

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Bruno Damasceno Bahia

Efeitos imunomodulatórios do tratamento “*in vitro*” com o ácido copálico e o óxido baccharis sobre culturas de células primárias de camundongo C57BL/6

**JUIZ DE FORA
2022**

Bruno Damasceno Bahia

Efeitos imunomodulatórios do tratamento “*in vitro*” com o ácido copálico e o óxido baccharis sobre culturas de células primárias de camundongo C57BL/6

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat

**JUIZ DE FORA
2022**

Bruno Damasceno Bahia

Efeitos imunomodulatórios do tratamento *in vitro* com o ácido copálico e o óxido de baccharis sobre culturas de células primárias de camundongo C57BL/6

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em
Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências
Farmacêuticas. Área
de
concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos
Ativos.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Otávio do Amaral Corrêa - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Rômulo Augusto de Abreu Franchini

Universidade Federal Fluminense

Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior

Juiz de Fora, 21/02/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Jose Otavio do Amaral Correa, Professor(a)**, em 23/02/2022, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Claudia Chagas de Paula Ladvocat, Professor(a)**, em 23/02/2022, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Olavo dos Santos Pereira Junior, Professor(a)**, em 23/02/2022, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Romulo Augusto de Abreu Franchini, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0687833** e o código CRC **44A97FD1**.

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bahia, Bruno Damasceno Bahia.

Efeitos imunomodulatórios do tratamento “in vitro” com o ácido copálico e o óxido baccharis sobre culturas de células primárias de camundongo C57BL/6 / Bruno Damasceno Bahia Bahia. -- 2022.
98 p. : il.

Orientador: José Otávio do Amaral Corrêa Corrêa
Coorientadora: Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat Ladvocat
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. Ácido copálico. 2. Óxido baccharis. 3. Imunomodulação. 4. Produtos naturais. I. Corrêa, José Otávio do Amaral Corrêa, orient. II. Ladvocat, Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvocat, coorient. III. Título.

“Uma vida vivida com medo é uma vida vivida pela metade.”
Baz Luhrman

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus; por ter me dado uma vida com saúde, qualidades e oportunidades que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus pais pelo suporte financeiro durante a graduação e agora, mais uma vez, durante o mestrado.

Aos meus amigos de vida, em especial nesses últimos anos, ao Felipe e ao Claucimar, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Às minhas primas Katielle, Alyne e Alyce pela companhia e apoio.

Aos meus amigos de graduação, Júlia, Thamires, Thalita, Taianne e Victor pela companhia e pelos muitos trabalhos em grupo que fizemos.

Ao Diogo e à Ludmila, os quais dividi momentos de aprendizado no laboratório.

Ao meu orientador José Otávio por ter aceitado me orientar, pela paciência, pelos conhecimentos teórico e prático transmitidos, e à professora Ana Cláudia Chagas pela co-orientação.

À técnica Lívia do anexo de Ciências Farmacêuticas, a qual me ajudou no manuseio de equipamentos, procedimentos laboratoriais e produção de reagentes.

Ao professor Ademar pelo fornecimento das substâncias e também aos alunos envolvidos.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas por esta formação e por ter acolhido os excedentes.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Farmácia e à UFJF pela formação superior, pelo conhecimento e experiências que vivi durante a academia.

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente na minha jornada. Obrigado!

RESUMO

INTRODUÇÃO: O sistema imunológico apresenta funções essenciais para a manutenção da homeostase no organismo. Quando este sistema não atua devidamente, podem ocorrer respostas imunológicas inapropriadas, e, conseqüentemente, o surgimento de doenças. A resposta imunológica pode ser modulada através de medicamentos tradicionais, como os anti-inflamatórios, imunossupressores e imunomoduladores não esteroidais e os esteroidais. Contudo, estes estão associados a altos custos no tratamento e a ocorrência de efeitos adversos, por vezes graves. Neste cenário, substâncias oriundas de produtos naturais poderiam ser uma alternativa, dada sua forma barata de obtenção, eficácia e segurança comprovadas, na maioria das vezes. O extrato de espécies do gênero *Baccharis* e o óleo-resina das copaíbas apresentam efeitos anti-inflamatórios, conforme descrito na literatura, e, deste modo, a descoberta de quais substâncias apresentam este efeito isoladamente poderia permitir o desenvolvimento de medicamento no futuro. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos imunomodulatórios *in vitro* do ácido copálico (AC) e do óxido baccharis (OB) sobre células obtidas de camundongos C57BL/6. **MATERIAL E MÉTODOS:** O AC e o OB, previamente isolados, tiveram sua citotoxicidade avaliada nos ensaios de MTT e azul de Tripán. Após verificar a viabilidade celular, o AC e o OB foram testados em diferentes concentrações em cultura de células peritoneais estimuladas com lipopolissacarídeo para avaliar a produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α ; e sobre cultura de esplenócitos estimulados com concanavalina A para avaliar a proliferação celular. **RESULTADO:** No teste de viabilidade celular do MTT, não se observou toxicidade do AC nem do OB nas concentrações de 100, 75, 50, 25, 10 e 5 μ M após 24 e 48 horas de exposição das células peritoneais às substâncias. No teste de viabilidade do azul de Tripán, realizado nos tempos de 24 e 48 horas ambas substâncias mostraram ser seguros nas dosagens entre 50 e 75 μ M, mostrando, portanto, toxicidade à 100 μ M. No ensaio de proliferação celular, o AC apresentou inibitória sobre os esplenócitos nas concentrações de 75 e 50 μ M. No ensaio do nitrito, somente o AC na concentração 75 μ M foi capaz de reduzir a produção de NO pelas células peritoneais. Na determinação de citocinas por ELISA nas células peritoneais estimuladas e tratadas, o AC foi capaz de reduzir a produção de IL-1 β e IL-6 na concentração 75 μ M, IL-12 nas concentrações 75 e 50 μ M, mas não apresentou efeito sobre IFN- γ e TNF- α , em

relação ao grupo controle. O OB não reduziu a produção de nenhuma das citocinas investigadas. **CONCLUSÃO:** O AC apresenta potencial atividade imunomodulatória e muito provavelmente é um dos compostos presentes no óleo de copaíba responsável pelo seu efeito anti-inflamatório. O OB não apresentou potencial anti-inflamatório e muito provavelmente não contribui para esta atividade do seu extrato. Contudo novos estudos devem ser realizados para aprofundar em seu claro mecanismo de ação.

Palavras-chave: Ácido copálico, Óxido baccharis, Imunomodulação, Produtos naturais

ABSTRACT

INTRODUCTION: The immune system has essential functions to maintain the homeostasis in the body. When this system does not work properly, inappropriate immune responses can occur and, consequently, the appearance of diseases. The immune response can be modulated by using traditional drugs, such as non-steroidal and steroidal anti-inflammatory, immunosuppressive and immunomodulatory drugs. However, these are associated with high costs of treatment and the occurrence of adverse effects, sometimes serious. In this scenario, substances from natural products could be an alternative, given their cheap way of obtaining, proven efficacy and safety, in most of the times. The extract of species of the genus *Baccharis* and the oil-resin from copaibas have anti-inflammatory effects, as described in the literature, and the elucidation of which substances alone present this effect could allow the development of new medication in the future. **OBJECTIVE:** To evaluate the *in vitro* immunomodulatory effects of copalic acid (CA) and baccharis oxide (BO) on cells obtained from C57BL/6 mice. **MATERIAL AND METHODS:** CA and BO, previously isolated, had their cytotoxicity evaluated in the MTT and blue Trypan assays. After verifying cellular viability, CA and BO were tested under different concentrations into peritoneal cells culture stimulated with lipopolysaccharide to evaluate nitric oxide (NO) production and the production of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α ; and into splenocytes culture stimulated with concanavalin A to evaluate cellular proliferation. **RESULTS:** In the MTT cellular viability assay, it was not observed toxicity in CA neither in BO in the concentrations of 100, 75, 50, 25 10 and 5 μ M after 24 and 48 hours of exposure of the peritoneal cells to the substances. In the blue Tripan assay, realized at the times 24 and 48 hours both substances were safe at the dosage of 50 and 75 μ M showing, therefore, toxicity at 100 μ M. In the proliferation assay, CA presented innibitory activity against splenocytes in the concentration of 75 e 50 μ M. In the nitrite assay, only CA in the concentration of 75 μ M was able to reduze production of NO from peritoneal cells. In the determination of cytokines by ELISA in the stimulated and treated peritoneal cells, the CA was able to reduce the production of IL-1 β and IL-6 in the concentration of 75 μ M, IL-12 in the concentrations of 50 and 75 μ M, but presented no effect against IFN- γ e TNF- α , compared to control group. BO didn't reduced the production of any of the cytokines. **CONCLUSION:** AC presented potential

immunomodulatory activity and it's very likely to be one of the compounds in the copaiba oil responsible for its anti-inflammatory effect. BO didn't present potential anti-inflammatory activity and it's very likely it doesn't contribute to such activity of the extract. However, further studies must be carried out to understand its clear mechanism of action.

Keywords: Copalic acid, Baccharis oxide, Immunomodulation, Natural products

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido copálico
APC	Célula apresentadora de antígeno
BPF	Fator potencializador da bradicinina
CBR	Centro de Biologia de Reprodução
CD	Ligante de diferenciação
CO ₂	Gás carbônico
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Foxp	Proteína da família Foxp
GATA	Família de fatores de transcrição
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
Hg ₂ Cl ₂	Cloreto de mercúrio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HMGB1	Domínio 1 do grupo de alta mobilidade
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
<i>i</i> NOS	Óxido nítrico sintetase induzível
IPEX	Poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X
LAG-3	Gene 3 de ativação linfocitária
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOG	Glicoproteína da mielina de oligodendrócito
mRNA	RNA mensageiro

MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]
NF-κB	Fator nuclear kappa beta
NK	<i>Natural killer</i>
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais
NTC	<i>Non template control</i>
NO	Óxido nítrico / <i>nitric oxide</i>
OB	Óxido baccharis
OPD	Orto-fenileno-diamina
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PD1	Proteína programada 1 da morte celular
pH	Potencial hidrogeniônico ou $-\log[\text{H}_3\text{O}^+]$
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécie reativa de nitrogênio
RoR γ T	Receptor órfão T relacionado ao RAR
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RPM	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo γ
PBS	Tampão fosfato-salina
PBS-T	Tampão fosfato-salina com Tween 20
PHA	Fitohemaglutinina
SFB	Soro fetal bovino
SOCS1	Supressor da sinalização de citocina 1
SOCS3	Supressor da sinalização de citocina 3
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
T-bet	Fator de transcrição da família T-box
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator transformador de colônias β
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TIM-3	Domínios de mucina e imunoglobulina de célula T
TLR-4	Receptor tipo toll 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral
T _{reg}	Células T regulatórias

VLC Cromatografia líquida à vácuo
XTT 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1	– Foto da <i>Baccharis articulata</i> L.....	29
Figura 2	– Estrutura do óxido baccharis.....	31
Figura 3	– Foto de árvores de copaíba	32
Figura 4	– Estrutura química do ácido copálico.....	35
Figura 5	– Ativação de Células T e B.....	39
Figura 6	– Respostas Th.....	41
Tabela 1	– Distribuição de animais por procedimento	54

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Resultado do ensaio de MTT realizado sobre as células peritoneais tratadas com AC por um período de 24 horas (Gráfico 1A) e por período de 48 horas (Gráfico 1B) nas concentrações de 100, 75, 50, 25 10 e 5 μM61
- Gráfico 2** – Resultado do ensaio de MTT realizado sobre as células peritoneais tratadas com OB por um período de 24 horas (Gráfico 2A) e por período de 48 horas (Gráfico 2B) nas concentrações de 100, 75, 50, 25 10 e 5 μM62
- Gráfico 3** – Resultado de viabilidade expresso em porcentagem do ensaio do azul de Tripán sobre as células peritoneais expostas ao AC após 24 e 48 horas nas concentrações de 100, 75, 50, 25 10 e 5 μM63
- Gráfico 4** – Resultado de viabilidade expresso em porcentagem do ensaio do azul de Tripán sobre as células peritoneais expostas ao OB após 24 e 48 horas nas concentrações de 100, 75, 50, 25 10 e 5 μM64
- Gráfico 5** – Resultado do ensaio de proliferação celular do AC e do OB sobre os esplenócitos no período de 48 horas nas concentrações de 100, 75, 50, 25 10 e 5 μM 65
- Gráfico 6** – Resultado do óxido nítrico do AC e do OB sobre as células peritoneais no período de 48 horas nas concentrações de 75, 50 e 25 μM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO_266
- Gráfico 7** – Resultado da determinação de IFN- γ por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 μM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO_267
- Gráfico 8** – Resultado da determinação de IL-1 β por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 μM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO_2 68

Gráfico 9 – Resultado da determinação de IL-6 por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 µg/mL e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 µM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO₂69

Gráfico 10 – Resultado da determinação de IL-12 por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 µg/mL e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 µM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO₂70

Gráfico 11 – Resultado da determinação de TNF-α por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 µg/mL e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 µM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO₂71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 PRODUTOS NATURAIS NA MEDICINA	23
2.2 PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, IMUNOSSUPRESSORA E IMUNOMODULADORA.....	26
2.3 O GÊNERO <i>Baccharis</i>	29
2.3.1 Estudos envolvendo o extrato	30
2.3.2 Óxido baccharis	31
2.4 O GÊNERO <i>Copaifera</i>	32
2.4.1 Estudos envolvendo o extrato e o óleo-resina	33
2.4.2 Ácido copálico	35
2.5 MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE COMO TRATAMETNO	37
2.6 RESPOSTA IMUNES MODULADAS	39
2.6.1 Resposta Th1	41
2.6.2 Resposta Th2	42
2.6.3 Resposta Th17	43
2.6.4 Resposta T_{reg}	44
2.7 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO	46
3 OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	49
4.2 SUBSTÂNCIAS.....	50
4.2.1 Ácido copálico	50
4.2.2 Óxido baccharis	50
4.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS E ESLENÓCITOS.....	52
4.3.1 Células peritoneais	52
4.3.2 Esplenócitos	53
4.4 DISTRIBUIÇÃO DE ANIMAIS POR PROCEDIMENTO	54
4.5 VIABILIDADE CELULAR – AZUL DE TRIPAN	55
4.6 VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO MTT.....	56
4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	57

4.8 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO).....	58
4.9 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA	59
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
5 RESULTADOS.....	61
5.1 VIABILIDADE CELULAR – MTT	61
5.1.1 MTT das células peritoneais tratadas com AC.....	61
5.1.2 MTT das células peritoneais tratadas com OB	62
5.2 VIABILIDADE CELULAR – AZUL DE TRIPAN	63
5.2.1 Azul de Tripán das células peritoneais tratadas com AC	63
5.2.2 Azul de Tripán das células peritoneais tratadas com OB	64
5.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	65
5.4 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	66
5.5 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS	67
5.5.1 Determinação de IFN-γ por ELISA	67
5.5.2 Determinação de IL-1B por ELISA.....	68
5.5.3 Determinação de IL-6 por ELISA	69
5.5.4 Determinação de IL-12 por ELISA	70
5.5.5 Determinação de TNF-α por ELISA	71
6 DISCUSSÃO	72
6.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MTT E AZUL DE TRIPAN .	72
6.2 AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	74
6.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	75
6.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA	77
7 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO A	97
ANEXO B	98

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico surgiu no processo evolutivo dos seres vivos como um mecanismo de defesa contra patógenos e toxinas (CHAPLIN, 2010, MARSHALL *et al.*, 2018). Além disso, o sistema imunológico apresenta papel importante na reparação e regeneração de tecidos (NEWTON; DIXIT, 2012; JULIER *et al.*, 2017) e também capacidade de atuar no combate de células cancerígenas (VESLEY *et al.*, 2011; CANDÉIAS; GAIPL, 2016).

As funções do sistema imunológico são desempenhadas por um conjunto de órgãos, células, receptores, citocinas e mediadores (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014; NICHOLSON, 2016; MARSHALL *et al.*, 2018). Tais componentes estão localizados difusamente em todo o organismo e atuam de maneira coordenada (ANDRADE; ARAÚJO-JORGE; COUTINHO-SILVA, 2016).

A imunidade é dividida em inata ou natural e adaptativa ou específica. A inata refere-se a todos os componentes presentes no organismo antes do contato com o invasor; é a “primeira” linha de defesa. A adaptativa é composta pelos linfócitos T e B, e são responsáveis por respostas mais específicas e pela memória (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014). Porém, atualmente é reconhecido que algumas células da imunidade inata, como mastócitos e macrófagos, são epigeneticamente reprogramadas com experiências passadas, assim sendo, essas células apresentarão resposta inflamatória alterada diante de encontros subsequentes com patógenos (CRONKITE; STRUTT, 2018).

