

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM POLIMORFONUCLEARES COM MUTAÇÃO NO GENE CFTR TRATADOS COM COMPOSTOS FENÓLICOS

THIAGO INÁCIO TEIXEIRA DO CARMO¹, JONATHA WRUCK², SARAH
FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA MACIEL³, MARGARETE DULCE BAGATINI⁴

1 Introdução

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética de padrão autossômico recessivo que apresenta manifestações clínicas multissistêmicas, afetando, principalmente, os tratos respiratório, gastrointestinal e hepatobiliar. É caracterizada por mutações no regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), que leva a disfunção ou ausência da proteína CFTR, um canal de cloreto. Mudanças subsequentes no compartimento de sódio e água resultam na produção de secreções ácidas, muco-purulentas e viscosas, difíceis de serem eliminadas. É a doença genética mais comum na infância e já se conhece mais de 2.000 mutações que afetam a sequência de aminoácidos do gene CFTR. Essas mutações são divididas em seis classes, sendo que as variantes causadoras da doença das classes I, II e III estão associadas a pouca ou nenhuma função da proteína CFTR, apresentando um fenótipo mais grave. Mutações de classe IV, V e VI são conhecidas por manter a função residual da CFTR, o que, geralmente preserva a função pancreática exócrina no início da vida (BELL et al., 2020; DO CARMO et al., 2021).

A inflamação nas vias aéreas dos pacientes com FC são mediadas por uma infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PBMCs), no entanto, estes não são capazes de eliminar infecções pulmonares e ainda contribuem para danos teciduais e estresse oxidativo (BELL et al., 2020; DO CARMO et al., 2021). Embora existam moduladores do CFTR, que corrigem o defeito molecular da doença e modificam a evolução natural da doença, o tratamento, no Brasil, consiste em apaziguar a sintomatologia da doença. Ainda são necessárias abordagens terapêuticas dos inúmeros sintomas, além da fisioterapia intensiva que requerem gastos elevados e apresentam um impacto psicológico notório para o paciente. Como alternativa, compostos naturais se mostram como opções promissoras para o tratamento da FC, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (SOARES et al., 2021). Portanto, torna-se importante o desenvolvimento de terapias complementares de baixo custo como forma de melhorar a qualidade de vida dos pacientes diagnosticados com FC no Brasil.

1 Titulação acadêmica ensino superior em curso, instituição Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Chapecó*, contato: thiago.carmo@estudante.uffs.edu.br

2 Titulação acadêmica ensino superior em curso, instituição Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Chapecó*.

3 Titulação acadêmica doutora, instituição Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Chapecó*.

4 Titulação acadêmica doutora, instituição Universidade Federal da Fronteira Sul, **Orientadora**.

2 Objetivos

Analisar os efeitos do ácido cafeico sobre o processo inflamatório e funcionamento dos canais de cloreto em células com mutações no gene CFTR. Os objetivos específicos incluem: revisão de literatura sobre FC; cultivo de células com mutações no gene CFTR; avaliação do perfil inflamatório das células com mutações no gene CFTR e análise do envolvimento do estresse oxidativo na imunomodulação.

3 Metodologia

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional, sob número de registro 48492621.7.0000.5564. Foi coletado sangue periférico de 3 sujeitos com FC, nomeados de sujeitos 01, 02 e 03, e de 3 sujeitos sem FC, nomeados de sujeitos 03, 04 e 05. As amostras sanguíneas foram diluídas e centrifugadas, coletando a fase entre o plasma e o Ficoll. As células foram cultivadas e coletadas, sendo posteriormente tratadas com ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido rosmarínico nas concentrações de 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM e 400 μM . Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) de acordo com um estudo realizado por Mosmann (1983). O teste do óxido nítrico (NO) foi avaliado através de um ensaio espectrofotométrico em 540 nm, pela detecção de coloração rosa na amostra (NOH et al., 2015). O teor de ácido ascórbico foi acessado pelo método Jacques-Silva et al. (2001), com leitura de absorbância em 520 nm.

