



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE MEDICINA

MARIA CLARA BARBOSA DE OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES PELO  
EUGENOL REDUZ A LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA PELA FUMAÇA  
DO CIGARRO EM CAMUNDONGOS**

MOSSORÓ

2022

MARIA CLARA BARBOSA DE OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES PELO  
EUGENOL REDUZ A LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA PELA FUMAÇA  
DO CIGARRO EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a  
Universidade Federal Rural do Semiárido  
como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Kennedy  
Feitosa Lima

MOSSORÓ

2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

BB238 Barbosa de Oliveira, Maria Clara.  
m Modulação da atividade dos macrófagos alveolares  
pelo eugenol reduz a lesão pulmonar aguda  
induzida pela fumaça do cigarro em camundongos. /  
Maria Clara Barbosa de Oliveira. - 2022.  
38 f. : il.

Orientador: Emanuel Kennedy Feitosa Lima.  
Monografia (graduação) - Universidade Federal  
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina, 2022.

1. Fumaça de cigarro. 2. Macrófagos alveolares.  
3. Inflamação pulmonar. 4. Estresse oxidativo. 5.  
Eugenol. I. Feitosa Lima, Emanuel Kennedy ,  
orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade  
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência  
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva  
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

MARIA CLARA BARBOSA DE OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES PELO  
EUGENOL REDUZ A LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA PELA  
FUMAÇA DO CIGARRO EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado a Universidade Federal  
Rural do Semiárido como requisito para  
obtenção do título de Bacharel em  
Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Kennedy  
Feitosa Lima

Defendida em 23/06/2022

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Emanuel Kennedy Feitosa Lima (UFERSA)  
Presidente

---

Prof. Dra. Teresinha Silva de Brito (UFERSA)  
Membro Examinador



Documento assinado digitalmente  
MICASSIO FERNANDES DE ANDRADE  
Data: 16/12/2023 15:06:44-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Micássio Fernandes de Andrade (UFERSA)  
Membro Examinador

MOSSORÓ

2022

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e à minha Família, em especial aos meus pais, Meyre-Ester e Raimundo José, por serem o meu porto seguro e fonte diária de incentivo e apoio.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Dr. Emanuel Kennedy Feitosa Lima, por todos os aprendizados e oportunidades proporcionados, pela paciência, parceria e dedicação.

Agradeço a Banca Examinadora pela disponibilidade em ler e apresentar contribuições para o meu trabalho.

Agradeço aos coautores do artigo pelas contribuições e a todos os amigos e familiares que contribuíram de alguma forma nesse processo.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do projeto.

“O que faz andar a estrada? É o sonho. Enquanto a gente sonha a estrada permanecerá viva. É para isso que servem os caminhos, para nos fazerem parentes do futuro”.

Mia Couto

## RESUMO

A fumaça do cigarro (FC) provoca inflamação pulmonar e recrutamento de macrófagos M1 e M2, que liberam, respectivamente, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Objetivou-se avaliar os efeitos do eugenol (EUG) – composto bioativo com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes – na lesão pulmonar aguda (LPA) induzida pela FC. *In vivo*, camundongos C57BL/6 foram expostos a 12 cigarros/dia/5dias (LPA e LPA+EUG) e tratados 15 min/dia/5dias com eugenol 100 mg/mL (LPA+EUG e EUG) ou salina (Controle e LPA). Avaliou-se escore de inflamação; índice de broncoconstrição (IBC); leucócitos; macrófagos e neutrófilos/campo; MDA; CAT e MPO. *In vitro*, macrófagos alveolares de rato foram expostos ao extrato de fumaça de cigarro (EFC 1, 2,5, 5 ou 10%) para o teste de citotoxicidade. EFC 5% foi tratado com EUG (10, 30 ou 100 µg/mL) para análise inflamatória e redox. *In vivo*, LPA+EUG, comparado a LPA, apresentou menor inflamação e redução de 51,8% do IBC ( $p<0,0001$ ), recuperou a altura do epitélio em 29,5% ( $p<0,001$ ), e reduziu leucócitos, neutrófilos e macrófagos em 46%, 56,1% e 59,2% respectivamente ( $p<0,05$ ). O tratamento com EUG não reduziu a atividade da CAT e MPO, mas reduziu MDA em 45,1% ( $p<0,001$ ). *In vitro*, EUG 100 µg/mL reduziu MDA em 38% e KC em 65% ( $p<0,05$ ), recuperou a atividade da CAT em 77,6% ( $p<0,05$ ), e aumentou IL-10 e a relação IL-10/KC em 77,8% e 2,1x respectivamente ( $p<0,05$ ). EUG 30 µg/mL reduziu em 34% a atividade da SOD ( $p<0,05$ ). Esses resultados sugerem que o eugenol reduziu a LPA induzida pela FC, e atuou na modulação da atividade dos macrófagos.

**Palavras-chave:** fumaça de cigarro; macrófagos alveolares; inflamação pulmonar; estresse oxidativo; eugenol.

## ABSTRACT

Cigarette smoke (CS) causes lung inflammation and recruitment of M1 and M2 macrophages, which release, respectively, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. The objective was to evaluate the effects of eugenol (EUG) - a bioactive compound with anti-inflammatory and antioxidant properties - on CS-induced acute lung injury (ALI). *In vivo*, C57BL/6 mice were exposed to 12 cigarettes/day/5days (ALI and ALI+EUG) and treated 15 min/day/5days with eugenol 100 mg/mL (ALI+EUG and EUG) or saline (Control and ALI). We evaluated inflammation score; bronchoconstriction index (BCI); leukocytes; macrophages and neutrophils/field; MDA; CAT and MPO. *In vitro*, rat alveolar macrophages were exposed to cigarette smoke extract (CSE 1, 2.5, 5 or 10%) for the cytotoxicity test. CSE 5% was treated with EUG (10, 30 or 100 µg/mL) for inflammatory and redox analysis. *In vivo*, ALI+EUG, compared to LPA, showed less inflammation and 51.8% reduction in BCI ( $p<0.0001$ ), recovered epithelial height by 29.5% ( $p<0.001$ ), and reduced leukocytes, neutrophils and macrophages in 46%, 56.1% and 59.2% respectively ( $p<0.05$ ). EUG treatment did not reduce CAT and MPO activity, but reduced MDA by 45.1% ( $p<0.001$ ). *In vitro*, EUG 100 µg/mL reduced MDA by 38% and KC by 65% ( $p<0.05$ ), recovered CAT activity by 77.6% ( $p<0.05$ ), and increased IL-10 and the IL-10/KC ratio in 77.8% and 2.1x respectively ( $p<0.05$ ). EUG 30 µg/mL reduced SOD activity by 34% ( $p<0.05$ ). These results suggest that eugenol reduced CS-induced ALI and acted in the modulation of macrophage activity.

**Keywords:** cigarette smoke; alveolar macrophages; lung inflammation; oxidative stress; eugenol

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |                                               |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|
| CAT                           | Catalase                                      |
| CO                            | Monóxido de carbono                           |
| DMEN                          | Dulbecco's Modified Eagle's Medium            |
| DPOC                          | Doença pulmonar obstrutiva crônica            |
| EFC                           | Extrato da fumaça de cigarro                  |
| ERN                           | Espécies reativas de nitrogênio               |
| ERO                           | Espécies reativas de oxigênio                 |
| EUG                           | Eugenol                                       |
| FC                            | Fumaça de cigarro                             |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                        |
| IBC                           | Índice de broncoconstrição                    |
| IL-10                         | Interleucina 10                               |
| IL-8                          | Interleucina 8                                |
| IL-6                          | Interleucina 6                                |
| IL- $\beta$                   | Interleucina 1 $\beta$                        |
| KC                            | Quimioatraente de queratinócitos              |
| LBA                           | Lavado broncoalveolar                         |
| LPA                           | Lesão pulmonar aguda                          |
| LPS                           | Lipopolissacarídeos                           |
| MAR                           | Macrófagos alveolares de ratos                |
| MDA                           | Malondialdeído                                |
| MPO                           | Mieloperoxidase                               |
| NF- $\kappa$ B                | Fator nuclear kappa B                         |
| NK                            | Natural killers                               |
| OH <sup>-</sup>               | Hidroxila                                     |
| SARA                          | Síndrome da angústia respiratório aguda       |
| SFB                           | Soro fetal bovino                             |
| SOD                           | Superoxidodismutase                           |
| TGF- $\beta$                  | Fator de transformação do crescimento $\beta$ |
| TNF- $\alpha$                 | Fator de necrose tumoral $\alpha$             |

