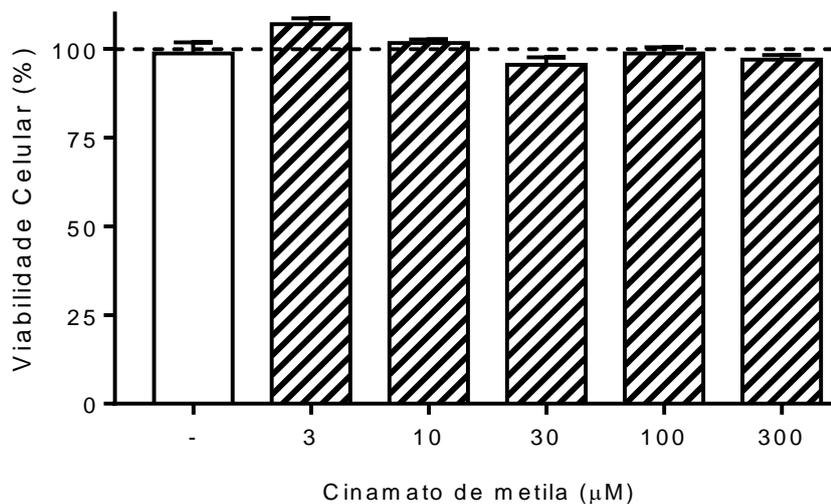
Em (A) as linhas representam o perfil do consumo de ração dos animais ao longo do experimento, enquanto que em (B) as barras representam a média \pm EPM (n=5) dos valores de área sob a curva obtidos a partir do dia 0 até o dia 21 pós-estímulo para o consumo de ração. Em (C) as linhas representam ingestão de água dos animais durante o experimento, enquanto que em (D) as barras representam a média \pm EPM (n=5) dos valores de área sob a curva obtidos a partir do dia 0 até o dia 21 pós-estímulo para o consumo de água. A análise estatística foi detectada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, sendo $+++p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (animais estimulados com PBS);

*** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo de animais estimulados com elastase sem tratamento.

5.7 Efeito do cinamato de metila sobre a viabilidade de células epiteliais alveolares

Com propósito de verificar o efeito direto do cinamato de metila sobre as células do epitélio alveolar, seguimos para avaliar se este composto teria algum efeito citotóxico sobre células alveolares humanas. Como evidenciado na Figura 28, o tratamento por 24 horas com cinamato de metila nas concentrações de 3, 10, 30, 100 ou 300 μM não afetou o perfil da viabilidade das células A549. Este resultado demonstra a ausência de atividade citotóxica do cinamato de metila nas concentrações testadas.

Figura 29 – Efeito do cinamato de metila sobre a viabilidade de células A549.

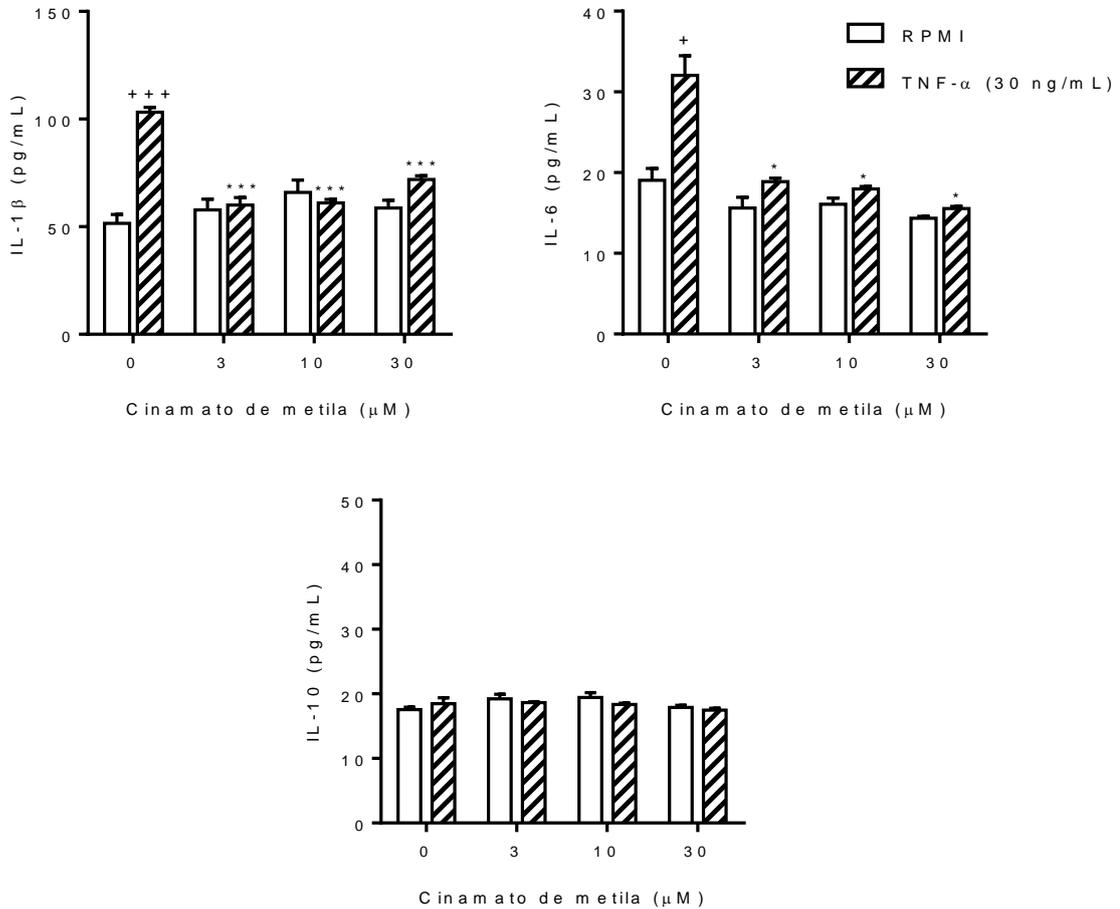


Células epiteliais do alvéolo humano da linhagem A549 foram tratadas com cinamato de metila (3-300 μM) por 24 horas. As barras representam a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes da porcentagem de células viáveis (%) quando comparados ao grupo controle que foram mantidas em meio de cultivo RPMI (linha tracejada). Células expostas ao veículo DMSO (0,023%) também foram usadas como controle (barra branca).

5.8 Efeito do cinamato de metila sobre a produção de citocinas IL-6, IL-1 β e IL-10 em células a549 estimuladas com TNF- α .

Com o intuito de avaliar o efeito do cinamato de metila sobre a produção de mediadores inflamatórios, a produção de citocinas foi quantificada pelo ensaio de ELISA. Para este propósito, as células foram tratadas previamente com cinamato de metila (3, 10 ou 30 μ M) por 1 h, e durante as 24 h de estimulação com TNF- α (30 ng/mL). Após o tempo de estimulação o sobrenadante foi recolhido e os mediadores quantificados. A Figura 30 (pág. 74) demonstra que células A549 estimuladas com TNF- α produzem níveis significativamente elevados de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β e IL-6. Porém, este mesmo estímulo não induziu aumento significativo da citocina anti-inflamatória IL-10. O tratamento com cinamato de metila, nas concentrações de 3, 10 ou 30 μ M diminuiu, respectivamente a produção de IL-1 β em aproximadamente 42%, 41% e 30% e de IL-6 em 41%, 44% e 51%.

Figura 30 - Efeito do cinamato de metila sobre a produção de citocinas em células A549 estimuladas com TNF- α .