4 Resultados e Discussão

Primeiramente, como forma de avaliar a citotoxicidade de compostos fenólicos em PBMCs, foi utilizado o ensaio MTT, considerando que os valores de absorbância obtidos são diretamente proporcionais ao número de células vivas. O MTT apresenta vantagens como fácil manuseio, aplicação em larga escala e ausência de radioatividade e já foi validado em células não aderentes, como linfócitos de sangue periférico (AMANI et al., 2021). Assim, os compostos polifenólicos estudados aumentaram a viabilidade das PBMCs na maioria das amostras de células testadas, com exceção das PBMCs do sujeito 02, o que demonstra que não são citotóxicos em diferentes concentrações, abrindo caminho para futuras terapias. No entanto, estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmar esse achado.

Os compostos fenólicos testados foram capazes de aumentar a concentração de ácido ascórbico de PBMCs tanto em sujeitos com FC quanto em amostras de sujeitos sem FC, com diferentes níveis de significância. A função pulmonar em sujeitos com FC tem sido associada à diminuição das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico, que é importante para reduzir o estresse oxidativo e, no contexto da FC, também pode induzir a abertura da CFTR, a fim de aumentar a secreção de fluido epitelial e melhorar a depuração mucociliar. Além disso, também parece inibir a formação de mieloperoxidase (MPO) a partir de PBMCs. Baixas concentrações de ácido ascórbico estão associadas a altos graus de inflamação em sujeitos com FC (ADEWALE et al., 2020). Assim, o aumento do ácido ascórbico pode ser benéfico

para os sujeitos com FC, reduzindo a quantidade de EROs e também os aspectos inflamatórios.

Os três ácidos testados mostraram uma tendência de aumentar a concentração de NO em PBMCs tanto em amostras de células de sujeitos sem FC quanto de sujeitos com FC. Apesar de serem compostos antioxidantes, é interessante notar que esse aumento de NO foi mais significativo nas células tratadas com ácido rosmarínico. Embora a FC seja considerada uma doença que apresenta um aspecto geral pró-oxidante, o NO exalado está diminuído, sugerindo redução na sua formação, aumento do metabolismo e/ou perda de NO (DE WINTER; ENT, 2005). Após o início da terapia com moduladores CFTR, há um aumento no NO exalado, o que suporta uma estreita conexão entre a função da CFTR e a regulação do NO (KORTEN et al., 2017). A redução do NO exalado também está relacionado a contagens mais altas de neutrófilos no sangue em sujeitos com FC. Como o NO demonstrou se opor ao sequestro de neutrófilos, a relativa falta na FC pode estar por trás da intensa infiltração de neutrófilos que caracteriza a doença (KRANTZ et al., 2017). Assim, o aumento do NO reduz a inflamação excessiva dos pulmões, aumentando ainda mais o potencial terapêutico desses ácidos para a FC, principalmente na forma inalada e na solução de ácido rosmarínico. Estudos com administração pulmonar de uma solução de ácido polifenólico, que inclui o ácido rosmarínico, fornecem uma visão pré-clínica da viabilidade de administração pulmonar desse composto (LU et al., 2019).

Por fim, como parte dos objetivos e de forma a sedimentar o conhecimento do tema, foram publicados 2 artigos em revistas internacionais acerca da temática da Iniciação Científica. O artigo intitulado “*Role of inflammation and oxidative stress in tissue damage associated with cystic fibrosis: CAPE as a future therapeutic strategy*”, publicado na revista *Molecular and Cellular Biochemistry*, apresenta de forma inédita o uso do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) na terapêutica da FC. O artigo aborda as possíveis vias de atuação do CAPE como forma de diminuir o estresse oxidativo e a hiperinflamação presente na FC. Ademais, publicado na revista *Clinical Medicine & Research*, o segundo artigo é intitulado “*Pancreatic Insufficiency in a Child With p.Gly542* and c.2657+5G>A Heterozygote CFTR: A Case Report*”, relatando um caso de um paciente com insuficiência pancreática exócrina precoce, uma característica clínica atípica para pacientes com arranjo de mutações de classe I e V.

5 Conclusão

Na pesquisa, foi demonstrado que as amostras de células tratadas *in vitro* com diferentes concentrações de compostos fenólicos, em geral, tiveram sua viabilidade aumentada. Os ácidos fenólicos testados (ácido rosmarínico, ácido cafeico e ácido clorogênico) também mostraram um papel significativo no aumento das concentrações de ácido ascórbico. Esse dado é importante, uma vez que o ácido ascórbico está relacionado à redução do estresse oxidativo, por inibir a gênese da MPO e também contribuir para a indução da abertura da CFTR, o que favorece a redução do dano tecidual e melhora o clearance mucociliar. Nesse sentido, o ácido clorogênico apresentou melhor desempenho no aumento dos níveis de ácido ascórbico.

