

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
***CAMPUS* CHAPECÓ**
CURSO DE MEDICINA

JONATHA WRUCK
THIAGO INÁCIO TEIXEIRA DO CARMO

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS
ÁCIDOS CAFEICO, CLOGÊNICO E ROSMARÍNICO EM PBMCS DE SUJEITOS
COM MUTAÇÃO NO GENE *CFTR***

CHAPECÓ
2022

**JONATHA WRUCK
THIAGO INÁCIO TEIXEIRA DO CARMO**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS
ÁCIDOS CAFEICO, CLOROGÊNICO E ROSMARÍNICO EM PBMCS DE SUJEITOS
COM MUTAÇÃO NO GENE *CFTR***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Medicina da Universidade Federal da
Fronteira Sul (UFFS), como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Médico(a).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini

Coorientadora: Prof. Dr.^a. Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

**CHAPECÓ
2022**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Mruck, Jonatha

Avaliação da viabilidade celular e do efeito antioxidante dos ácidos cafeico, clorogênico e rosmarinico em FPMCs de sujeitos com mutação no gene CFTR / Jonatha Mruck, Thiago Inácio Teixeira do Carmo. -- 2022.
30 f.:il.

Orientadora: Doutora Margarete Dulce Bagatini

Co-orientadora: Doutora Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Medicina, Chapecó, SC, 2022.

I. Carmo, Thiago Inácio Teixeira do II. Bagatini, Margarete Dulce, orient. III. Maciel, Sarah Franco Vieira de Oliveira, co-orient. IV. Universidade Federal da Fronteira Sul. V. Título.

Jonatha Wruck
Thiago Inácio Teixeira do Carmo
acadêmicos(as)

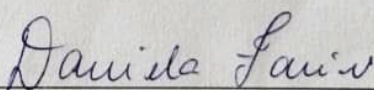
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS ÁCIDOS
CAFEICO, CLOROGÊNICO E ROSMARÍNICO EM PBMCS DE SUJEITOS COM MUTAÇÃO NO
GENE *CFTR*
Título do trabalho

Trabalho de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de aprovação
no respectivo componente da grade do curso de Medicina da Universidade Federal da
Fronteira Sul - *campus* Chapecó.

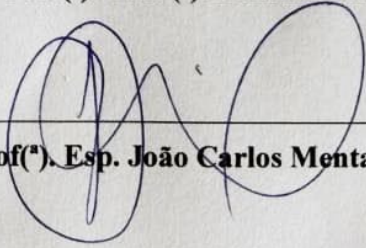

Orientador(a): **Prof^(a). Dra. ^(a). Margarette Dulce Bagatini**

Este trabalho de curso foi defendido e aprovado pela banca em; 29/08/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof^(a). Dra. ^(a). Daniela Zanini



Prof^(a). Esp. João Carlos Menta Filho

AValiação DA Viabilidade Celular E DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS ÁCIDOS CAFEICO, CLOROGÊNICO E ROSMARÍNICO EM PBMCs DE SUJEITOS COM MUTAÇÃO NO GENE CFTR

Jonatha Wruck^{1*}

Thiago Inácio Teixeira do Carmo^{2**}

Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel^{3***}

Margarete Dulce Bagatini^{4****}

RESUMO

A fibrose cística (FC) consiste em uma doença genética autossômica recessiva, causada por mutação no gene regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (*CFTR*), que codifica uma proteína de mesmo nome, responsável pelo transporte de cloreto e bicarbonato. A redução ou ausência da função proteica leva a alguns distúrbios multissistêmicos, além de infecções pulmonares crônicas, causadas principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, e uma resposta imune exagerada, na qual os neutrófilos aparecem como o tipo celular majoritário, embora não sejam capazes de eliminar os patógenos adequadamente. A apresentação da doença depende de inúmeros fatores e um mesmo genótipo pode ser clinicamente diferente em sujeitos distintos. Como alternativas ao tratamento, os moduladores de CFTR têm apresentado resultados importantes, porém, existem limitações decorrentes do *background* genético que podem reduzir sua eficácia. Sob esta perspectiva, os compostos fenólicos surgem como uma estratégia terapêutica natural e mais barata para controlar a inflamação e o estresse oxidativo. Para avaliar a ação dos ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico, realizamos coleta de sangue periférico de três sujeitos com FC e de três indivíduos não afetados. As células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram cultivadas e expandidas em frascos de cultura celular e transferidas para placas de 24 poços. Após a transferência e adaptação, foram tratadas com diferentes concentrações dos ácidos estudados. A viabilidade celular foi analisada pelo método MTT e parâmetros de estresse oxidativo também foram testados. Identificamos que os compostos fenólicos aumentaram as concentrações de ácido ascórbico e os níveis de óxido nítrico, bem como aumentaram a viabilidade celular. Nesse sentido, os compostos fenólicos são estratégias mais acessíveis e naturais para o tratamento da FC que devem ser estudadas.

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

^{1*} Estudante de graduação em medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. E-mail: jonatha.wruck@estudante.uffs.edu.br

^{2**} Estudante de graduação em medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul. E-mail: thiago.carmo@estudante.uffs.edu.br

^{3***} Professora – Universidade Federal da Fronteira Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas. E-mail: sarahfvo@gmail.com.

^{4****} Professora – Universidade Federal da Fronteira Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas. E-mail: margaretebagatini@yahoo.com.br.

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease caused by a mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR), which encodes a protein of the same name, responsible for the transport of chloride and bicarbonate. The reduction or absence of protein function leads to some multisystem disorders, in addition to chronic lung infections, caused mainly by *Pseudomonas aeruginosa*, and an exaggerated immune response, in which neutrophils appear as the majority cell type, although they are not able to eliminate pathogens properly. The presentation of the disease depends on numerous factors and the same genotype can be clinically different in different subjects. As alternatives to treatment, CFTR modulators have shown important results, however, there are limitations arising from the genetic background that may reduce their effectiveness. From this perspective, phenolic compounds emerge as a natural and cheaper therapeutic strategy to control inflammation and oxidative stress. To evaluate the action of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids, we collected peripheral blood from three subjects with CF and from three unaffected individuals. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were grown and expanded in cell culture flasks and transferred to 24-well plates. After transfer and adaptation, they were treated with different concentrations of the studied acids. Cell viability was analyzed by the MTT method and oxidative stress parameters were also tested. We identified that phenolic compounds increased ascorbic acid concentrations and nitric oxide levels, as well as increased cell viability. In this sense, phenolic compounds are more accessible and natural strategies for the treatment of CF that should be studied.

Keywords: Cystic fibrosis; Phenolic compounds; Oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) consiste em um distúrbio multissistêmico hereditário, limitante da vida, causado por mutações no gene regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (*CFTR*), que leva a anormalidades na proteína CFTR, um canal de cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-) (RAFEEQ; MURAD, 2017; BELL et al., 2020). É considerada a doença autossômica recessiva mais frequente na população caucasiana (aproximadamente 1/2.500 nascidos vivos), com consequências pulmonares, intestinais, hepáticas, pancreáticas e também no trato reprodutor masculino (KAMAL; SURANA; KOH, 2018; TERZIC et al., 2019; BELL et al., 2020).

Mais de 2.000 mutações foram descritas e agrupadas em seis classes, de acordo com seu efeito proteico (VEIT et al., 2016). A gravidade da FC é induzida geneticamente por genes de mutação e modificadores (STRUG et al., 2018), bem como pela presença de mais de uma mutação no mesmo alelo (CHEVALIER; HINZPETER, 2020). Nesse sentido, sujeitos com a mesma mutação em homozigose podem apresentar diferentes manifestações pulmonares da doença (VECCHIO-PAGÁN et al., 2016). No mesmo contexto, mutações adicionais em outras regiões de genes também podem alterar a gravidade do quadro, bem como a eficácia dos moduladores de CFTR (MASSON et al., 2019).

A inflamação nas vias aéreas de sujeitos com FC é mediada por uma infiltração de leucócitos polimorfonucleares, no entanto, eles não são capazes de eliminar infecções pulmonares, notadamente por *Pseudomonas aeruginosa*, além de contribuírem para danos teciduais e estresse oxidativo (RADA et al., 2017; DO CARMO et al., 2021). Nesse sentido, é importante salientar que os neutrófilos representam entre 50% a 70% dos leucócitos no sangue humano, formando a primeira barreira contra infecções (KRUGER et al., 2015).

Yoshimura et al. (1991) descreveram pela primeira vez a expressão de mRNA de CFTR em neutrófilos, embora em baixas concentrações. Por sua vez, Painter et al. (2006), Bonfield et al. (2012) e Ng et al. (2014) demonstraram, por meio de estudos *in vivo* e *in vitro*, que a função reduzida da CFTR, ou sua ausência em neutrófilos, prejudica a função bactericida.