## SUMÁRIO

|            |                                                                  |           |
|------------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                          | <b>11</b> |
| <b>2</b>   | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>                               | <b>12</b> |
| <b>3</b>   | <b>OBJETIVOS .....</b>                                           | <b>14</b> |
|            | <b>ARTIGO .....</b>                                              | <b>15</b> |
| <b>4</b>   | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                          | <b>17</b> |
| <b>5</b>   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                 | <b>19</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Reagentes.....</b>                                            | <b>19</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Animais .....</b>                                             | <b>19</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Desenho experimental .....</b>                                | <b>19</b> |
| 5.3.1      | Exposição à fumaça de cigarro e tratamento <i>in vivo</i> .....  | 19        |
| <b>6.4</b> | <b>Protocolos experimentais in vivo .....</b>                    | <b>19</b> |
| 6.4.1      | Processamento tecidual e análises histológicas .....             | 19        |
| 6.4.1.1    | Análises morfológicas .....                                      | 20        |
| <b>6.5</b> | <b>Procedimentos experimentais in vitro .....</b>                | <b>20</b> |
| 6.5.1      | Preparação do extrato da fumaça de cigarro .....                 | 20        |
| 6.5.2      | Exposição à fumaça de cigarro e tratamento <i>in vitro</i> ..... | 21        |
| <b>6.6</b> | <b>Análises .....</b>                                            | <b>21</b> |
| 6.6.1      | Análises bioquímicas .....                                       | 21        |
| 6.6.2      | Marcadores inflamatórios .....                                   | 22        |
| <b>6.7</b> | <b>Análises estatísticas .....</b>                               | <b>22</b> |
| <b>7</b>   | <b>RESULTADOS .....</b>                                          | <b>22</b> |
| <b>7.1</b> | <b>Morfologia.....</b>                                           | <b>22</b> |
| <b>7.2</b> | <b>Marcadores inflamatórios in vivo .....</b>                    | <b>23</b> |
| <b>7.3</b> | <b>Marcadores redox in vivo .....</b>                            | <b>23</b> |
| <b>7.4</b> | <b>Viabilidade celular .....</b>                                 | <b>23</b> |
| <b>7.5</b> | <b>Marcadores inflamatórios in vitro .....</b>                   | <b>23</b> |
| <b>7.6</b> | <b>Marcadores redox in vitro .....</b>                           | <b>23</b> |
| <b>8</b>   | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                           | <b>24</b> |
| <b>9</b>   | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                | <b>28</b> |
|            | <b>FIGURAS .....</b>                                             | <b>29</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                         | <b>34</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A fumaça de cigarro contém cerca de cinco mil compostos tóxicos (MACNEE, 2000; HOFFMANN, et al., 2005), os quais induzem uma resposta inflamatória caracterizada pelo recrutamento de células inflamatórias, principalmente macrófagos e neutrófilos. Os macrófagos podem ser polarizar em dois fenótipos distintos: os macrófagos M1 liberam citocinas pró-inflamatórias como TNF-  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6 e IL-8 (KENNEDY-FEITOSA et al., 2016). Além disso, a fumaça de cigarro possui uma alta concentração de oxidantes potentes, tais como acroleína, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> e radicais orgânicos (CAVALCANTE e BRUIN, 2009). O excesso desses agentes oxidantes, e a redução dos sistemas antioxidantes caracterizam o desequilíbrio redox, desencadeando o estresse oxidativo, o qual tem papel fundamental na lesão pulmonar aguda (MOKRA, MOKRY, 2019).

As plantas são uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais com ação farmacológica (FIRMO, et al., 2011), sendo algumas espécies amplamente usadas no tratamento dos sintomas de doenças respiratórias (JUERGENS et al, 2014). O eugenol (4-Alil-2-Metoxifenol), um fenilpropanoide encontrado no óleo essencial de diversas espécies, tais como noz-moscada, canela e folha de louro (BHUIYAN, 2010), em virtude de sua capacidade de modular respostas biológicas, vem tendo seu potencial farmacológico investigado. O eugenol inibiu a liberação de interleucinas, como a IL-1- $\beta$ , e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) (LEE et al., 2007); reduziu o depósito de colágeno e o influxo de células inflamatórias, como neutrófilos (MAGALHÃES et al., 2010); e inibiu, de forma dose-dependente, a produção de óxido nítrico (NO) induzida por LPS em cultura de macrófagos, sugerindo ter como mecanismo a inibição da óxido nítrico sintase induzível (LI et al., 2006). Além disso, compostos antioxidantes fenólicos, como o eugenol, demonstraram capacidade de inibir o fator transcricional NF kappa B (NF $\kappa$ B), responsável pela transcrição de citocinas inflamatórias (RAHMAN, ADCOCK, 2006).

Este estudo mostra os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do eugenol na inflamação pulmonar aguda induzida pela exposição à fumaça de cigarro, bem como, identifica as principais vias por meio das quais ele exerce os seus efeitos biológicos. A demonstração do potencial farmacológico do eugenol e a compreensão das suas ações sobre os mecanismos moleculares e sobre as vias de sinalização envolvidas nos processos inflamatórios nos pulmões implicam novas possibilidades no tratamento de doenças do sistema respiratório associadas ao tabagismo.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A fumaça de cigarro contém nas suas fases gasosa e particulada, oxidantes como superóxido e óxido nítrico e toxinas como monóxido de carbono (CO) e nicotina. Os componentes da fase particulada recrutam células inflamatórias da microcirculação e ativam diretamente células fagocitárias, particularmente macrófagos alveolares, que são ativados para produzir mediadores pró-inflamatórios, espécies reativas de oxigênio (ERO) e enzimas proteolíticas, levando à inflamação e à lesão pulmonar aguda (LPA) (JOHNSON, MATTHAY, 2010).

Nesta perspectiva, fumar cigarro é considerado uma das maiores causas de mortes isoladas na espécie humana, isso porque, o tabagismo está relacionado com 90% das mortes por câncer de pulmão, 25% das mortes por doenças coronarianas e infarto agudo do miocárdio e 85% das mortes por doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) com ênfase no enfisema pulmonar (ALMEIDA et al., 2001).

Embora seja do conhecimento de muitos os danos provocados pelo hábito de fumar cigarro (SANTOS e FILHO, 2005), os números do tabagismo no mundo são alarmantes, abrangendo cerca de 1,3 bilhões de pessoas fumantes. Calcula-se que o fumo seja responsável por mais de cinco milhões de mortes a cada ano. Estima-se que se as tendências atuais de consumo dos produtos de tabaco persistirem, esse número pode superar oito milhões de mortes anuais até 2030 (INCA, 2011). Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil a estimativa da prevalência do tabagismo está em torno de 32%. Considerando que 15% dos fumantes desenvolvem DPOC clinicamente significativa, constata-se que aproximadamente 7,5 milhões de pessoas tem DPOC, o que representa 5% da população (BARRETO, 2006).

Está documentado que mesmo em curto prazo, a inalação da fumaça do cigarro induz inflamação pulmonar significativa, devido a um desequilíbrio nos mecanismos oxidantes/antioxidantes com aumento de neutrófilos e macrófagos (MOURA et al., 2012). Além disso, a fumaça do cigarro prejudica os mecanismos de defesa da resposta imune inata mediados por macrófagos, células dendríticas e células natural killer, comprometendo a capacidade de fagocitose dos macrófagos alveolares e aumentando assim o risco e a gravidade das infecções (STÄMPFLI, ANDERSON, 2009).

Os macrófagos alveolares desempenham um papel fundamental na lesão pulmonar aguda e crônica. Essas células são dotadas de plasticidade funcional e fenotípica, podendo se polarizar em macrófagos M1, que expressam mediadores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 8 (IL-8), ou, macrófagos M2, os quais

liberam citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (YAMASAKI, EEDEN, 2018; RETAMALES et al, 2001).

Atualmente existem vários tratamentos para reduzir a inflamação e melhorar o fluxo de ar nas vias aéreas; porém, nenhum deles é eficaz em promover o remodelamento pulmonar. No arsenal da terapia farmacológica estão inclusos anticolinérgicos,  $\beta$ 2-agonistas, inibidores de fosfodiesterase 4, glicocorticoides ou a combinação entre vários fármacos. Ainda assim, a variedade de fármacos que podem ser utilizadas para o tratamento das exacerbações é considerada escassa. Atualmente, o único avanço na terapia farmacológica tem sido a utilização de broncodilatadores de ação prolongada, os quais não são efetivos no tratamento da inflamação. Essas intervenções farmacológicas objetivam apenas induzir broncodilatação e reduzir a sensação de falta de ar (BARNES et al., 2013; VESTBO et al., 2013). Por isso, há a necessidade de se descobrir novos fármacos que possam ser eficazes na terapêutica de doenças respiratórias decorrentes do hábito de fumar como a inflamação pulmonar aguda e até o enfisema pulmonar que é uma manifestação mais grave e tardia do hábito de fumar.

Há milhares de anos as plantas já eram utilizadas pelas populações como forma terapêutica, mesmo sem qualquer conhecimento científico sobre as espécies. Por isso, a grande maioria das plantas consideradas medicinais, passou a ser foco de grandes estudos, na busca de conhecimentos sobre sua ação terapêutica e/ou toxicológica. Relatos mostram que aproximadamente 80% da população utiliza algum tipo de erva buscando fins terapêuticos para manifestações patológicas, apesar de muitas delas ainda não apresentarem comprovações científicas de sua real eficácia biológica (VAVASSOUR et al., 1999).

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo, tendo catalogadas mais de 55.000 espécies (GIULIETTI et al., 2005). No entanto, apenas 8% dessas espécies tiveram seu potencial farmacológico investigado (GUERRA, NODARI, 2000). Ainda assim, as agências financiadoras dos estudos com plantas medicinais no Brasil, não dão a devida importância a esse tema (PINTO et al., 2002). A pesquisa com plantas medicinais obteve um crescimento significativo na década de 1950, quando o pesquisador Francisco José de Abreu Matos, dedicou parte de sua carreira ao estudo multidisciplinar da flora medicinal (DIÓGENES, BASTOS, 2009). Esses estudos já renderam vários trabalhos de iniciação científica, mestrado e doutorado, além de trabalhos publicados em revistas e jornais nacionais e internacionais (LEAL et al., 2006). Esses resultados se dão, porque as plantas são uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais constituem um modelo para o desenvolvimento de novos fármacos (GUERRA, NODARI, 2000). Dentro dessa área no

Brasil, a área da Química de Produtos Naturais (QPN) é a área que atrai o maior número de pesquisadores (MARTINS et al., 1998). O eugenol (4-Alil-2-Metoxifenol), por exemplo, é um fenilpropanoide encontrado no óleo essencial de diversas espécies, tais como noz-moscada, canela e folha de louro (BHUIYAN et al., 2010). Sua capacidade de modular respostas biológicas vem sendo mostrada em diversas situações. O eugenol (160 mg/kg) apresentou atividade anti-inflamatória na inflamação pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos. Além disso, foi observado que esse constituinte é capaz de reduzir o depósito de colágeno e o influxo de células inflamatórias como neutrófilos (MAGALHÃES et al., 2010). Também se mostrou eficaz em inibir dose-dependente a produção de óxido nítrico (NO) induzida por LPS em cultura de macrófagos, sugerindo ter como mecanismo a inibição da óxido nítrico sintase induzível (LI et al., 2006). Esse constituinte também se mostrou como inibidor da liberação de interleucinas como IL-1- $\beta$ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), em macrófagos estimulados com LPS (LEE et al, 2007). Além disso, compostos antioxidantes fenólicos, como o eugenol, inibem o fator transcricional NF kappa B (NF $\kappa$ B), responsável pela transcrição de citocinas inflamatórias (RAHMAN; ADCOCK, 2006).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do eugenol na lesão pulmonar aguda induzida pela fumaça do cigarro em camundongos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Investigar a eficácia do eugenol em promover remodelamento pulmonar em pulmões de camundongos expostos à fumaça do cigarro;
2. Avaliar o papel do eugenol na modulação da atividade dos macrófagos alveolares;
3. Caracterizar a atividade do eugenol como modulador do desequilíbrio redox em pulmões de camundongos expostos a fumaça do cigarro.