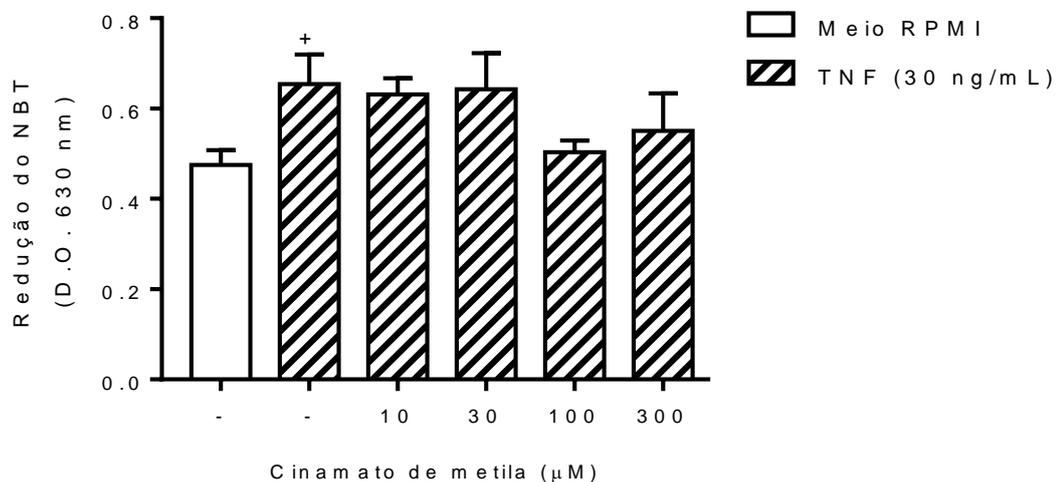


As barras representam os níveis de citocinas produzidas por células A549 tratadas com cinamato de metila (3, 10 e 30 μ M) e estimuladas com TNF- α (30 ng/mL) por 24 horas. Dados apresentados por média \pm E.P.M. de três experimentos independentes e as análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, sendo +++p<0,001 e +p<0,01 quando comparado as células não-estimuladas e ***p<0,001 e *p<0,01 quando comparados ao controle estimulado com TNF- α .

5.9 Efeito do cinamato de metila sobre a geração de espécies reativas de oxigênio.

Uma vez que o tratamento das células A549 com cinamato de metila afetou a produção de citocinas pró-inflamatórias, decidimos avaliar se este composto interferiria também com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células A549 estimuladas com TNF- α (30 mg/mL). A quantificação de EROs foi realizada pelo método do NBT a partir de amostras do sobrenadante das células A549 mantidas 24 h sob tratamento com cinamato de metila e estimulação com TNF- α (30 ng/mL). Conforme apresentado na Figura 31, células A549 estimuladas com TNF- α exibiram uma significativa produção de EROs quando comparado com células sem estímulo. Esta produção de EROs estimulada por TNF- α não foi afetada de forma significativa pelo tratamento das células A549 com 10, 30, 100 ou 300 μ M de cinamato de metila.

Figura 31 - Efeito do tratamento com cinamato de metila sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células A549 estimuladas com TNF- α .



As barras indicam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) representada pela redução do NBT em células A549 tratadas com cinamato de metila (10, 30, 100 e 300 μ M) e estimuladas com TNF- α (30 ng/mL) por 24 horas. Dados apresentados por média \pm E.P.M. de três experimentos independentes e as análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls, sendo + $p < 0,01$ quando comparado as células não-estimuladas.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito do cinamato de metila sobre a resposta inflamatória associada ao modelo murino de enfisema pulmonar induzido por elastase. Com este propósito, buscou-se caracterizar a ação do cinamato de metila sobre o recrutamento de leucócitos para as vias aéreas durante o estabelecimento do enfisema, quantificando ainda os mediadores inflamatórios no parênquima pulmonar de animais com enfisema. Para tanto, os animais estimulados com elastase foram tratados por via intranasal durante cinco dias consecutivos (do 16º ao 20º dia pós-elastase) com cinamato de metila. No tempo de 24 h após o último tratamento constatamos que houve uma redução no infiltrado inflamatório obtido do lavado broncoalveolar e uma diminuição no conteúdo de citocinas inflamatórias no pulmão. Observou-se ainda que o tratamento com cinamato de metila reverteu as alterações pulmonares (alargamento dos alvéolos e deposição de MEC) induzidas pela elastase sem afetar a macroscopia de órgãos como rim, fígado e baço. *In vitro*, o cinamato de metila não exibiu toxicidade na linhagem de células do epitélio alveolar humano A549. Além disso, em células A549 estimuladas por TNF- α , o cinamato de metila inibiu a produção de IL-1 β e IL-6, sem interferir com a produção de espécies reativas de oxigênio, o que reforça a proposta do cinamato de metila como um potencial candidato para tratamento das lesões pulmonares de base inflamatória.

É bem estabelecido que a doença pulmonar obstrutiva crônica se caracteriza por várias modificações na estrutura pulmonar, incluindo resposta inflamatória crônica e enfisema. Nesta condição, há destruição da estrutura alveolar e excesso de produção de muco, o que leva a um prejuízo na mecânica respiratória. A utilização de modelos animais de experimentação permite caracterizar aspectos fisiopatológicos da DPOC bem como investigar possíveis efeitos terapêuticos de candidatos a fármacos úteis para o tratamento das diferentes manifestações clínicas da doença (JOBSE et al. 2014).

Os camundongos são amplamente utilizados para realização de ciências em animais, uma vez que seu genoma apresenta semelhanças aos de humanos (WATERSTON et al., 2002). O amplo conhecimento sobre os aspectos anatomofisiológicos aliado a característica de apresentarem níveis menores de anti-protease e anti-tripsina, quando comparados a outros animais como os ratos para

predisposição ao enfisema, torna-os uma alternativa de escolha para estudos da condição enfisematosa (IHRIG; KLEINERMAN; RYNBRANT, 1971).

Em ciências com animais, o modelo que mais se aproxima da condição de enfisema em humanos é o tabagismo em cobaias. Porém, este modelo necessita submeter os animais a várias semanas de exposição à fumaça de cigarro para alcançar um nível detectável de lesão pulmonar (CHURG; WRIGHT, 2007).

Modelos utilizados nas ciências com animais para desenvolver enfisema podem ser destacados: o uso de proteases (papaína, elastase de neutrófilos), inalação de gases tóxicos (fumaça de cigarro), animais geneticamente susceptíveis ao desenvolvimento da doença ou geneticamente modificados para a doença (MAHADEVA; SHAPIRO, 2002). Dentre estes modelos, a administração de substâncias proteolíticas por via traqueal ou inalatória ainda é amplamente utilizada para induzir enfisema e suas repercussões fisiopatológicas no organismo (STEVENSON; BIRRELL, 2011).

A instilação intratraqueal de elastase em camundongos é um modelo útil, de fácil execução, alta reprodutibilidade e econômico para mimetizar rapidamente vários aspectos do enfisema humano quando comparado a outros modelos animais, além de permitir controlar a gravidade da doença de acordo com a dose da enzima utilizada para indução (WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008; GAMES et al., 2016; ZUREK et al., 2016). Estas alterações morfofisiológicas podem ser facilmente obtidas em um mês, e são geralmente investigadas num período entre duas e quatro semanas (SZABARI et al., 2015).

Apesar da instilação de protease reproduzir o enfisema causado por fumo, é importante mencionar que nesta condição a lesão pulmonar é imediata, e esse aspecto difere do que é encontrado em humanos no qual o enfisema mostra-se como uma doença progressiva e de caráter crônico (ANTUNES; ROCCO, 2011).

No modelo animal de indução de enfisema pulmonar sugere-se que aproximadamente 20% da perda de tecido parenquimatoso é causada diretamente pela ação da enzima, enquanto os demais 80% são provenientes da resposta inflamatória expressa pelo animal, o que torna esse modelo aceitável para avaliar os mecanismos subjacentes à essa progressiva perda de tecido alveolar, mecanismos de reparo/remodelação do tecido, relação estrutura *versus* lesões pulmonares, funções pulmonares *versus* mecânica do enfisema, investigar processos celulares,

moleculares e genéticos que impedem a cicatrização adequada do tecido pulmonar (LUCHEY et al. 2002). Essa mecanística permite ainda, investigar potenciais fármacos que atuem a retardar a progressão do enfisema (MORENO et al. 2014).

Tendo por base as vantagens e desvantagens do uso da elastase para induzir enfisema, o presente estudo mostrou-se como pioneiro na avaliação do uso do cinamato de metila como uma proposta de tratamento curativo para enfisema pulmonar. Em nossas condições experimentais, avaliamos o efeito do composto natural cinamato de metila, administrado por via intranasal, sobre as alterações pulmonares enfisematosas induzidas pela administração intratraqueal de elastase porcina pancreática em camundongos C57BL/6.

Os animais receberam por via intratraqueal 2 UI de elastase, e após 21 dias (Figura 19, pág 61), as análises revelaram extensos danos pulmonares compatíveis com enfisema humano, como presença de exsudato inflamatório contendo neutrófilos e macrófagos no trato respiratório inferior e aumento da secreção de diversos mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β e IL-6.