Sabe-se também que os neutrófilos na FC estão sob profunda ativação (ADIB-CONQUY et al., 2008). Essas células sofrem adaptações ao ambiente inócuo das vias aéreas de sujeitos com FC, uma vez que o microambiente inflamatório é responsável pela regulação da morte celular dos neutrófilos (COAKLEY et al., 2002), com regulação positiva de vias celulares, metabólicas e de estresse (MAKAM et al., 2009).

Indivíduos com FC também têm *burst* respiratório reduzido e expressão alterada de receptores *toll-like* (TLR) (PETIT-BERTRON et al., 2008; HOUSTON et al., 2013), como TLR2, TLR4 e TLR5 (KOLLER et al., 2009). A redução do *burst* respiratório está relacionada à atividade da explosão oxidativa da mieloperoxidase (MPO), que está alterada na FC quando comparada aos controles (ZHOU et al., 2013).

O estresse oxidativo desempenha papéis benéficos no organismo, como indução da resposta mitogênica, do controle de vias de sinalização celular e do sistema imunológico, a fim de ativar a cascata inflamatória e eliminar patógenos (PIZZINO et al., 2017; LIGUORI et al., 2018; IDDIR et al., 2020). Tem sido apontado um papel fundamental na fisiopatologia da FC, uma vez que a infecção pulmonar crônica leva a uma resposta imune excessiva, mediada principalmente por leucócitos ativados, que produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GALLI et al., 2012; SOARES et al., 2021).

Apesar dos avanços relativos no tratamento da FC com moduladores de CFTR, devido ao seu alto custo, ao difícil acesso, ao benefício limitado do tratamento em crianças, à resposta insignificante em mutações menos prevalentes e em arranjo genético, é importante a busca por alternativas terapêuticas seguras e de baixo custo (RAFEEQ; MURAD, 2017; MASSON et al., 2019). Como alternativa, os compostos fenólicos apresentam-se como opções promissoras, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes e por estarem presentes em inúmeros compostos naturais (SOARES et al., 2021).

Nesse contexto, considerando o possível papel do estresse oxidativo na FC e o potencial terapêutico promissor dos compostos fenólicos, objetivamos avaliar a viabilidade celular e o efeito antioxidante dos ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico em células mononucleares do sangue periférico (PBMcs) de sujeitos com FC.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DECLARAÇÃO ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Chapecó, sob o número de registro 48492621.7.0000.5564. Todos os protocolos realizados nesta investigação seguiram os padrões éticos do comitê de ética em pesquisa institucional e nacional sobre o envolvimento de participantes humanos. Os sujeitos com FC e o grupo sem FC foram admitidos no estudo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2 PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES

Todos os reagentes e produtos químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico adquiridos da Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, EUA) e Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Salvo indicação em contrário, todos os outros reagentes foram de pureza analítica e todas as soluções foram preparadas com água destilada. Os marcadores bioquímicos foram realizados pelo analisador clínico automatizado Wiener Lab. CM 200 (LABIN POLSKA SP. Z.O.O.). As placas e frascos de cultura de células utilizados para os procedimentos de cultura foram obtidos da Gibco™ Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, EUA) e da Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). A análise fotométrica foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.3 DESENHO DO ESTUDO E CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Três sujeitos com diagnóstico de FC foram selecionados com base nos critérios de inclusão e exclusão. O estudo incluiu sujeitos de ambos os sexos do sul do Brasil, diagnosticados com FC com teste genético confirmatório, podendo ou não ter atingido a maioria, denominados de sujeitos 01, 02 e 03 (Tabela 1). Foram excluídos os sujeitos com FC que apresentavam processo infeccioso em andamento e/ou estavam em uso de imunossuppressores. Ademais, três sujeitos (04, 05 e 06) que não apresentavam o diagnóstico de FC foram incluídos com base no pareamento de idade e sexo em relação aos sujeitos com FC. Os participantes foram solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da coleta de sangue, e os menores de 18 anos também assinaram um Termo de Assentimento.

Tabela 1 – Características dos sujeitos com FC

Sujeitos	Mutações e classes	Idade	Gênero
01	F508del e c.2657+5G>A (classe II e classe V)	43	Feminino

02	F508del e pn1303k (ambas classe II)	8	Feminino
03	F508del e G85E (ambas classe II)	19	Feminino

Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

2.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO SANGUE PERIFÉRICO

O sangue total foi coletado de cada sujeito por meio de punção venosa em tubos anticoagulantes EDTA, de aproximadamente 20 ml, e o material coletado foi utilizado para separar as PBMCs. Amostras usando PBMCs são essenciais para pesquisa imunológica, diagnóstico de doenças e desenvolvimento de novos medicamentos. Eles têm uma vantagem sobre outros métodos por serem fáceis de obter e rapidamente isolados e processados (RIEDHAMMER; HALBRITTER; WEISSERT, 2016; MARCO-CASANOVA et al., 2021).

As amostras de sangue foram diluídas com o mesmo volume de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Esta preparação foi adicionada ao Ficoll Histopaque (proporção de 2 partes de sangue para 1 parte de Ficoll), centrifugado a 1800 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente, e a fase entre o plasma e o Ficoll foi coletada. Esta fase foi lavada com soro fisiológico.

As células foram cultivadas em incubadora de CO₂ à temperatura de 37 °C, em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI), com 10% de soro fetal bovino (FBS), suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de antifúngico anfotericina B (PERES; CURI, 2005), no laboratório de cultura de células da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó. Após o cultivo, as células foram adicionadas a uma placa estéril de 24 poços a uma densidade celular de 1x10⁵ para tratamento com ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido rosmarínico nas medições de 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM e 400 µM. As concentrações foram determinadas com base em uma escala logarítmica.

2.5 COLETA DE SANGUE E CULTURA DE PBMCs

Os níveis sanguíneos periféricos de fosfatase alcalina, de bilirrubina direta e total, de creatina quinase, de aspartato aminotransferase, de alanina transaminase, de lactato desidrogenase, de uréia, de ácido úrico e de creatinina em sujeitos com FC e no grupo sem FC foram avaliados em um analisador clínico automatizado (Wiener Lab. CM 200) usando kits de reagentes, por meio de ensaio colorimétrico.

2.6 VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foi utilizado de acordo com um estudo realizado por Mosmann (1983). Resumidamente, as PBMCs foram semeadas em placas de 96 poços, em 4 repetições, em densidades de 1x10⁵ células/poço e tratadas com diferentes

concentrações dos ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico. Após os tempos de exposição, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas uma vez com PBS (0,1 M, pH 7,4) para evitar qualquer interferência do composto utilizado no tratamento. O reagente MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (5 mg/ml) dissolvido em PBS foi adicionado e as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e 200 µL de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazan gerados pela redução do sal MTT pelas células viáveis. A absorbância foi medida a 570 nm usando microplacas SpectraMax® i3 Multimode Plate Reader 96 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

2.7 ÓXIDO NÍTRICO

O teste de Óxido Nítrico (NO) detecta a presença de nitrito orgânico na amostra. O nitrito é detectado pela formação de uma cor rosada quando o reagente de Griess é adicionado à amostra contendo NO_2^- . A sulfanilamida no reagente de Griess é responsável pela formação de sais de diazônio a partir do nitrito na amostra. Quando o bicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina, um azo composto, interage com sais de diazônio, aparece uma coloração rosa na amostra, que é avaliada por ensaio espectrofotométrico em 540 nm (CHOI, et al., 2012; NOH et al, 2015).

2.8 TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico, também chamado de vitamina C, funciona como um cofator enzimático, sendo capaz de eliminar as EROs (REIS et al., 2015). O teor de ácido ascórbico pode ser acessado pelo método de Jacques-Silva et al. (2001), com leitura de absorbância em 520 nm. Resumidamente, 100 µL de alíquota de sobrenadante em um volume final de 170 µL de solução, contendo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e TCA 13,3%, foi incubado por 2 horas a 37 °C. Por fim, foi gerado um produto composto vermelho alaranjado, proporcional ao teor de ácido ascórbico, expresso em ug/dL de acordo com o padrão de ácido ascórbico.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes foram realizados em quadruplicata. Os dados foram tabulados em planilhas Excel e apresentados em porcentagem em relação ao grupo controle. As estatísticas foram realizadas usando o software Graphpad Prism, versão 9.0. Os resultados foram comparados por análise de variância unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Resultados com um asterisco (*) mostram $p = 0,05$; com dois asteriscos (**), $p = 0,01$; três asteriscos (***), $p = 0,001$ e quatro asteriscos (****), $p < 0,001$.