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DOS MACRÓFAGOS ALVEOLARES PELO  
EUGENOL REDUZ A LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA PELA FUMAÇA  
DO CIGARRO EM CAMUNDONGOS**

Maria Clara Barbosa de Oliveira<sup>a</sup>, Samuel dos Santos Valença<sup>c</sup>, Manuella Lanzetti<sup>c</sup>, Flávio Santos da Silva<sup>a</sup>, Felipe Andrade Carvalho da Silva<sup>a</sup>, Paolo Oliveira-Melo<sup>b</sup>, Marcos Henrique Gonçalves da Silva<sup>a</sup>, Sidnei Miyoshi Sakamoto<sup>a</sup>, Emanuel Kennedy-Feitosa<sup>a</sup>

- a. Departamento de Ciências da Saúde – Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA;
- b. Laboratório de Cirurgia Torácica - Instituto do Coração (INCOR) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP);
- c. Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

**\* Corresponding author**

Emanuel Kennedy Feitosa Lima, Ph.D.

Adjunct Professor

Science Health Department - Federal Rural University of the Semi-Arid (UFRSA)

R. Francisco Mota, 572 - Pres. Costa e Silva, Mossoró - RN, 59625-900

Tel: +55 3317 8263 / 1196

e-mail: kennedyfeitosa.e@gmail.com/emanuel.lima@ufersa.edu.br

## RESUMO

A fumaça do cigarro (FC) provoca inflamação pulmonar e recrutamento de macrófagos M1 e M2, que liberam, respectivamente, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Objetivou-se avaliar os efeitos do eugenol (EUG) – composto bioativo com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes – na lesão pulmonar aguda (LPA) induzida pela FC. *In vivo*, camundongos C57BL/6 foram expostos a 12 cigarros/dia/5dias (LPA e LPA+EUG) e tratados 15 min/dia/5dias com eugenol 100 mg/mL (LPA+EUG e EUG) ou salina (Controle e LPA). Avaliou-se escore de inflamação; índice de broncoconstrição (IBC); leucócitos; macrófagos e neutrófilos/campo; MDA; CAT e MPO. *In vitro*, macrófagos alveolares de rato foram expostos ao extrato de fumaça de cigarro (EFC 1, 2,5, 5 ou 10%) para o teste de citotoxicidade. EFC 5% foi tratado com EUG (10, 30 ou 100 µg/mL) para análise inflamatória e redox. *In vivo*, LPA+EUG, comparado a LPA, apresentou menor inflamação e redução de 51,8% do IBC ( $p<0,0001$ ), recuperou a altura do epitélio em 29,5% ( $p<0,001$ ), e reduziu leucócitos, neutrófilos e macrófagos em 46%, 56,1% e 59,2% respectivamente ( $p<0,05$ ). O tratamento com EUG não reduziu a atividade da CAT e MPO, mas reduziu MDA em 45,1% ( $p<0,001$ ). *In vitro*, EUG 100 µg/mL reduziu MDA em 38% e KC em 65% ( $p<0,05$ ), recuperou a atividade da CAT em 77,6% ( $p<0,05$ ), e aumentou IL-10 e a relação IL-10/KC em 77,8% e 2,1x respectivamente ( $p<0,05$ ). EUG 30 µg/mL reduziu em 34% a atividade da SOD ( $p<0,05$ ). Esses resultados sugerem que o eugenol reduziu a LPA induzida pela FC, e atuou na modulação da atividade dos macrófagos.

**Palavras-chave:** fumaça de cigarro; macrófagos alveolares; inflamação pulmonar; estresse oxidativo; eugenol.

## 4 INTRODUÇÃO

A síndrome da angústia respiratório aguda (SARA) é uma condição clínica comum seguida de lesão pulmonar aguda (LPA). A LPA é caracterizada por edema pulmonar não-cardiogênico, inflamação pulmonar e sistêmica sendo causa de comum e frequentemente fatal de insuficiência respiratória aguda em pacientes críticos (RUBENFELD, 2005; WARE e MA, 2000; GOSS, 2003).

Análises retrospectivas sugeriram que o tabagismo pode estar associado à LPA (IRIBARREN, 2000). Estudos experimentais já mostram que o tabagismo ativo causa alterações fisiopatológicas características da LPA, incluindo aumento da permeabilidade do epitelial pulmonar, lesão endotelial e alteração da função plaquetária (FERNANDEZ, 2002).

A fumaça do cigarro contém cerca de  $10^{17}$  oxidantes/radicais livres e aproximadamente 5.000 compostos químicos por tragada (RAJENDRASOZHAN et al, 2008). Nos pulmões, é capaz de ativar mecanismos que resultam em lesão oxidante endógena (SCHULIGA, 2015) pela liberação de espécies reativas de oxigênio pelas células inflamatórias, contribuindo para o estabelecimento de um desequilíbrio redox e resposta inflamatória.

O material particulado inalado a partir da fumaça do cigarro se deposita no trato respiratório seja nas vias aéreas superiores, em caso de partículas maiores ou no caso das partículas menores se depositam nos alvéolos, resultando em estresse oxidativo e inflamação com recrutamento e ativação de células inflamatórias para as vias aéreas como células epiteliais, neutrófilos, linfócitos e macrófagos alveolares. Durante esse insulto sobretudo neutrófilos e macrófagos são recrutadas e ativadas (SCHULIGA, 2015; YAMASAKI e EEDEN, 2018).

Macrófagos estão presentes em quase todos os tecidos do corpo (MURRAY, 2011). Nos pulmões, os macrófagos alveolares desempenham um papel fundamental na lesão pulmonar aguda e crônica. Essas células são dotadas de plasticidade funcional e fenotípica, podendo se polarizar em macrófagos M1, que expressam mediadores pró-inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 8 (IL-8), ou, macrófagos M2, os quais liberam citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (YAMASAKI e EEDEN, 2018; RETAMALES et al, 2001). Além disso, essas células são capazes de gerar Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), liberadas durante a inflamação, levando ao estresse oxidativo (DIÓGENES-BASTOS, et al., 2011).

Já é bem descrito que fumar cigarro induz um aumento de células imunes dentro do pulmão avaliada pelo lavado broncoalveolar (LBA) com a maioria do aumento atribuído à macrófagos (KARIMI, 2012). Em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) os macrófagos estão aumentados em até 10 vezes nas vias aéreas e no parênquima pulmonar (BARROSO, et al., 2017). Embora a exposição aguda à fumaça do cigarro não cause DPOC, há semelhança com os marcadores inflamatórios e redox presentes no insulto pulmonar agudo (BARBOZA et al., 2018). Nesse sentido, diferentes estudos mostram um aumento do infiltrado leucocitário, acompanhado de um incremento nos marcadores oxidativos em animais expostos à fumaça aguda do cigarro (KENNEDY-FEITOSA, et al., 2016; HSIAO et al., 2013).

O tratamento da lesão pulmonar aguda se baseia em estratégias ventilatórias e não ventilatórias, mas os avanços mais significativos no tratamento da LPA estão associados às estratégias ventilatórias (JOHNSON, MATTHAY, 2010). Nesse sentido, ensaios clínicos mostraram que vários fármacos, incluindo os glicocorticoides, não foram eficazes na prevenção e redução de mortalidade na SARA (MATTHAY et al., 2019).

Compostos bioativos de várias espécies de origem vegetal têm demonstrado propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias contra inflamação pulmonar aguda que podem contribuir para a prevenção de doenças inflamatórias (MAGALHÃES et al., 2010). Nesse contexto, o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) é um fenilpropanoide encontrado no cravo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum verum*), café, dentre outros alimentos (KIRKHAM et al., 2013). Foram relatados os efeitos anti-inflamatórios do eugenol na lesão pulmonar induzida por LPS em ratos (DRAPER; HADLEY, 1990). e propriedades antioxidantes in vitro (CHAINY, et al., 2000; RAHMAN, 2006; LI W et al., 2016). No entanto, não há investigações que demonstrem os efeitos do eugenol (EUG) na inflamação induzida pela fumaça do cigarro e no estresse oxidativo. Este relato descreve os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do eugenol na lesão pulmonar aguda causada pela inalação da fumaça do cigarro, modulando a atividade dos macrófagos alveolares. A demonstração do potencial farmacológico do eugenol e a compreensão das suas ações sobre os mecanismos moleculares e sobre as vias de sinalização envolvidas nos processos inflamatórios nos pulmões suscitam discussões sobre novas possibilidades no tratamento de doenças do sistema respiratório associadas ao tabagismo.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Reagentes**

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e mantidos em condições adequadas.

### **5.2 Animais**

Para o estudo *in vitro* 6 ratos Wistar (200-250 g) foram utilizados. Para o estudo *in vivo* foram utilizados 35 camundongos machos C57BL/6 (18-22 g). Todos os animais foram alimentados com ração, com livre acesso à água, e mantidos em ambiente controlado (18 - 22 °C, 50 a 70% de umidade relativa e ciclo claro/escuro de 12/12 h). Todos os métodos e protocolos envolvendo o uso animal utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA/UFERSA) (23091.007638/2018-95).