A avaliação do LBA é uma das análises metodológicas mais comuns e eficientes para monitorar a inflamação pulmonar (THEODORO-JÚNIOR et al., 2017). Nossos resultados revelaram que as contagens de leucócitos total e diferencial nas amostras de LBA dos grupos testados de animais injetados com elastase apresentaram intenso infiltrado inflamatório, fenômeno que se mostrou associado a elevação no número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Nos animais que receberam elastase e foram tratados com cinamato de metila observamos uma redução significativa nos valores totais de células, macrófagos, neutrófilos e linfócitos, em todas as doses testadas, ao compararmos ao grupo elastase, indicando ação anti-inflamatória. Parâmetros similares aos obtidos em nosso estudo foram reportados também por Roulet e colaboradores (2012), onde a administração de 25 UI de elastase (i.t.) induziu um aumento significativo na celularidade total do LBA quando em comparação com o grupo controle salina; deste total, cerca de 80% corresponde ao número de macrófagos alveolares.

Em linha com nossos resultados, em um estudo recente realizado por Theodoro-Junior et al. (2017) também utilizando elastase (30 UI) por via intratraqueal, as contagens total e diferencial de células inflamatórias do grupo elastase também evidenciaram aumento em todos os perfis celulares (macrófagos, neutrófilos, linfócitos

e eosinófilos) quando comparado ao grupo salina. Em particular, neste estudo, os animais foram tratados com um inibidor de protease da *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) e evidenciaram uma redução significativa no número destas células em comparação com aqueles que não receberam o tratamento, indicando uma importante ação anti-inflamatória da substância em teste. Dando suporte ao racional de que os produtos derivados de plantas podem apresentar efeitos relevantes que os tornam potenciais candidatos para o tratamento do enfisema.

Estendendo o uso de produtos de origem vegetal potencialmente úteis para a atenuação dos danos resultantes do enfisema, o estudo de Suzuki e colaboradores (2009) demonstrou que a curcumina, que é encontrada no gengibre (Zingiberaceae), também reduziu a resposta inflamatória no modelo de enfisema por elastase. Cabe destacar que a curcumina, assim como o cinamato de metila, são compostos derivados do ácido cinâmico.

Uma das primeiras alterações em tabagistas é o acúmulo de macrófagos nos bronquíolos respiratórios, estas células correspondem a mais de 95% da contagem total de células do LBA dos fumantes (SHAPIRO; INGENITO, 2005). Em um indivíduo acometido por enfisema, o número de macrófagos é persistentemente elevado, podendo estar de 5 a 10 vezes maior quando comparado com indivíduos não tabagistas, sendo característica também presente nos modelos murinos da doença (COSTA; RUFINO; LAPA E SILVA, 2009). Os neutrófilos e linfócitos também estão em número aumentados no espaço alveolar, no entanto, os neutrófilos correspondem a aproximadamente 1 - 2% do total celular, e os linfócitos em menor expressão (SHAPIRO; INGENITO, 2005).

A infiltração de macrófagos e neutrófilos é intensa no vigésimo primeiro dia após o estímulo enfisematoso (TAGUCHI et al., 2015). Além disso, é sabido que estas células desempenham papéis determinantes na progressão da doença, e são células predominantes no tecido pulmonar de pacientes enfisematosos (SZABARI et al., 2015). No presente estudo, constatamos um aumento significativo no acúmulo de leucócitos nas vias aéreas dos animais após 21 dias do estímulo (Figura 20, pág. 62).

Este aumento no número de leucócitos nas vias aéreas está associado também ao aumento no número de leucócitos no tecido pulmonar. No pulmão, os números de macrófagos, eosinófilos e linfócitos permanecem elevados durante semanas após administração do estímulo elastase, e esta razão está associada ao agravamento dos

danos pulmonares estruturais que podem ser visualizados histologicamente (LIMJUNYAWONG et al. 2015). Os resultados obtidos revelaram um intenso dano na estrutura do parênquima pulmonar após 21 dias da administração de elastase.

Os produtos de origem natural são amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças, muitos foram testados e foram eficazes no tratamento da inflamação pulmonar em modelos experimentais agudos e crônicos de doenças pulmonares. Compostos que apresentam potenciais efeitos anti-inflamatórios têm sido cada vez mais estudados, primando por atividades mais seletivas e que atuem na gênese da doença (GAMES et al., 2016).

A atividade anti-inflamatória de compostos derivados do ácido cinâmico tem sido demonstrada em diferentes modelos de doenças respiratórias. Assim como, derivados do ácido cinâmico alguns flavonóides são capazes de inibir a atividade da elastase e esses efeitos provavelmente envolvem redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, fatores quimiotáticos e supressão do estresse oxidativo (BRAS et al., 2010). Até o momento, não há estudos que reportem o efeito do cinamato de metila na inflamação das vias aéreas e pulmão no modelo de enfisema.

Nos modelos animais de enfisema induzido por elastase, há uma destruição direta das fibras elásticas e MEC, que por consequência iniciam um processo de reparo que envolve recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão, dentre estas, neutrófilos ativados que liberam mais elastase e produzem espécies reativas que favorecem a um ambiente proteolítico (TAGUCHI et al., 2015).

No presente estudo, realizamos a quantificação de mediadores inflamatórios pelo ensaio de ELISA e, verificamos que a estimulação por elastase aumentou os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α (Figura 21, pág. 63). Em animais tratados com cinamato de metila observou-se uma diminuição da produção dessas citocinas, o que poderia sustentar a redução no recrutamento de células inflamatórias, e conseqüentemente, a possível redução no dano tecidual.

A inflamação crônica persistente é uma das chaves sob o mecanismo da patogênese da DPOC, é permeada pela infiltração celular das vias aéreas, mediadores característicos como citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e TGF- β , recrutamento de neutrófilos e macrófagos (COSTA; RUFINO; LAPA E SILVA, 2009).

Os macrófagos são células fundamentais na fisiopatologia do enfisema, capazes de liberar vários mediadores inflamatórios envolvidos na destruição do parênquima alveolar; TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, entre outras, estão envolvidas na progressão da doença. Games et al. (2016) avaliaram três monoterpenos na secreção de citocinas no BAL por ELISA, evidenciando que os tratamentos reduziram os níveis de IL-6 e IL-1 β de forma semelhante ao grupo salina. Cepas de camundongos deficientes em receptores para TNF- α , IL-1 β e IL-6, são protegidas do enfisema, enquanto cepas que expressam níveis elevados destes receptores são mais propensas ao desenvolvimento da doença (RUWANPURA et al. 2011; THOMSON et al. 2012).

A utilização de compostos naturais pode ser uma alternativa para o tratamento da DPOC. Estudos prévios demonstraram que o tubérculo de *Alisma orientale* suprimiu vários distúrbios inflamatórios, incluindo a infiltração pulmonar neutrofílica em um modelo de rato com lesão pulmonar aguda (KIM et al., 2016).

Consoantes aos nossos resultados, outros estudos também observaram que o infiltrado leucocitário no enfisema experimental é composto principalmente por linfócitos, neutrófilos e macrófagos, presentes também em regiões peribronquiolares (ROULET et al., 2012). Resultados obtidos por Martins-Oliveira et al. (2016) demonstraram também que o impedimento no acúmulo leucocitário nas vias aéreas e atenuou o dano tecidual associado ao enfisema.

É reconhecido que os leucócitos exercem papéis determinantes na progressão do enfisema, uma vez que são capazes de secretar MMPs que clivam a elastina e o colágeno (SZABARI et al., 2015), promovendo destruição alveolar e remodelamento inadequado do parênquima com deposição de colágeno e fenômenos elastolíticos (PADILHA et al., 2015).

Em estudo desenvolvido por Lima e colaboradores (2014), ratos com colite apresentaram níveis aumentados de IL-1 β sanguíneos, porém ao serem tratados com cinamato de metila, houve reversão significativa dos níveis desta citocina pró-inflamatória. Neste aspecto, estes achados estão em sintonia aos observados em nosso estudo, visto que também constatamos uma redução no conteúdo de IL-1 β no tecido inflamado (Figura 21, pág.63).

Para verificar se os efeitos protetores do cinamato de metila se estenderiam ao tecido pulmonar, realizamos análises histopatológicas do pulmão para evidenciar as

alterações estruturais associadas ao enfisema nos animais estimulados com elastase. Nossos resultados revelaram que os cortes histológicos de animais estimulados com PBS e corados por H&E apresentaram estruturas pulmonares normais. No entanto, com a administração de elastase, observou-se o desenvolvimento de estruturas heterogêneas, com grandes áreas de destruição tecidual, espaços aéreos aumentados, quebras nas paredes septais e presença de infiltrado inflamatório, fenômenos estes, que podem ser facilmente visualizados nas imagens do grupo (Figura 22, pág. 65). No entanto, os animais ao receberem tratamentos com cinamato de metila nas diferentes doses, apresentaram diâmetros alveolares muito menores quando comparados com o grupo estimulado com elastase.