3 RESULTADOS

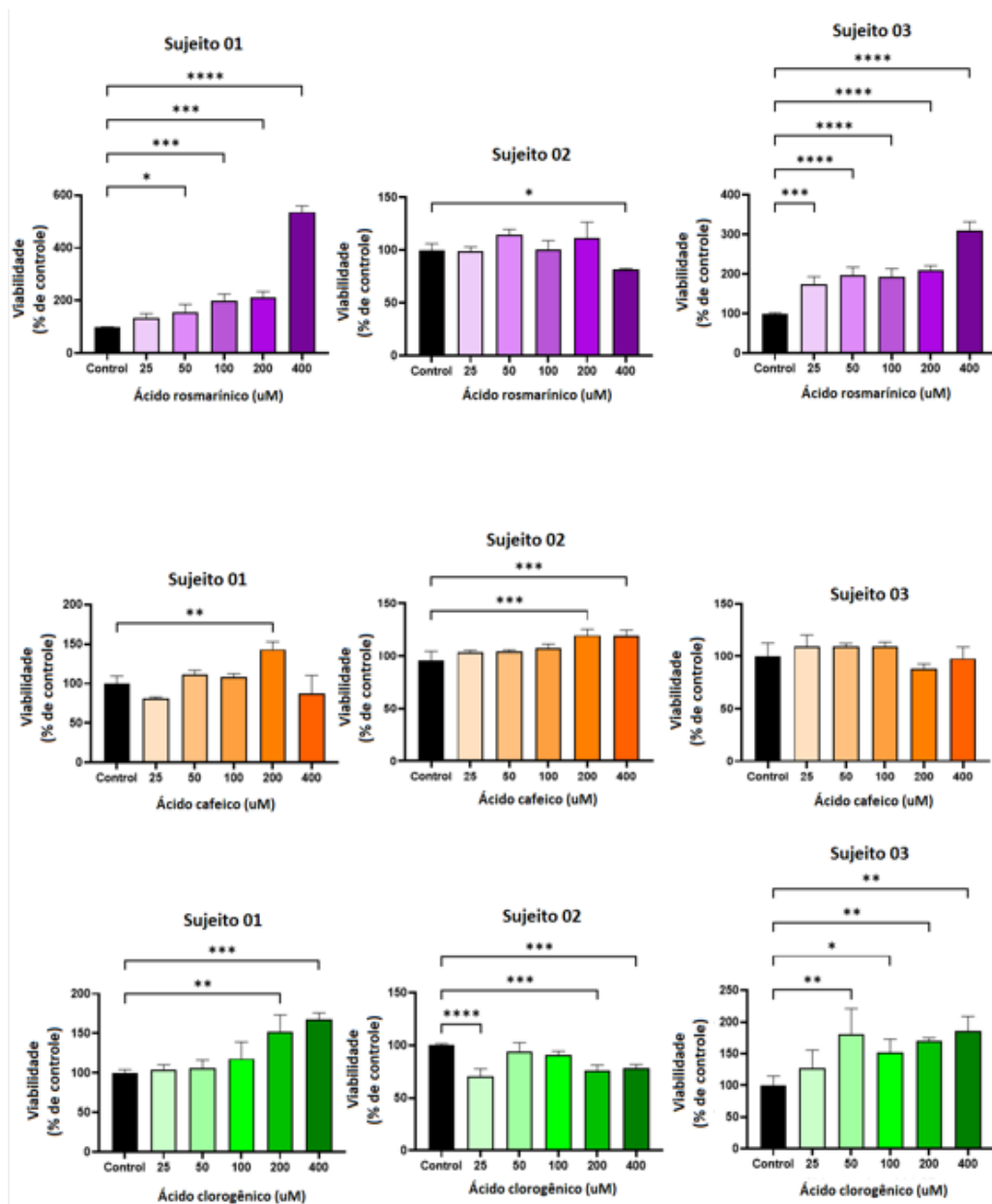
3.1 VIABILIDADE CELULAR

Quanto à viabilidade e à proliferação celular, analisadas pela técnica do MTT, o ácido clorogênico foi responsável por aumentar a viabilidade das amostras celulares de dois sujeitos com FC, a partir de concentrações de 200 μM (Figura 1). No entanto, a amostra 02 apresentou redução significativa na viabilidade celular nas concentrações de 25 μM ($p < 0,001$), 200 μM ($p = 0,001$) e 400 μM ($p = 0,001$). Nas amostras de células do grupo sem FC, houve aumento da viabilidade celular, principalmente na concentração de 400 μM , com diferentes significâncias de acordo com cada sujeito (Figura 2).

O ácido rosmarínico foi responsável por aumentar progressivamente a viabilidade celular das amostras celulares 01 e 03 de sujeitos com FC, sendo que a concentração de 400 μM apresentou significância de $p < 0,001$. Na amostra 02, a viabilidade celular diminuiu significativamente na concentração de 400 μM ($p = 0,05$). Nas amostras do grupo sem FC, houve aumento progressivo da viabilidade celular em dois sujeitos, com a concentração de 400 μM apresentando alto grau de significância ($p = 0,001$). O sujeito 04 apresentou significância no aumento da viabilidade celular em três concentrações (25 μM , 200 μM e 400 μM).

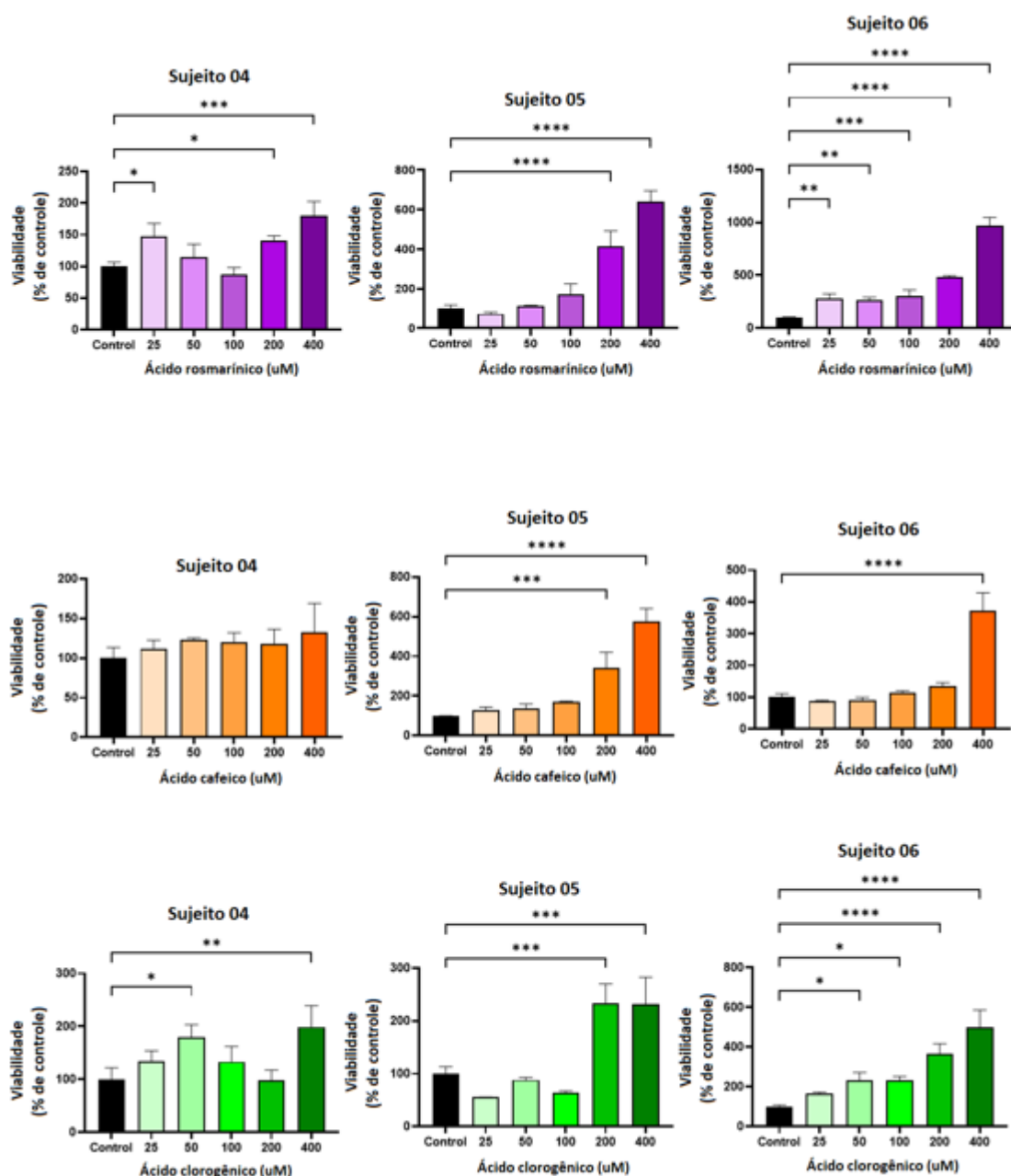
O ácido cafeico demonstrou aumentar a viabilidade celular em duas amostras de células de sujeitos com FC, especialmente em uma concentração de 200 μM ($p = 0,01$) no sujeito 01 e em 200 μM ($p = 0,001$) e 400 μM ($p = 0,001$) no sujeito 02. No entanto, na amostra de células do sujeito 03, não houve alteração significativa. Houve também, aumento da viabilidade celular em duas amostras de células de sujeitos sem FC, notavelmente na concentração de 400 μM ($p < 0,001$), mas não houve alteração significativa na amostra de células 04.