### **5.3 Desenho experimental**

#### **5.3.1 Exposição à fumaça de cigarro e tratamento *in vivo***

Camundongos C57BL/6 foram divididos em quatro grupos (n=8 a 9 cada): Controle, Lesão Pulmonar Aguda (LPA), Lesão Pulmonar Aguda + Eugenol (LPA+EUG) e Eugenol (EUG). Os grupos LPA e LPA+EUG foram expostos a 12 cigarros comerciais (10 mg de alcatrão, 0,9 mg de nicotina e 10 mg de monóxido) por dia durante 5 dias, por meio de uma câmara de inalação conforme descrito anteriormente (BYRNE et al., 2015; KENNEDY-FEITOSA, 2016). Os grupos Controle e EUG foram expostos apenas ao ar ambiente. Ao final de cada dia, os grupos foram tratados por via inalatória com o veículo (grupos Controle e LPA) ou com o EUG 100 mg/mL (grupos LPA + EUG e EUG). e tratados com veículo (controle) ou com EUG (EUG) por via inalatória. O tratamento foi realizado, durante 15 minutos por dia, em uma caixa (21 cm de largura, 20 cm de comprimento e 30 cm de altura) acoplada a um nebulizador (Ultrasonic Nebulizer RespiraMax® NS x®) (MOURA, et al. 2012).

### **5.4 Protocolos experimentais *in vivo***

#### **5.4.1 Processamento tecidual e análises histológicas**

Vinte e quatro horas após a conclusão do quinto dia do procedimento experimental, os animais foram anestesiados via inalatória com sevoflurano e eutanasiados por deslocamento cervical. O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado através da lavagem dos espaços aéreos

pulmonares com solução salina (3 x 0,5 mL) tamponada para contagem de leucócitos totais usando uma câmara de Neubauer (TORNLING, et al., 1987).

Os ventrículos direitos de todos os camundongos foram perfundidos com solução salina para remoção do sangue dos pulmões. Os pulmões esquerdos foram coletados e transferidos para uma solução fixadora de formalina tamponada (10%; pH 7,2), antes da inclusão em parafina para processamento histológico e preparação das lâminas com cortes pulmonares de 5 µm foram corados com hematoxilina e eosina (H&E).

#### 5.4.1.1 Análises morfológicas

A análise histopatológica foi avaliada através do score de inflamação já descrito anteriormente por BAO et al., (2015). De cada corte pulmonar foram feitas 10 imagens de campos aleatórios e não coincidentes do parênquima pulmonar que foram analisados às cegas por três investigadores diferentes. As imagens do parênquima pulmonar foram pontuadas, de acordo com os seguintes critérios do escore de inflamação pulmonar: 0, tecido normal; 1, alteração inflamatória mínima; 2, nenhum dano óbvio à arquitetura do pulmão; 3, espessamento dos septos alveolares; 4, formação de nódulos ou áreas de pneumonite que distorcem a arquitetura normal; e 5, obliteração total do campo (BAO et. al, 2015).

O perímetro da via aérea foi avaliado pela determinação do índice de broncoconstrição (IBC). Para tanto, foram capturadas imagens de 7-10 brônquios diferentes em cada lâmina coradas com H&E em ampliação de 400x. O IBC foi quantificado usando o número de interceptos que cruzam a membrana basal (NI) e o número de pontos que atingem o lúmen das vias aéreas (L) pelo retículo M42. O IBC foi calculado pela seguinte equação:  $IBC = NI/\sqrt{L}$  (SAKAE et al., 1994). Foram aceitos apenas os brônquios cuja relação entre o maior e o menor diâmetro da elipse que descrevia seu lúmen não excedesse 1,25.

A mensuração da altura do epitélio brônquico (µm) foi feita a partir da membrana basal até a extremidade da célula, em pelo menos 4 pontos diferentes do mesmo brônquio, utilizando-se o software ImageJ.

Os números de macrófagos e neutrófilos alveolares foram estimados contando dez campos aleatórios e não coincidentes de seções pulmonares usando uma lente objetiva de 100x. Dois investigadores realizaram morfometria contando seções codificadas.

### 5.5 Procedimentos experimentais *in vitro*

#### 5.5.1. Preparação do extrato da fumaça de cigarro

A fumaça de 2 cigarros comerciais foi borbulhada em 10 mL de DMEM com 1% de FBS. A solução resultante, definida como 100% EFC, foi diluída em DMEM para obtenção das concentrações de EFC 1; 2,5; 5 e 10% (KODE, et al., 2006).

#### 5.5.2 Exposição ao extrato da fumaça de cigarro (EFC) e tratamento *in vitro*

Para esta etapa, macrófagos alveolares de ratos (MAR) foram obtidos de ratos Wistar. O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado por lavagem dos pulmões (10x, com 5 mL de solução salina). O LBA foi centrifugado (600 rpm, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante descartado. O sedimento celular foi ressuspensionado em meio de cultura padrão (DMEM com 1% de SBF), plaqueado ( $1 \times 10^6$  células/poço) em um volume final de 1 mL de meio em triplicata e mantido em condições controladas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) por 1h para aderência dos macrófagos ao fundo do poço. Após esse intervalo, o meio foi coletado, o poço foi lavado com PBS e em seguida os MAR foram expostos a concentrações variadas de extrato de fumaça de cigarro (EFC) (1; 2,5; 5 ou 10%) e assim permaneceram por mais 1 hora nas condições controladas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 1h o sobrenadante foi coletado para o teste de toxicidade.

Após a escolha da concentração mais viável com base no teste de toxicidade, esse mesmo procedimento de coleta foi realizado e os MAR foram plaqueados novamente nas mesmas condições e etapas descritas anteriormente. O meio de cultura padrão foi substituído por meio contendo EFC 5% na presença ou ausência de EUG (10, 30 ou 100 µg/ ml). Para condição controle os MAR foram expostos apenas ao DMEM. Este experimento foi realizado três vezes. Ao final do tratamento, o sobrenadante foi coletado para análises bioquímicas e imunológicas.

### 5.6 Análises

#### 5.6.1 Análises bioquímicas

O homogeneizado pulmonar (*in vivo*) e o sobrenadante das placas (*in vitro*) foram usados para os ensaios bioquímicos. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada de acordo com a inibição da auto-oxidação da adrenalina, no comprimento de onda de 480 nm (BANNISTER et al., 1987). A atividade da catalase (CAT) foi realizada monitorando a taxa de diminuição das concentrações de peróxido de hidrogênio, no comprimento de onda de 240 nm (AEBI et al., 1984). A concentração de malondialdeído (MDA) foi medida pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS/EMD Millipore, Billerica, EUA) a 532 nm (DRAPPER et al., 1993).

### 5.6.2 Marcadores inflamatórios

Os níveis de interleucina-10 (IL-10) e KC foram quantificados usando um ensaio imunoenzimático específico (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (PreproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA) e o protocolo padrão. A atividade da mieloperoxidase (MPO) no LBA foi medida usando peróxido de hidrogênio, brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; Cat. No. H5882, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e tetra-metilbenzidina (TMB; Cat. No. 860336, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) com comprimento de onda de 630 nm (SUZUKI et al., 1983).

### 5.7 Análises estatísticas

Os dados são expressos como média  $\pm$  S.E.M. O software GraphPad Prism 5 foi usado para análise estatística (San Diego, CA, EUA). Os resultados considerados estatisticamente significativos tiveram probabilidade de hipótese nula inferior a 5% ( $p < 0,05$ ). Foram utilizados os testes t de Student e a análise de variância (one-way ANOVA), seguidos pelo método de comparações múltiplas de Holm-Sidak ou Student-Newman-Keuls, quando apropriado.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Morfologia

Na análise histológica, os grupos controle e EUG apresentaram parênquima pulmonar preservado com septos alveolares finos e rara presença de leucócitos. O grupo LPA apresentou infiltrado de leucócitos (pontas da seta) nos alvéolos e no parênquima. O LPA+100 mg mostrou parênquima pulmonar semelhante ao do grupo controle, também com poucos leucócitos presentes (pontas de seta). Além disso, o escore de inflamação pulmonar no grupo LPA ( $2,86 \pm 0,08$ ) foi maior em relação ao grupo controle ( $1,39 \pm 0,18$ ) ( $p < 0,0001$ ). O LPA+EUG ( $2,07 \pm 0,07$ ) mostrou escore de lesão pulmonar inferior à lesão do grupo LPA ( $p < 0,0001$ ) (Figura 1). Ao avaliar o índice de broncoconstrição (IBC), observamos que o IBC foi maior no grupo LPA ( $4,188 \pm 0,4135$ ) em relação ao controle ( $2,550 \pm 0,2054$ ). Em contrapartida, os grupos LPA+EUG ( $2,019 \pm 0,1277$ ) e EUG ( $2,182 \pm 0,2380$ ) apresentaram menor IBC em relação ao LPA (Figura 2). O grupo LPA ( $76,30 \pm 4,155$ ) apresentou menor altura do epitélio ( $\mu\text{m}$ ) em relação ao grupo controle ( $111,8 \pm 4,948$ ), e o grupo LPA+EUG ( $98,80 \pm 3,99$ ) aumentou a altura do epitélio em relação ao LPA (Figura 3).

## 6.2 Marcadores inflamatórios *in vivo*

A exposição à fumaça de cigarro aumentou o infiltrado leucocitário no LBA em 2 vezes comparado ao grupo controle (leucócitos totais: LPA -  $0,66 \pm 0,14$  vs.  $0,17 \pm 0,03 \cdot 10^6$  células/mL; neutrófilos:  $2,25 \pm 0,70$  vs. LPA:  $9,62 \pm 0,96 \cdot 10^6$  células/mL; macrófagos:  $7,0 \pm 0,65$  vs. LPA:  $16,63 \pm 1,28 \cdot 10^6$  células/mL. A EUG reduziu a migração de leucócitos totais ( $0,31 \pm 0,04$  vs. LPA:  $0,66 \pm 0,14$  células/campo), neutrófilos ( $4,22 \pm 0,93$  vs. LPA:  $9,62 \pm 0,96$  células/campo) e macrófagos ( $6,77 \pm 0,59$  vs. LPA:  $16,63 \pm 1,28 \cdot 10^6$  células/campo) em 47%, 44% e 41%, respectivamente (Figuras 4A, 4B e 4C).