Os compostos fenólicos também demonstraram um aumento nos níveis de NO das amostras de células tratadas, o que aparece como um ponto promissor do nosso estudo, uma vez que os sujeitos com FC apresentam melhora significativa de suas condições clínicas quando tratados com NO inalado.

Por fim, os materiais técnico-científicos elaborados possibilitaram construir um conhecimento aprofundado acerca da temática, além de colaborar para o crescimento da ciência na universidade pública e no âmbito brasileiro.

Em conclusão, pode-se ser ressaltado a importância de pesquisas básicas e ensaios clínicos com compostos fenólicos, uma vez que são uma alternativa mais barata e promissora de tratamento. Tendo em vista que a FC se apresenta como uma doença multifatorial, a modulação das vias anti-inflamatórias e anti-oxidantes pode ser utilizada como base importante para o controle dos sintomas e progressão da doença.

Referências Bibliográficas

ADEWALE, Adegboyega Timothy et al. Novel therapy of bicarbonate, glutathione, and ascorbic acid improves cystic fibrosis mucus transport. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 63, n. 3, p. 362-373, 2020. Disponível em:

https://www.atsjournals.org/doi/10.1165/rcmb.2019-0287OC?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 15 nov. 2021.

AMANI, Fatemeh et al. The protective effect of oleuropein against radiation-induced cytotoxicity, apoptosis, and genetic damage in cultured human lymphocytes. **International Journal of Radiation Biology**, v. 97, n. 2, p. 179-193, 2021. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09553002.2020.1793014?journalCode=irab20>. Acesso em: 02 jun. 2022.

BELL, Scott C. et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 1, p. 65-124, 2020. Disponível em:

[https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(19\)30337-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(19)30337-6/fulltext). Acesso em: 07 abr. 2022.

DE WINTER-DE GROOT, Karin M.; VAN DER ENT, Cornelis K. Nitric oxide in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 4, p. 25-29, 2005. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199305000573?via%3Dihub>. Acesso em: 07 abr. 2022.

DO CARMO, Thiago Inácio Teixeira et al. Hyperinflammation and airway surface liquid dehydration in cystic fibrosis: purinergic system as therapeutic target. **Inflammation Research**, v. 70, n. 6, p. 633-649, 2021. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00011-021-01464-z>. Acesso em: 02 jan. 2022.

JACQUES-SILVA, Maria Caroline et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology & toxicology**, v. 88, n. 3, p. 119-125, 2001. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1600-0773.2001.d01-92.x>. Acesso em: 15 nov. 2021.

KORTEN, Insa et al. Lower exhaled nitric oxide in infants with Cystic Fibrosis compared to healthy controls. **Journal of cystic fibrosis**, v. 17, n. 1, p. 105-108, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199317307622?via%3Dihub>. Acesso em: 07 abr. 2022.

KRANTZ, Christina et al. Exhaled and nasal nitric oxide in relation to lung function, blood cell counts and disease characteristics in cystic fibrosis. **Journal of Breath Research**, v. 11, n. 2, p. 026001, 2017. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1752-7163/aa61aa>. Acesso em: 07 abr. 2022.

LU, Peng et al. Pharmacokinetics of salvianolic acid B, rosmarinic acid and Danshensu in rat after pulmonary administration of Salvia miltiorrhiza polyphenolic acid solution. **Biomedical Chromatography**, v. 33, n. 8, p. e4561, 2019. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.4561>. Acesso em: 15 nov. 2021.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034?via%3Dihub>. Acesso em: 10 dez. 2021

NOH, Hyung Jun et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu. **Journal of ethnopharmacology**, v. 163, p. 106-112, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874115000392?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2021.

SOARES, Victor Emanuel Miranda et al. Role of inflammation and oxidative stress in tissue damage associated with cystic fibrosis: CAPE as a future therapeutic strategy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 477, n. 1, p. 39-51, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-021-04263-6>. Acesso em: 10 dez. 2021.

Palavras-chave: Fibrose Cística; Compostos Fenólicos; Estresse Oxidativo.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2021-0191

Financiamento: Universidade Federal da Fronteira Sul