Figura 1 – Viabilidade celular de PBMCs de sujeitos com fibrose cística tratados com ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

Figura 2 – Viabilidade celular de PBMCs de sujeitos sem fibrose cística tratados com ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

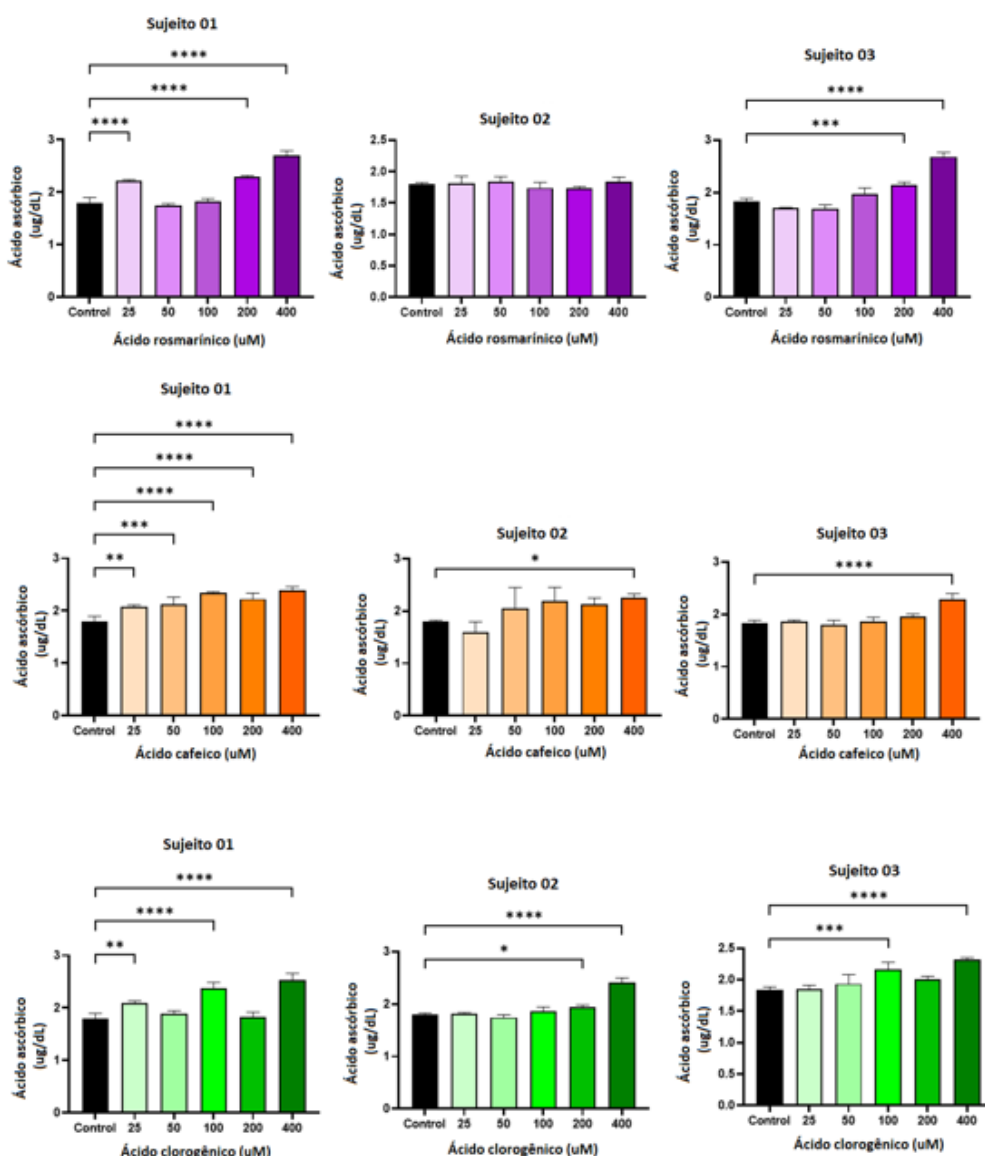
3.2 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido rosmarínico foi capaz de aumentar a concentração de ácido ascórbico em PBMCs de dois sujeitos com FC, sendo que a concentração de 400 μM representou um alto grau de significância ($p < 0,001$) (Figura 3). Em PBMCs do sujeito 02, especificamente, o ácido não alterou significativamente os níveis de vitamina C. No entanto, em PBMCs de sujeitos que não apresentam mutações no gene *CFTR*, as concentrações de 25 μM e 200 μM foram responsáveis por um aumento significativo de ácido ascórbico ($p < 0,001$), nas três amostras de células (Figura 4).

O ácido clorogênico aumentou a concentração de ácido ascórbico de PBMCs dos três sujeitos com FC com diferentes mutações e idades, com alta significância na concentração de 400 μM ($p<0,001$). Em amostras de células do grupo sem FC, o ácido clorogênico aumentou o potencial antioxidante também na concentração de 400 μM ($p<0,001$) e em outras concentrações demonstradas na figura 04.

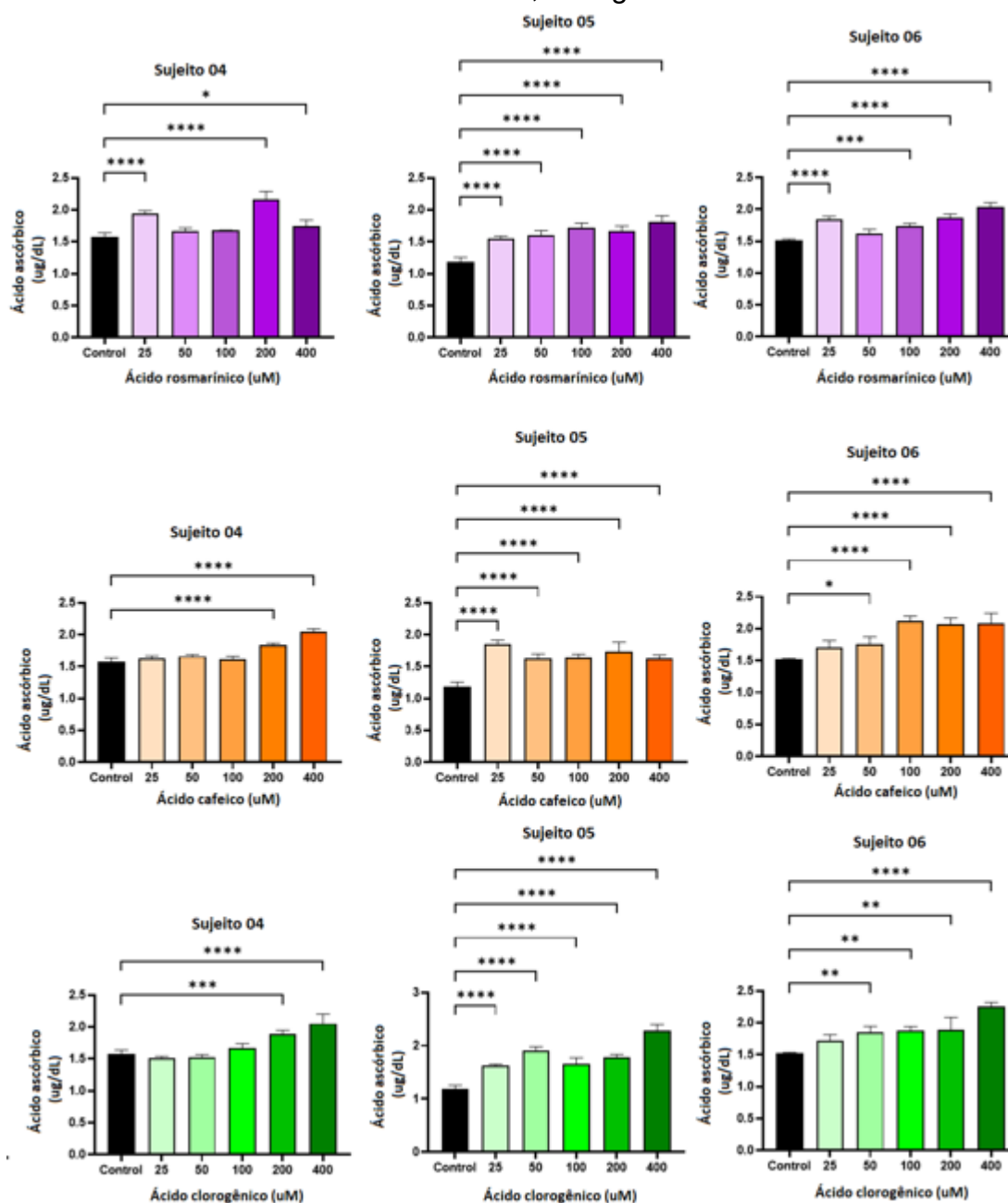
O ácido cafeico foi responsável por aumentar a concentração de ácido ascórbico em PBMCs de três sujeitos heterozigotos em diferentes idades, notadamente na concentração de 400 μM , com diferentes significâncias. Em amostras de células do grupo sem FC, o ácido supracitado foi responsável por aumentar o ácido ascórbico em PBMCs com alta significância ($p<0,001$) a partir da concentração de 200 μM .