## 6.3 Marcadores redox *in vivo*

Os níveis de MDA aumentaram no grupo LPA ( $943,6 \pm 18,2$ ) quando comparados ao controle ( $799,7 \pm 37,32$ ;  $p < 0,05$ ) e foram menores no grupo tratado com EUG ( $518,0 \pm 67,84$ ) quando comparado ao grupo controle ( $799,7 \pm 37,32$ ) ( $p < 0,001$ ) (Figura 5A). A atividade da CAT aumentou no grupo LPA ( $34,86 \pm 3,21$ ) em relação ao controle ( $18,94 \pm 2,39$ ) ( $p < 0,01$ ), mas não houve diferença estatística entre o grupo LPA e LPA+EUG ( $28,22 \pm 4,03$ ) (Figura 5B). Quando avaliados os níveis de MPO, o tratamento não foi capaz de reduzir o aumento desse marcador de infiltração de neutrófilos no grupo LPA+EUG ( $2,24 \pm 0,29$ ) em relação ao LPA ( $2,17 \pm 0,26$ ) (Figura 4D).

## 6.4 Viabilidade celular

As células expostas a EFC 1, 2 e 10% apresentaram menor viabilidade celular ao teste de toxicidade, em comparação com o meio de cultura padrão. No entanto, no meio EFC 5%, o teste MTT apresentou resultados semelhantes ao DMEM, sendo escolhido para realizar os demais experimentos *in vitro* (Figura 6).

## 6.5 Marcadores inflamatórios *in vitro*

Os níveis de KC aumentaram 82% na condição EFC ( $461,4 \pm 23,5$ ;  $p < 0,01$ ) quando comparado ao controle ( $252,4 \pm 56,8$ ). EUG ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) reduziu os níveis de KC em 34% ( $304,6 \pm 1,70$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 7A). Por outro lado, os níveis de IL-10 foram reduzidos em 50% na condição EFC (CSE:  $146,8 \pm 22,4$  vs. Controle:  $290,0 \pm 35,0$ ;  $p < 0,05$ ). tratamento com EUG ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) recuperou os níveis de IL-10 em 127% ( $333,8 \pm 32,2$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 7B). Por fim, quando avaliada a relação IL-10/KC, a condição EFC apresentou uma relação menor em relação ao controle (EFC:  $0,59 \pm 0,09$  vs. Controle:  $1,75 \pm 0,40$ ;  $p < 0,05$ ),

aumentando com o tratamento (EFC+30:  $1.161 \pm 0,14$ ; ( $p < 0,05$ ) e EFC+100:  $1.274 \pm 0,03$ ; ( $p < 0,01$ ) (Figura 7C).

## 6.6 Marcadores redox *in vitro*

Os níveis de MDA na condição EFC aumentaram 5 vezes ( $32,9 \pm 5,51$ ;  $p < 0,01$ ) em relação ao controle ( $6,10 \pm 2,14$ ). Na presença de EUG, apenas as células tratadas com  $100 \mu\text{g/mL}$  apresentaram níveis reduzidos de MDA ( $12,7 \pm 1,37$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 8A). A atividade da SOD foi maior na condição EFC do que na condição controle ( $6,04 \pm 1,10$  vs.  $1,67 \pm 0,65$ ;  $p < 0,05$ ), sendo reduzida significativamente com o tratamento de EUG  $30 \mu\text{g/mL}$  ( $2,28 \pm 0,40$ ,  $p < 0,5$ ) (Figura 8B). Além disso, a atividade da CAT diminuiu no EFC ( $16,8 \pm 0,46$ ) em relação ao controle ( $67,5 \pm 11,3$ ) ( $p < 0,0001$ ) e aumentou na condição EFC+EUG  $100 \mu\text{g}$  ( $29,9 \pm 2,48$ ) em relação ao EFC ( $p < 0,01$ ) (Figura 8C).

## 7 DISCUSSÃO

Esse estudo mostrou que a inalação aguda da fumaça de cigarro induziu alterações inflamatórias nos pulmões de camundongos, como espessamento dos septos alveolares e áreas de infiltrado inflamatório e hemorragia alveolar. O tratamento com eugenol melhorou essas alterações histopatológicas inflamatórias e diminuiu significativamente a média do escore de inflamação pulmonar, o que representa uma redução na lesão pulmonar pelas propriedades anti-inflamatórias do eugenol. Esse achado corrobora outros estudos os quais mostram uma atividade anti-inflamatória do eugenol em alguns modelos de inflamação pulmonar induzida por LPS (MAGALHÃES et al., 2010) e em macrófagos humanos reduzindo a liberação de IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$  e ciclooxigenase (COX) (LEE et al., 2007)

Além disso, fumar um cigarro pode causar broncoconstrição aguda (N.C. Thomson, 2004; LEE, et al. 2018.) o que foi observado nesse estudo através do IBC. Nesse trabalho, o tratamento com eugenol reduziu o índice de broncoconstrição (IBC) sugerindo o potencial efeito broncodilatador desse constituinte. Embora essa análise do IBC não seja uma análise funcional para mostrar a atividade broncodilatadora, o IBC é considerado um parâmetro morfométrico de avaliação indireta da broncoconstrição (CORSICO et al., 2003). Ademais, esse achado pode ser fortalecido pela propriedade broncodilatadora do eugenol já descrita na literatura em modelos de doenças inflamatórias como asma no qual foi capaz de reverter nas vias aéreas contrações induzidas por carbacol (CCh) (MARCIELE et al., 2014).

Na lesão pulmonar aguda há a ruptura das barreiras endoteliais e epiteliais pulmonares (JOHNSON, MATTHAY, 2010). Nesse contexto, já foi demonstrado previamente que a fumaça de cigarro reduz a integridade da camada epitelial (HEIJNINK et al., 2012). O dano epitelial afeta a responsividade das vias aéreas, uma vez que a disfunção da camada epitelial pode resultar no aumento da concentração de vários agentes contráteis (BASTOS, 2019). Dessa forma, a redução da altura do epitélio no grupo LPA se correlaciona com o aumento do índice de broncoconstrição nesse mesmo grupo. No presente estudo, o tratamento com o eugenol aumentou a altura do epitélio dos brônquios, demonstrando assim uma redução do dano epitelial induzido pela fumaça de cigarro, o que pode explicar a redução do IBC pelo eugenol.

Um outro fato importante é que os leucócitos produzem e liberam oxidantes em resposta ao estímulo inflamatório, contribuindo para esse processo. Essas células inflamatórias, particularmente macrófagos e neutrófilos, são recrutadas e ativadas durante a inflamação pulmonar induzida pela inalação de fumaça de cigarro (SCHULIGA et al., 2015; YAMASAKI et al., 2018; CUNDALL et al., 2003). Nesse estudo, a exposição a fumaça do cigarro aumentou com o mesmo padrão, a migração de leucócitos no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar. O tratamento com eugenol modificou o perfil celular no LBA/parênquima pulmonar, reduzindo o número total de leucócitos, principalmente macrófagos e neutrófilos. Esses resultados sugerem uma correlação entre a melhora do perfil redox com a capacidade do eugenol de reduzir o influxo de leucócitos no LBA, uma vez que essas células produzem e liberam oxidantes em resposta ao estímulo inflamatório, contribuindo para o estresse oxidativo. Essa hipótese é corroborada por estudos que mostram uma correlação entre o número de macrófagos no LBA e o dano aos tecidos pulmonares (BUTLER et al., 2018).

Os neutrófilos desempenham um papel importante na inflamação e fibrose pulmonar ao liberar mediadores inflamatórios, como MPO (FORONJY, D'ARMIENTO 2006), cuja atividade é aumentada no grupo LPA. Embora o tratamento com eugenol tenha reduzido o influxo de neutrófilos, curiosamente não teve efeito sobre a atividade da MPO. Esse achado nos leva a acreditar que o efeito anti-inflamatório do eugenol nesse modelo pode não ser mediado pelos neutrófilos, mas pela modulação dos macrófagos, aumentando sua relação de liberação de citocinas anti-inflamatórias/inflamatórias.

Macrófagos são células que compõe a primeira linha de defesa contra partículas inaladas (LUGG, et al., 2021) e são recrutadas e ativadas durante o insulto pulmonar,

desempenhando um papel relevante no sistema imune inato e adaptativo (YAMASAKI et al., 2018).

De acordo com alguns estudos, macrófagos alveolares e metaloproteases derivadas de macrófagos degradam o tecido conjuntivo do pulmão em fumantes (CHURG, 2003). O tabagismo demonstrou ser capaz de afetar a função e o fenótipo dos macrófagos (SILVA et al., 2019). Os macrófagos consistem em dois estados de polarização. Os macrófagos M1 (ativados classicamente) expressam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-8 e IL-6. Em contraste, o fenótipo M2 (macrófagos ativados alternativamente) expressa CD206 e citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 e TGF- $\beta$  (YAMASAKI et al., 2018; DIÓGENES-BASTO, et al., 2011). As células M2 antagonizam os efeitos das células M1 e promovem reparo tecidual após a lesão inflamatória, atuando como reguladores do processo inflamatório (ABDELAZIZ, et al., 2020).