Os principais linfócitos envolvidos na imunidade específica são o Th1, Th2, Th17 e T regulador (T_{reg}), os quais secretam citocinas para acionar respostas imunológicas (MARSHALL *et al.*, 2018). Citocinas são proteínas pequenas secretadas por células brancas e tem a função de sinalizar as respostas imunológicas humoral e celular (ASSAF; AL-ABBASSI; AL-BINI, 2017).

O linfócito Th1 produz as citocinas IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-6 e IL-8, que possuem atividade pró-inflamatória, como estimular a produção de anticorpos e atividade de macrófagos (ASSAF; AL-ABBASSI; AL-BINI, 2017). O linfócito Th2 secreta as citocinas IL-5, IL-4, e IL-13, que estimulam a maturação e recrutamento de mastócitos, eosinófilos, dentre outras células, e atuam sobre os linfócitos B estimulando a produção da imunoglobulina E (IgE) (PELAIA *et al.*, 2015). O linfócito Th17 produz IL-17 e IL-22, as quais estão envolvidas na resposta contra bactérias e fungos

(BHAUMIK; BASU, 2017). O linfócito T_{reg} produz IL-10 e TGF- β , que tem papel na modulação da resposta imune (SHEVACH, 2018; MARSHALL *et al.*, 2018).

Defeitos ou mal funcionamento tanto da imunidade inata quanto da específica podem causar doenças. Tais desordens ocorrem devido a resposta imune exagerada (chamada de hipersensibilidade), inapropriada (chamada de autoimunidade) ou inefetiva (chamada de imunodeficiência) (MARSHALL *et al.*, 2018).

A inflamação tem a função de combater a infecção e lesões no tecido (HOU *et al.*, 2018; FRATTARUOLO *et al.*, 2019). A resposta inflamatória causa alterações vasculares, como estímulo à vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, ocasionando, assim, o extravasamento de células de defesa circulantes (NEWTON; DIXIT, 2012; ANDRADE; VALENTÃO, 2018).

Contudo, a resposta inflamatória deve ser modulada para que não produza efeitos deletérios ao próprio organismo, pois a inflamação crônica pode resultar em várias doenças (FRATTARUOLO *et al.*, 2019) e dificulta a regeneração do tecido, podendo ocasionar a formação de fibrose (CHAPLIN, 2010). Os anti-inflamatórios não esteroidais têm sido a medicação mais prescrita no mundo todo, todavia, apresentam uma série de efeitos adversos como úlcera gástrica, hipertensão, insuficiência renal aguda e piora da insuficiência cardíaca (SOSTRES *et al.*, 2010). Neste contexto, é preciso descobrir novas opções terapêuticas capazes de modular a resposta imunológica, tal como os produtos naturais (JULIER *et al.*, 2017).

Os produtos naturais representam um grupo rico de substâncias químicas diversas com variados efeitos biológicos que podem ser desenvolvidas para aplicação na área clínica (KINGSTON, 2011). As fontes de produtos naturais incluem plantas, bactérias, fungos e animais marinhos (KATZ; BALTZ, 2016). Em vista disso, as substâncias oriundas de produtos naturais devem ser mais pesquisadas porque são produtos da evolução durante a seleção natural, isto é, essas substâncias propositalmente fornecem vantagens ao produtor (WRIGHT, 2019).

A humanidade sempre usou produtos naturais ao longo de sua história para fins terapêuticos e culturais (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Por décadas, os produtos naturais têm mostrado sua eficácia no combate a doenças em diferentes áreas, como desordens metabólicas, cardiovasculares, inflamatórias, neurológicas entre outras (CHE; ZHANG, 2019). Portanto, produtos naturais tem grande potencial de fornecerem substâncias que tenham como alvo imunomoduladores, para o tratamento de alguns tipos de doenças imunológicas e inflamatórias, como artrite

reumatoide, psoríase, Doença de Crohn, espondilite anquilosante, por exemplo (WANG *et al.*, 2018).

Com o passar dos anos e o avanço da medicina, os produtos sintéticos gradualmente dominaram o mercado (NISAR; SULTAN; RUBAB, 2017). Apesar da importância histórica dos produtos naturais e de seu potencial terapêutico, as indústrias farmacêuticas ainda dão mais ênfase aos produtos sintéticos por terem mais pesquisas envolvidas nestes (WRIGHT, 2019). Todavia, os pesquisadores voltaram a se interessar pelos produtos naturais, como pode ser percebido pela rápida expansão do mercado de produtos naturais tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (EKOR, 2013).

As substâncias naturais apresentam uma série de vantagens em relação às sintéticas: normalmente menos tóxicas, menos associadas a reações adversas e mais fácil de serem obtidas (NISAR; SULTAN; RUBAB, 2017). Ademais, os produtos de origem natural apresentam um custo menor de produção em relação aos sintéticos (VEERESHAM, 2012). Somada às suas vantagens anteriormente descritas, os produtos naturais representam uma alternativa eficaz e relativamente barata em relação às aos produtos sintéticos amplamente prescritos nas terapias tradicionais (FRATTARUOLO *et al.*, 2019).

Estima-se que menos de 10% da biodiversidade do mundo tem seu potencial biológico descrito, o que significa haver muitas outras substâncias para serem ainda descobertas (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Para melhor compreender a propriedade medicinal de um produto natural e estabelecer fortes evidências de seu futuro desenvolvimento, são necessárias investigações clínicas e pré-clínicas juntamente da elucidação de seu mecanismo de ação e comprovação de sua eficácia (CHE; ZHANG, 2019).

Neste contexto, a fim de buscar substâncias oriundas de produtos naturais que forneçam atividade terapêutica de interesse, em especial atividade anti-inflamatória, o presente trabalho avalia o potencial imunomodulador de duas moléculas extraídas de plantas: o óxido baccharis (OB), extraído de espécies do gênero *Baccharis*, e o ácido copálico (AC), extraído das copaíbas. Tais moléculas estão presentes em plantas cujos extratos já possuem descritas sua atividade anti-inflamatória, então, o uso de testes imunomodulatórios *in vitro* com substância isolada evidenciará se a mesma apresenta tal atividade isoladamente.

O OB é um triterpeno que está presente em espécies de plantas do gênero *Baccharis*, como a *Baccharis dracunculifolia* (SAWAI *et al.*, 2011). Missima e colaboradores (2010) demonstraram que o extrato de *Baccharis dracunculifolia* apresenta atividade imunomodulatória, a qual foi verificada, de forma preliminar, também no OB, isolado posteriormente. Neste estudo, o OB elevou a produção de H₂O₂. Em um estudo *in vivo*, Santos *et al.* (2010) demonstraram que o extrato da folha de *Baccharis* reduziu a atividade da ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Padua (2013) realizou testes *in vitro* e *in vivo* com o extrato de *Baccharis trimera*, e, em ambos, houve redução da produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos.

Apesar destes achados na literatura, ainda são necessários mais estudos sobre a atividade imunomodulatória do OB. É também reportado na literatura que o OB apresenta atividade antimicrobiana, tal como foi reportado em um estudo envolvendo testes *in vitro* (HERRERA-MARTÍNEZ *et al.*, 2012).

O AC é um diterpeno (ALVES *et al.*, 2017) presente nas espécies de plantas do gênero *Copaifera*, como a *Copaifera reticulata* (TEIXEIRA *et al.*, 2017) e a *Copaifera langsdorffii* (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esta substância é um dos principais constituintes ácidos do óleo-resina das copaíferas (TEIXEIRA *et al.*, 2017). O óleo-resina das plantas deste gênero é usado popularmente como agente anti-inflamatório e regenerativo no tratamento de feridas (GUIMARÃES-SANTOS *et al.*, 2012).

Há estudos que demonstraram a atividade anti-inflamatória do óleo-resina em testes tanto *in vivo* como *in vitro*. Guimarães-Santos *et al.* (2012) demonstraram que o tratamento com óleo-resina reduziu a ativação de macrófagos em 60% e reduziu também a infiltração mononuclear no córtex motor inflamado de ratos. Ademais, Teixeira *et al.* (2017) demonstraram que o óleo-resina reduziu o número de macrófagos CD68-positivo na ferida em língua de ratos. Em um ensaio *in vitro*, Vargas *et al.* (2015) demonstraram que o AC reduziu o óxido nítrico (NO) produzido por macrófagos ativados por lipopolissacarídeo.

A atividade anti-inflamatória do óleo-resina das copaíferas pode estar relacionada, entre outras substâncias, também à presença do ácido-copálico, então, são necessários mais estudos com a substância isolada que demonstrem sua atividade. Outras atividades do AC que a literatura descreve incluem a atividade anticancerígena e antimicrobiana em testes *in vitro* (ABRÃO *et al.*, 2015).

A busca por novas moléculas farmacologicamente ativas, seguras, sem efeitos adversos ou mesmo que sejam toleráveis e de baixo custo são características que

norteiam a pesquisa de novos fármacos. Pelo anteriormente exposto, substâncias oriundas do extrato de *Baccharis* spp. e do óleo-resina de copaíba podem ser promissoras. Deste modo, o foco do presente trabalho é a execução de testes *in vitro* para verificar a toxicidade e melhor compreensão do potencial imunomodulatório do OB e do AC, uma vez isolados de suas fontes naturais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUTOS NATURAIS NA MEDICINA

Desde épocas remotas, produtos naturais têm sido largamente usados para tratar doenças (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Incluem-se como fontes principais as plantas, os minerais, os animais e microrganismos, sendo que as fontes majoritárias são as plantas e os microrganismos (CALIXTO, 2019; PHAM *et al.*, 2019). Embora, atualmente, muitas das grandes empresas farmacêuticas não estejam focando em desenvolver produtos naturais, historicamente as plantas forneceram muitas drogas importantes para o homem, desde a morfina descoberta no início do século XIX a mais recente artemisina (CHE; ZHANG, 2019).

O mercado global medicinal vale, atualmente, cerca de 1,1 trilhões de dólares, sendo 35% destes produtos medicinais oriundos direta ou indiretamente de produtos naturais: plantas (25%), microrganismos (13%) e animais (3%). Produtos oriundos de fontes naturais têm muitas aplicações podendo ser usados para: a) fonte direta de agentes terapêuticos, b) fonte para desenvolvimento e síntese de drogas semi-sintéticas; c) protótipos para desenvolver moléculas; d) marcadores taxonômicos para descoberta de novas drogas (CALIXTO, 2019).

As plantas correspondem à maior porcentagem devido a sua maior biodiversidade e também facilidade de obtenção (CRAGG; NEWMAN, 2013). Até o início do século XIX, 80% dos medicamentos vinham de fontes vegetais (PHAM *et al.*, 2019) e o medicamento oriundo de planta mais conhecido é, provavelmente, a aspirina[®], um agente anti-inflamatório. O ácido salicílico foi isolado da casca do tronco da salgueira (*Salix alba* L.) e, posteriormente, foi sintetizado em ácido acetilsalicílico para reduzir a acidez de sua forma ácida (DIAS; URBAN, ROESSNER, 2012). Outro exemplo muito importante foi o isolamento da droga antimalárica, quinina, a partir da casca de espécies de *Cinchona*, em 1820. A quinina foi a base para o desenvolvimento de drogas antimalárica, como a cloroquina e a mefloquina, as quais substituíram a quinina em meados do século XX (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os microrganismos como fonte natural para obtenção de medicamentos tiveram como marco a descoberta da penicilina do fungo *Penicillium notatum* por Alexander Fleming em 1928. Desde então, compostos oriundos de microrganismos têm sido usados na medicina, na agricultura e na indústria. A pesquisa por antibióticos

levou à descoberta da estreptomicina do *Streptomyces griseus*, cloranfenicol do *Streptomyces venezuelae*, cefalosporina de *Cephalosporium acremonium*, eritromicina do *Saccharopolyspora erythraea*, por exemplo. Atualmente, cerca de 69% dos produtos antibacterianos têm origem natural (PHAM *et al.*, 2019).

Embora os animais sejam fontes de apenas 3% das drogas aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration), muitas drogas importantes foram oriundas de animais, principalmente de toxicinas destes, tal como foi o desenvolvimento do captopril (CALIXTO, 2019). Rocha e Silva *et al.* (1949) descobriram que o peptídeo bradicinina, um agente hipotensivo que estimula a musculatura lisa é liberado no plasma pelo veneno da víbora brasileira *Bothrops jararaca*. Anos depois, Ferreira (1965) descobriu que tal efeito acontece devido a uma substância presente no veneno da cobra que ele chamou de fator potencializador da bradicinina (ou BPF, do inglês, *bradykinin-potentiating fator*). Após muito estudo e pesquisa, elucidou-se que o BPF degrada a enzima conversora de angiotensina (ECA) e, este mecanismo farmacológico, poderia ser interessante para o desenvolvimento de uma droga anti-hipertensiva. Após muitos desafios, dentre eles o de converter o peptídeo BPF numa forma estável que possibilitasse a administração oral, o captopril foi aprovado pelo FDA no início de 1980. Atualmente, há cerca de nove inibidores da ECA no mercado e juntos suas vendas arrecadam mais de 5 bilhões de dólares por ano (CALIXTO, 2019).

Em relação aos produtos naturais de origem mineral, o uso de drogas baseadas em metais é antigo. Medicamentos a base de ouro foram usados na China há 3500 anos e cloreto de mercúrio I (Hg_2Cl_2) foi usado como agente diurético, por exemplo (KEOGAN; GRIFFITH, 2014). O uso da prata para tratar e prevenir várias doenças infecciosas data cerca de 4000 anos a.C. A prata tem atividade bactericida bem estabelecido e foi muito usada no século XVIII para tratamento de queimaduras, úlceras e machucados infectados, mas seu uso reduziu após a Segunda Guerra Mundial com o advento dos antibióticos (POLITANO *et al.*, 2013). O bismuto foi usado do século XVIII até o início do século XX para tratar feridas de guerras, cóleras em neonatos e gastroenterites. Em 1901, desenvolveram o salicilato de bismuto, o qual é usado até os dias de hoje para tratar úlceras e infecção por *Helicobacter pylori* (KEOGAN; GRIFFITH, 2014).

Por último e não menos importante, no mar há muitas fontes de produtos naturais. Embora a maioria das fontes de produtos naturais seja de origem terrestre,

o ambiente marinho possui gigantesca diversidade de seres vivos, e, conseqüentemente, diversidade de substâncias químicas. Contudo, o mar é muito vasto e pouco conhecido. Deste modo, o uso de tecnologias (fermentação, biotecnologia, síntese química etc) é crucial para o sucesso dos produtos naturais marinhos como medicamentos. O primeiro produto de origem marinha aprovado pelo FDA foram os nucleosídeos sintéticos purina e pirimidina, desenvolvidos a partir de nucleosídeos naturais extraídos da esponja *Tehya crypta*. Em 2010, o FDA aprovou o mesilato de eribulina, um agente anticâncer para combater metástase no câncer de mama, o qual é uma droga sintetizada análoga ao composto citotóxico haliquondrina B, isolado pela primeira vez da esponja marinha *Halichondria okadai* em 1986 (MONTASER; LUESCH, 2011).

Como bem descrito na literatura, o homem usa produtos naturais desde épocas remotas até os dias de hoje. Com o avanço da ciência e da tecnologia, os processos de extração tornaram-se cada vez mais eficazes, possibilitando novas descobertas e desenvolvimento de novas substâncias, permitindo, assim, que as mesmas possam ser introduzidas no mercado após comprovação de sua eficácia e segurança.

2.2 PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, IMUNOSSUPRESSORA E IMUNOMODULADORA

As plantas têm sido usadas há séculos para tratar diferentes doenças e enfermidades e forneceram ao homem muitos medicamentos (AMIRGOHOFAN, 2012). Vinblastina, vincristina e seus derivados sintéticos isolados da vinca-de-Madagascar (*Catharanthus roseus*), capsaicina das pimentas (espécies *Capsicum*), paclitaxel do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) e galantamina da planta *snowdrops* (*Galanthus caucasicus*) são exemplos de medicamentos baseados em compostos de plantas (JANTHAN; AHMAD; BUKHARI, 2015).

Imunomoduladores são agentes que estimulam (imunoestimuladores) ou suprimem (imunossupressores) a resposta de defesa do hospedeiro (BASCONES-MARTINEZ; MATTILA; MEURMAN, 2014). Os produtos naturais com atividade imunomodulatória são usados no tratamento de muitas doenças autoimunes, desordens inflamatórias e contra o câncer. Imunomoduladores naturais, como a genisteína, a curmina e o resveratrol, podem ser usados como agentes profiláticos contra a iniciação do câncer e proliferação de tumor (MOHAMED; JANTAN; HAQUE, 2017).

De todas as diferentes atividades biológicas de produtos naturais vegetais publicadas até o momento, o efeito anti-inflamatório é o mais reportado. A prática de usar plantas e extratos como anti-inflamatórios é conhecida desde a antiguidade. Por exemplo, o extrato aquoso de *Ceratonia siliqua* L. foi usado por décadas na medicina árabe, especialmente para tratar inflamações na boca (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016).