Nossos resultados se assemelham aos observados por Takata e colaboradores (2015), onde a administração de elastase (3 UI) causou significativa destruição da parede alveolar em comparação com os grupos veículo ou ao grupo estimulado com elastase em concentrações dez vezes menor (0,3 UI). Szabari et al. (2015) em seu ensaio de instilação única de elastase (5 UI) por via intratraqueal e análises realizadas após diferentes períodos de tempo (3, 10, 21 e 105 dias), afirmaram haver deterioração progressiva e contínua dos volumes e da mecânica pulmonares, mesmo 105 dias após a indução, bem como, também evidenciaram destruição tecidual, com espaços aéreos aumentados e falhas nas paredes septais durante a progressão da doença. Tendo por base estas informações, em nosso estudo padronizamos o tempo de 21 dias para avaliar as alterações inflamatórias causadas pela administração de elastase.

Com a ruptura de paredes septais, pode ocorrer coalescência entre alvéolos vizinhos e, em consequência aumento dos diâmetros alveolares alterando a estrutura local e influenciando no desempenho funcional; ou ainda destruição de fibras elásticas que sustentam as paredes pulmonares, o que, por sua vez, diminuem a rigidez pulmonar, propiciando um aumento na tensão das fibras vizinhas, aumentando a probabilidade de outras rupturas subsequentes. Neste contexto, a ruptura das paredes septais, da estrutura alveolar e a rigidez parenquimatosa tornam-se mecanismos intimamente ligados que induzem a um rearranjo estrutural heterogêneo e declínio da função pulmonar (HAMAKAWA et al., 2011; SZABARI et al., 2015). A falha mecânica do órgão, por sua vez, gera fragmentos que são quimioatraentes aos macrófagos (HOUGHTON et al., 2006), propiciando um processo repetitivo: a inflamação do tecido

pulmonar promove falha mecânica, que por sua vez, mantém a inflamação, tendendo a progressão e posterior estabilidade da doença (SZABARI et al., 2015).

Cortes corados com H&E foram usados para avaliar o espaço aéreo alveolar, o que é amplamente aceito como um indicador da presença de enfisema (AGGARWAL et al., 2018). A quantificação estrutural no pulmão consegue mensurar a gravidade da doença, bem como a resposta de intervenções experimentais ao tratamento. Permite uma interpretação significativa dos resultados, com poder estatístico adequado e facilita comparações entre grupos experimentais e entre diferentes estudos (HSIA et al., 2010). A quantificação do espaço aéreo alveolar utilizando morfometria é de extrema importância para avaliar o efeito do tratamento com cinamato de metila no modelo de enfisema induzido por elastase.

Utilizando uma abordagem quantitativa para verificar a reversão do enfisema após tratamento com cinamato de metila, analisamos a ampliação do espaço aéreo alveolar (Figura 23, pág. 66). A estimulação com elastase levou ao aumento nos espaços alveolares nos animais, quando comparados com o grupo controle, característica marcante do enfisema imposta pela destruição das paredes dos alvéolos. Em sintonia com nossos resultados, verificamos que as análises histológicas realizadas por Padilha et al. (2015), após a administração de 0,1 UI de elastase/i.t./semana, durante quatro semanas, revelaram maior Intercepto Linear Médio (Lm), bem como maior aumento da infiltração celular, células mononucleares e neutrófilos, no tecido pulmonar no grupo controle elastase que no grupo controle salina, além de destruição de septos alveolares, o que condiz com nossos achados.

A ruptura do tecido pulmonar acarreta a perda de recuo elástico, com consequente aumento dos espaços aéreos, o que leva a obstrução ao fluxo aéreo, com prejuízo as trocas gasosas e hiperinsuflação pulmonar (ZUREK et al., 2016). Os espaços alveolares do modelo utilizado por Games et al. (2016) também aumentaram no grupo elastase em comparação com os animais que receberam apenas solução salina, assim como aqui evidenciado, tendo os monoterpenos atenuado o enfisema, como foi observado pelos menores valores de Lm em relação ao grupo elastase.

No modelo experimental desenvolvido por Kuhl e colaboradores (2014), que avaliava diferentes graus de enfisema pulmonar induzidos pela administração de diferentes doses de elastase (0,1; 0,15 e 0,2 UI) em camundongos, observaram que doses mais altas da enzima resultaram em Lm aumentado, quando comparado aos

valores do grupo controle, um padrão de dano semelhante ao enfisema progressivo em humanos.

O tratamento com as diferentes concentrações de cinamato de metila conseguiu diminuir ou inibir de maneira efetiva estas expansões de áreas alveolares. Em estudo realizado por Almeida-Reis e colaboradores (2017) utilizaram uma substância natural, inibidor de antiprotease, e encontraram resultados semelhantes aos evidenciados em termos de reversão da expansão do espaço aéreo alveolar e inibição do recrutamento de células inflamatórias. Considerando que iniciamos o tratamento com cinamato de metila após 15 dias do estímulo com elastase, desconsideramos a possibilidade do composto cinamato de metila atuar como uma antiprotease, uma vez que consideramos que o dano aos alvéolos já estava estabelecido.

Após administrações múltiplas de elastase (0,4 UI/i.t.) para indução do enfisema, Henriques et al. (2016) concluíram em seu modelo que os níveis de IL-1 β e TNF- α estavam mais elevados; houve colapso alveolar, hiperinsuflação pulmonar, com aumento da área dos espaços aéreos e do número de neutrófilos, aumento da deposição de colágeno resultando em danos estruturais do epitélio e células endoteliais, resultados semelhantes observados neste estudo. Considerando as informações apresentadas até o momento, podemos sustentar a proposta de que o cinamato de metila parece apresentar efeitos inibidores do dano pulmonar por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, o infiltrado leucocitário para as vias aéreas e pulmão.

Com intuito de avaliar a repercussão sistêmica do enfisema, ao analisarmos a média do ganho de peso corporal dos animais, constatamos uma redução no peso dos animais que receberam o estímulo com elastase (Figura 26, pág. 70). De forma interessante, aqueles animais com enfisema que foram tratados com a maior dose de cinamato de metila exibiram uma reversão na redução do peso corpóreo.

O enfisema pode ser considerado uma doença sistêmica, caracterizada por alterações esqueléticas, fraqueza, disfunção muscular e perda de peso, a qual ocorre em virtude de estresse oxidativo e ingestão calórica reduzida. É reconhecido que o tabagismo contribui para a perda de peso, agrava o enfisema e gera um circuito de retroalimentação (KOZMA et al., 2014).

A acentuada perda de peso observada no presente estudo não ocorreu em virtude da ação direta da elastase, mas sim em decorrência do estabelecimento do quadro enfisematoso, haja vista a redução ter sido observada no terceiro dia após o estímulo. Em nossas condições, o tratamento com cinamato de metila na maior dose reverteu a redução de peso. Vale mencionar que este ganho de peso pode estar associado ao aumento na ingestão de ração, que pode ou não, estar relacionado ao estabelecimento do quadro patológico dos animais (Figura 28, pág. 72). Para esclarecer este aspecto mais estudos são necessários.

Na progressão do enfisema pulmonar, uma vez que, os espaços aéreos alveolares aumentam, há conseqüente diminuição do conteúdo de elastina e aumento do conteúdo de colágeno, sendo bastante plausível que após a destruição dos alvéolos, desapareçam todos os componentes da MEC, induzindo a ocorrência de reparos aberrantes, com fibras elásticas parenquimatosas desordenadas e excesso de colágeno anormalmente organizado (SHAPIRO; INGENITO, 2005; SZABARI et al., 2015). Fragmentos de elastina são quimioatraentes para monócitos e fibroblastos (SHAPIRO; INGENITO, 2005), e é de conhecimento que estas células produzem diferentes MMPs que degradam diretamente o colágeno da MEC (D'ARMIENTO et al., 1992), situação que pode amplificar a resposta inflamatória contribuindo para o perfil progressivo e crônico do enfisema.

A administração de elastase é capaz de produzir enfisema promovendo redução na fração de fibras de colágeno nos septos alveolares, entretanto, na fase de remodelação tecidual, que se inicia aproximadamente oito dias após o estímulo da enzima, há depósito de colágeno em volta dos brônquios (KUHL et al., 2014).