Na ativação de macrófagos, a produção de IL-10 depende do estado de polarização, sendo produzida em maior quantidade pelos macrófagos M2 (MURRAY, 2017). Além disso, a IL-10 é necessária para a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, uma vez que torna os macrófagos mais sensíveis a serem direcionados a esse estado de polarização (LOPES, et al., 2016). Nesse contexto, a IL-10 é um dos marcadores de células M2a – subtipo de macrófagos M2 – em humanos e camundongos (ABDELAZIZ, et al., 2020). Diversas vias de sinalização têm sido implicadas na polarização de macrófagos mediada pela fumaça do cigarro. Como a o perfil de liberação de citocinas é uma característica chave da polarização dos macrófagos, avaliamos os níveis de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em macrófagos do lavado broncoalveolar. Nesse estudo, a exposição de macrófagos ao extrato de fumaça do cigarro resultou em aumento dos níveis de KC e redução nos níveis de IL-10. O tratamento com EUG 100  $\mu$ g/mL reduziu os níveis da citocina pró-inflamatória KC, homóloga à IL-8 em humanos, e aumentou os níveis de IL-10, que tem efeitos anti-inflamatórios. Essa resposta pode ser a responsável por modular a resposta imune e prevenir danos (BUTLER et al., 2018; JASPER et al., 2019). O aumento dos níveis de IL-10 após o tratamento com eugenol contribui para reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que a IL-10 suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (CUNDALL et al., 2003). O aumento da razão IL-10/KC, marcadores do fenótipo M2 e M1, respectivamente, após o tratamento com eugenol, contribui para fortalecer a hipótese de que a atividade anti-inflamatória do eugenol pode ser via modulação de macrófagos.

O dano pulmonar está associado ao estresse oxidativo, tem sido implicado na remodelação da matriz extracelular e na peroxidação lipídica (CAVALCANTE, BRUIN,

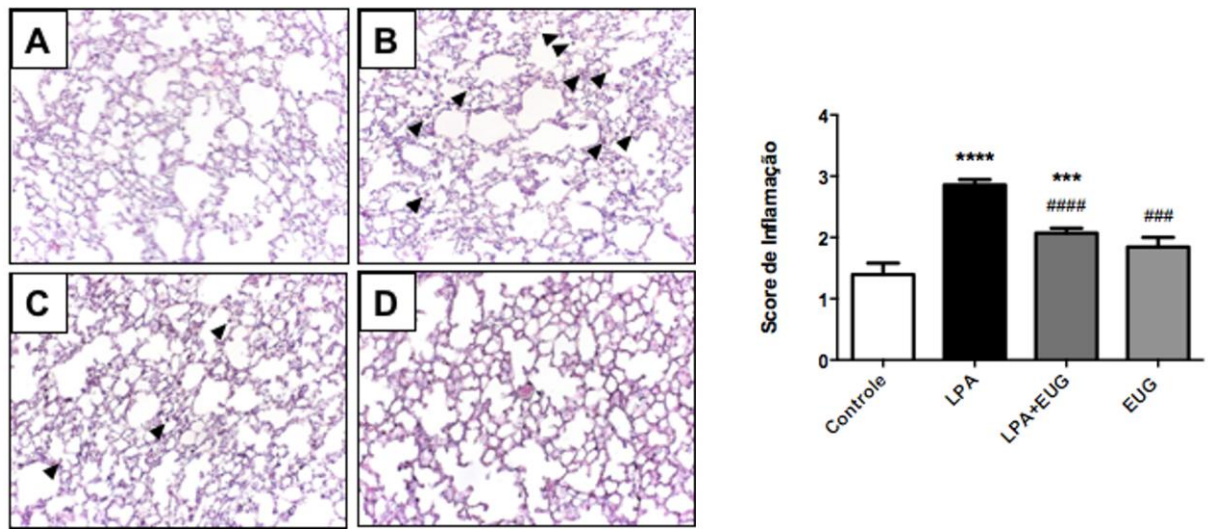
2009), contribuindo para as alterações inflamatórias induzidas pela fumaça de cigarro nos pulmões. A redução das concentrações de MDA (*in vivo* e *in vitro*), um produto citotóxico da peroxidação lipídica, pelo eugenol sugere que este composto tem um efeito protetor contra o estresse oxidativo e, portanto, reduz o dano oxidativo tecidual. Esse mecanismo pode também ajudar a explicar a melhora das estruturais pulmonares induzidas pela fumaça do cigarro.

O estresse oxidativo *in vitro* foi avaliado a partir da atividade enzimática antioxidante de SOD e CAT e os níveis de MDA, produto da peroxidação lipídica e, portanto, marcador de estresse oxidativo. A fumaça de cigarro libera oxidantes como o ânion superóxido, o qual é convertido, pela SOD, em peróxido de hidrogênio. Os maiores níveis de oxidantes quando essas células foram expostas ao EFC podem explicar o aumento da atividade da SOD nesta condição, uma vez que a SOD atua na primeira defesa contra oxidantes e é o principal fator de defesa contra radicais de oxigênio durante o estresse oxidativo (KUYUMCU, AYCAN 2018; FORONJY, D'ARMIENTO 2006). A atenuação do desequilíbrio redox pelo tratamento com EUG 30µg/mL também explica a redução da atividade da SOD necessária nesta resposta. A SOD, ao dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), aumenta a necessidade de CAT para catalisar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, acredita-se que a fumaça de cigarro aumente a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos macrófagos alveolares, em virtude do aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no condensado do ar exalado de fumantes (CAVALCANTE e BRUIN, 2009), o que reforça o aumento da necessidade da atividade da CAT após a exposição a fumaça de cigarro. A despeito disso, a condição EFC não conseguiu aumentar a atividade da CAT em relação ao controle. Em contrapartida, o eugenol melhorou o equilíbrio oxidante/antioxidante, recuperando a atividade da CAT. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apesar de não ser um radical livre, tem alto potencial reativo e possui vida longa, tendo papel importante na peroxidação lipídica (BARBOSA, et al., 2010). O aumento da atividade da CAT, enzima antioxidante que converte o peróxido de hidrogênio em radical hidroxila e água, bem como a possível redução da liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos macrófagos alveolares, podem explicar a redução nos níveis de MDA – produto da peroxidação lipídica – e do dano celular oxidativo após o tratamento com o eugenol. Esses achados sugerem que o eugenol possui uma atividade antioxidante via ativação do sistema antioxidante enzimático, atuando preferencialmente via CAT. Esses resultados são corroborados por estudos prévios que demonstraram os efeitos antioxidantes do eugenol em modelos *in vivo* e *in vitro* (NAGABADU et al., 2010; GÜLÇİN 2011).

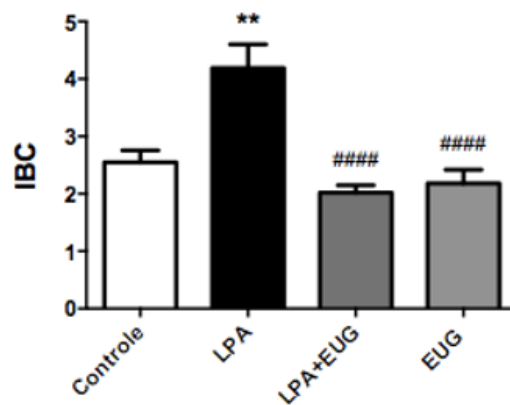
## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem que o eugenol é capaz de atuar na lesão pulmonar induzida pela fumaça do cigarro, reduzindo as alterações inflamatórias nos pulmões de camundongos. Além disso, o eugenol reduziu o dano oxidativo em modelos *in vivo* e *in vitro*, melhorando as defesas antioxidantes enzimáticas, e aumentou a relação entre citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, produzidas respectivamente por macrófagos M2 e M1. Estes resultados sugerem que o eugenol atua principalmente por meio da modulação da atividade dos macrófagos. Portanto, o eugenol é um composto com potencial aplicação farmacológica para o tratamento e prevenção da lesão pulmonar aguda.

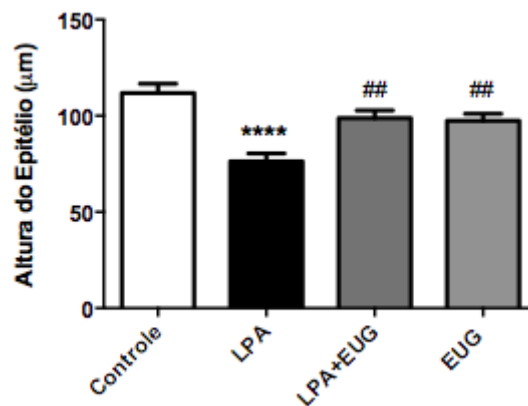
## FIGURAS



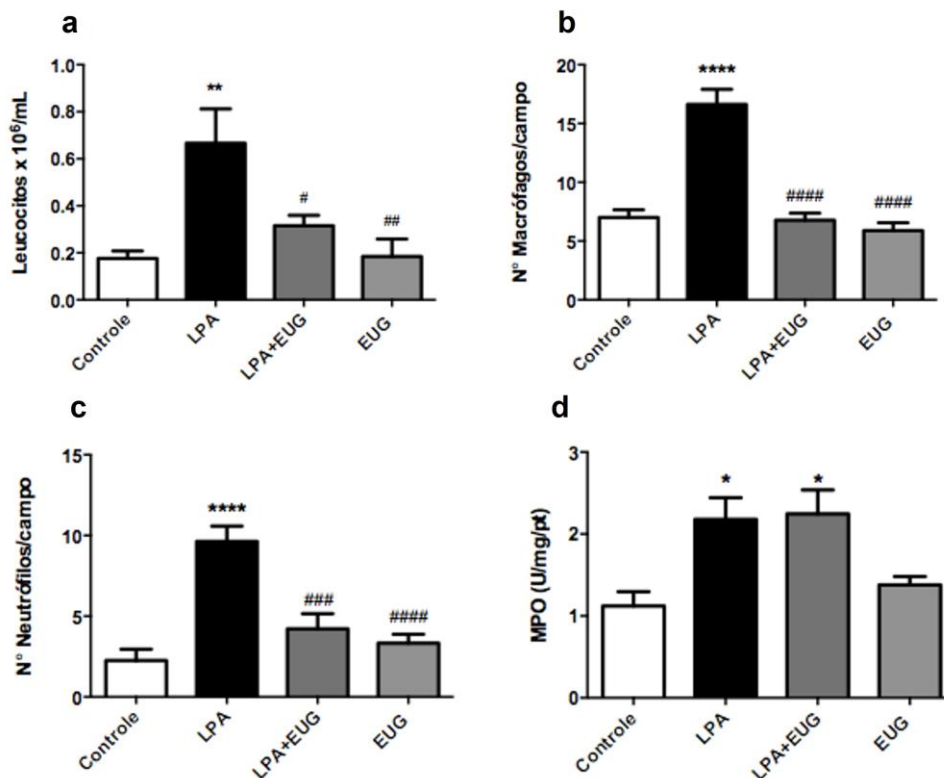
**Figura 1.1** Fotomicrografias de cortes pulmonares corados com hematoxilina e eosina. a) Grupo controle; b) Camundongos expostos a 12 cigarros por dia por 5 dias (LPA); c) Camundongos expostos a 12 cigarros por dia (5 d) e tratados com eugenol 100 mg/mL por 5 d (LPA+EUG); d) Grupo EUG (camundongos tratados apenas com eugenol 100 mg/mL). As pontas de seta, ►, representam os leucócitos nos alvéolos ou parênquima. **1.2** Escores de lesão pulmonar dos grupos (valores arbitrários). \*\*\* $p < 0.001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  quando comparado ao grupo controle. #### $p < 0.001$  e ##### $p < 0.0001$  quando comparado a LPA.