Figura 3 – Níveis de ácido ascórbico de PBMCs de sujeitos com fibrose cística tratados com ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

Figura 4 – Níveis de ácido ascórbico de PBMCs de sujeitos sem fibrose cística tratados com ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

3.3 ÓXIDO NÍTRICO

Da mesma forma, os níveis de NO foram avaliados após as amostras de células serem tratadas com os ácidos fenólicos. O ácido rosmarínico desempenhou um papel importante no aumento dos níveis de NO em todas as amostras de células de sujeitos com FC (Figura 5). O sujeito 01, apresentou taxas significativas de aumento dos níveis de NO nas concentrações de 200 μ M ($p=0,01$) e 400 μ M ($p=0.01$), assim como as

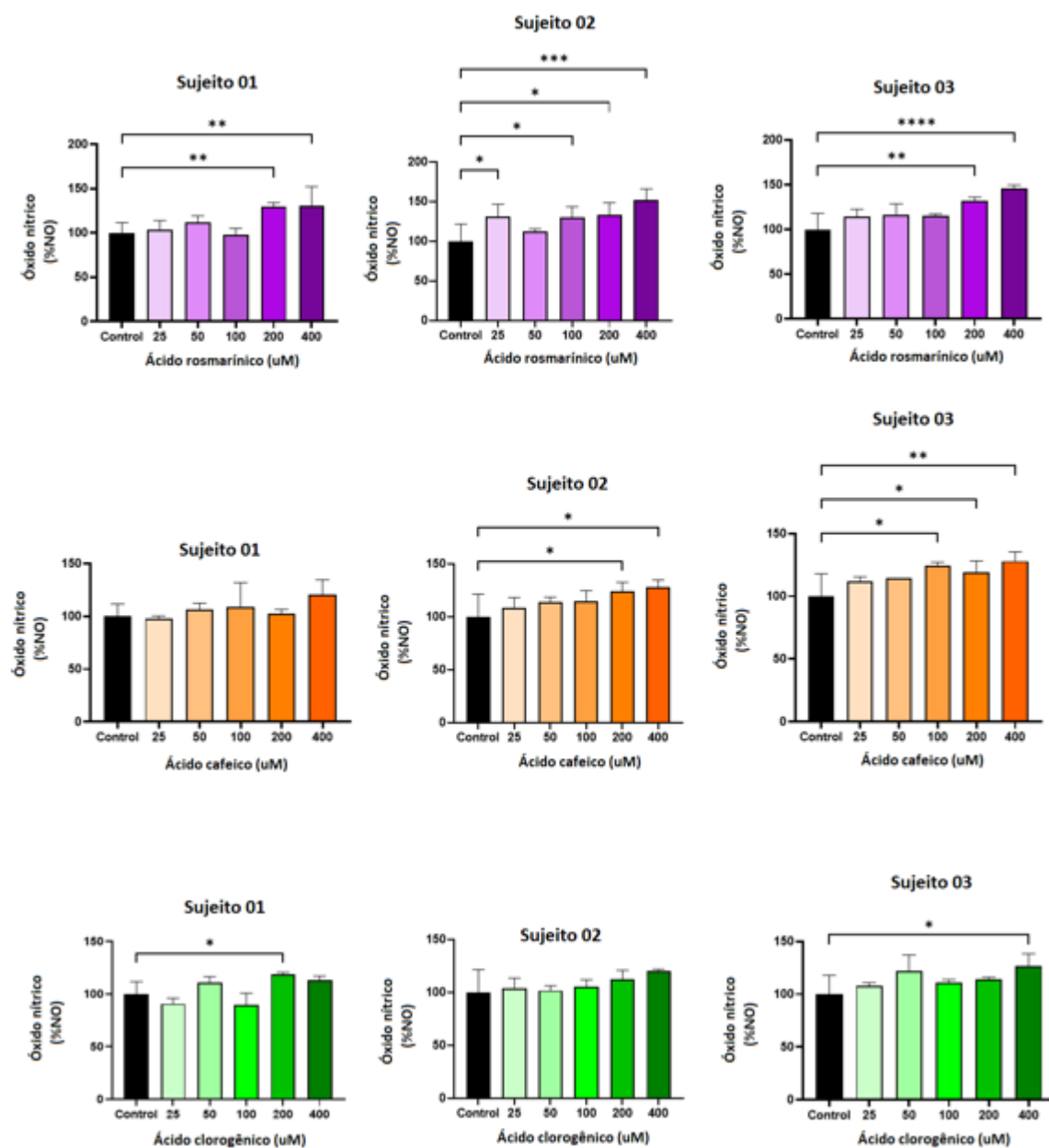
amostras dos sujeitos 03 (200 μ M, $p=0,01$; 400 μ M, $p<0,001$) e 06 (200 μ M, $p<0,001$; 400 μ M, $p<0,001$). A amostra do sujeito 02 apresentou taxas significativas de aumento dos níveis de NO em todas as concentrações testadas (25 μ M, $p=0,05$; 100 μ M, $p=0,05$; 200 μ M, $p=0,05$ e 400 μ M, $p=0,001$), exceto 50 μ M.

Quanto aos sujeitos sem FC (Figura 6), resultados semelhantes podem ser observados na amostra do sujeito 04, que apresentaram aumento significativo nos níveis de NO em todas as concentrações testadas (25 μ M, $p=0,05$; 50 μ M, $p=0,001$; 200 μ M, $p=0,05$ e 400 μ M, $p=0,001$), exceto 100 μ M. A amostra do sujeito 05 apresentou um aumento significativo dos níveis de NO apenas na concentração de 400 μ M ($p=0,01$). Quanto ao sujeito 06, observou-se aumento dos níveis de NO nas concentrações de 200 μ M ($p<0,001$) e 400 μ M ($p<0,001$). Nenhuma amostra apresentou redução dos níveis de NO nas concentrações testadas.

O ácido cafeico não apresentou redução dos níveis de NO em nenhuma amostra celular (Figura 5; Figura 6), independentemente da concentração testada. A amostra do sujeito 01 não apresentou alteração significativa dos níveis de NO. A amostra do sujeito 02 mostrou um aumento significativo nos níveis de NO nas concentrações de 200 μ M ($p=0,05$) e 400 μ M ($p=0,05$). A amostra do sujeito 03 mostrou aumento significativo nos níveis de NO nas concentrações de 100 μ M ($p=0,05$), 200 μ M ($p=0,05$) e 400 μ M ($p=0,01$). A amostra do sujeito 04 apresentou aumento nos níveis de NO nas concentrações de 50 μ M ($p=0,05$), 100 μ M ($p=0,01$) e 400 μ M ($p=0,001$), enquanto a amostra do sujeito 05 apresentou aumento significativo nos níveis de NO nas concentrações de 25 μ M ($p=0,01$), 100 μ M ($p<0,001$) e 400 μ M ($p<0,001$). A amostra do sujeito 06 apresentou aumento dos níveis de NO em todas as concentrações testadas (25 μ M, $p=0,001$; 50 μ M, $p=0,01$; 100 μ M, $p=0,01$ e 400 μ M, $p=0,01$), exceto 200 μ M.