Em nosso estudo, amostras de tecido pulmonar foram submetidos a processamento histopatológico para análise por coloração com tricômio de Masson que revelam deposição de MEC em coloração azul e os demais componentes estruturais em vermelho, o que permite uma análise mais ampliada da estrutura pulmonar durante a progressão da doença (Figura 24, pág. 68). Em virtude da destruição das fibras elásticas, seguida por uma renovação do conteúdo de colágeno, os resultados obtidos indicaram um aumento na deposição de matriz extracelular nos animais estimulados com elastase em comparação com os tratados com PBS. Já nos animais com enfisema o tratamento com cinamato de metila nas maiores doses, 10 ou 50 $\mu\text{mol/Kg}$, reduziram a deposição de colágeno, sugerindo redução na destruição

do tecido pulmonar, ou ainda, uma redução na síntese de colágeno pelas células produtoras, tal como fibroblasto (Figura 25, pág. 69). No entanto, para saber se o cinamato de metila possui algum efeito direto sobre a síntese de colágeno, estudos futuros são necessários. Nossos resultados encontram respaldo na literatura uma vez que o estímulo com elastase induz aumento na proporção de fibras de colágeno no pulmão de camundongos, fenômeno que se mostrou relacionado com aumento da resposta inflamatória e sensível ao tratamento com inibidor de protease (THEODORO-JUNIOR et al., 2017; ALMEIDA-REIS et al., 2017).

No cenário de destruição das paredes alveolares, dá-se início a um processo de reparo anormal de remodelação das fibras de colágeno, e este fenômeno contribui para o desenvolvimento do enfisema. No estudo de Ito et al. (2005) foi observado aumento de 45% do conteúdo de colágeno total dos pulmões de camundongos após a lesão elastolítica. Outros estudos, como os de Tanaka e colaboradores (2001), o aumento no conteúdo de colágeno foi menor, porém ainda com significância estatística de 38%.

O cinamato de metila é um composto de uso já muito difundido para finalidades cosmética e alimentícia. Estudos de toxicidade oral, realizados no Research Institute for Fragrance Materials (1975) dos Estados Unidos com ratos expostos a cinco administrações de cinamato de metila em dose de até 6,0 g/Kg por um período de 14 dias, revelaram sinais clínicos de diminuição respiratória com uma dose igual ou superior 3,16 g do composto/kg de peso corporal. Neste estudo, não houve evidências de alterações teciduais em todos os animais após eutanásia e necropsia. Estabelecidos parâmetros para dose letal mediana de 2,61 g/kg e intervalo de confiança no nível de 95% nas doses entre 2,00 a 3,41 g/kg. Dados que demonstram a segurança no uso deste composto. Apesar do nosso estudo submeter os animais ao tratamento por via intranasal, não observamos qualquer indicativo de toxicidade após tratamento nas doses utilizadas. Outro aspecto importante a ser mencionado refere-se à ausência de citotoxicidade do cinamato de metila quando exposto in vitro diretamente sobre células A549 (Figura 29, pág. 73), o que sustenta a segurança de uso deste derivado do ácido cinâmico.

Dando sustentação aos nossos achados sobre a ausência de citotoxicidade, os estudos de Ballabeni e coautores (2010) revelaram que o óleo essencial de *Ocotea quixos*, que possui grande quantidade de cinamato de metila também não se mostrou

citotóxico para células J774. Neste mesmo estudo, os autores ainda demonstraram que a produção de óxido nítrico induzida por LPS foi suprimida pelo tratamento com cinamato de metila de maneira dependente de dose.

Com propósito de verificar se o cinamato de metila possui capacidade de interferir com a secreção de citocinas inflamatórias produzidas por células do epitélio alveolar, submetemos as células A549 a estimulação com TNF- α . Nossos resultados revelaram que o perfil anti-inflamatório do cinamato de metila ficou evidente, uma vez que a secreção de IL-1 β e IL-6 foram significativamente suprimidos pelo cinamato de metila. Estes resultados são relevantes uma vez que está bem consolidado o papel da IL-6 e IL-1 β no estabelecimento e progressão do enfisema (RUWANPURA et al., 2011; ZOU et al., 2017). Neste mesmo conjunto de experimentos, os níveis de IL-10 não foram afetados pelo estímulo com elastase, ou mesmo pelo tratamento com o derivado do ácido cinâmico.

O aumento da expressão de espécies oxidativas, substâncias secretadas por células imunes ativadas e estruturais ou partículas tóxicas da fumaça do cigarro ou outros agentes, resultam alto grau de estresse oxidativo nos pulmões de pacientes com DPOC. A inflamação e o estresse oxidativo são mecanismos inseparáveis neste assunto (KHAN et al., 2014). Além das citocinas IL-6 e IL-1 β , o óxido nítrico tem-se revelado como um mediador crítico para a progressão do enfisema, tanto que valores de óxido nítrico exalado vêm sendo utilizado como marcador da severidade da DPOC (RIO et al., 2018). Em nosso estudo, ao estimular as células do alvéolo com TNF- α constatamos um significativo aumento na produção *in vitro* de óxido nítrico, porém, o tratamento com cinamato de metila não inibiu esta produção (Figura 30, pág. 75). Este dado sugere que o cinamato de metila pode atuar em vias moleculares distintas afetando de forma diferencial a produção de citocinas e a produção de mediadores não proteicos.

Tomando em conjunto todos os resultados é possível especular que a diminuição da resposta inflamatória das vias aéreas e a reversão do dano pulmonar pode ser devido a ação do cinamato de metila sobre as células do epitélio das vias aéreas *in vivo*. Tendo por base que o cinamato de metila tem efeitos anti-inflamatórios diretos sobre células epiteliais estimuladas *in vitro*.

7 CONCLUSÃO

Com a realização deste estudo, estabelecemos na Universidade Federal de Alagoas, o modelo de enfisema induzido por elastase em camundongos. Os resultados obtidos demonstram, pela primeira vez, que o tratamento curativo com cinamato de metila reduziu a resposta inflamatória associada ao enfisema induzido por elastase em camundongos. Este modelo animal mimetiza aspectos da doença em humanos, reproduzindo o dano à arquitetura pulmonar marcada pela destruição das paredes alveolares, intenso infiltrado de células inflamatórias, e aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no pulmão. Demonstramos ainda que o tratamento com cinamato de metila reverteu a lesão enfisematosa pulmonar induzido por elastase. Outra observação importante refere-se a aparente ausência de toxicidade com uso do cinamato de metila, visto que nas concentrações utilizadas *in vivo* não induziu alterações macroscópicas nos rins, fígado e baço, nem exibiu efeitos citotóxicos nos ensaios *in vitro* sobre as células A549. Além disso, constatamos o efeito direto do cinamato de metila em suprimir a produção de mediadores pró-inflamatórios em células A549 estimuladas com TNF- α . Portanto, o cinamato de metila mostra-se como um promissor agente para o desenvolvimento de um medicamento para o tratamento das condições inflamatórias associadas ao enfisema.

REFERÊNCIAS

ABBOUD, R. T.; VIMALANATHAN, S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. vol.12, n. 4, p. 361 – 367, Apr. 2008. PMID: 18371259.

AGGARWAL, S. A. et al. Heme scavenging reduces pulmonary endoplasmic reticulum stress, fibrosis, and emphysema. **JCI Insight**. vol. 3, n. 21, e120694.2 Nov. 2018. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.046.

AGASSANDIAN, M.; MALLAMPALLI, R. K. Surfactant phospholipid metabolism. **Biochimica et biophysica acta**. vol. 1831, n. 3, p. 612 - 625. Mar. 2013. doi:10.1016/j.bbalip.2012.09.010

ALMEIDA-REIS, R. et al. Plant proteinase inhibitor bbci modulates lung inflammatory responses and mechanic and remodeling alterations induced by elastase in mice. **BioMed Research International**. vol. 2017. Mar. 2017. doi:10.1155/2017/8287125.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures for African Americans 2019-2021. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer>

ANTUNES, M. A.; ROCCO, P. R. M. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v. 83, n. 4, p. 1385 – 1396. Dec. 2011. ISSN 0001-3765.

ANTUNES, M. A. et al. Effects of different mesenchymal stromal cell sources and delivery routes in experimental emphysema. **Respiratory Research**. vol. 15, n. 1 118. Oct. 2014. doi: 10.1186/s12931-014-0118-x.

ARBEX, M.A. et al. Assessment of the effects of sugar cane plantation burning on daily counts of inhalation therapy. **Journal of the Air & Waste Management Association**. vol. 50, n. 10, p. 1745 – 1749. Pittsburgh, 2000.

BALLABENI, V. et al. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. *Fitoterapia*. vol. 81, n. 4, p. 289 - 295. Jun. 2010. doi:10.1016/j.fitote.2009.10.002.