Os polifenóis possuem várias atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória. Flavonoides constituem um dos mais representativos da classe (ANDRADE; VALENTÃO, 2018). Por exemplo, a licochalcona A, um flavonoide isolado de alcaçuz, demonstrou efeito protetor à micróglia por ter promovido efeito anti-inflamatório em modelos de doença de Parkinson, *in vitro* e *in vivo*. Nesse estudo, a licochalcona A inibiu a produção de NO e prostaglandina E2 por suprimir a produção de óxido nítrico sintase e ciclo-oxigenase 2 em células BV2 da micróglia estimuladas por lipopolissacarídeo. Também suprimiu a sinalização nas vias das quinases regulada por sinal extracelular e o fator nuclear NF- κ B na micróglia. Nos modelos animais, inibiu

a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β e reduziu a expressão de mRNA de citocinas (HUANG *et al.*, 2017).

Proantocianidinas são também polifenóis muito comuns na natureza. Zhang *et al.* (2016) discutiram as propriedades anti-inflamatórias do extrato proantocianidínico da semente de uva, focando na prevenção da isquemia, injúria renal aguda e fibrose. O estudo foi feito em ratos com isquemia/reperfusão bilateral e, após administração do extrato, houve melhora significativa da função renal e redução da inflamação. Nesses modelos animais, a proteção renal foi associada à inibição de HMGB1 nucleocitoplasmática, a qual está envolvida no desencadeamento de respostas inflamatórias a partir do receptor tipo-toll 4 (TLR-4) e também por se ligar ao P53, uma proteína citoplasmática que regula o ciclo celular.

As fitoalexinas exercem uma variedade de atividade farmacológicas como antimicrobiana, anticâncer, anti-inflamatória e antioxidante. Uma fitoalexina muito conhecida é o resveratrol, o qual está presente em muitas espécies de uva, vinho tinto e amendoim. Como demonstrado na literatura, o resveratrol é capaz de inibir a expressão de COX-2, de óxido nítrico sintase, de inibir a secreção de NO, TNF- α , de reduzir a produção de IL-12, IL-6, IL-1, TNF- α e IFN- γ (JANTAN; AHMAND, BUKHARI, 2015).

Sesquiterpenos também apresentam atividade anti-inflamatória, tal como descrito na literatura. Mathema *et al.* (2012) avaliaram o efeito anti-inflamatório do sesquiterpeno partenolido derivado da planta *Tanacetum parthenium*. Foi demonstrado forte inibição de NF- κ B e de STATs (sinais tradutores e ativadores de transcrição). Em trabalho de nosso grupo, envolvendo modelo animal de encefalomielite autoimune, o tratamento, *in vitro*, com partenolído foi capaz modular a atividade de células Th1 e Th17, principalmente por reduzir a produção de IL-17, TNF- α e IFN- γ (CARVALHO *et al.*, 2017).

A literatura descreve também o efeito anti-inflamatório em derivados dos terpenos. O *Ginkgo biloba* L. é uma planta medicinal conhecida há tempos. Sua atividade anti-inflamatória está ligada ao ginkgolide A, uma trilactona diterpênica. Seu mecanismo de ação já foi esclarecido usando macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo, tanto *in vitro* quanto em modelos de camundongo. Evidenciou-se que o ginkgolide A é capaz de modular NF- κ B, proteino-quinases ativada por mitógenos, reduzir a produção de NO, COX-2, TNF- α , IL-1 e IL-6 (ANDRADE; VALENTÃO, 2018).

Alcaloides também possuem representantes com atividade anti-inflamatória. A capsaicina é um alcaloide encontrado em espécies de pimenta e é a responsável pela pungência no sabor. Foi usado tradicionalmente para alívio do rubor e da dor nos músculos e nas juntas. A pesquisa com capsaicina resultou na descoberta dos receptores vaniloide, o qual está localizado, principalmente, nos neurônios nociceptivos. O mecanismo de ação da capsaína neste uso é promover a dessensibilização desses receptores por meio de ativação excessiva (JANTAN; AHMAD; BUKHARI, 2015).

E sobre os fungos, Elsayed *et al.* (2014) estudaram um grupo de fungos que possuíam uma diversidade de substâncias com atividade anti-inflamatória, dentre as quais se destacam polissacarídeos, proteoglicanos, terpenoides, compostos fenólicos, esteroides e lectinas. Esses compostos tem um amplo alcance de efeitos terapêuticos e podem atuar como agentes imunomodulatórios, anticarcinogênicos, antiviral, antioxidante e anti-inflamatório. Segundo este estudo, o efeito anti-inflamatório reportado se deve aos mecanismos de redução de IL-1 β , IL-6, leucotrieno, prostaglandina, TNF- α e inibição de COX-2, de óxido nítrico sintase e da atividade de NF- κ B (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016).

2.3 O GÊNERO *Baccharis*

O gênero *Baccharis* inclui espécies de plantas perenes e arbustivas (figura 1). As espécies *Baccharis*, conhecidas como carqueja, são nativas no Sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (OLIVEIRA *et al.*, 2012; BUDEL *et al.* 2018; BASSO *et al.*, 2019). O chá feito com suas partes aéreas é usado tradicionalmente para tratar doenças no fígado (RABELO; COSTA, 2018), doenças gástricas (OLIVEIRA *et al.*, 2012), diurético (BASSO *et al.*, 2019) e processos inflamatórios (PAUL *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012; RABELO; COSTA, 2018).

Figura 1 – Foto da *Baccharis articulata* L.



Fonte: BAGATINI, 2018.

Conforme descrito na literatura, flavonoides, terpenos e ácidos clorogênicos são os principais compostos presentes nas partes aéreas que foram associados aos efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antigástrico, hepatoprotetor, antimicrobiano, antifúngico, antiparasitário e promotor da perda de peso (RABELO; COSTA, 2018). Outras substâncias presentes na planta incluem o óleo volátil, flavonas, saponinas e diterpenos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

2.3.1 Estudos envolvendo o extrato

Há estudos na literatura que avaliaram a atividade farmacológica do extrato de espécies *Baccharis*. Paul *et al.* (2009) injetaram o extrato de *Baccharis trimera* na cavidade pleural ratos induzidos a pleurisia. Os parâmetros inflamatórios foram atenuados 30 minutos após a administração do extrato. Oliveira *et al.* (2012) realizaram um estudo parecido com o do autor anterior. Em ratos induzidos a pleurisia, administraram diferentes extratos de *Baccharis trimera*, o qual também demonstrou redução nos parâmetros inflamatórios em relação ao grupo controle. Neste estudo, o extrato fenólico foi o que apresentou maior atividade antioxidante e anti-inflamatória. Padua *et al.* (2013) administraram o extrato de *Baccharis trimera* em modelos de inflamação induzido com paracetamol. Houve restauro do balanço de espécies reativa de oxigênio e NO que é alterada durante o processo inflamatório causado pelo paracetamol. Budel *et al.* (2018) estudaram *in vitro* os efeitos farmacológicos do óleo essencial de cinco espécies do gênero *Baccharis* e reportaram as atividades antimalária, antitripanossomal e inseticida. Basso *et al.* (2019) avaliaram o efeito citotóxico e antiproliferativo do extrato de *Baccharis anomala*. Realizando ensaio *in vitro* com células hepáticas, o extrato reduziu a proliferação celular através de um mecanismo de ativação da via do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ).

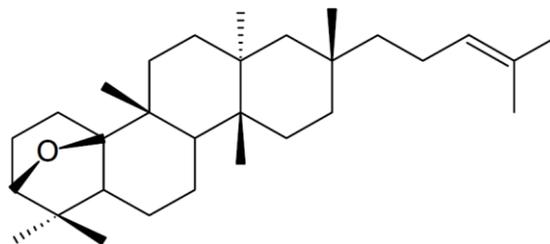
Em outro trabalho de nosso grupo, a *Baccharis dracunculifolia* DC tem sido muito estudada. Demonstrou-se que o extrato das folhas e alguns de seus compostos isolados apresentam atividade antimicrobiana, especialmente contra *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* (SILVA FILHO *et al.*, 2008). Também se avaliou a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato cru hidroalcoólico das folhas em teste *in vivo*. Foi observado redução significativa nas constrições abdominais, inibição da nocicepção e prolongamento do efeito anti-hipernociceptivo e, ainda, inibição da COX-2 (SANTOS *et al.*, 2010). Um outro estudo avaliou o efeito protetor *in vivo* do extrato de folhas contra a hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono e acetaminofeno. Evidenciou-se que o pré-tratamento com o tratamento do extrato reduziu a concentração de marcadores séricos indicativos de injúria hepática. O extrato também apresentou atividade antioxidante por meio do método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), e conteúdo alto de fenólicos totais e flavonoides (REZENDE *et al.*, 2014).

A atividade anti-inflamatória/antioxidante do extrato de *Baccharis trimera* é reportada em vários artigos. Das espécies de *Baccharis*, a *Baccharis trimera* tem sido a mais estudada (RABELO; COSTA, 2018). Como apontado pelos autores, essa atividade se deve principalmente à presença de flavonoides, mas uma vez que se trata de um extrato, outras substâncias presentes poderiam também estar contribuindo para o efeito. Diante disto, o OB é um composto presente nas espécies do gênero *Baccharis* que poderia estar contribuindo para a atividade do extrato, mas há relativamente poucos estudos sobre sua atividade isoladamente.

2.3.2 Óxido baccharis

O OB é um triterpeno (figura 2) que está presente em espécies de plantas do gênero *Baccharis* (SAWAI *et al*, 2011).

Figura 2 – Estrutura do óxido baccharis



Fonte: MISSIMA *et al.*, 2010.

Enquanto há muitos estudos envolvendo extratos de espécies do gênero *Baccharis*, são poucos os estudos envolvendo o OB. Silva Filho *et al.* (2004) avaliaram a atividade tripanomicida de alguns compostos isolados de *Baccharis dracunculifolia*. O OB não foi o componente mais ativo, mas apresentou atividade moderada. Missima *et al.* (2010) avaliaram atividade imunomoduladora do extrato de *Baccharis dracunculifolia* D.C. e alguns de seus compostos isolados na ativação de macrófagos de camundongos e na produção de H₂O₂ pelos mesmos. Nesse trabalho, alguns dos compostos isolados, como o OB, apresentou aumento da produção de H₂O₂ pelos macrófagos.

2.4 O GÊNERO *Copaifera*

As espécies deste gênero são denominadas de copaíbas e são árvores de grande porte (figura 3), nativas da região tropical da América Latina e África Ocidental (NAKAMURA *et al.*, 2017), mas a diversidade de espécies encontra-se no Brasil. As copaíbas são amplamente utilizadas na medicina popular devido às propriedades farmacológicas do óleo resina, extraído do tronco de suas espécies, o qual é administrado por via oral ou tópica. Das espécies que fornecem o óleo, a *Copaifera reticulata* é a mais frequente (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018).

Figura 3 – Foto de árvores de copaíba



Fonte: PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009.

O óleo-resina apresenta atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e é usado para o tratamento de doenças respiratórias e dermatológicas (KOBAYASHI *et al.*, 2011). É um dos mais importantes remédios naturais das populações da região da Amazônia (TEIXEIRA *et al.*, 2017). O óleo resina ou decocção do tronco é usado como anti-inflamatório e contraceptivo pelos nativos da Amazônia brasileira. O uso tópico na pele é indicado para curar feridas. Massagem na cabeça alivia dores de cabeça e convulsões. A ingestão diária de duas gotas do óleo misturada com uma colher de mel é indicada para tratar inflamação, sífilis, bronquite e tosse. Ademais, o óleo de copaíba é também usado na indústria de cosméticos como fixador de fragrância (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018).

O óleo é composto de ácidos resina e de compostos voláteis (KOBAYASHI *et al.*, 2011). Dos compostos voláteis incluem muitos sesquiterpenos, como β -carofileno, α -copaeno, β -elemeno, α -humuleno e germacreno D. Além desses, há muitos diterpenos ácidos, como AC, ácido kaurenico, ácido alepterólico e ácido polialtico (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). Análises químicas têm mostrado que a predominância de compostos variam entre as espécies (KOBAYASHI *et al.*, 2011).

2.4.1 Estudos envolvendo o extrato e o óleo-resina

O óleo-resina de *Copaifera* spp. apresenta atividade anti-inflamatória, antitumoral, antisséptica, germicida, antifúngica e antibacteriana (DIEFENBACH *et al.*, 2018). Há trabalhos envolvendo o óleo-resina e o extrato da copaíba avaliando sua atividade farmacológica.

Em relação a atividade do extrato, Brancalion *et al.* (2012) reportaram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii* administrado em ratos com urolitíase apresentou níveis reduzidos de ácido úrico e na massa de cálculos. Senedese *et al.* (2013) avaliaram o efeito quimioprotetor do extrato hidroalcoólico de *Copaifera langsdorffii* em ratos com câncer no cólon. O resultado desse estudo mostrou que o grupo tratado com o extrato apresentou menor frequência de DNA danificado em relação ao grupo controle. Gushiken *et al.* (2017) administraram o extrato hidroalcoólico das folhas e óleo resina de *Copaifera langsdorffii* em feridas de pele de ratos. Realizou-se análise biomolecular e imunohistoquímica da pele dos ratos, onde evidenciou-se a ocorrência de angiogênese, epitelização, retração da ferida e mecanismos de remodelação.

Em relação à atividade do óleo-resina, Guimarães *et al.* (2016) reportaram atividade antibacteriana do óleo de *Copaifera officinalis* contra *Staphylococcus aureus* em um ensaio *in vitro*. Teixeira *et al.* (2017) avaliaram a inflamação em língua machucada de ratos após o tratamento do óleo de copaíba da espécie *Copaifera reticulata*. Foi reportado modulação do processo de inflamação através da redução de infiltrado, edema e de macrófagos. Uma revisão feita por Diefenbach *et al.* (2018) apontou que, de 11 estudos feitos com espécies de copaíba, todas apresentaram atividade antimicrobiana (bactericida e/ou bacteriostática) em ensaios *in vitro*.

O óleo de copaíba apresenta atividade imunomodulatória no tratamento da encefalomielite autoimune experimental, um tipo de esclerose múltipla em roedor (DIAS *et al.*, 2014). Neste estudo, cultura de células de camundongo tratadas *in vitro* com o óleo de copaíba apresentaram redução na produção de H₂O₂, NO, IFN- γ TNF- α and IL-17. Uma vez que a imunopatogênese da encefalomielite autoimune experimental é imunomediada principalmente por células Th1 e Th17, as quais estão relacionadas com as vias de produção das citocinas citadas, deste modo, percebe-se que o óleo de copaíba é um produto natural com potencial para tratamento desta e outras doenças autoimunes inflamatórias e desmielinizantes.

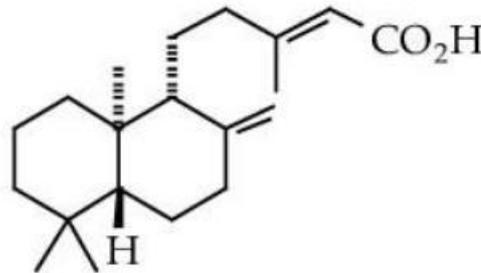
O óleo de copaíba também mostrou atividade em modelo animal de asma alérgica. Segundo o estudo de Caputo *et al.* (2020), o óleo de copaíba apresentou forte atividade antiasmática *in vivo*. O óleo foi administrado por gavagem em camundongos BALB/c previamente induzidos à asma pelo método da ovalbumina. Foi reportado redução do número de células inflamatórias no fluido broncoalveolar, supressão da produção de NO e redução da produção de IL-4, IL-5, IL-17, IFN- γ , TNF- α e anticorpo IgE, os quais estão associados a respostas imunomediadas por Th2 e Th17.

Há uma diversidade de atividades reportadas ao óleo de copaíba na literatura, o que, possivelmente, se deve a sua riqueza de constituintes com propriedades de atuar sobre o sistema imunológico. Enquanto é bem estabelecido que a sinergia entre as substâncias do óleo contribui para o seu efeito farmacológico, algumas delas apresentam atividade mesmo isoladas, como o AC, e, por isso, devem ser mais estudadas para o desenvolvimento de medicamentos.

2.4.2 Ácido copálico

O AC é um diterpeno (ALVES *et al.*, 2017) (figura 4) presente nas espécies de plantas do gênero *Copaifera* (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esta substância é um dos principais constituintes ácidos do óleo-resina das copaíferas (KOBAYASHI *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2017) e é o diterpeno majoritário (SOUZA *et al.*, 2018), e, ainda, o AC é considerado o biomarcador do gênero *Copaifera* (LEANDRO *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2017).

Figura 4 – Estrutura química do ácido copálico



Fonte: TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018.