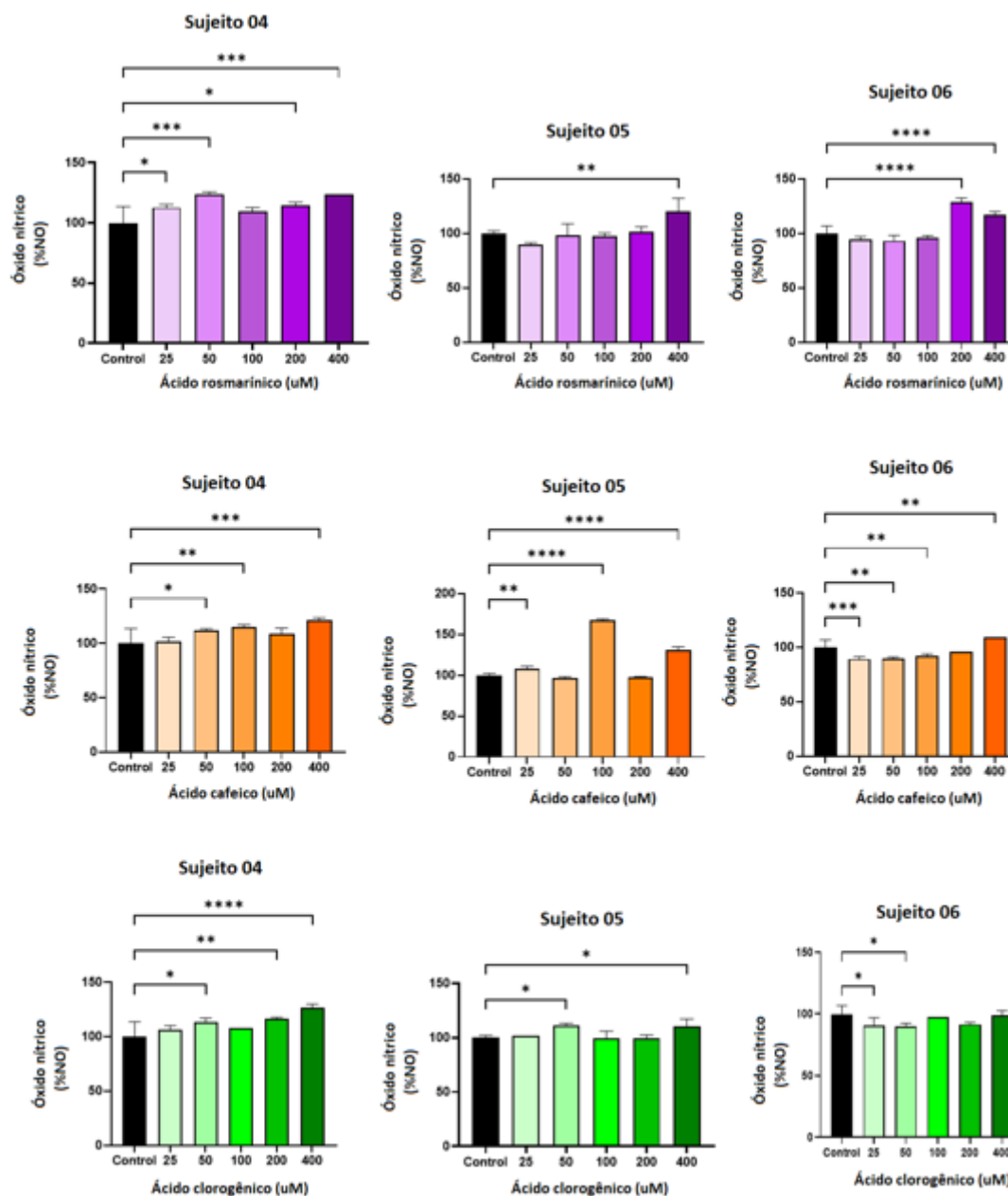
Em relação ao ácido clorogênico, as amostras de células de sujeitos com FC (Figura 5) não apresentaram aumento significativo nos níveis de NO na maioria das concentrações testadas, exceto as concentrações de 200 μ M ($p=0,05$) na amostra do sujeito 01 e 400 μ M ($p=0,05$) na amostra do sujeito 03. As amostras de células dos sujeitos sem FC (Figura 6) mostraram um aumento nas concentrações de NO. A amostra do sujeito 04 apresentou elevação nos níveis de NO nas concentrações de 50 μ M ($p=0,05$), 200 μ M ($p=0,01$) e 400 μ M ($p=0,001$), enquanto a amostra do sujeito 05 apenas nas concentrações de 50 μ M ($p=0,05$) e 400 μ M ($p=0,05$). A amostra do sujeito 06, por outro lado, apresentou um aumento nos níveis de NO em baixas concentrações, como 25 μ M ($p=0,05$) e 50 μ M ($p=0,05$).

Figura 5 – Níveis de óxido nítrico de PBMCs de sujeitos com fibrose cística tratados com ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

Figura 6 – Níveis de óxido nítrico de PBMCs de sujeitos sem fibrose cística tratados com ácidos cafeico, clorogênico e rosmarínico



Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A análise bioquímica dos níveis de fosfatase alcalina, de bilirrubina direta e total, de creatina quinase, de aspartato aminotransferase, de alanina transaminase, de lactato desidrogenase, de uréia, de ácido úrico e de creatinina dos sujeitos com FC e sem FC (Tabela 2) não mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$). No entanto, a média de alanina aminotransferase dos sujeitos com FC estava acima dos valores de

referência. O valor de p das análises não foi significativo, possivelmente, devido ao grande desvio padrão dos sujeitos, pois o sujeito 01 apresentou valores dentro da normalidade em todas as análises, enquanto os sujeitos 02 e 03 apresentaram valores alterados.

Tabela 2 – Parâmetros Bioquímicos

Parâmetros	Grupo com FC (média/desvio padrão)	Grupo sem FC (média/desvio padrão)	Valores de referência	Valor-p
Fosfatase Alcalina	376,3 ± 184,3	152,7 ± 39	65 to 300 U/L	0.1685
Bilirrubina Direta	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0	0 to 0,3 mg/dL	0.1161
Bilirrubina Total	0,43 ± 0,09	0,3 ± 0,08	0 to 1 mg/dL	0.2051
Creatina Quinase	25 ± 7,79	14,67 ± 0,47	24 to 95 U/L	0.1344
Aspartato Aminotransferase	20,3 ± 4,9	14,7 ± 0,5	0 to 38 U/L	0.1804
Alanina Transaminase	11 ± 6,2	7,7 ± 0,5	0 to 41 U/L	0.4883
Lactato Desidrogenase	319,7 ± 52,5	282,3 ± 28,9	230 to 460 U/L	0.4279
Uréia	17,7 ± 1,2	21,7 ± 2,6	10 to 50 mg/dL	0.1234
Ácido Úrico	4,1 ± 1,2	4 ± 0,5	2,5 to 6 mg/dL	0.9180
Creatinina	0,8 ± 0,2	0,98 ± 0,1	0,72 to 1,16 mg/dL	0.2999

Fonte: Elaborado pelos autores (2022)

4 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 (GRELA; KOZLOWSKA; GRABOWIECKA, 2018). O MTT apresenta vantagens como fácil manuseio, aplicação em larga escala e ausência de radioatividade (WEICHERT et al., 1991; NI; HOLLANDER, 1996), e já foi validado em células não aderentes, como linfócitos de sangue periférico (WEICHERT et al., 1996; AMANI et al., 2021; HASSANI et al., 2021). Os ácidos fenólicos, em geral, aumentaram a viabilidade celular e a proliferação de PBMCs, mas as células do sujeito 02 tiveram uma diminuição significativa em sua viabilidade. Embora não tenhamos encontrado estudos semelhantes para comparação, o ácido rosmarínico aumentou a contagem de leucócitos em camundongos (EFTEKHAR; MOGHIMI; BOSKABADY, 2018). Quanto ao ácido cafeico, Prasad, Jeyanthimala e Ramachandran (2009) demonstraram um aumento significativo na viabilidade celular de linfócitos do sangue humano de forma dependente da concentração. No estudo de Cariddi et al. (2015), o ácido clorogênico não afetou a viabilidade dos linfócitos, independente da concentração testada, mas

reduziu o dano induzido pela ocratoxina A, sendo assim, um possível bioprotetor. Em nosso estudo, o ácido clorogênico foi responsável por aumentar a viabilidade e proliferação celular tanto nas amostras dos sujeitos sem FC quanto nas amostras de células de sujeitos com FC. 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. A função pulmonar em sujeitos com FC tem sido associada à diminuição das concentrações plasmáticas de ácido ascórbico (BROWN et al. 1996), 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 (FISCHER et al., 2004). Além disso, também parece inibir a formação de MPO a partir de PBMCs (WILLIAMS et al., 1984). Baixas concentrações de ácido ascórbico estão associadas a altos graus de inflamação em sujeitos com FC (WINKLHOFFER-ROOB et al., 1997; 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.

Comparando os três compostos fenólicos testados, o ácido clorogênico apresentou um aumento do ácido ascórbico mais significativo e constante nas PBMCs de sujeitos com FC. O ácido clorogênico conseguiu aumentar os níveis de ácido ascórbico de forma altamente significativa, mesmo em amostras de células do sujeito 02, que tiveram uma resposta menor ao ácido cafeico e sem alterações quando tratadas com ácido rosmarínico. Comparadas às amostras de células do sujeito 03, que apresentavam as mesmas classes de mutações, sexo e idade semelhante, as amostras de células do sujeito 02 podem ter uma resposta menor devido a fatores nutricionais e metabólicos, uma vez que este apresentou fosfatase alcalina elevada e creatinina abaixo do esperado (Tabela 1).

Mutações de classe II como a F508del, que está relacionada com pouca ou nenhuma função da proteína CFTR, tende a promover um fenótipo clássico de FC. No entanto, heterozigotos com mutações classe V, como c.2657+5G>A, que preserva a função residual da proteína, têm melhor prognóstico, pois apresentam função pancreática exócrina e menos complicações pulmonares (MASVIDAL et al., 2014; BELL et al., 2020). Assim, devido a um genótipo brando, o sujeito 01 tem resultados mais semelhantes aos sujeitos sem FC, enquanto os sujeitos 02 e 03, portadores de duas mutações de classe II, são menos responsivos aos tratamentos com os ácidos. Além disso, o sujeito 01 tem 43 anos, sendo praticamente o dobro da expectativa de vida dos sujeitos com FC no Brasil (BELL et al, 2020), mostrando que a mutação classe V está ligada à melhor qualidade de vida. Cabe ressaltar que as manifestações fenotípicas são variadas, pois fatores como genes modificadores e fatores ambientais e socioeconômicos interferem na gravidade e apresentação da doença (COLLACO; CUTTING, 2008; BELL et al, 2020). Há também muitas dúvidas sobre o fenótipo gerado pelo rearranjo genético em heterozigose na FC (TOMAIUOLO et al., 2008).