BARNES, P.J. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. **Annual review of medicine**. vol. 54, p. 113 - 129. Dec. 2003 doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152209

BARNES, P.J. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews. Drug Discovery**. vol. 12, n. 7, p. 543 - 559. Jul. 2013. doi:org/10.1038/nrd4025.

BARNES, P. J et al. Barriers to new drug development in respiratory disease. **The European respiratory journal**. vol. 45. n. 5. P. 1197 – 1207. May. 2015. doi:10.1183/09031936.00007915

BARNES, P. J. Small airway fibrosis in COPD. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. vol. 116. Nov. 2019. doi:10.1016/j.biocel.2019.105598.

BARROSO, M. V. et al. Propolis reversed cigarette smoke-induced emphysema through macrophage alternative activation independent of Nrf2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. vol. 25, n. 20, p. 5557 – 5568. Oct. 2017. doi:10.1016/j.bmc.2017.08.026.

BHATIA, S. P. Fragrance material review on methyl cinnamate. **Food and Chemical Toxicology**. vol. 45, n. 1(1), p. 113 -119, 2007. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.077.

BRANDÃO, M. D. G. L. et al. Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. *Environmental Monitoring and Assessment*. vol. 185, p. 7013 – 7023. Jan. 2013. doi.org/10.1007/s10661-013-3081-y

BRAS, N. F. et al. Inhibition of pancreatic elastase by polyphenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 58, n. 19. 2010. doi: 10.1021/jf1017934.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria SAS/MS no 609, de 06 de junho de 2013, retificada em 14 de junho de 2013. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Doença pulmonar obstrutiva crônica. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/pcdt-doenca-pulmonar-obs-cronica-livro-2013.pdf>

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria Executiva. Datasus. Informações de Saúde. Morbidade e informações epidemiológicas. 2019. Acesso em: 01 de fevereiro de 2020. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>.

BRASIL, **Ministério da Saúde**. Instituto Nacional do Câncer. Tabagismo. Acesso em: 01 de maio de 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tabagismo>.

CAMPOS, H. S. **Jornal Brasileiro de Medicina**. vol. 101, n. 3, p. 15 – 30. Maio/Junho 2013. ISSN 0047-2077

CASTRO, H.G. et al. Contribuição ao estudo das plantas medicinais. **Metabólitos secundários**. 2ª ed. p.113, 2004.

CHEN, Y.-Y. et al. Methyl cinnamate inhibits adipocyte differentiation via activation of the CaMKK2–AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 60, n. 4, p. 955 - 963. Feb. 2012. doi:10.1021/jf203981x.

CHURG, A.; WRIGHT, J. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive lung disease. **Contributions to microbiology**. vol. 14, p. 113 - 125. 2007 doi:10.1159/000107058

CHRUSCIEL, S. et al. Lack of transcription factor p53 exacerbates elastase-induced emphysema in mice. **American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology**. vol. 54, n. 2, p. 188 – 199. Feb. 2016. doi: 10.1165/rcmb.2014-0375OC.

CORNELL, B. 2016. *Referencing*. [ONLINE] Available at: <http://ib.bioninja.com.au>. [Accessed 18 October 2018]

COSTA, C. H.; RUFINO, R; LAPA E SILVA, J.R. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. **Revista Associação Médica Brasileira**. vol. 55, n. 3, p. 347 - 354. 2009. DOI: 10.1590/S0104-42302009000300031.

CRAIG, J. M.; SCOTT, A. L.; MITZNER, W. Immune-mediated inflammation in the pathogenesis of emphysema: insights from mouse models. **Cell Tissue**. vol. 367, n. 3 p. 591 - 605. Oct. 2016. doi: 10.1007/s00441-016-2567-7.

CRUZ, T. et al. Interaction between polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and peritoneal macrophages: MTT metabolism, NBT reduction, and NO production. **Pharmaceutical Research**. vol. 14, n. 1, p. 73 - 79. Jan. 1997. doi:10.1023/a:1012059501947

DAVIS, A. M; THANE, K. E.; HOFFMAN, A. M. Practical Methods for Assessing Emphysema Severity Based on Estimation of Linear Mean Intercept (Lm) in the Context of Animal Models of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), vol. 1639, p. 93 - 106. 2017. doi:10.1007/978-1-4939-7163-3_9.

D'ARMIENTO, J. et al. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. **Cell**. vol. 71, n. 6, p. 955 - 961. Dec. 1992. doi:10.1016/0092-8674(92)90391-o.

DE VITA, D. et al. Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. vol. 26, n. 24. p. 5931-5935. Dec. 2016. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.10.091.

DI PETTA, A. Pathogenesis of pulmonary emphysema – cellular and molecular events. **Einstein**. vol. 8, n. 2, p. 248 – 251. Jun. 2010. ISSN 2317-6385.

DIJK, V. E. M. et al. Elastase-induced parenchymal disruption and airway hyperresponsiveness in mouse precision cut lung slices: toward an ex vivo COPD model. **Frontiers in Physiology**. vol. 7, n. 657. Jan. 2017. doi: 10.3389/fphys.2016.00657.

FERREIRA-CECCATO, A.D. et al. Short-term effects of air pollution from biomass burning in mucociliary clearance of Brazilian sugarcane cutters. **Respiratory medicine**. vol.105, n. 11, p. 1766 – 1768, 2011.

FERRO, A. B., et al. Optimização da técnica do tricómio de Masson. **Revista Técnica de Anatomia Patológica. Mícron**. n. 13, ano 9, Julho, 2006.

FINK, K. et al. Determination of ²H/¹H and ¹³C/¹²C isotope ratios of (E)-methyl cinnamate from different sources using isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. vol. 52, p. 3065-3068. Apr. 2004. doi: 10.1021/jf040018j.

FUJIWARAA, G.M. et al. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. vol. 139, p. 238-244. May. 2017. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.01.046.

GRABIEC, A. M.; Hussell, T. The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. **Seminars in immunopathology**. vol. 38, n. 4, p. 409 - 423. Jul. 2016. doi:10.1007/s00281-016-0555-3

GAMES, E. et al. Structurally related monoterpenes p-cymene, carvacrol and thymol isolated from essential oil from leaves of *Lippia sidoides* cham. (verbenaceae) protect mice against elastase-induced emphysema. **Molecules**. vol. 21, n. 10(1390). Oct. 2016. doi:10.3390/molecules21101390.

GOLD. Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2019.

GOLDNER, J. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. **American Journal of Pathology**. v.14, n. 2, p. 237 - 243, 1938.

GUIA, Y. et al. Methyl cinnamate alleviated CCI-induced upregulation of spinal AMPA receptors and pain hypersensitivity by targeting AMPK. **European Journal of Pharmacology**. vol 833, p. 183 - 189. Aug. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.033>

GUILLOT, L. et al. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. vol. 45. n. 11. p. 2568 - 2573. Aug. 2013. doi:10.1016/j.biocel.2013.08.009.

GUOA, R. et al. Phenylpropanoid derivatives from the fruit of *Crataegus pinnatifida* Bunge and their distinctive effects on human hepatoma cells. **Phytochemistry**. vol. 164. p. 252-261. Aug. 2019. doi:10.1016/j.phytochem.2019.05.005.

HAMAKAWA, H. et al. Structure–function relations in an elastase-induced mouse model of emphysema. **American journal of respiratory cell and molecular biology**. vol. 45, n. 3 p. 517 - 524. Set. 2011 doi:10.1165/rcmb.2010-0473OC.

HAN, M. K. et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes. The future of copd. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. vol. 182. Dec. 2009. doi.org/10.1164/rccm.200912-1843CC

HASENBERG, M. et al. Cellular immune reactions in the lung. **Immunological reviews**. vol. 251, n. 1, p. 189 - 214. Jan. 2013. doi:10.1111/imr.12020

HENRIQUES, I. et al. Moderate Aerobic Training Improves Cardio respiratory Parameters in Elastase-Induced Emphysema. **Frontiers in Physiology**. Vol 7 n. 329. Aug. 2016. doi: 10.3389/fphys.2016.00329

HENSON, P.M. et al. Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease?. **Proceedings of the American Thoracic Society**. vol. 3, n. 8, p. 713 - 717. Nov. 2006. doi:10.1513/pats.200605-104SF

HOGG, J. C; SENIOR, R. M. Chronic obstructive pulmonary disease c2: Pathology and biochemistry of emphysema. **Thorax**. vol. 57, n. 9, p. 830 - 834. Sep. 2002. doi:10.1136/thorax.57.9.830.