Há muitos estudos associando o AC à atividade antimicrobiana e citotóxica. Souza *et al.* (2011) reportaram que o AC apresentou efeito antimicrobiano considerável contra *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria envolvida na periodontite, abrindo a possibilidade do uso deste em produtos de saúde oral. Abrão *et al.* (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de componentes isolados do óleo resina de *Copaifera langsdorffii*. O AC foi o composto com maior atividade antibacteriana e apresentou concentrações inibitórias mínimas promissoras contra a maioria das cepas de bactérias. Os autores avaliaram também a atividade citotóxica dos compostos em linhagens de células tumorais e, novamente, o AC demonstrou melhor atividade.

Nakamura *et al.* (2017) avaliaram a atividade antifúngica do óleo de copaíba e do AC, e ambos apresentaram grande atividade contra dermatófitos por causarem forte inibição e alterações morfológicas nas hifas. Este estudo ainda comparou diferentes frações, concluindo que o AC foi o componente mais ativo do óleo. Alves *et al.* (2017) avaliaram a atividade antitumoral e demonstraram que o AC reduziu a frequência de foco de criptas aberrantes induzido por 1,2-dimetilhidrazina em ratos

Wistar. Esta supressão da formação pode estar associada a um efeito protetor contra o câncer no cólon. Souza *et al.* (2018) avaliaram a atividade antimicrobiana do AC associado à clorexidina contra as bactérias anaeróbicas *Peptostreptococcus anaerobius* e *Actinomyces naeslundii*, e os resultados apontaram redução do número de microrganismos e erradicação de biofilme. Demonstrando essas atividades *in vitro*, esse diterpeno parece ser efetivo contra bactérias anaeróbicas.

O AC tem muitos estudos avaliando atividades farmacológicas, em sua maioria, atividade antimicrobiana. Esta substância pode também apresentar atividade antiinflamatória, a qual está muito bem descrita no óleo-resina da copaíba. Todavia, é preciso que haja estudos que investiguem esta atividade isoladamente no AC.

A descoberta de novas substâncias anti-inflamatórias poderia representar uma nova alternativa de tratamento para muitas doenças associadas a desordens imunológicas cujo tratamento se baseia no uso de imunomoduladores.

2.5 MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE COMO TRATAMENTO

Os imunomoduladores possuem mecanismos diversos, pois atuam em diferentes níveis do sistema imunológico. Podem tanto inibir como impulsionar populações de células, como linfócitos, macrófagos, neutrófilos, células NK (*natural killer*) e linfócito T citotóxico. Deste modo, afetam a produção de mediadores (i.e. citocinas). Como exemplo, existem os imunossuppressores para inibir a resposta imunológica no transplante de órgão e nas doenças autoimunes, enquanto existem imunostimulantes para aumentar a resposta imunológica contra infecções, imunodeficiência e câncer (BASCONES-MARTINEZ; MATTILA; MEURMAN, 2014).

Nas terapias contra o câncer, a imunomodulação objetiva guiar o sistema imunológico do paciente a controlar o tumor, estabilizá-lo e tem potencial de erradicar a doença, tal como faz uma classe de drogas chamada de anticorpos inibidores de *checkpoint* imunológico (NAIDOO; PAGE; WOLCHOCK, 2014). *Checkpoints* imunológicos são moléculas de superfície nas células que servem como reguladores endógenos do sistema imunológico, limitando a autoimunidade por mediar vias de sinalização co-inibitória (NIRSCHL; DRAKE, 2013). No câncer, esses caminhos no microambiente do tumor e nos linfonodos de drenagem levam a uma exaustão das células T, permitindo, assim, que o tumor escape por falta de vigilância do sistema imunológico. Assim, os anticorpos monoclonais têm como alvo *checkpoint* imunológicos que tanto antagonizam vias de co-inibição ou ativam vias co-estimulatórias, e desta forma, estimulando o sistema imunológico (NAIDOO; PAGE; WOLCHOCK, 2014). Moléculas *checkpoint* incluem CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico), PD-1 (proteína programada 1 da morte celular), LAG-3 (gene 3 de ativação linfocitária), TIM-3 (domínios de mucina e imunoglobulina de célula T) e muitos outros (NIRSCHL; DRAKE, 2013). Estudos clínicos anteriores envolvendo o bloqueio do *checkpoint* CTLA-4 (HODI *et al.*, 2010) e PD-1 (TOPALIAN *et al.*, 2012, HAMID *et al.*, 2013), em pacientes com câncer, demonstraram que essas vias possuem papel importante na manutenção da tolerância ao tumor em humanos, uma vez que o bloqueio de uma molécula *checkpoint* está associada com respostas objetivas ao tumor e maior sobrevivência. Em 2011, o inibidor de CTLA-4 foi aprovado em 2011 para o tratamento de melanoma (SALOMON *et al.*, 2018).

Na esclerose múltipla, a imunomodulação também tem sido usada como opção de tratamento. Esta é uma doença autoimune inflamatória causada por linfócitos T

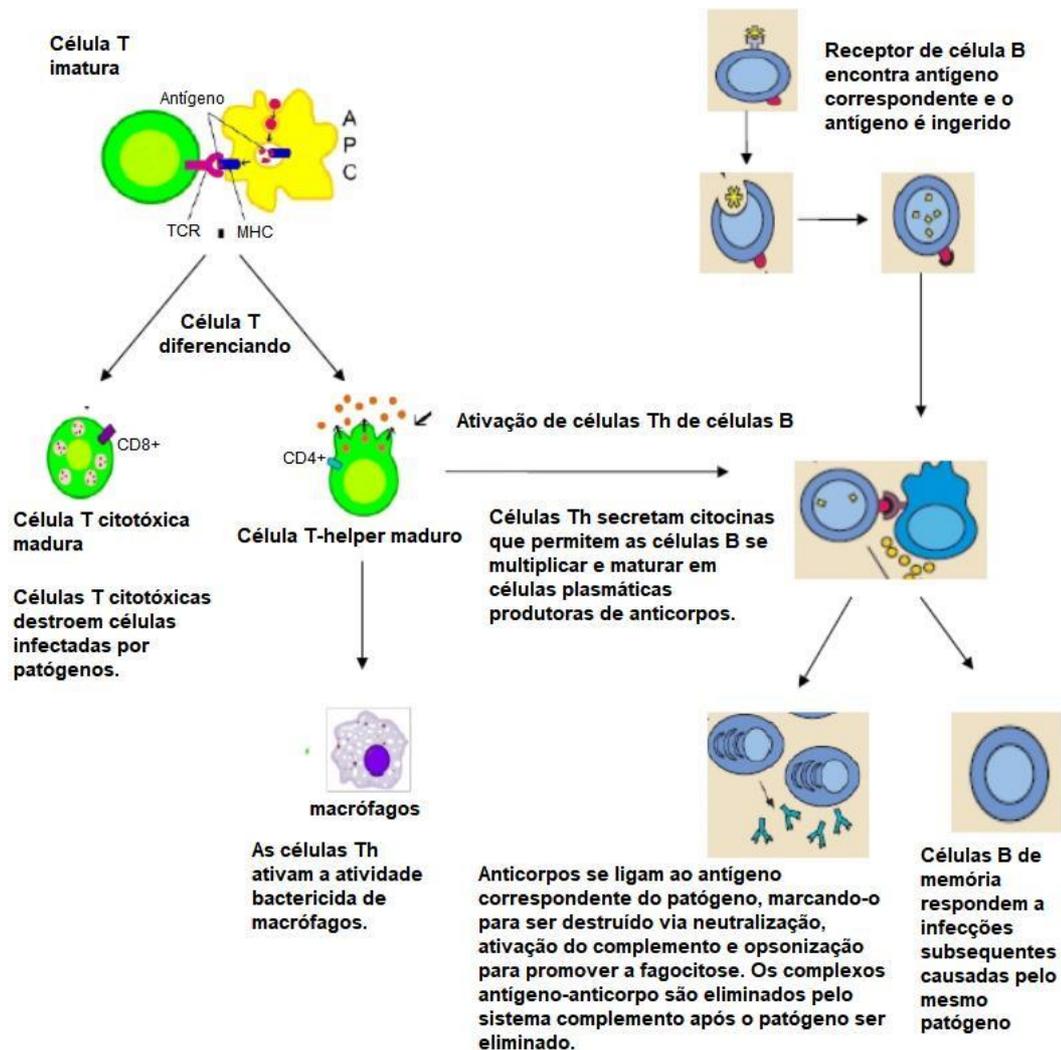
autorreativos que atacam proteínas do sistema nervoso central, resultando em inflamação, desmielinização e degeneração de axônios. Os pacientes com essa doença apresentam altos níveis, no sangue e no fluido cerebrospinal, de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , linfotóxina- α , IL-2, IL-1 β e citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-13 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), sendo este último associado à fadiga. Há vários medicamentos imunomoduladores usados para tratar a esclerose múltipla e, de uma maneira geral, seus mecanismos envolvem modular a resposta imunológica do hospedeiro como reduzir o número de células T, células B, monócitos/macrófagos, promover resposta anti-inflamatória por ativar resposta Th2, inibir a migração de linfócitos através da barreira hematoencefálica por se ligar a integrina $\alpha 4\beta 1$, entre outros. Mas apresentam muitos efeitos adversos, ainda que raros: infecção urinária e respiratória, infecções herpéticas, linfopenia, queda nos níveis de vitamina D, náusea, artralgia, febre, bradiarritmia, bloqueio atrioventricular, função renal elevada dentre outros (ALKHAMIS, 2016).

A artrite reumatoide é uma doença crônica, sistêmica, autoimune de etiologia desconhecida que envolve as articulações, predominantemente as sinoviais, podendo resultar em deformidade e destruição das mesmas. O reconhecimento de citocinas pró-inflamatórias mais expressas na artrite reumatoide, como o IL-1, IL-6 e o TNF- α possibilitou o surgimento de novas terapias tendo essas citocinas como alvos (FALEIRO; ARAÚJO, VARAVALLO, 2011). O inibidor de TNF- α foi o primeiro imunomodulador aprovado para o tratamento desta doença, e, posteriormente, surgiram outros como etanercepte e adalimumabe (PAPPAS; GERALDINO-PARDILLA; BATHON, 2011). No entanto, são medicamentos caros e, embora seguros contra artrite reumatoide, podem apresentar complicações como risco de infecções graves, como reativação de tuberculose latente (FALEIRO; ARAÚJO, VARAVALLO, 2011).

2.6 RESPOSTAS IMUNES MODULADAS

O processo inflamatório envolve diferentes células (células T, células B), enzimas, citocinas, eicosanoides e fatores de transcrição. Em um local lesado, a inflamação é iniciada pela migração de células inflamatórias dos vasos e pela liberação de mediadores, seguido do recrutamento de células inflamatórias, liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), de espécies reativa de nitrogênio (RNS) e citocinas pró-inflamatórias para eliminar patógenos estranhos, culminar a infecção e possibilitar a regeneração dos tecidos (ANDRADE; VALENTÃO, 2018).

Figura 5 – Ativação de células T e B



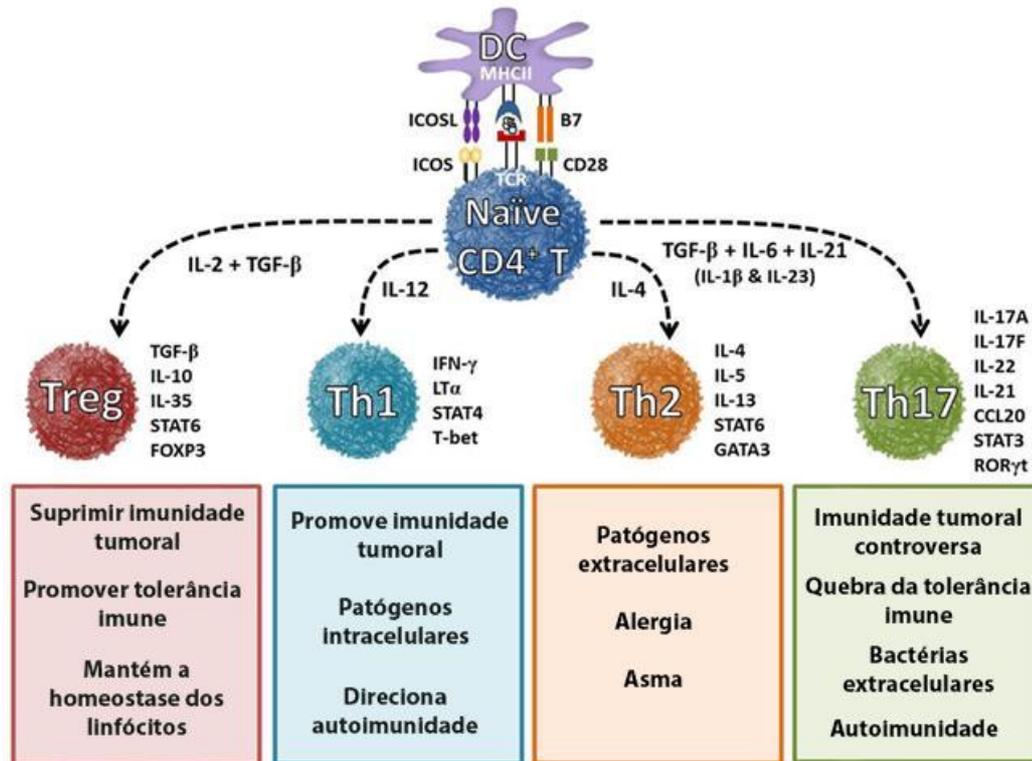
FONTE: adaptado de Marshall *et al.*, 2018.

As células T expressam em sua superfície o receptor de célula T (TCR), que se liga a antígenos (figura 5). O antígeno é apresentado por uma célula denominada célula apresentadora de antígeno (APC, do inglês, *antigen presenting cell*), que pode ser uma célula dendrítica, macrófago, células B entre outros. Após um processo de digestão, a APC apresenta este antígeno na forma de um peptídeo que estará ligado a uma molécula de MHC (complexo principal de histocompatibilidade). O complexo MHC-antígeno ativa o TCR e a célula T secreta citocinas, as quais irão controlar as respostas imunes. Esta apresentação de antígeno estimula as células T a se diferenciarem em célula T citotóxica (CD8+) ou T-*helper* (CD4+) (Th). A célula T citotóxica está envolvida no combate de vírus e células expressando antígenos estranhos (como as tumorais). São ativadas quando ocorre a ligação entre o seu TCR e um peptídeo ligado ao MHC de classe I. Essa ativação causa expansão clonal das células T que produzirão células efetoras que secretarão substâncias para induzir a célula alvo a apoptose. Ao final da infecção, a maioria das células efetoras é eliminada por fagócitos. As células Th CD4+ estão envolvidas na estabilização e intensidade da resposta imune. Elas não têm atividade citotóxica ou fagocítica e são incapazes de matar diretamente células infectadas. Porém, elas medeiam a resposta imune por direcionar outras células a executarem essas tarefas e regular o tipo de imunidade que será desenvolvido. As células Th são ativadas quando seu TCR reconhece um antígeno ligado as moléculas MHC de classe II. As células B, ao contrário das células T, podem reconhecer os antígenos diretamente, sem precisar de uma APC. A principal função das células B é produzir anticorpos e, sob determinadas circunstâncias, podem atuar como APCs. Uma vez ativadas, as células B se proliferam e diferenciam em células plasmáticas secretoras de anticorpo ou células B de memória. Os anticorpos se grudam ao agente invasor, num processo chamado de opsonização, o qual facilita a fagocitose pelos macrófagos. As células plasmáticas têm vida curta e desaparecem com a eliminação do patógeno causador da infecção. As células B de memória possuem vida longa e continuam expressando o receptor para o antígeno causador, para que respondam rapidamente e produzam anticorpos, caso haja reexposição ao antígeno (MARSHALL *et al.*, 2018).

Imediatamente após o estímulo pelo antígeno da APC, a célula Th começa a produzir IL-2 e são caracterizadas como Th0 (CHAPLIN, 2010). IL-2 promove o desenvolvimento das células T de memória e a diferenciação das células T efetoras (WATERS *et al.*, 2018). À medida que as células Th continuam em contato com o sinal

ativador, elas progridem para uma resposta diferenciada (CHAPLIN, 2010). As células Th podem executar várias respostas, sendo as mais frequentes Th1, Th2, Th17 e T_{reg} (MARSHALL *et al.*, 2018) (figura 6).

Figura 6 – Respostas Th



Fonte: BAILEY *et al.*, 2014.

2.6.1 Resposta Th1

As células Th1 produzem IL-2, IFN- γ (CHAPLIN, 2010; BHAUMIK; BASU, 2017) e TNF- α (JANTAN; AHMAD; BUKHARI *et al.*, 2015), embora este último em baixa quantidade porque é produzido principalmente por macrófagos (CHU, 2013). As células Th1 são reguladas pelo fator de transcrição t-bet (BEDOYA *et al.*, 2013; RUSS *et al.*, 2013), e, também, pelo transdutor de sinal e ativador de transcrição 4 (STAT4) (XUE *et al.*, 2019) (figura 6).