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 (GRASEMANN et al., 2015; KOTHA et al., 2015; KORTEN et al., 2017). Em estudo recente, alterações locais e sistêmicas na via da L-arginina e do NO foram encontradas no escarro, sangue e urina de sujeitos com FC (HANUSCH et al., 2020). A redução do NO exalado também está relacionado a contagens mais altas de neutrófilos no sangue em sujeitos com FC (KRANTZ et al., 2017). 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 (MENG et al., 2000).

As terapias com NO inalado demonstram melhora no quadro clínico (YAACOBY-BIANU et al., 2018. BARTLEY et al., 2020; BENTUR et al., 2020). As terapias que aumentam o NO foram testadas em uma variedade de condições em sujeitos com FC e se mostraram promissoras (SOMAYAJI; NICHOLS; BELL, 2020). 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, em relação aos parâmetros bioquímicos, a fosfatase alcalina estava elevada em dois sujeitos com FC, com a média dos três sujeitos acima do valor de referência. O desvio padrão foi significativo, pois o sujeito 01 não apresentou alterações, possivelmente devido às características de seu genótipo. A fosfatase alcalina, que pode ser muito alta em sujeitos com FC (REKEN et al., 2021; DELMEZ et al., 2022), é uma enzima hepática importante para caracterizar a doença hepática relacionada à FC, uma das principais causas de morbimortalidade da doença (COLOMBO; ALICANDRO, 2019). No entanto, apresenta resultados estatísticos moderados para ser utilizado como método de triagem, com sensibilidade de 63% e especificidade de 64% (MARTONOSI et al., 2021). Estudos prévios indicaram isoenzimas de fosfatase alcalina no líquido amniótico com um possível teste de triagem pré-natal para FC (DICTUS-VERMEULEN et al., 1988; SCHOENAU et al., 1989), porém outros exames recentes apresentam resultados mais satisfatórios (LAM et al., 2019; LEWINDON et al., 2019). Para caracterizar a doença hepática, a elastografia transitória mostrou-se um método superior, mais simples e mais barato (LAM et al., 2019; MARTONOSI et al., 2021). Outros marcadores bioquímicos hepáticos testados não mostraram diferenças significativas com os sujeitos sem FC, como aspartato aminotransferase e alanina transaminase. Por fim, dados bioquímicos sem diferenças estatísticas entre sujeitos com FC e sujeitos sem alteração no gene *CFTR*, podem indicar que os sujeitos testados possuem uma doença relativamente controlada e uma capacidade homeostática para uma boa resposta às terapias experimentais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mostramos que 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.

Em conclusão, ressaltamos 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 inflamatórias pode ser utilizada como base importante para o controle dos sintomas e progressão da doença.

REFERÊNCIAS

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.

ADIB-CONQUY, Minou et al. Neutrophils in cystic fibrosis display a distinct gene expression pattern. **Molecular medicine**, v. 14, n. 1, p. 36-44, 2008. Disponível em: <https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.2119/2007-00081.Adib-Conquy>. Acesso em 05 jan. 2022.

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.

BARTLEY, Bethany L. et al. High-dose inhaled nitric oxide as adjunct therapy in cystic fibrosis targeting Burkholderia multivorans. **Case Reports in Pediatrics**, v. 2020, n. 1, p. 1-6, 2020. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/crpe/2020/1536714/>. Acesso em: 07 abr. 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.

BENTUR, Lea et al. Pilot study to test inhaled nitric oxide in cystic fibrosis patients with refractory Mycobacterium abscessus lung infection. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 19, n. 2, p. 225-231, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199319301043?via%3Dihub>. Acesso em: 07 abr. 2022.

BONFIELD, T. L. et al. Absence of the cystic fibrosis transmembrane regulator (Cftr) from myeloid-derived cells slows resolution of inflammation and infection. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 5, p. 1111-1122, 2012. Disponível em: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.0412188>. Acesso em: 05 jan. 2022.

BROWN, R. K. et al. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. **European Respiratory Journal**, v. 9, n. 2, p. 334-339, 1996. Disponível em: <https://erj.ersjournals.com/content/9/2/334.long>. Acesso em: 02 jan. 2022.

CARIDDI, Laura Noelia et al. Polyphenols as possible bioprotectors against cytotoxicity and DNA damage induced by ochratoxin A. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 3, p. 1008-1018, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668915000770?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jun. 2022.

CHEVALIER, Benoit; HINZPETER, Alexandre. The influence of CFTR complex alleles on precision therapy of cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 19, n. 1, p. S15-S18, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199319309889?via%3Dihub>. Acesso em: 05 jan. 2022.

CHOI, Woo-Suk et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cells. **Cellular immunology**, v. 280, n. 2, p. 164-170, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000887491300004X?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2021.

COAKLEY, Raymond J. et al. Cytosolic pH and the inflammatory microenvironment modulate cell death in human neutrophils after phagocytosis. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 100, n. 9, p. 3383-3391, 2002. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/100/9/3383/16427/Cytosolic-pH-and-the-inflammatory-microenvironment>. Acesso em: 09 dez. 2021.

COLLACO, Joseph M.; CUTTING, Garry R. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 14, n. 6, p. 559, 2008. Disponível em: https://journals.lww.com/co-pulmonarymedicine/Fulltext/2008/11000/Update_on_gene_modifiers_in_cystic_fibrosis.10.aspx. Acesso em: 07 abr. 2022.

COLOMBO, Carla; ALICANDRO, Gianfranco. Liver disease in cystic fibrosis: illuminating the black box. **Hepatology**, v. 69, n. 4, p. 1379-1381, 2019. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.30255>. Acesso em: 15 nov. 2021.

DELMEZ, Quentin et al. Elevation of alkaline phosphatase and long-term drug therapy for cystic fibrosis. **European journal of clinical pharmacology**, v. 78, n. 4, p. 699-701, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00228-021-03272-0>. Acesso em: 15 nov. 2021.

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.

DICTUS-VERMEULEN, Claudine et al. Alkaline phosphatase isoenzyme pattern in human amniotic fluid is dependent on the level of total activity. Implications in cystic fibrosis diagnosis. **Clinica chimica acta**, v. 173, n. 2, p. 173-181, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009898188902550>. Acesso em: 15 nov. 2021.

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.

EFTEKHAR, Naeima; MOGHIMI, Ali; BOSKABADY, Mohammad Hossein. Prophylactic effect of rosmarinic acid on tracheal responsiveness, white blood cell count and oxidative stress markers in lung lavage of sensitized rats. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 1, p. 119-125, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1734114017303316?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jun. 2022.

FISCHER, Horst; SCHWARZER, Christian; ILLEK, Beate. Vitamin C controls the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3691-3696, 2004. Disponível em: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0308393100?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 02 jun. 2022.

GALLI, Francesco et al. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 690-713, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443911002973?via%3Dihub>. Acesso em: 10 dez. 2021.

GRASEMANN, Hartmut et al. Effect of ivacaftor therapy on exhaled nitric oxide in patients with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 14, n. 6, p. 727-732, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199315001630?via%3Dihub>. Acesso em: 07 abr. 2022.

GRELA, Ewa; KOZŁOWSKA, Joanna; GRABOWIECKA, Agnieszka. Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. **Acta histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303-311, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128118300278?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jun. 2022.

HANUSCH, Beatrice et al. Local and systemic alterations of the L-arginine/nitric oxide pathway in sputum, blood, and urine of pediatric cystic fibrosis patients and effects of antibiotic treatment. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 12, p. 3802, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/12/3802>. Acesso em: 07 abr. 2022.

HASSANI, Melika et al. Cytotoxic effects of duloxetine on MKN45 and NIH3T3 cell lines and genotoxic effects on human peripheral blood lymphocytes. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 56, p. 372-376, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ag/a/dddJBcfXsGfbBC53RmcsrSm/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 02 jun. 2022.

HOUSTON, Neralee et al. Sputum neutrophils in cystic fibrosis patients display a reduced respiratory burst. **Journal of cystic fibrosis**, v. 12, n. 4, p. 352-362, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199312002081>. Acesso em: 09 dez. 2021.

IDDIR, Mohammed et al. Strengthening the immune system and reducing inflammation and oxidative stress through diet and nutrition: considerations during the COVID-19 crisis. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1562, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/6/1562>. Acesso em 10 dez. 2021.

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.