HOUGHTON, A. M. et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. **The Journal of clinical investigation**. vol. 116, n. 3 p. 753 - 759. Mar. 2006. doi:10.1172/JCI25617

HSIA, C. C. W. et al. How to measure lung structure--what for? On the "Standards for the quantitative assessment of lung structure. **Respiratory physiology & neurobiology**. vol. 171, n. 2, p. 72 - 74. Apr. 2010. doi:10.1016/j.resp.2010.02.016

HUSARI, A. et al. Antioxidant activity of pomegranate juice reduces emphysematous changes and injury secondary to cigarette smoke in an animal model and human alveolar cells. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**. vol. 11, n. 3, p. 227 - 237. Feb. 2016. doi:10.2147/COPD.S97027.

IHRIG, J.; KLEINERMAN, J.; RYNBRANT, D. Serum antitrypsins in animals. Studies of Species Variations, Components, and the Influence of Certain Irritants. **American Review of Respiratory Disease**. v. 103, n. 3, p. 377 - 387, 1971

ITO, S. et al. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. **Journal of Applied Physiology**. vol. 98, p. 503 - 511. Feb. 2005. doi.org/10.1152/jappphysiol.00590.2004

JOBSE, B.N. et al. Impact of inflammation, emphysema, and smoking cessation on V/Q in mouse models of lung obstruction. **Respiratory Research**. vol. 15, n. 1, p. 42. Apr. 2014. doi:10.1186/1465-9921-15-42

JOSE, B. P. S. et al. Mortality and disability from tobacco-related diseases in Brazil, 1990 to 2015. **Revista brasileira de epidemiologia**. vol. 20, n. 1, p. 75 - 89. May. 2017. doi.org/10.1590/1980-5497201700050007.

KHAN, Y. M. et al. Brd4 is essential for IL-1 β -induced inflammation in human airway epithelial cells. **Plos one**. vol. 9, n. 4 e95051. Apr. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0095051.

KIM, K. H. et al. Ethanol extract of the tuber of *Alisma orientale* reduces the pathologic features in a chronic obstructive pulmonar disease mouse model. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 188, p. 21 - 30. May. 2016. doi:10.1016/j.jep.2016.05.004.

KIM, Y. S. et al. The therapeutic effects of optimal dose of mesenchymal stem cells in a murine model of an elastase induced-emphysema. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**. vol. 78, n. 3, p. 239 - 45. Jun. 2015. doi:10.4046/trd.2015.78.3.239.

KOZMA, R. I. H., et al. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar rats. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. vol. 40, n. 1, p. 46 – 54. Feb. 2014. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132014000100007>.

KUHL, C. et al. Development of different degrees of elastase-induced emphysema in mice: a randomized controlled experimental study. **Clinical & Biomedical Research**. vol. 34, n.3, p. 297 – 306. 2014. ID: 59416250.

LIMA, F.J.B. et al. Antispasmodic and myorelaxant effects of the flavoring agent methyl cinnamate in gut: potential inhibition of tyrosine kinase. **European Journal of Pharmacology**. vol. 740, p. 192 -199. Jul. 2014. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.016.

Limjunyawong, N. et al. Experimental progressive emphysema in BALB/cJ mice as a model for chronic alveolar destruction in humans. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**. vol. 309, n. 7, p.662 - 676. Oct. 2015. doi:10.1152/ajplung.00214.2015

LOURENÇO, J. D. et al. A treatment with a protease inhibitor recombinant from the cattle tick (*Rhipicephalus boophilus microplus*) ameliorates emphysema in mice. **PLOS ONE**. vol. 9, n. 6. Jun. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098216>.

LUCEY, E. C. et al. Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta receptor-deficient mice. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**. vol. 82, n.1, p. 79 - 85. Jan. 2002. doi:10.1038/labinvest.3780397

LUNKENBEIN, S. et al. Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry. **Plant Physiology**. vol. 140, n. 3, p. 1047 – 1058. Mar. 2006. doi:10.1104/pp.105.074955

MAN-HUI, L. M. D. et al. Short-term Exposure to Ambient Fine Particulate Matter Increases Hospitalizations and Mortality in COPD: A Systematic Review and Meta-analysis. **Chest**. vol. 149, n. 2, p. 447 – 458. Feb. 2016. <https://doi.org/10.1378/chest.15-0513>

MAHADEVA, R.; SHAPIRO, S. D. Chronic obstructive pulmonary disease * 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema. **Thorax**. vol. 57, n. 10, p. 908 - 914. Oct. 2002. doi:10.1136/thorax.57.10.908

MARTINS-OLIVEIRA et al. The plant-derived *Bauhinia bauhinioides* kallikrein proteinase inhibitor (rBbKi) attenuates elastase-induced emphysema in mice. **Mediators of Inflammation**. vol. 2016. AUG, 2016. doi:10.1155/2016/5346574 2016.

MASON, R. J. Biology of alveolar type II cells. **Respirology**. vol. 11 Suppl: S12-5. Jan. 2006. doi:10.1111/j.1440-1843.2006.00800.x

MOLETA, J. F. K. **Avaliação do impacto da saúde bucal sobre a qualidade de vida em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).**

Dissertação. Mestrado em Ciências Biomédicas. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

MONTUSCHI, P. et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. **American journal of respiratory and critical care medicine**. vol. 162, n. 3, p. 1175 - 1177. Sep. 2000 doi:10.1164/ajrccm.162.3.2001063

MORAES, S. L. **Imunodiagnósticos de doenças infecciosas**. Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo. 2013. Disponível em:

<https://pt.slideshare.net/SandraLagoMoraes/imunodiagnostico-de-doenas-infecciosas>. Acesso em: 17/05/2020.

MORICHKA, D. et al. A retinoid X receptor partial agonist attenuates pulmonary emphysema and airway inflammation. **Respiratory Research**. vol. 20. n.2. Jan. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0963-0>.

MORENO, J.A. et al. High-density lipoproteins potentiate α 1-antitrypsin therapy in elastase-induced pulmonary emphysema. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. vol. 51, n. 4, p. 536 - 49. Oct. 2014. doi:10.1165/rcmb.2013-0103OC

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**. vol. 65, p. 55 - 63. Jun. 1983. doi:0022-1759/83.

MURAKAMI, Y. et al. Cytotoxicity and pro-/anti-inflammatory properties of cinnamates, acrylates and methacrylates against RAW264.7. **Cells. In vivo**. vol. 32, n. 6. P. 1309 - 1322. Dec. 2018. doi:10.21873/invivo.11381.

NUNES, N. M. et al., Interaction of cinnamic acid and methyl cinnamate with bovine serum albumin: A thermodynamic approach. **Food Chemistry**. vol. 237, p. 525 - 531. May. 2017. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.131.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Vigilância global, prevenção e controle das doenças respiratórias crônicas: uma abordagem integradora. 2008. ISBN 978-972-675-183-0

OMS. Organização Mundial de Saúde. The top 10 causes of death. 2020. Acesso em: 01 de fevereiro de 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Chronic obstructive respiratory diseases. 2019. Acesso em: 01 de fevereiro de 2020. Disponível em: <https://www.who.int/respiratory/copd/en/>

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Unidade Técnica: Doenças transmissíveis e não transmissíveis. Doenças respiratórias crônicas. 2014. Acesso em: 01 de fevereiro de 2020. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=581:doencas-respiratorias-cronicas&Itemid=463

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia.** Elsevier. p. 334. Rio de Janeiro, 2008.

OZAWA, C. et al. Pulmonary Administration of GW0742, a High-Affinity Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist, Repairs Collapsed Alveoli in an Elastase-Induced Mouse Model of Emphysema. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** vol. 39, p. 5778 – 5785. Feb. 2016. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00909>

PADILHA, G.A., et al. Therapeutic effects of LASSBio-596 in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Frontiers in Physiology.** vol. 6, n. 267. Sep. 2015. doi:10.3389/fphys.2015.00267.

PAMPLONA, P.; MENDES, B. Estratégia de tratamento do tabagismo na DPOC. **Revista Portuguesa de Pneumologia.** vol. 15, n. 6, p. 1121 - 1156. Nov – Dec. 2009. doi:10.1016/s0873-2159(15)30196-3

PEREZ-GIL, J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. **Biochimica et Biophysica Acta.** vol. 1778, n. 7, p. 1676 - 1695. Aug. 2008. doi:10.1016/j.bbamem.2008.05.003

PIERRE, A. et al. Impact of aging on inflammatory and immune responses during elastin peptide-induced murine emphysema. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular.** vol. 316, n. 4, p. 608 - 620. Jan. 2019. doi:10.1152/ajplung.00402.2018.