Estão envolvidas na diferenciação da resposta Th1 as citocinas da família IL-12, a qual inclui quatro citocinas: IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35. IL-12, IL-13 e IL-27 são secretadas por células apresentadoras de antígenos ativadas, enquanto IL-35 é

produzida regularmente por células T e células B. A IL-12 induz as células T CD4⁺ a se diferenciarem em Th1. IL-12 está associada à inflamação e à ativação de membros específico de STAT (transdutores de sinais e ativadores de transcrição). Embora muitas das características moleculares e funcionais da IL-12 sejam conhecidas e um pouco menos da IL-23, muito pouco se sabe da IL-27 e IL35 (SUN *et al.*, 2015).

O IFN- γ aciona a atividade bactericida dos macrófagos e melhora a imunidade antiviral, assim como contra outros patógenos. O TNF- α causa a necrose de células tumorais (um processo que envolve destruição de organelas e, finalmente, a lise) e apoptose (um processo onde a célula encolhe, forma um corpo condensado e com DNA fragmentado) (CHU, 2013). Além disso, o TNF- α ativa macrófagos, células T, células B, produz citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6), produção de quimiocinase, moléculas de adesão e inibição de células T reguladoras (SALOMON *et al.*, 2018).

As citocinas oriundas da resposta Th1 também contribuem para a diferenciação de células B para causar a opsonização de anticorpos e, assim, melhorar a eficiência dos fagócitos. A resposta Th1 inapropriada está associada com algumas doenças autoimunes (MARSHALL *et al.*, 2018).

2.6.2 Resposta Th2

As células Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (CHAPLIN, 2010; BHAUMIK; BASU, 2017) e também produz IL-10 (JANTAN; AHMAD; BUKHARI, 2015). A expressão de células Th2 está associada ao fator de transcrição GATA-3 (BEDOYA *et al.*, 2013; RUSS *et al.*, 2013), e, além deste, o STAT3 e STAT6 também estão associados à regulação da resposta Th2 (YAN *et al.*, 2016) (figura 6).

Essas citocinas estão envolvidas no desenvolvimento de células B produtoras de imunoglobulina E, e, também, como no desenvolvimento e recrutamento de mastócitos e eosinófilos, os quais são essenciais nas respostas contra muitos parasitas. Mastócitos e eosinófilos têm papel fundamental na iniciação da inflamação aguda, tal como acontece na alergia e na asma. Os anticorpos IgE estão associados às respostas alérgicas, então, um desbalanço na produção de citocinas Th2 está associado ao desenvolvimento de condições alérgicas (MARSHALL *et al.*, 2018).

As células Th1 e Th2 frequentemente participam juntas nas respostas imunes, porém, após imunização prolongada, uma resposta torna-se dominante. Geralmente, as células Th1 medeiam resposta imune enquanto as células Th2 medeiam as respostas humoral e alérgica (CHAPLIN, 2010).

2.6.3 Resposta Th17

As células Th17 produzem várias citocinas, sendo a principal IL-17 (CHAPLIN, 2010). As células Th17 são induzidas no início da resposta adaptativa a bactérias extracelulares e contribuem para o recrutamento de neutrófilos. Também está associada com respostas de inflamação, particularmente nas infecções e doenças crônicas (MARSHALL *et al.*, 2018) (figura 6).

A expressão das células Th17 está associada ao fator de transcrição ROR γ t (NORMANTON; MARTI, 2013; RUSS *et al.*, 2013). É descrito na literatura que experimentos com camundongos onde houve mutação na Foxp3 resultaram em doença autoimune linfoproliferativa fatal. Similarmente, humanos com a síndrome de desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X (IPEX) possuem mutação na Foxp3 e apresentam um conjunto de sintomas consistentes com células T_{reg} não funcionais (ZIEGLER; BUCKNER, 2009).

Th17 e IL-17 estão envolvidas em muitas doenças autoimunes como esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatoide, lúpus sistêmico eritematoso e asma. O Th17 tem sítio associado também ao diabetes tipo 1 (BEDOYA *et al.*, 2013). A IL-17 possui papel importante no curso de doenças causada por *Klebsiella pneumoniae* (CHEN *et al.*, 2016) e *Candida albicans* (MENGESHA; CONTI, 2017). Ademais, tem sido descrita a participação desta citocina na rejeição aguda em transplante de órgãos (NORMANTON; MARTI, 2013).

Enquanto sua contribuição para a inflamação e autoimunidade tem sido estabelecida sem controvérsia, seu papel na imunidade tumoral é controverso. É descrito na literatura que a Th17 combate o câncer como também é descrito que promove o tumor (BAILEY *et al.*, 2014).

A indução de células Th17 ocorre através da combinação de IL-6 e TGF β , ou IL-21 e TGF- β na ausência de IL-6. Das várias citocinas produzidas pela linhagem Th17, incluem: IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21, GM-CSF (fator estimulador de colônias de

granulócitos e macrófagos), TNF- α , IL-9, IL-10, e IFN- γ . Seus níveis são aumentados diante de IL-23, IL-1 β , TNF- α e altos níveis de sódio. Todavia, IL-25, IL-27, IL-2, SOCS3 (supressor da sinalização de citocina 3), SOCS1 (supressor da sinalização de citocina 1), vitamina D e ácido retinoico regulam negativamente as células Th17 (BEDOYA *et al.*, 2013).

2.6.4 Resposta T_{reg}

Há uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ com propriedades imunossupressoras, chamado de T_{reg} (KONDĚLKOVÁ *et al.*, 2010). Assim como as células Th17, a expressão das células T_{reg} está associada ao fator de transcrição Foxp3 (RUSS *et al.*, 2013; PLITAS; RUDENSKY, 2016). As células T_{reg} se desenvolvem naturalmente no timo com a expressão de Foxp3 ou na periferia por estímulo de TGF- β . Uma vez que TGF- β também induz a expressão de ROR γ t, então esta citocina relaciona a diferenciação das duas linhagens Th17 e T_{reg}. Contudo, na ausência de um segundo sinal de uma citocina pró-inflamatória, Foxp3 inibe ROR γ t e, deste modo, direciona a diferenciação de T_{reg}. Mas se a célula recebe um sinal de uma citocina pró-inflamatória, Foxp3 é inibida e a via de diferenciação Th17 é induzida (ZIEGLER; BUCKNER, 2009) (figura 6).

Os linfócitos T_{reg} produzem IL-10 e TGF- β , as quais têm papel na modulação da resposta imune (SHEVACH, 2018; MARSHALL *et al.*, 2018). Estes linfócitos estão envolvidos em muitas doenças humanas (alérgicas, autoimunes, inflamatórias) e seu uso em tratamentos emerge como uma possibilidade dada sua atividade funcional (PLITAS; RUDENSKY, 2016).

O CD25 é um marcador para o linfócito T_{reg} uma vez que é essencial para sua diferenciação e proliferação. Ratos sem a cadeia IL2R α ou IL2R β sofriam autoimunidade massiva, mas a mesma foi revertida ao transferir células T CD4⁺CD25. O baixo nível de T_{reg} foi associado ao baixo nível de IL-2 (MALEK *et al.*, 2002).

Uma maneira de avaliar a expressão destes genes e citocinas é através de reação de cadeia em polimerase (PCR), a qual já foi demonstrada ser um método eficaz para este fim (SHAN *et al.*, 2013). Essa técnica tem sido usada em vários trabalhos, como, por exemplo, Xu *et al.* (2011) que estudaram o balanço entre Th17 e

T_{reg} na colite e fizeram a análise de citocinas e expressão de genes por meio de PCR. BELLANGER *et al.* (2016) utilizaram a técnica de PCR para analisar a detectar e quantificar as citocinas de Th17 no fluido broncoalveolar de pacientes com pneumotite de hipersensibilidade.

2.7 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Muitas doenças inflamatórias tornaram-se comuns na sociedade do mundo todo (GAUTAM; JACHAK, 2009). A interação entre as células do sistema imunológico e agentes etiológicos estranhos é um mecanismo de defesa, mas quando a resposta ocorre excessiva ou inapropriadamente, pode lesar os tecidos do hospedeiro e resultar no surgimento de diferentes doenças imunes ou de inflamação crônica como alergia, problemas autoimunes, desordens reumatóides, cânceres e outros (JANTAN; AHMAD; BUKHARI, 2015).

O uso de drogas anti-inflamatórias apresenta as desvantagens de efeitos adversos e custos de tratamento. Alternativamente a essas drogas, têm os produtos naturais, que, uma vez eficazes e baratos, representam uma esperança para descobrir substâncias que possam ser desenvolvidas em drogas para tratar doenças inflamatórias (GAUTAM; JACHAK, 2009).

Os compostos naturais têm contribuído grandiosamente para as terapias imunomodulatórias. Desde os tempos antigos, os produtos naturais têm constituído tratamento com poucos efeitos adversos. Há muitas substâncias que são conhecidas por influenciar o sistema imunológico. Uma vez que a imunomodulação é a chave para a homeostase da estabilidade fisiológica do organismo, é importante procurar por imunomoduladores, como os derivados de produtos naturais (ORTUÑO-SAHAGÚN *et al.*, 2017).

O conhecimento que produtos naturais são uma fonte rica de descobertas terapêuticas permitiu o desenvolvimento de muitas das drogas mais usadas no mundo. Desde 1940, cerca de 73% das drogas antitumorais foram descobertas ou inspiradas em moléculas naturais. Em relação aos anti-inflamatórios, os produtos naturais tendem a agir mais sutil e amplamente que a maioria das drogas, com efeitos modestos em múltiplas etapas da cascata da inflamação ao invés de atuar em uma única etapa, como as drogas fazem (GOSSLAU *et al.*, 2011).

As plantas continuam sendo excelente fonte para a descoberta e desenvolvimento de drogas modernas. Os derivados de produtos naturais podem ser sinteticamente modificados para melhorar seu perfil farmacológico. Para que estas substâncias sejam candidatas aos testes clínicos, são necessários estudos que investiguem a atividade biológica, mecanismo de ação e a síntese de análogos (LEE, 2010).

O reconhecimento da veracidade da atividade biológica de substâncias químicas isoladas é um desafio para os produtos naturais com eficácia terapêutica. A complexidade do produto é sua característica especial que garante eficácia e ausência de efeitos adversos. Deste modo, é de extrema importância que haja estudos investigando a atividade destas substâncias através de metodologia rigorosa para que possa servir de referência para pesquisadores e para a indústria (GOSSLAU *et al.*, 2011).

Embora na literatura haja trabalhos sobre a atividade imunomodulatória do óleo de copaíba (Teixeira *et al.*, 2017; Caputo *et al.*, 2020) e do extrato de baccharis (Paul *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2012; Padua *et al.*, 2013), nas bases de dados pesquisadas (Periódico Capes, Scientific Electronic Library Online - SciELO, National Center for Biotechnology Information - NCBI, Repositório Institucional da UFJF, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações) não foram encontrados trabalhos que avaliaram a atividade imunomodulatória do AC e do OB isoladamente. Deste modo, o estudo da atividade imunomodulatória destas substâncias isoladas realizado neste estudo se mostra importante contribuição para a literatura científica, podendo descobrir substâncias com potencial atividade assim como fundamentar futuros trabalhos.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho terá como objetivo geral avaliar os efeitos imunomodulatórios *in vitro* do óxido baccharis e do ácido copálico sobre células obtidas de camundongos C57BL/6.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos citotóxicos do óxido baccharis e do ácido copálico sobre as células peritoneais de camundongos C57BL/6.
- Avaliar os efeitos do óxido de baccharis e do ácido copálico sobre a proliferação celular de esplenócitos de camundongos C57BL/6.
- Avaliar os efeitos do óxido baccharis e do ácido copálico sobre a produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α em culturas de células peritoneais de camundongos C57BL/6;
- Avaliar os efeitos do óxido baccharis e do ácido copálico sobre a produção de óxido nítrico (nitrito) em culturas de células peritoneais de camundongos C57BL/6;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram solicitados no total 20 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6 fêmeas, com 8-12 semanas. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Biofarmácia da Faculdade de Farmácia, em gaiolas com dimensão de 30 x 45 x 15 cm e em grupos de no máximo 8 animais por gaiola. Estes foram alojados em sala com temperatura ambiente 23 ± 2 °C, sob ciclo claro-escuro de 12-12h, sendo as luzes acessas às 7 h e apagadas às 19h. As mesmas tiveram livre acesso à ração e água.

Os animais foram provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório tendo sido autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG (Protocolo N° 009/2020).

O Certificado da Comissão Ética no Uso de Animais e o Parecer estão nos anexos A e B, respectivamente.

4.2 OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

As substâncias foram obtidas de forma sucinta como descrito a seguir e gentilmente cedidas para este trabalho pelo professor Ademar Alves da Silva Filho.

O AC foi isolado no Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) paralelamente no trabalho de dissertação “Isolamento do ácido caurenóico a partir dos ramos de *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) e desenvolvimento de nanocarreadores para sua incorporação” da aluna Kézia Cristine Barbosa Ferreira, orientada pelo professor Frederico Pittella Silva.

O OB foi isolado no Centro de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas em trabalho de dissertação “Caracterização química e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica in vivo do extrato hexânico e óxido de baccharis obtidos das raízes de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae)” do aluno Everton Allan Ferreira, mais a colaboração do mestrando Lucas Sales Queiroz e do aluno de iniciação científica Igor Moreira Campos, orientados pelo professor Ademar Alves da Silva Filho.

4.2.1 Ácido Copálico

Resina de copaiba foi pesada e submetida à cromatografia líquida acoplada a vácuo, gerando frações e estas foram submetidas à cromatografia em camada delgada. As frações que apontaram presença de AC segundo a cromatografia em camada delgada, foram unidas e submetidas a uma nova extração em cromatografia líquida aplicada a vácuo. Verificou-se a presença de AC na fração hexano:acetato de etila 95:5 e, a partir daí, partiu-se para extração ácido-base com solução aquosa de carbonato de sódio a 5%, obtendo-se assim o AC com cerca de 96% de pureza.

4.2.2 Óxido baccharis

Raízes secas de *Baccharis dracunculifolia* foram trituradas e extraídas, por maceração, usando n-hexano como solvente. Após o processo de extração, o n-hexano foi removido e obteve-se um extrato. Este foi submetido à cromatografia de sílica gel (40-63 mesh, Merck) sob um sistema de cromatografia líquida a vácuo (VLC, colunas de vidro com 5-10 cm) usando mistura de hexano:etilacetato em proporções crescentes como eluente, que resultou em 7 frações. A fração hexano:etilacetato

85:15 foi submetida à coluna cromatográfica com sílica gel, usando hexano:etilacetato em proporções crescentes como eluente, isolando o OB. A estrutura química do OB foi determinada por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e sua pureza foi estimada como maior que 95% por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama e pela análise da ressonância magnética nuclear ^{13}C .

4.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS PERITONEAIS E ESPLENÓCITOS

Os animais foram sedados com clorofórmio e, logo após, eutanasiados através de deslocamento cervical. Em seguida, realizaram-se os procedimentos de extração do exsudato peritoneal para obtenção de células peritoneais (macrófagos em sua maioria) e dissecação do baço para obtenção de esplenócitos (linfócito, monócito, células NK, entre outras).

4.3.1 Células peritoneais

A pele da região abdominal dos animais foi removida e feita assepsia com etanol 70% (v/v). Em seguida, foi inoculado 5 mL de tampão fosfato salina (PBS) estéril na cavidade abdominal. Após a inoculação, realizou-se massagem abdominal 30 vezes por, aproximadamente, por 30 segundos para desprendimento das células, então o líquido peritoneal foi aspirado e transferido para tubo plástico estéril do tipo Falcon.

Após a coleta, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C (Novatecnica NT 815). O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspenso em 1 mL de PBS estéril (pH = 7,4). O número de células presente no lavado peritoneal foi contado num hemocitômetro (Câmara de Neubauer). A viabilidade celular foi avaliada com azul de Tripán (0,1%). Então, foi feito ajuste do volume para obter a concentração final de $1,5 \times 10^6$ para os testes de viabilidade celular e de 2×10^6 células/mL para obter sobrenadantes para ensaio do NO e ELISA.

As células foram adicionadas em meio de cultura de célula RPMI completo – RPMI 1640 (Sigma) + estreptomicina, 50 µg/mL (Sigma); penicilina, 50 u/mL (Sigma); aminoácido não essencial, 1% v/v (Sigma); soro fetal bovino, 5% (Sigma); hepes, 1,5 mL / 500 mL de meio – 250 mM (Sigma); L. glutamina, 4 mM (Sigma) – em placa de cultura de 24 poços. Estas foram colocadas em cultura à 37 °C por 1 hora, após isto o sobrenadante foi coletado para retirar as células não aderentes. Novamente foram colocadas em cultura 37°C, agora por 24 horas a 5% de CO₂, sem ou com estímulo de lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma L2880, *Escherichia coli* O55:B5, Brasil) a 1 µg/mL com as substâncias AC e OB nas concentrações que não foram citotóxicas de acordo com o MTT.