**Figura 2** Índice de broncoconstrição (IBC). \*\* $p < 0.01$  quando comparado ao grupo controle ##### $p < 0.0001$  quando comparado a LPA.

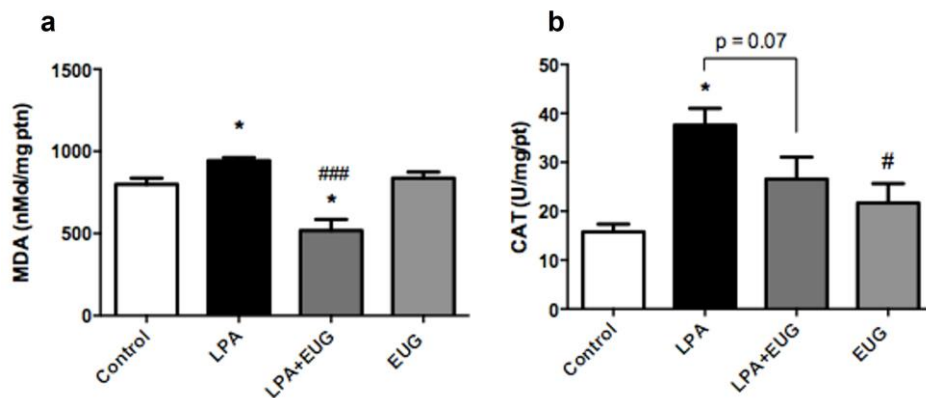


**Figura 3:** Altura do epitélio dos brônquios.  $p^{****} < 0.0001$  quando comparado ao grupo controle.  $^{###}p < 0.001$  quando comparado a LPA. Os valores para todas as medições são expressos como médias  $\pm$  EPM. Considerados estatisticamente significantes  $p < 0,05$ .

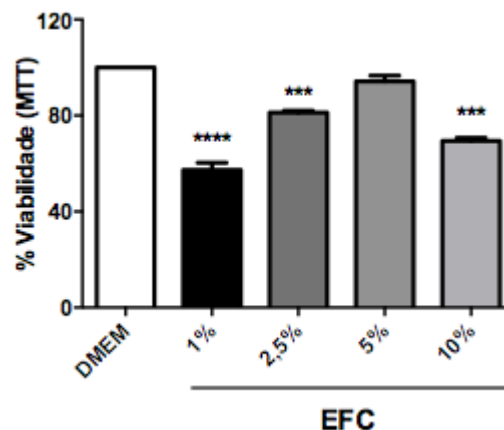


**Figura 4:** Efeitos do EUG nos marcadores inflamatórios *in vivo*. O número total de a) leucócitos, de b) macrófagos e c) neutrófilos por campo foi quantificado por morfometria. d) A atividade da mieloperoxidase (MPO) no LBA foi medida usando peróxido de hidrogênio, brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; Cat. No. H5882, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e tetra-metilbenzidina (TMB; Cat. No. 860336, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  quando comparado ao grupo controle. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  e #### $p < 0.0001$  quando comparado ao grupo CS. Os valores para todas as

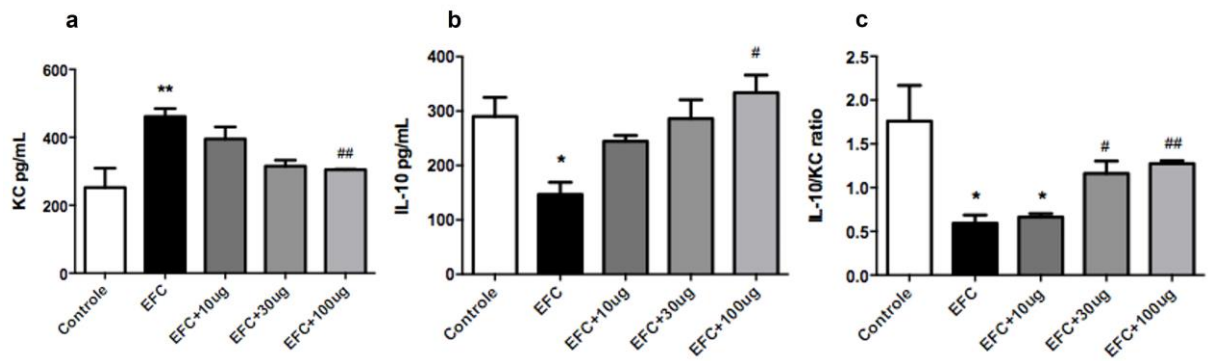
medições são expressos como médias  $\pm$  EPM. Considerados estatisticamente significantes  $p < 0,05$ .



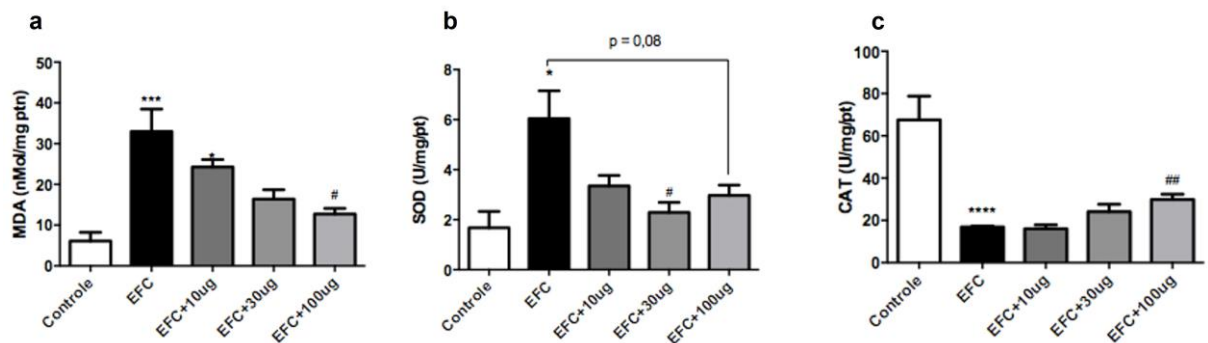
**Figura 5:** Efeitos do EUG nos marcadores redox *in vivo*. a) A concentração equivalente de malondialdeído (MDA) foi medida pelo ensaio TBARS. b) Atividade da catalase (CAT) foi medida pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$  e ### $p < 0,001$  quando comparado ao grupo LPA. Os valores para todas as medições são expressos como médias  $\pm$  EPM. Considerados estatisticamente significantes  $p < 0,05$ .



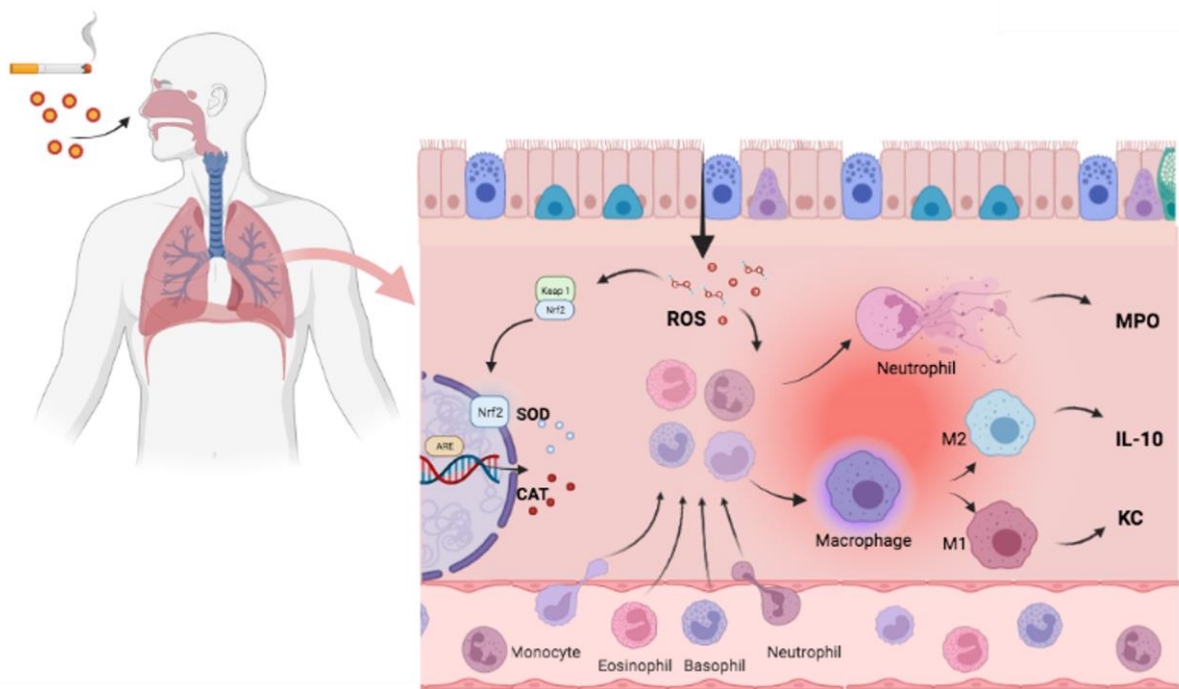
**Figura 6:** EFC 5% mostra viabilidade celular próxima ao meio de cultura padrão. EFC – Extrato de fumaça de cigarro. Os valores são expressos em porcentagem em relação ao DMEM. Os valores para todas as medições são expressos como médias  $\pm$  EPM. Considerados estatisticamente significantes  $p < 0,05$ .