PRADO, GF et al. Burnt sugarcane harvesting: particulate matter exposure and the effects on lung function, oxidative stress, and urinary 1-hydroxypyrene. **The Science of the total environment.** vol. 437, p. 200 - 208, 2012. ISSN: 0048-9697.

RABAHI, M.F. Epidemiologia da DPOC: Enfrentando Desafios. **Pulmão.** Rio de Janeiro, vol. 22, n. 2, p. 4 – 8, 2013.

RIO, R. M. T. et al. Value of Exhaled Nitric Oxide (FeNO) And Eosinophilia During the Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Requiring Hospital Admission. **COPD.** vol. 15, n. 4, p. 369 - 376. Jun – Aug. 2018. doi: 10.1080/15412555.2018.1482532.

RIFM. Research Institute for Fragrance Materials, Inc. 1975. Report on human maximization studies. RIFM report number 1799, March 27. RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA.

ROBERTONI, F. S. Z. et al. Collagenase mRNA Overexpression and Decreased Extracellular Matrix Components Are Early Events in the Pathogenesis of Emphysema. **PloS One.** vol. 10, n. 6. Jun. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0129590

RODRIGUES, M. P. et al. Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**. vol. 183. Sep. 2019. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111688.

ROULET, A. et al. Intratracheally administered titanium dioxide or carbon black nanoparticles do not aggravate elastase-induced pulmonary emphysema in rats. **BMC Pulmonary Medicine**. vol. 12, n. 38. Jul. 2012. doi:10.1186/1471-2466-12-38.

RUWANPURA, S. M. et al. Interleukin-6 promotes pulmonary emphysema associated with apoptosis in mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. vol. 45 n. 4, p. 720 - 730. Oct. 2011. doi:10.1165/rcmb.2010-0462OC

SAAVEDRA, L. M. et al. Quantitative structure – antifungal activity relationships for cinnamate derivatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. vol. 122, p. 521 - 527. Sep. 2015. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.09.024

SENIOR, R. M.; ANTHONISEN, N.R. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. vol. 157, n. 4, p. 139 - 147. Apr. 1998. doi:10.1164/ajrccm.157.4.nhlbi-12.

SENIOR, R.M.; SILVERMAN, E.K. Chronic obstructive pulmonary disease. **ACP Medicine**. 2011.

SHAPIRO, S. D; INGENITO, E. P. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. vol. 32, n. 5, p. 367 - 372. May. 2005. doi:10.1165/rcmb.

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemistry Pharmaceutical Research**. vol. 3, n. 2, p. 403 – 423, 2011.

SHUAB, R. et al. Cinnamate and phytohormones interaction interplay on sugar pool fractions, phytochemical constituents and molecular changes in isolated cucumber cotyledons. **South African Journal of Botany**. vol. 121, p. 422 – 430. Mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.025>

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

STEVENSON, C. S.; BIRRELL, M. A. Moving towards a new generation of animal models for asthma and COPD with improved clinical relevance. **Pharmacology & Therapeutics**. vol. 130, n 2, p. 93 - 105. May. 2011 doi:10.1016/j.pharmthera.2010.10.008

SUZUKI, M. et al. Curcumin attenuates elastase- and cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**. vol. 296, n. 4, p. 614 - 623. Jan. 2009. doi:10.1152/ajplung.90443.2008

SZABARI, M.V. et al. Lung structure and function in elastase-treated rats: A follow-up study. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. vol. 215, p. 13 - 19. Apr. 2015. doi:10.1016/j.resp.2015.04.005.

TAGUCHI, L. et al. A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF- κ B, oxidative stress and metalloproteinases. **Respiratory Research**. vol. 16, n. 1. Jun. 2015. doi:10.1186/s12931-015-0233-3.

TAKATA, F. et al. Elevated permeability of the blood-brain barrier in mice intratracheally administered porcine pancreatic elastase. **Journal of Pharmacological Sciences**. vol. 129, n. 1, p. 78 - 81. Sep. 2015. doi:10.1016/j.jphs.2015.08.008

TANAKA, R. et al. Maturation changes in extracellular matrix and lung tissue mechanics. **Journal of Applied Physiology**. (Bethesda, Md.: 1985). vol. 91, n. 5, p. 2314 - 2321. Nov. 2001. doi:10.1152/jappl.2001.91.5.231

THEODORO-JÚNIOR, O. A. et al. A plant proteinase inhibitor from enterolobium contortisiliquum attenuates pulmonary mechanics, inflammation and remodeling induced by elastase in mice. **International Journal of Molecular Science**. vol. 18, n. 2. Feb. 2017. doi:10.3390/ijms18020403.

THOMSON, E. M. et al. Overexpression of tumor necrosis factor- α in the lungs alters immune response, matrix remodeling, and repair and maintenance pathways. **The American Journal of Pathology**. vol. 180, n. 4, p. 1413 - 1430. Apr. 2012. doi:10.1016/j.ajpath.2011.12.020

TRAJANO, L. A. S. N. et al. Elastase modifies bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Acta Histochemica**. vol. 118, n. 3, p. 203 - 212. Feb. 2016. doi:10.1016/j.acthis.2015.12.010.

TUDER, R. M. et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. vol. 29, n. 1, p. 88 - 97. Jan. 2003. doi:10.1165/rcmb.2002-0228OC.

WATERSTON, R. H. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**. vol. 420, 6915, p. 520 - 562. Dec. 2002. doi:10.1038/nature01262

WEDZICHA, J. A. et al. Roflumilast: a review of its use in the treatment of COPD. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**. vol. 11, n. 6, p. 81 - 90. Jan. 2016. doi:10.2147/COPD.S89849

WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **The Journal of cell biology**. vol. 30, n. 1, p. 23 - 38. Jul. 1966. doi:10.1083/jcb.30.1.23

WEITNAUER, M. et al. Control of local immunity by airway epithelial cells. **Mucosal immunology**. vol. 9, n. 2, p. 287 - 298. Mar. 2016. doi:10.1038/mi.2015.126

WRIGHT, J. L.; COSIO, M.; CHURG, A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**. vol. 295, n. 1, p. 1 - 15. Jul. 2008. doi:10.1152/ajplung.90200.2008

WU, Q. et al. Retrospective analysis of Verhoeff-Van Gieson elastic staining, diffractive microscopy, and Masson trichrome staining in the diagnosis of alopecia. **Journal of the American Academy of Dermatology**. vol. 82, n. 1, p. 247 - 249. Jan. 2020. doi:10.1016/j.jaad.2019.08.038

YAMASHITA, Y. et al. Chemical modification-mediated optimisation of bronchodilatory activity of mepenzolate, a muscarinic receptor antagonist with anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. vol. 27, n. 15, p. 3339 - 3346. Aug. 2019. doi:10.1016/j.bmc.2019.06.016.

ZHANG, C. et al. Biosynthesis of methyl (E)-cinnamate in the liverwort *Conocephalum salebrosum* and evolution of cinnamic acid methyltransferase. **Phytochemistry**. vol.164, p. 50 – 59, Aug. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.04.013>.

ZOU, Y. et al. Serum IL-1 β and IL-17 levels in patients with COPD: associations with clinical parameters. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**. vol. 12, p. 1247 - 1254. Apr. 2017, doi:10.2147/COPD.S131877

ZUREK, et al. Assessing the Relationship between Lung Density and Function with Oxygen-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in a Mouse Model of Emphysema. **Plos One**. Mar. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151211>

ANEXOS A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

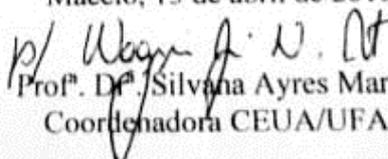


CERTIFICADO

Certificamos que o proposta intitulada “Estudo da atividade do fenil propanóide metil cinamato na fibrose pulmonar”, registrada com o nº **85/2015**, sob a responsabilidade de **Emiliano de Oliveira Barreto**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas - CEUA/UFAL, em reunião de 08/04/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	14.04.2016 a 30.04.2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico / Black C57Bl/6
Nº de animais	504
Peso/idade	20-30g / 6 semanas
Sexo	252 machos e 252 fêmeas
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas – UFAL / Biotério do Laboratório de Biologia Celular – Severinão (UFAL)

Maceió, 13 de abril de 2016.


Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Coordenadora CEUA/UFAL

Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Coordenadora CEUA/UFAL
Ética no uso de animais