4.3.2 Esplenócitos

O baço dos animais foi coletado de forma asséptica e, após lavagem com solução de RPMI estéril, foi macerado em 5 mL desta mesma solução e transferidos para tubos Falcon de 15 mL. Estas células foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C (Novatecnica NT 815). O botão celular foi ressuspensão em solução de cloreto de amônio 0,16M em Tris (hidroximetil) aminometano 0,17 M para causar a lise das hemácias. Este processo foi repetido até lise total das hemácias.

Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo – RPMI 1640 (Sigma) + estreptomicina, 50 µg/mL (Sigma); penicilina, 50 u/mL (Sigma); aminoácido não essencial, 1% v/v (Sigma); soro fetal bovino, 5% (Sigma); hepes, 1,5 mL / 500 mL de meio – 250 mM (Sigma); L. glutamina, 4 mM (Sigma) – a suspensão foi transferida para tubos do tipo Falcon de 15 mL para serem contadas em câmara de Neubauer. Ajustaram-se as suspensões para obter número de células igual a $1,0 \times 10^6$ células/mL e estas foram colocadas em cultura em placas 96 poços por 24 horas com ou sem estímulo, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ (Laboven L212), para a realização do teste de proliferação celular.

As culturas foram estimuladas com Concanavalina A (ConA, Sigma C2010, *Canavalia ensiformis*, Brasil) a 5 µg/mL e tratadas com AC e OB nas concentrações que não foram citotóxicas de acordo com o MTT.

4.4 DISTRIBUIÇÃO DE ANIMAIS POR PROCEDIMENTO

A quantidade de animais usados como fonte de células peritoneais e esplenócitos por cada um dos procedimentos experimentais realizados neste trabalho encontra-se detalhado na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição de animais por procedimento

Quantidade de animais	Procedimento
8 Animais	MTT e Tripan
6 Animais	ELISA
	Proliferação
	NO

4.5 VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO MTT

O efeito citotóxico *in vitro*, após tratamento com AC e OB, foi avaliado quantitativamente pelo ensaio colorimétrico do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). Neste teste, o MTT é reduzido por proteinases mitocondriais as quais são ativas apenas em células viáveis, causando a produção do sal de formazan, o qual altera a coloração do meio para roxa (MOSMANN, 1983).

As células foram quantificadas em hemocítômetro (câmara de Neubauer) e, posteriormente, o ajuste para $1,5 \times 10^6$ células/mL para as células peritoneais em meio RPMI completo – RPMI 1640 (Sigma) + estreptomicina, 50 µg/mL (Sigma); penicilina, 50 u/mL (Sigma); aminoácido não essencial, 1% v/v (Sigma); soro fetal bovino, 5% (Sigma); hepes, 1,5 mL / 500 mL de meio – 250 mM (Sigma); L. glutamina, 4 mM (Sigma). As células peritoneais foram então transferidas para placa de 96 poços de fundo chato e fundo “U”, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço.

Após o período de 2 horas para adesão das células peritoneais, o meio foi retirado e as placas foram lavadas com PBS e então os poços receberam 50 µL de OB e de AC diluído em meio RPMI completo, com 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec, Brasil), de modo a atingir as concentrações de 5 µM – 10 µM – 25 µM – 50 µM – 75 µM – 100 µM (todas em triplicata) no volume final por poço de 200 µL e, então, as placas foram incubadas novamente por períodos de 24 e 48 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ (Laboven L212).

O controle positivo (mortalidade celular) utilizado foi DMSO 2% e o controle negativo foi somente meio de cultura RPMI completo. Testou-se também o efeito de DMSO 0,1% (diluído 400 vezes), visto que nos poços da placa as substâncias estão em meio RPMI completo com DMSO nesta diluição.

Após os períodos de incubação, serão retirados os sobrenadantes e adicionados, em cada poço, 100 µL da solução de meio RPMI completo e 10 µL do reagente MTT na concentração de 5 mg/mL, mantendo a placa protegida da luz. A placa será homogeneizada e novamente incubada em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ (Laboven L212), por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram retirados e em seguida adicionados 100 µL de DMSO por poço. A placa foi agitada a 150 rpm/10 minutos e a absorbância medida em leitora de microplacas (TP Reader) no comprimento de onda de 550 nm.

4.6 VIABILIDADE CELULAR – AZUL DE TRIPAN

A citotoxicidade celular também foi avaliada pela coloração do azul de Tripán. Este é ensaio de exclusão que se baseia no fato que as células viáveis possuem membranas intactas que impedem a entrada de certos corantes, enquanto a membrana de células não viáveis ou mortas são incapazes, causando a entrada deste e corando seu interior. Este é um ensaio de exclusão que permite visualizar e distinguir no microscópio as células viáveis das não viáveis.

Para esse ensaio, as células peritoneais foram plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^6$ células/mL, em meio RPMI completo – RPMI 1640 (Sigma) + estreptomicina, 50 µg/mL (Sigma); penicilina, 50 u/mL (Sigma); aminoácido não essencial, 1% v/v (Sigma); soro fetal bovino, 5% (Sigma); hepes, 1,5 mL / 500 mL de meio – 250 mM (Sigma); L. glutamina, 4 mM (Sigma), em placas de 24 poços. Após o período de 24 horas para adesão, o meio foi retirado e as placas foram lavadas com PBS e então os poços receberam 50 µL de OB e de AC diluído em meio RPMI completo, com 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec), de modo a atingir as quantidades de 5 µM – 10 µM – 25 µM – 50 µM – 75 µM – 100 µM e receber RPMI completo para completar o volume final. O meio de cultura RPMI completo foi utilizado como controle negativo, durante o período de 24 e 48 h. Após essa etapa, as células dos poços foram desaderidas por ação da tripsina e coletadas em um microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, foi adicionado 0,4% do corante Azul de Tripán diluído em PBS (pH 7,2 -7,4) na proporção de 1:1 volume/volume (v/v) (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004). As células foram contadas na Câmara de Neubauer, sendo consideradas não viáveis quando apresentarem em seu interior a coração azul e os resultados foram obtidos pelo cálculo: células não coradas / (células coradas + não coradas) x 100 (MCGAHON *et al.*, 1995), conforme mostrado na fórmula abaixo.

$$\frac{\text{células transparentes}}{\text{células coradas} + \text{células transparentes}} \times 100\% = \text{resultado}$$

4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para o ensaio de proliferação, os esplenócitos na concentração $1,0 \times 10^6$ células/mL foram estimulados com Concanavalina A (ConA, Sigma C2010, *Canavalia ensiformis*, Brasil) a $5 \mu\text{g/mL}$ como mitógeno, e receberam os tratamentos com o AC e OB em concentrações que não apresentarem citotoxicidade. Após incubação (48 h) foram retirados os sobrenadantes e adicionados, em cada poço, $100 \mu\text{L}$ da solução de meio RPMI completo e $10 \mu\text{L}$ do reagente MTT na concentração de 5 mg/mL , mantendo a placa protegida da luz. A placa foi homogeneizada e novamente incubada em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 (Laboven L212), por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram retirados e adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de DMSO por poço. Após agitação a $150 \text{ rpm}/10$ minutos a medida da absorbância será realizada em leitora de microplacas (TP Reader) no comprimento de onda de 550 nm , como feito para os ensaios de citotoxicidade.

4.8 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO)

A produção de óxido nítrico foi verificada indiretamente pela presença de nitrito porque este é um produto de degradação do óxido nítrico. Após 24 horas o tratamento ou não com a substância isolada, conforme descrito no tópico 4.3, foi coletado 100 μ L de sobrenadante da cultura de macrófagos (células peritoneais) nos poços de microplacas com fundo chato tipo *Corning*. O sobrenadante foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente com 100 μ L do Reativo de Griess (DING *et al.*, 1988).

A absorbância foi medida utilizando-se um filtro de 540 nm em um leitor automático de microplacas (TP Reader) e a produção de NO quantificada através de comparação com uma curva padrão de nitrito em concentrações variando de 3,12 a 100 μ M, sendo os resultados expressos em mol/L.

4.9 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

As suspensões de células foram cultivadas na densidade de $2,0 \times 10^5$ /poço (células peritoneais) em meio RPMI completo – RPMI 1640 (Sigma) + estreptomicina, 50 µg/mL; penicilina, 50 u/mL; aminoácido não essencial, 1% v/v; soro fetal bovino, 5%; hepes, 1,5 mL / 500 mL de meio – 250 mM; L. glutamina, 4 mM), na estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ (Laboven L212).

As culturas foram estimuladas com LPS (Sigma, Brasil) a 1 µg/mL (macrófagos peritoneais). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e as microplacas foram sensibilizadas com um primeiro anticorpo (IL-1β, IL-6, IL-12, IL-4, IFN-γ, TNF-α) (PeProtech Inc, New Jersey), diluídos em PBS, incubados durante 16 horas a 4°C e bloqueados com PBS-Tween 20 (PBS-T) + 10% SFB, por 2 horas.

Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e, em seguida, adicionados os padrões (das citocinas citadas anteriormente) recombinante de camundongo (PeProtech Inc, New Jersey) e as amostras dos animais utilizados no modelo experimental. As placas foram então incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e o segundo anticorpo biotinilados (dos respectivos anticorpos primários) (PeProtech Inc, New Jersey) foram adicionados e incubados por mais 1 hora à temperatura ambiente.

A seguir mais quatro lavagens com PBS-T foram feitas, para adicionar o conjugado enzimático constituído do complexo streptoavidina-peroxidase, na diluição de 1/400 (SIGMA - Co, St. Louis), seguido de incubação por 1 hora. Após este período, a reação foi revelada pela adição do substrato contendo Tampão Citrato (pH 5,5), cromógeno ABTS (1 mg/mL) e água oxigenada 30% (1 µg/mL). A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 4 N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas (TP Reader) a 440 nm. As amostras foram quantificadas por comparação com as curvas padrões recombinantes (as concentrações dos anticorpos e recombinantes foram de acordo com as recomendações do fabricante PeProtech Inc, New Jersey).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo programa InStat Graphpad versão 3.0. O teste de Tukey utilizado considerou $p < 0,05$ para indicar nível de significância. Os gráficos foram desenhados pelo programa Graphpad Prism versão 9.

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE CELULAR – MTT

5.1.1 MTT das células peritoneais tratadas com AC

Em relação aos ensaios biológicos, no teste realizado com MTT não foi observada citotoxicidade do AC nas concentrações avaliadas, de 100, 75, 50, 25 10 e 5 μM em células peritoneais no período de 24 horas (Gráfico 1A) e no período de 48 horas (Gráfico 1B). Na concentração de 100 μM no período de 48 horas de incubação, nota-se uma menor absorbância frente as células, ressaltando mesmo assim que esta não foi estatisticamente significativa (Gráfico 1B).

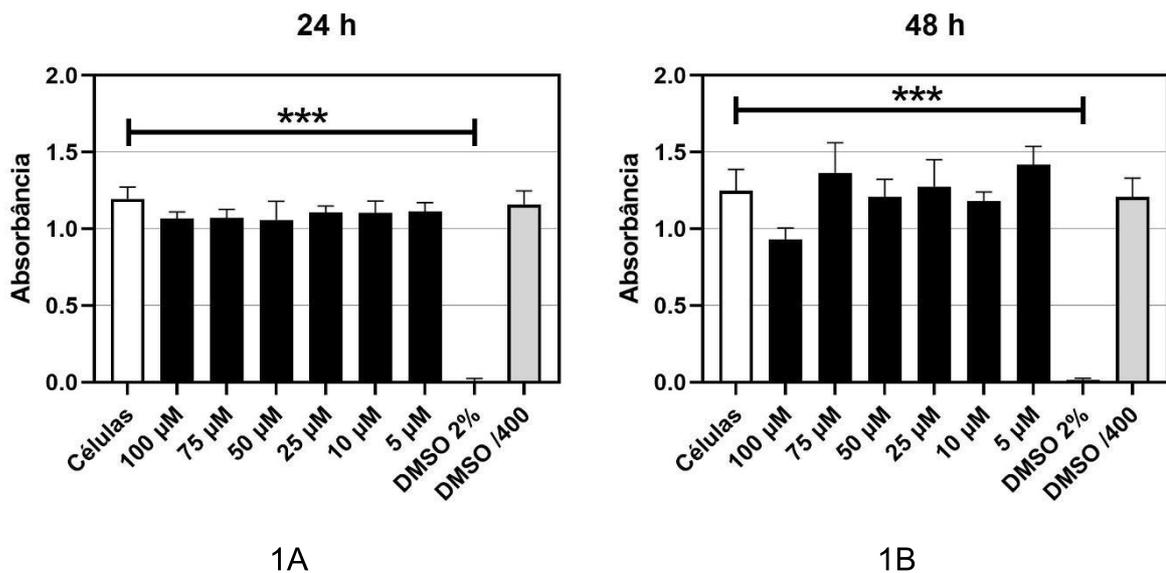


Gráfico 1. Resultado do ensaio de MTT realizado sobre as células peritoneais tratadas com AC por um período de 24 horas (Gráfico 1A) e por período de 48 horas (Gráfico 1B) nas concentrações de 100, 75, 50, 25 10 e 5 μM . Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Neste gráfico, *** = $p < 0,001$ comparado com o controle (células). Abreviatura: DMSO, dimetilsulfóxido.

5.1.2 MTT das células peritoneais tratadas com OB

Ainda no ensaio de MTT, agora com outra substância deste estudo sendo testada, os resultados do óxido de baccharis sobre as células peritoneais nos mostram não haver citotoxicidade nas concentrações avaliadas (100, 75, 50, 25 10 e 5 μM) no período de 24 e também em 48 horas (Gráfico 2A e 2B).

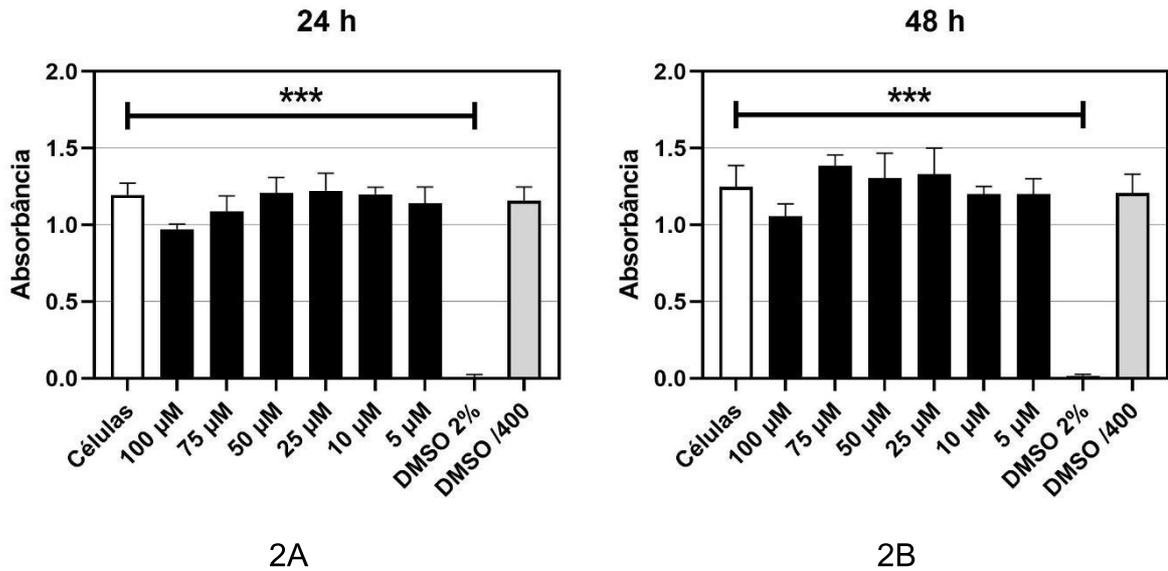


Gráfico 2. Resultado do ensaio de MTT realizado sobre as células peritoneais tratadas com OB por um período de 24 horas (Gráfico 2A) e por período de 48 horas (Gráfico 2B) nas concentrações de 100, 75, 50, 25 10 e 5 μM . Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Neste gráfico, *** = $p < 0,001$ comparado com o controle (células). Abreviatura: DMSO, dimetilsulfóxido.

5.2 VIABILIDADE CELULAR - AZUL DE TRIPAN

5.2.1 Azul de Tripan das células peritoneais tratadas com AC

Outra metodologia foi empregada para se avaliar uma concentração efetivamente segura para ensaios biológicos com células. A viabilidade celular pelo azul de Tripan nas células peritoneais frente ao AC após 24 horas de incubação foi maior que 80% em todas as concentrações testadas. Resultado um pouco diferente foi apresentado após 48 horas de exposição, onde a viabilidade manteve-se maior que 80% em todas as concentrações, exceto na concentração de 100 μM , a qual apresentou viabilidade de 76% (gráfico 3).