KAMAL, Natasha; SURANA, Pallavi; KOH, Christopher. Liver disease in patients with cystic fibrosis. **Current opinion in gastroenterology**, v. 34, n. 3, p. 146, 2018. Disponível em: https://journals.lww.com/co-gastroenterology/Fulltext/2018/05000/Liver_disease_in_patients_with_cystic_fibrosis.6.aspx. Acesso em: 05 jan. 2022.

KOLLER, B. et al. Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease. **European journal of clinical investigation**, v. 39, n. 7, p. 535-547, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2362.2009.02145.x>. Acesso em: 09 dez. 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.

KOTHA, Kavitha et al. Concentration of fractional excretion of nitric oxide (FENO): A potential airway biomarker of restored CFTR function. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 14, n. 6, p. 733-740, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199315001642?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.

KRUGER, Philipp et al. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004651, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004651>. Acesso em: 05 jan. 2022.

LAM, Simon et al. Transient elastography in the evaluation of cystic fibrosis–associated liver disease: systematic review and meta-analysis. **Journal of the Canadian Association of Gastroenterology**, v. 2, n. 2, p. 71-80, 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcag/article/2/2/71/5050541?login=true>. Acesso em: 15 nov. 2021.

LEWINDON, Peter J. et al. Accuracy of transient elastography data combined with APRI in detection and staging of liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 12, p. 2561-2569. e5, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542356519302794?via%3Dihub>. Acesso em: 15 nov. 2021.

LIGUORI, Ilaria et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical interventions in aging**, v. 13, n. 1, p. 757, 2018. Disponível em: <https://www.dovepress.com/oxidative-stress-aging-and-diseases-peer-reviewed-fulltext-article-CIA>. Acesso em: 09 dez. 2021.

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.

MAKAM, Megha et al. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5779-5783, 2009. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0813410106>. Acesso em: 09 dez. 2021.

MARCO-CASANOVA, Paola et al. Preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cell Pellets and Plasma from a Single Blood Draw at Clinical Trial Sites for Biomarker Analysis. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 169, p. e60776, 2021. Disponível em: <https://www.jove.com/t/60776/preparation-peripheral-blood-mononuclear-cell-pellets-plasma-from>. Acesso em: 10 dez. 2021.

MARTONOSI, Ágnes Rita et al. Non-invasive diagnostic tests in cystic fibrosis-related liver disease: A diagnostic test accuracy network meta-analysis. **Frontiers in medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.598382/full>. Acesso em: 15 nov. 2021.

MASSON, Alexandra et al. Predictive factors for lumacaftor/ivacaftor clinical response. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 18, n. 3, p. 368-374, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156919931830821X?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jan. 2022.

MASVIDAL, Laia et al. C. Assessing the residual CFTR gene expression in human nasal epithelium cells bearing CFTR splicing mutations causing cystic fibrosis. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 6, p. 784-791, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ejhg2013238>. Acesso em: 07 abr. 2022.

MENG, Qing-Hai et al. Neutrophils enhance expression of inducible nitric oxide synthase in human normal but not cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 190, n. 2, p. 126-132, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10657009/>. Acesso em: 07 abr. 2022.

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

NG, Hang Pong et al. Neutrophil-mediated phagocytic host defense defect in myeloid Cftr-inactivated mice. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106813, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106813>. Acesso em: 05 jan. 2022.

NI, Jian; HOLLANDER, Daniel. Applications of the MTT assay to functional studies of mouse intestinal intraepithelial lymphocytes. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 10, n. 1, p. 42-52, 1996. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291098-2825%281996%2910%3A1%3C42%3A%3AAID-JCLA7%3E3.0.CO%3B2-N>. Acesso em: 02 jun. 2022.

NOH, Hyung Jun et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrussin 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.

PAINTER, Richard G. et al. CFTR expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. **Biochemistry**, v. 45, n. 34, p. 10260-10269, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi060490t>. Acesso em: 05 jan. 2022.

PERES, Carmem Maldonado; CURI, Rui. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283p.

PETIT-BERTRON, Anne-France et al. Circulating and airway neutrophils in cystic fibrosis display different TLR expression and responsiveness to interleukin-10. **Cytokine**, v. 41, n. 1, p. 54-60, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466607004589?via%3Dihub>. Acesso em: 09 dez. 2021.

PIZZINO, Gabriele et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, n. 1, p. 1-13, 2017. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/8416763/>. Acesso em: 09 dez. 2021

PRASAD, Nagarajan Rajendra; JEYANTHIMALA, Kasinathan; RAMACHANDRAN, Samivel. Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 95, n. 3, p. 196-203, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134409000542?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jun. 2022.

RADA, Balázs. Interactions between neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Pathogens**, v. 6, n. 1, p. 1-24, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/6/1/10>. Acesso em: 02 jan. 2022.

RAFEEQ, Misbahuddin M.; MURAD, Hussam Aly Sayed. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. **Journal of translational medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2017. Disponível em: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-017-1193-9/tables/1>. Acesso em 01 fev. 2022.

REIS, R. C. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante de variedades melhoradas de mamão. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 2076–2081, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/VPhvKt7jHrJ3QN9RZbvHFMD/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 02 jun. 2022.

REKEN, Jennae et al. Elevated Alkaline Phosphatase in a 10-Year-Old With Cystic Fibrosis. **Clinical Pediatrics**, v. 60, n. 11-12, p. 489-491, 2021. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/00099228211044567?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 15 nov. 2021.

RIEDHAMMER, Christine; HALBRITTER, Dagmar; WEISSERT, Robert. Peripheral blood mononuclear cells: isolation, freezing, thawing, and culture. In: **Multiple Sclerosis**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 53-61. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/7651_2014_99. Acesso em: 15 nov. 2021.

SCHOENAU, E. et al. High-molecular-mass ("biliary") isoenzyme of alkaline phosphatase and the diagnosis of liver dysfunction in cystic fibrosis. **Clinical chemistry**, v. 35, n. 9, p. 1888-1890, 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2776312/>. 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.

SOMAYAJI, Ranjani; NICHOLS, Dave P.; BELL, Scott C. Cystic fibrosis—Ten promising therapeutic approaches in the current era of care. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 29, n. 10, p. 1107-1124, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13543784.2020.1805733?journalCode=ieid20>. Acesso em: 07 abr. 2022.

STRUG, Lisa J. et al. Recent advances in developing therapeutics for cystic fibrosis. **Human molecular genetics**, v. 27, n. 2, p. 173-186, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article/27/R2/R173/5060051?login=true>. Acesso em: 05 jan. 2022.

TERZIC, M. et al. Cystic fibrosis mutation spectrum in North Macedonia: A step toward personalized therapy. **Balkan Journal of Medical Genetics**, v. 22, n. 1, p. 35-40, 2019. Disponível em: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/bjmg-2019-0009>. Acesso em: 01 fev. 2022.

TOMAIUOLO, R. et al. Epidemiology and a novel procedure for large scale analysis of CFTR rearrangements in classic and atypical CF patients: a multicentric Italian study. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 7, n. 5, p. 347-351, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199307001968?via%3Dihub>. Acesso em 07 abr. 2022.

VECCHIO-PAGÁN, Briana et al. Deep resequencing of CFTR in 762 F508del homozygotes reveals clusters of non-coding variants associated with cystic fibrosis disease traits. **Human genome variation**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/hgv201638>. Acesso em: 02 jan. 2022.

VEIT, Gudio et al. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. **Molecular biology of the cell**, v. 27, n. 3, p. 424-433, 2016. Disponível em: https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.E14-04-0935?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 05 jan. 2022.

WEICHERT, H. et al. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). **Allergie und Immunologie**, v. 37, n. 3-4, p. 139-144, 1991. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1793087>. Acesso em: 02 jun. 2022.

WILLIAMS, R. N. et al. Ascorbic acid inhibits the activity of polymorphonuclear leukocytes in inflamed ocular tissues. **Experimental eye research**, v. 39, n. 3, p. 261-265, 1984. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014483584900149?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jun. 2022.

WINKLHOFER-ROOB, Brigitte M. et al. Plasma vitamin C concentrations in patients with cystic fibrosis: evidence of associations with lung inflammation. **The American journal of clinical nutrition**, v. 65, n. 6, p. 1858-1866, 1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/65/6/1858/4655541?login=true>. Acesso em: 07 abr. 2022.

YAACOBY-BIANU, Karin et al. Compassionate nitric oxide adjuvant treatment of persistent Mycobacterium infection in cystic fibrosis patients. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 37, n. 4, p. 336-338, 2018. Disponível em: https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/2018/04000/Compassionate_Nitric_Oxide_Adjuvant_Treatment_of.11.aspx. Acesso em: 07 abr. 2022.

YOSHIMURA, Kunihiro et al. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5417-5423, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328907/>. Acesso em: 05 jan. 2022.

ZHOU, Yun et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator recruitment to phagosomes in neutrophils. **Journal of innate immunity**, v. 5, n. 3, p. 219-230, 2013. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/346568>. Acesso em: 09 dez. 2021.