**Figura 7:** Efeitos do EUG nos marcadores inflamatórios *in vitro*. a) KC; b) IL-10; c) razão IL-10/KC. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  em relação ao grupo EFC. Os valores para todas as medições são expressos como médias  $\pm$  EPM. Considerados estatisticamente significantes  $p < 0,05$ .



**Figura 8:** Efeitos do EUG nos marcadores redox *in vitro*. a) A concentração equivalente de malondialdeído (MDA) foi medida pelo ensaio TBARS. b) A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida pelo monitoramento da inibição da auto-oxidação da adrenalina. c) Atividade da catalase (CAT) medida pelo consumo de  $H_2O_2$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo EFC. Os valores para todas as medições são expressos como médias  $\pm$  EPM. Considerados estatisticamente significantes  $p < 0,05$ .



**Figura 9:** Fisiopatologia da lesão pulmonar aguda induzida pela fumaça de cigarro. A fumaça de cigarro leva ao recrutamento de células inflamatórias da microcirculação, principalmente macrófagos e neutrófilos. Os macrófagos M1 liberam citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, enquanto os macrófagos M2 liberam mediadores anti-inflamatórios, como IL-10. Além disso, quando ativadas, as células inflamatórias liberam espécies reativas, provocando um desequilíbrio redox.

## REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, Mohamed Hamed et al. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma. **Journal of translational medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2020.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BARBOZA, Joice Nascimento et al. An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.
- BARNES, Peter J. et al. Chronic obstructive pulmonary disease. **Nat Rev Dis Primers** 1, 15076, 2015.
- BARROSO, Marina Valente et al. Propolis reversed cigarette smoke-induced emphysema through macrophage alternative activation independent of Nrf2. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 20, p. 5557-5568, 2017.
- BASTOS, Vasco Pinheiro Diógenes. **Ação broncodilatadora do 1,8-cineol em modelo experimental de asma em cobaias**. 2009 163 f. Tese (doutorado) Faculdade de farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- BUTLER, Aidan; WALTON, Georgia May; SAPEY, Elizabeth. Neutrophilic Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 15, n. 4, p. 392-404, 2018.
- BYRNE, Adam J. et al. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. **Thorax**, v. 70, n. 12, p. 1189-1196, 2015.
- CAVALCANTE, Antonio George de Matos; BRUIN, Pedro Felipe Carvalhede de. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.
- CHAINY, Gagan BN et al. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- $\kappa$ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, v. 19, n. 25, p. 2943-2950, 2000.
- CUNDALL, Meghan et al. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 112, n. 6, p. 1064-1071, 2003.
- CORSICO Angelo et al. Airway Hyperresponsiveness: From Molecules to Bedside Selected Contribution: Small airway morphology and lung function in the transition from normality to chronic airway obstruction. **J Appl Physiol** 95: 441–447, 2003.
- DE PASCALE, Clara et al. Suppression of nuclear factor- $\kappa$ B activity in macrophages by chylomicron remnants: modulation by the fatty acid composition of the particles. **The FEBS journal**, v. 276, n. 19, p. 5689-5702, 2009.

DIÓGENES-BASTOS, V. P. et al. Inhaled 1,8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of ovalbumin-challenge guinea pigs. **Basic & Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 108: 34-9, 2011.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1990. p. 421-431.

FERNÁNDEZ, José A. et al. Protein C pathway impairment in nonsymptomatic cigarette smokers. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 29, n. 1, p. 73-82, 2002.

FORONJY, Robert; D'ARMIENTO, Jeanine. The effect of cigarette smoke-derived oxidants on the inflammatory response of the lung. **Clinical and applied immunology reviews**, v. 6, n. 1, p. 53-72, 2006.

GEORGE, Leema et al. Macrophage polarization in lung biology and diseases. In: **Lung inflammation**. InTech, 2014. p. 29-57.

GIULIETTI, A. M.; et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**. v.1, n.1. p. 52-61, 2005.

GOSS, Christopher H. et al. Incidence of acute lung injury in the United States. **Critical care medicine**, v. 31, n. 6, p. 1607-1611, 2003.

GÜLÇİN, İlhami. Antioxidant activity of eugenol: A structure-activity relationship study. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 9, p. 975-985, 2011.

HEIJINK, Irene H. et al. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 2, p. 419-428, 2012.

HOFFMANN, P. R.; et al. Therapeutic inhibition of matrix metalloproteinases for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Curr Med Res Opin.**, v. 21, p. 587-93, 2005.

IRIBARREN, Carlos et al. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of ARDS: a 15-year cohort study in a managed care setting. **Chest**, v. 117, n. 1, p. 163-168, 2000.

IP, WK Eddie et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513-519, 2017.

IYER, Shankar Subramanian; CHENG, Gehong. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 32, n. 1, 2012.

JASPER, Alice E. et al. Understanding the role of neutrophils in chronic inflammatory airway disease. **F1000Research**, v. 8, 2019.

JOHNSON, Elizabeth R.; MATTHAY, Michael A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 23, n. 4, p. 243-252, 2010.

KARIMI, Reza et al. Cell recovery in bronchoalveolar lavage fluid in smokers is dependent on cumulative smoking history. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e34232, 2012.

KENNEDY-FEITOSA, Emanuel et al. Eucalyptol attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation and oxidative stress in the mouse. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 41, p. 11-18, 2016.

KIRKHAM, Paul A.; BARNES, Peter J. Oxidative stress in COPD. **Chest**, v. 144, n. 1, p. 266-273, 2013.

KODE, Aruna; YANG, Se-Ran; RAHMAN, Irfan. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. **Respiratory research**, v. 7, n. 1, p. 1-20, 2006.

KUYUMCU, Fetullah; AYCAN, Abdurrahman. Evaluation of oxidative stress levels and antioxidant enzyme activities in burst fractures. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 24, p. 225, 2018.

LANZETTI, M.; et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. v. 24. p. 375-381, 2008.

LEE, YY et al. Eugenol suppressed the expression of lipopolysaccharide-induced proinflammatory mediators in human macrophages. **J Endod, United States**, v. 33, p.698-702, 2007.

LI, Weihua et al. Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264. 7 macrophages. **Biomedical Research**, v. 27, n. 2, p. 69-74, 2006.

LIU, Yan-Cun et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases. **International journal of biological sciences**, v. 10, n. 5, p. 520, 2014.

LOPES, Rafael L. et al. IL-10 is required for polarization of macrophages to M2-like phenotype by mycobacterial DnaK (heat shock protein 70). **Cytokine**, v. 85, p. 123-129, 2016.

MACNEE, W. Oxidants/Antioxidants and COPD. **Chest**. v. 117, p. 303-17, 2000.

MACIELE, Campos Keina et al. Antiasthmatic Effect of Eugenol (4-Allyl-2-Methoxyphenol) Mediated by Both Bronchodilator and Immunomodulatory Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 38-49, 2014.

MAGALHÃES, Clarissa B. et al. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 4, p. 845-851, 2010.

MATTHAY, Michael A. et al. Acute respiratory distress syndrome. **Nature reviews Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 1-22, 2019.

MENEGALI, Bruno T. et al. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 22, n. 6, p. 567-573, 2009.

MOURA, R. S.; et al. Effects of Euterpe oleracea Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phyto.**, v. 19, p. 262-69, 2012.

MURRAY, Peter J. Macrophage polarization. **Annual review of physiology**, v. 79, p. 541-566, 2017.

MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

MOKRA, Daniela; MORY, Juraj. **Oxidative stress in experimental models of acute lung injury**. In: CHAKRABORTI, S., et al. Oxidative Stress in Lung Diseases. Springer, Singapore. 2019. p 25-57.

NAGABABU, Enika et al. Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. In: **Free radicals and antioxidant protocols**. Humana Press, 2010. p. 165-180.

PEASE, James E.; SABROE, Ian. The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease. **American Journal of Respiratory Medicine**, v. 1, n. 1, p. 19-25, 2002.

RAHMAN, I.; ADCOCK, I. M. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. **European respiratory journal**, v. 28, n. 1, p. 219-242, 2006.

RAJENDRASOZHAN, Saravanan et al. Deacetylases and NF- $\kappa$  B in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 4, p. 799-812, 2008.

RETAMALES, Ivan et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 3, p. 469-473, 2001.

RUBENFELD, Gordon D. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1685-1693, 2005.

SANGANI, Rahul G.; GHIO, Andrew J. Lung injury after cigarette smoking is particle related. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 6, p. 191, 2011.

SCHULIGA, Michael. NF-kappaB signaling in chronic inflammatory airway disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1266-1283, 2015.

TORNLING, G. et al. Hyaluronic acid in bronchoalveolar lavage in rats exposed to quartz. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 44, n. 7, p. 443-445, 1987.

VALENÇA, Samuel Santos; PORTO, Luís Cristóvão. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, p. 787-795, 2008.

VLAHOS, Ross; BOZINOVSKI, Steven. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 435, 2014.

WARE, Lorraine B.; MATTHAY, Michael A. The acute respiratory distress syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 18, p. 1334-1349, 2000.

YAMASAKI, Kei; EEDEN, Stephan F. van. Lung macrophage phenotypes and functional responses: role in the pathogenesis of COPD. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 582, 2018.