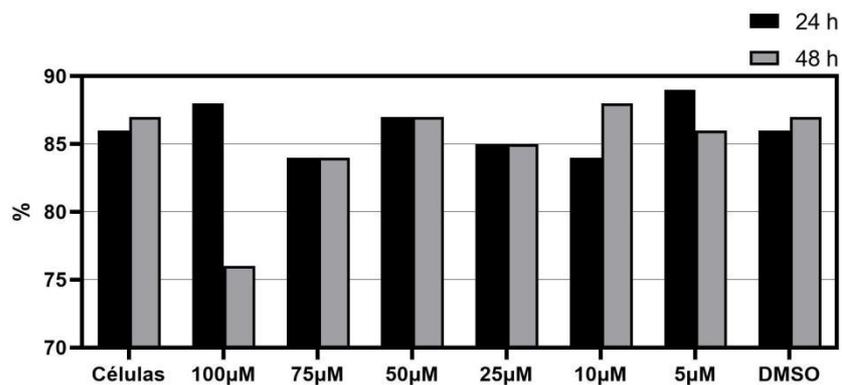


Gráfico 3. Resultado de viabilidade expresso em porcentagem do ensaio do azul de Tripan sobre as células peritoneais expostas ao AC após 24 e 48 horas nas concentrações de 100, 75, 50, 25, 10 e 5 μM . Abreviatura: h, hora; DMSO, dimetilsulfóxido.

5.2.3 Azul de Tripán das células peritoneais tratadas com OB

A viabilidade das células peritoneais avaliada pelo azul de Tripán assim como no ensaio de MTT, também foi realizada após exposição ao OB por 24 e 48 horas conforme descrito em material e métodos. O resultado apresentado no gráfico 4 mostra que após 24 horas de incubação, em todos os grupos de estudo, esta ficou entre 80 e 90% do apresentado pelas células isoladas. Após 48 horas de exposição ao óxido de baccharis, a viabilidade manteve-se entre 80 e 90% em todas as concentrações, exceto na concentração de 100 μM , a qual apresentou viabilidade de 72% (gráfico 4).

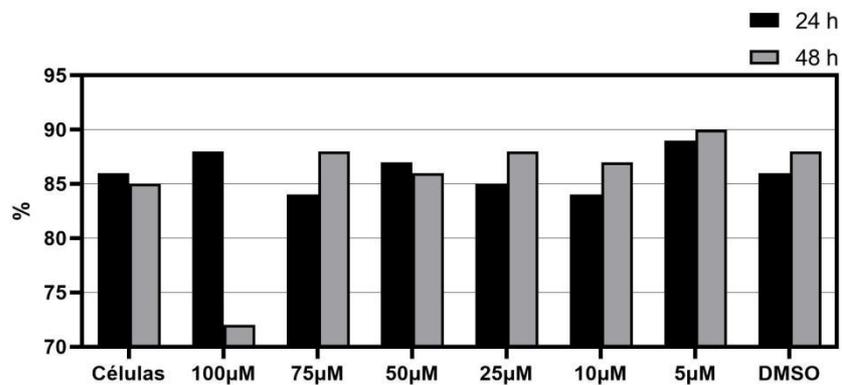


Gráfico 4. Resultado de viabilidade expresso em porcentagem do ensaio do azul de Tripán sobre as células peritoneais expostas ao OB após 24 e 48 horas nas concentrações de 100, 75, 50, 25, 10 e 5 μM . Abreviatura: h, hora; DMSO, dimetilsulfóxido.

5.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio de proliferação celular mostra que os esplenócitos estimulados com o concanavalina A (CP) proliferaram em quantidade superior ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). O AC reduziu a proliferação celular dos esplenócitos estimulados em 37% e 34% nas concentrações de 75 μM e 50 μM , respectivamente (gráfico 5). Nenhuma das concentrações testadas de OB reduziu a proliferação dos esplenócitos.

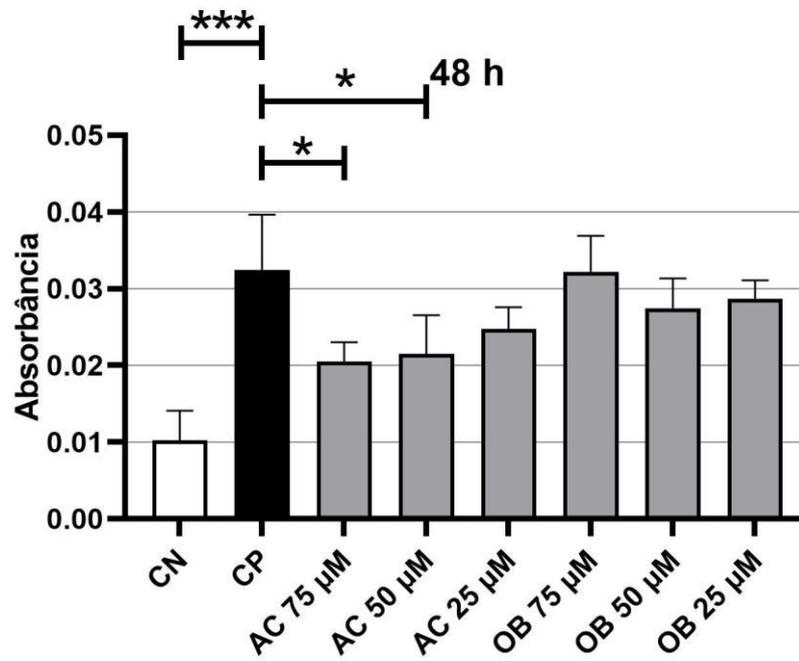


Gráfico 5. Resultado do ensaio de proliferação celular do AC e do OB sobre os esplenócitos no período de 48 horas nas concentrações de 75, 50 e 25 μM . Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Neste gráfico, * = $p < 0,05$ comparado com o controle positivo; *** = $p < 0,001$ comparado com o controle negativo. Abreviatura: CN, controle negativo; CP, controle positivo; AC, ácido copálico; OB, óxido baccharis.

5.4 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NITRITO)

Realizou-se o ensaio de NO para avaliar a produção deste composto uma vez que este é um mediador inflamatório muito presente nos processos inflamatórios. A produção de NO mostra que as células peritoneais dos animais estimuladas com o LPS (CP) apresentaram produção estatisticamente superior ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). Observando o resultado relativo ao tratamento *in vitro*, tanto o AC como o OB reduziram a produção de NO na concentração de 75 μM (gráfico 6). O AC reduziu a produção em $21,1 \pm 0,7 \%$ enquanto o OB reduziu em $18,8 \pm 0,6 \%$.

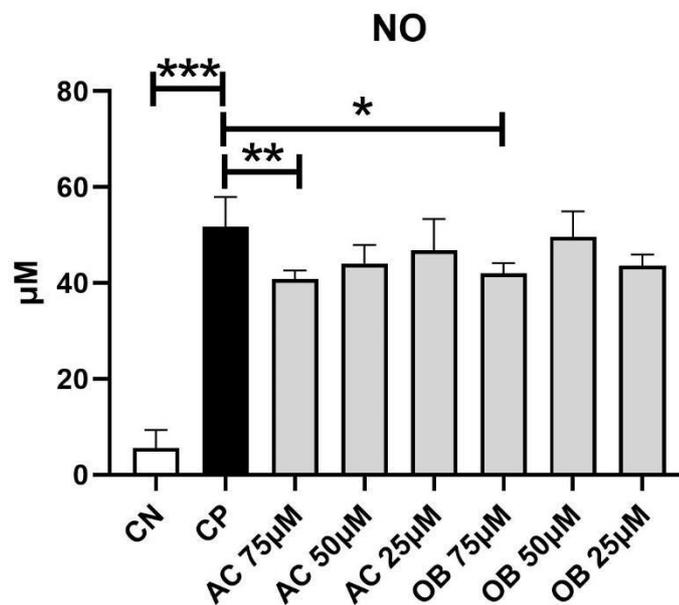


Gráfico 6. Resultado do óxido nítrico do AC e do OB sobre as células peritoneais no período de 48 horas nas concentrações de 75, 50 e 25 μM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO_2 . Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Neste gráfico, * = $p < 0,05$ comparado com o controle positivo; ** = $p < 0,01$ comparado com o controle positivo; *** = $p < 0,001$ comparado com o controle negativo. Abreviatura: CN, controle negativo; CP, controle positivo; AC, ácido copálico; OB, óxido baccharis.

5.5 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA EM CÉLULAS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6

5.5.1 Determinação de IFN- γ por ELISA

A determinação de IFN- γ por ELISA mostra que as células peritoneais dos animais estimuladas com o LPS (CP) apresentaram produção estatisticamente superior ao grupo controle negativo ($p < 0,01$). Observando o resultado relativo ao tratamento *in vitro*, não houve redução na produção de IFN- γ pelas células peritoneais tratadas com AC nem das tratadas com OB em relação ao controle positivo (gráfico 7).

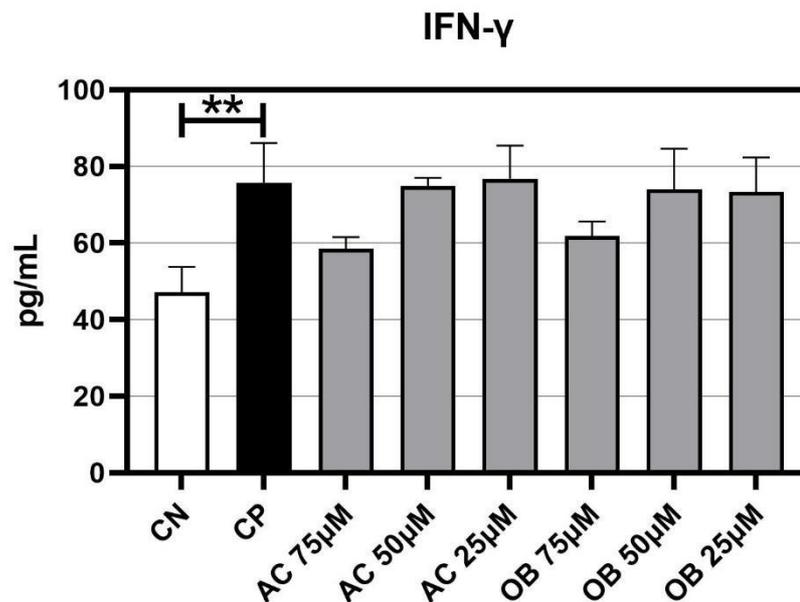


Gráfico 7. Resultado da determinação de IFN- γ por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 μM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO_2 . Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Neste gráfico, ** = $p < 0,01$ comparado com o controle negativo. Abreviatura: IFN- γ , interferon gama; CN, controle negativo; CP, controle positivo; AC, ácido copálico; OB, óxido baccharis.

5.5.2 Determinação de IL-1 β por ELISA

A determinação de IL-1 β por ELISA mostra que as células peritoneais dos animais estimuladas com o LPS (CP) apresentaram produção estatisticamente superior em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). Observando o resultado relativo ao tratamento in vitro, nas células peritoneais submetidas à concentração de 75 μM de AC, houve redução (68,8 % \pm 2,5 %) na produção de IL-1 β em relação ao grupo controle positivo, sendo esta redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$). As demais concentrações, tanto do AC quanto do óxido de baccharis, não reduziram de forma estatisticamente significativa a produção desta citocina em relação ao grupo controle positivo (gráfico 8).

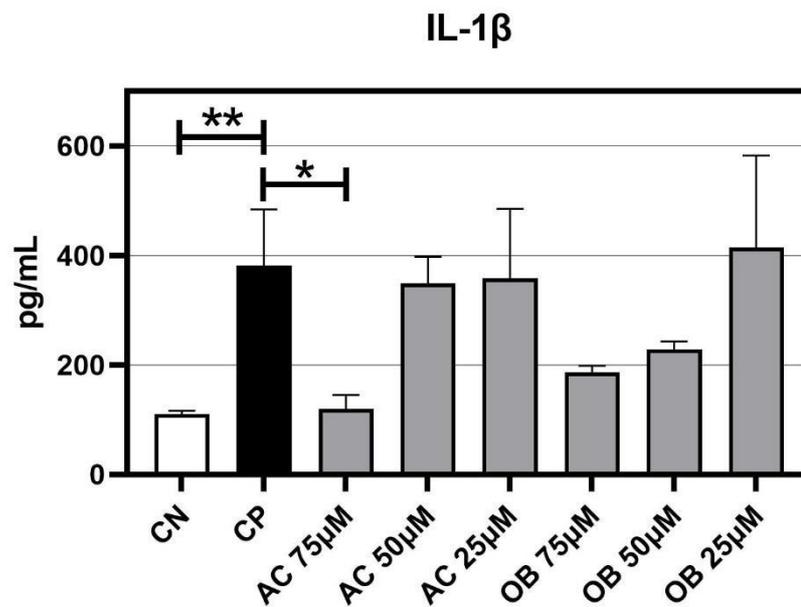


Gráfico 8. Resultado da determinação de IL-1 β por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 μM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO₂. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Neste gráfico, * = $p < 0,05$ comparado com o controle positivo, ** = $p < 0,05$ comparado com o controle negativo. Abreviatura: IL-1 β , interleucina 1-beta; CN, controle negativo; CP, controle positivo; AC, ácido copálico; OB, óxido baccharis.

5.5.3 Determinação de IL-6 por ELISA

A determinação de IL-6 por ELISA mostra que as células peritoneais dos animais estimuladas com o LPS (CP) apresentaram produção estatisticamente superior em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). Observando o resultado relativo ao tratamento in vitro, nas células peritoneais submetidas à concentração de 75 μM de AC, houve redução (54,7 % \pm 6,4 %) na produção de IL-6 em relação ao controle positivo, sendo esta redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$). As demais concentrações, tanto do AC quanto do óxido de baccharis, não reduziram de forma estatisticamente significativa a produção desta citocina em relação ao grupo controle positivo (gráfico 9).

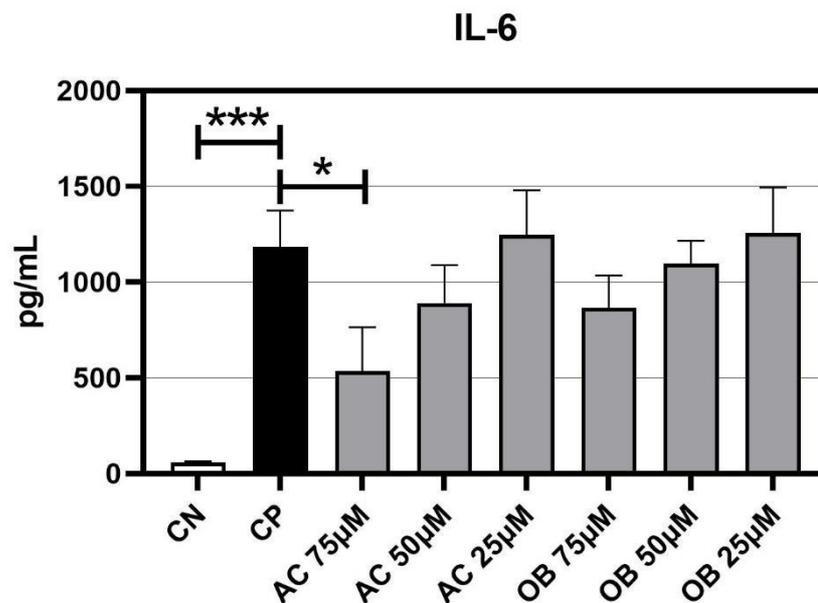


Gráfico 9. Resultado da determinação de IL-6 por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 μM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO_2 . Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Neste gráfico, * = $p < 0,05$ comparado com o controle positivo, *** = $p < 0,001$ comparado com o controle negativo. Abreviatura: IL-6, interleucina 6; CN, controle negativo; CP, controle positivo; AC, ácido copálico; OB, óxido baccharis.

5.5.4 Determinação de IL-12 por ELISA

A determinação de IL-12 por ELISA mostra que as células peritoneais dos animais estimuladas com o LPS (CP) apresentaram produção estatisticamente superior ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). Observando o resultado relativo ao tratamento *in vitro*, nas células peritoneais submetidas à concentração de 75 μM e 50 μM de AC, houve redução (37,8 % \pm 4,8 %) na produção de IL-12 em relação ao controle positivo, sendo esta redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$). As demais concentrações, tanto do AC quanto do óxido de baccharis, não reduziram de forma estatisticamente significativa a produção desta citocina em relação ao grupo controle positivo (gráfico 10).

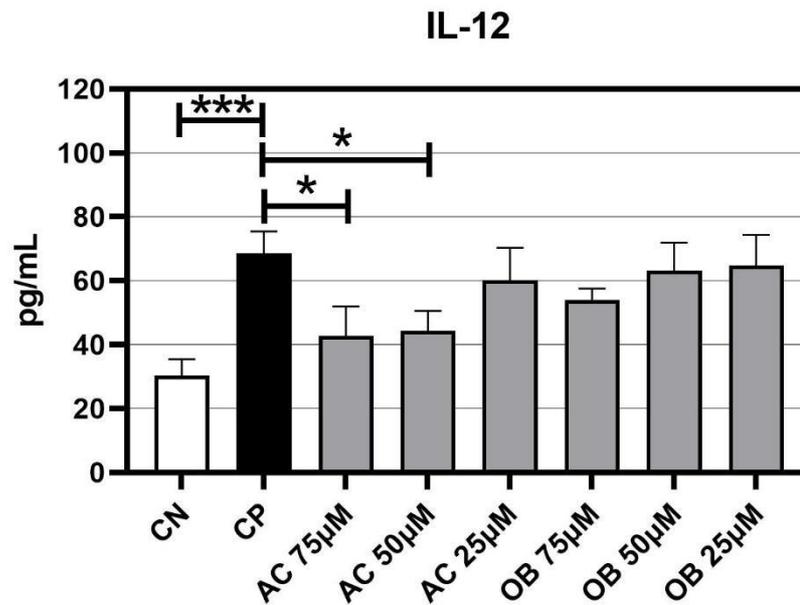


Gráfico 10. Resultado da determinação de IL-12 por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 μM incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO_2 . Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Neste gráfico, * = $p < 0,05$ comparado com o controle positivo, *** = $p < 0,001$ comparado com o controle negativo. Abreviatura: IL-12, interleucina 12; CN, controle negativo; CP, controle positivo; AC, ácido copálico; OB, óxido baccharis.

5.5.5 Determinação de TNF- α por ELISA

A determinação de TNF- α por ELISA mostra que as células peritoneais dos animais estimuladas com o LPS (CP) apresentaram produção estatisticamente superior ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). Observando o resultado relativo ao tratamento *in vitro*, não houve redução na produção de TNF- α pelas células peritoneais tratadas com AC nem nas tratadas com OB em relação ao controle positivo (gráfico 11).

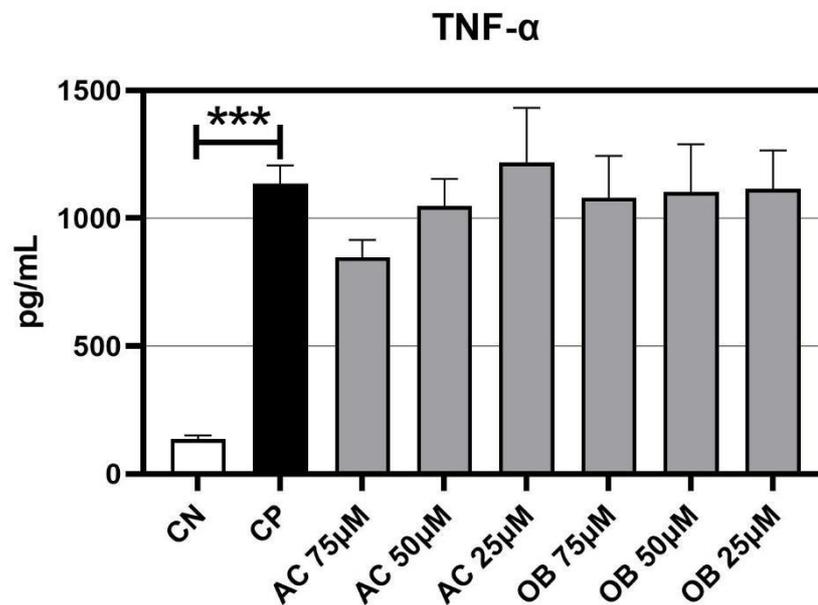


Gráfico 11. Resultado da determinação de TNF- α por ELISA nas células peritoneais estimuladas com LPS na concentração de 1 μ g/mL e tratadas com AC ou OB nas concentrações de 25, 50 e 75 μ M incubadas por 48 horas à 37°C à 5% de CO₂. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Neste gráfico, *** = $p < 0,001$ comparado com o controle negativo. Abreviatura: TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; CN, controle negativo; CP, controle positivo; AC, ácido copálico; OB, óxido baccharis.

6 DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MTT E PELO AZUL DE TRIPAN

Os testes de viabilidade celular ou testes de citotoxicidade são testes que avaliam a viabilidade de células através da análise quantitativa e/ou qualitativa de sua atividade celular. Estes testes são importantes para triar moléculas e concentrações destas que sejam tóxicas para as células e possam leva-las à morte. Muitos testes de viabilidade celular estão disponíveis como MTT, XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) e Tripán, entre outros.

No ensaio do MTT, todas as concentrações de AC e OB nas células peritoneais apresentaram coloração roxa nos períodos de 24 e 48 horas. Esta alteração de cor acontece por causa de proteinases mitocondriais, as quais são ativas somente em células viáveis, foram capazes de reduzir o MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]) ao sal de formazan e, a produção deste, ocasionou o surgimento da coloração roxa. A intensidade da cor roxa pode ser medida por absorbância e comparada com controle (sem exposição à substância) para quantificar a viabilidade celular.

Apesar do AC não ter apresentado toxicidade para as células peritoneais (gráfico 1), entretanto, no período de 48 horas (gráfico 1B), a concentração de 100 μM apresentou redução de 25,6% de células viáveis em relação ao controle e, embora a diferença não seja estatisticamente significativa, segundo Longo (2013), a redução maior que 20% do número de células viáveis é indício de toxicidade.

Em trabalho recente de Souza e Lima (2020) envolvendo um derivado do AC, o 3-ibuprofenil ácido copálico na concentração 10 μM reduziu a viabilidade celular de monócitos humanos. Embora seja um derivado e outro tipo de célula diferente deste trabalho, mas este resultado mostra que a alteração de uma molécula com um radical pode tornar a molécula estudada mais tóxica e, assim, menos suscetível a aplicação em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

O OB apresentou comportamento similar ao do AC no que diz respeito. Nas células peritoneais, o OB também não reduziu a viabilidade celular destas (gráfico 2). Nas bases de dados pesquisadas, não foram encontrados estudos envolvendo MTT do OB os quais pudessem ser usados para comparação.

No ensaio do azul de Tripán, avalia-se a viabilidade celular pela integridade da membrana das células. Uma vez expostas à substância estudada e, posteriormente, expostas ao azul de Tripán, as células viáveis mantêm sua membrana intactas e podem ser visualizadas no microscópio como células não coradas. Em contrapartida, as células que tiveram a membrana danificada são consideradas inviáveis e podem ser visualizadas no microscópio como células coradas, uma vez que o corante foi capaz de penetrar pela membrana para entrar no citoplasma.

No período de 24 horas, a viabilidade celular foi de >80% para todas as células expostas as substâncias, enquanto no período de 48 horas, a viabilidade celular foi de >70% para a concentração de 100 μM e manteve-se >80% nas concentrações menores. A literatura estabelece que o azul de Tripán tem baixa exatidão quando a viabilidade celular for menor que 80% (CHAN; RICE; QIU, 2020).

Diferentemente do nosso trabalho, Alves et al. (2017) encontram que hepatócitos de camundongo Swiss tratados com AC apresentaram viabilidade celular maior que 95% no ensaio do azul de Tripán. Porém, no referido trabalho, ele não cita qual concentração utilizou. Tamanha variação em relação ao nosso resultado poderia estar associada ao tipo celular trabalho, o qual envolveu hepatócitos de rato, enquanto no presente trabalho envolveu macrófagos de camundongo.

Nos ensaios de citotoxicidade do presente trabalho, apesar de tanto o AC como o OB apresentarem seguros nas concentrações testadas, optou-se por testar as concentrações inferiores a 100 μM . No ensaio de MTT, verificou-se redução maior que 20% no número de células viáveis nesta concentração, o que é indício de toxicidade. No ensaio do azul de Tripán, a viabilidade caiu para menos de 80% após 48 horas na concentração de 100 μM , o que compromete a exatidão deste ensaio. Sendo assim, as concentrações escolhidas para os ensaios imunomodulatórios foram de 75, 50 e 25 μM .

6.2 AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio de proliferação celular avalia o potencial multiplicativo das células estimuladas diante da exposição a uma substância que pressupostamente irá inibir tal atividade. Assim, verifica-se que a substância estudada pode apresentar atividade imunomodulatória quando ocorre redução da proliferação celular, que é um dos mecanismos ativados durante as respostas imunológicas.

O AC apresentou efetivo antiproliferativo de células estimuladas nas concentrações mais altas, 75 e 50 μ M. Uma vez que o AC é um dos componentes do óleo-resina de copaíba, o resultado deste ensaio pode justificar também a propriedade anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba, a qual é muito bem descrita na literatura (KOBAYASHI *et al.*, 2011; GUSHIKEN, 2017; DIEFENBACH *et al.*, 2018). Outrossim, não se pode deixar de considerar que outros componentes do óleo também possuem tal atividade farmacológica e, deste modo, contribuem sinergicamente para a ocorrência do mesmo.

O OB não apresentou atividade antiproliferativa e esta atividade também não foi percebida em estudos anteriores que avaliaram a substância isoladamente (MISSIMA *et al.*, 2010). Embora haja trabalhos que evidenciaram a atividade anti-inflamatória no extrato de espécies do gênero *Baccharis* (PAUL *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012; PADUA *et al.*, 2013), no presente trabalho, a substância isolada OB não apresentou atividade antiproliferativa (gráfico 5). De acordo com o observado no presente estudo, a propriedade anti-inflamatória do extrato em tais estudos possivelmente está associada a outra(s) substâncias que não seja o OB, pelo menos pelo testado nas condições de nosso estudo.

6.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O NO é um composto presente tanto nas vias inflamatórias como anti-inflamatórias. Como mediador pró-inflamatório, sua produção é aumentada nos locais inflamados para estimular a vasodilatação a qual promove o recrutamento de células.

Conforme pode ser observado no gráfico 6, ambas substâncias reduziram a produção de NO nas células peritoneais estimuladas na concentração de 75 μ M, sendo a redução maior pelo AC. Em relação ao controle positivo, o AC reduziu a produção de NO em $21,1 \pm 0,7$ % enquanto o óxido bádcharis reduziu em $18,8 \pm 0,6$ %.

A atividade de inibição do NO *in vitro* pelo AC já foi reportada na literatura. Um estudo envolvendo diterpenos de *Copaifera* spp. (VARGAS *et al.*, 2015), dentre eles o AC, verificou-se que este inibiu a produção de NO ($98,5\% \pm 1.3\%$) na concentração 100 μ M em diferentes linhagens de células tumorais humanas. Em um trabalho envolvendo derivados do AC, o ácido 3-acetóxi-copálico e ácido 3-hidróxi-copálico, estes reduziram a produção de NO em macrófagos RAW264.7 entre 40-70% na concentração 100 μ M (MEDEIROS, 2019).

A menor porcentagem de redução obtida no ensaio deste trabalho em relação aos estudos citados anteriormente pode estar associada a concentração menor, uma vez que se usou 75 μ M enquanto ambos trabalhos citados usaram 100 μ M. Outros fatores que muito provavelmente contribuíram também foram as células utilizadas e/ou por utilizar substância derivada. De qualquer maneira, está claramente demonstrado na literatura o efeito inibitório sobre a produção de NO que o AC, e seus derivados, têm.

O efeito inibitório sobre a produção de NO evidenciado no presente trabalho pode justificar a ocorrência desta atividade do óleo de copaíba já reportada na literatura. Caputo *et al.* (2020) mostraram que o óleo de copaíba reduziu a produção de NO em células do pulmão de camundongos BALB/c modelo de asma alérgica tratados com óleo de copaíba na concentração 50 e 100 mg/kg. Veiga Junior *et al.* (2017) avaliaram esta atividade do óleo de copaíba em diferentes espécies de *Copaifera* e em todas elas verificou-se a inibição da produção de NO em macrófagos peritoneais de ratos, sendo a *Copaifera multijuga* Hayne a mais potente por inibir a 5 μ g/mL enquanto *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke inibiu na concentração 50 μ g/mL e *Copaifera reticulata* Duck inibiu na concentração 500 μ g/mL.

A produção de NO é muito investigada porque esta molécula é um dos mediadores mais versáteis do sistema imunológico, mediando respostas pró e anti-inflamatórias. O NO está envolvido em doenças infecciosas, degenerativas, tumores, processos autoimunes e doenças crônico-degenerativas (BOGDAN, 2001; PAVANELLI *et al.*, 2010).

Num cenário de inflamação, o NO apresenta uma variedade de efeitos sobre os leucócitos, os quais incluem transcrição gênica, replicação, síntese de proteínas e secreção. Além disso, a produção de NO aumenta em consequência das células da imunidade inata que produzem espécies reativas de NO para combater agentes invasores. Outro efeito pró-inflamatório do NO é induzir a vasodilatação, a qual promove maior recrutamento de células sanguíneas. Num cenário de homeostase, o NO medeia reações de homeostase anti-inflamatória, inibição da adesão de neutrófilos, da produção de citocinas, reabsorção de osteoclastos e previne a autoimunidade (GUTIERREZ *et al.*, 2009).

A produção de NO ocorre por ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a qual é expressa constitutivamente e também induzida em um número de células epiteliais (MARTÍNEZ-RUIZ, 2015). A expressão da iNOS é regulada primariamente por citocinas. Outrossim, há uma lista de fatores de transcrição associados à sua expressão, dos quais incluem: NF- κ B, STAT-1, fator regulador de interferon-1 e fator nuclear de interleucina-6. Além disso, o próprio NO influencia sua produção: em baixa concentração, ativa a NF- κ B de macrófagos; em alta concentração, apresenta efeito oposto, o que previne a superprodução (BOGDAN, 2001; PAVANELLI *et al.*, 2010).

6.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINA POR ELISA

A avaliação da produção de citocinas por ELISA permite quantificar a produção entre os grupos teste e os grupos controle. Após submetter as células ao estímulo por LPS mais o AC ou OB nas concentrações de interesse, as citocinas são quantificadas através de espectrofotometria e faz-se a análise estatística.

O LPS foi capaz de estimular a produção de citocinas com sucesso, como pode ser visto nos gráficos 7 a 11, o controle positivo foi maior significamente que o controle negativo em todas as citocinas ($p < 0,01$ para IFN- γ , $p < 0,05$ para IL-1 β , $p < 0,001$ para IL-6, IL-12, TNF- α). Qi *et al.* (2012), Xu *et al.* (2014), Xie *et al.* (2019) também conseguiram estimular a produção de citocinas em macrófagos peritoneais após exposição com LPS.

O AC na concentração de 75 μ M reduziu a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-12 (gráficos 8, 9, 10) (sendo a produção desta última reduzida também na concentração de 50 μ M). No entanto, não reduziu a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α (gráfico 7 e 11). Diferente do encontrado na redução de IL-6 no presente trabalho (54,7 % \pm 6,4 %) (gráfico 9), Vargas *et al.* (2015) obtiveram redução da produção (4.2% \pm 1.8%) desta citocina na concentração de 25 μ M para células peritoneais estimuladas com LPS. A redução menor em comparação ao nosso estudo pode ser devido a menor concentração utilizada por Vargas. Esses achados com o AC podem representar um dos mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória promovida pelo óleo de copaíba, a qual é muito bem descrita na literatura (DIAS *et al.* 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2017). Embora este trabalho não tenha avaliado a produção de IL-10, o qual está envolvido na supressão da resposta imunomodulatória, em estudo anterior o AC elevou a produção deste (VARGAS *et al.*, 2015).

Muitas citocinas participam nos processos inflamatórios de muitas doenças (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019), como as citocinas estudadas no presente estudo. Por isso, faz-se necessário a busca por substâncias que sejam capazes de modulá-las. Uma vez demonstrado que o AC é capaz de reduzir a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-12 *in vitro* (gráficos 8, 9 e 10), este apresenta potencial para tratar muitas doenças associadas a essas citocinas.

A interleucina-1 β (IL-1 β) é uma citocina pró-inflamatória que atua na diferenciação de células linfóides e sua concentração elevada está associada a

doenças autoimunes, inclusive o papel de IL-1 já foi validado por inibidores em ensaios clínicos já aprovados pelo FDA (OWYANG *et al.*, 2011). No útero pós-parto, a inflamação é um evento comum e crucial para o reparo do tecido, mas nos bovinos, algumas vacas falham na resolução desta inflamação e resulta na endometriose, podendo comprometer a fertilidade. Já foi demonstrado que essa inflamação está associada a expressão de IL-1 β e que, assim, esta citocina é um potencial alvo para o tratamento desta doença (KELLY; MEADE; O'FARRELLY, 2019). Em um estudo que avaliou a participação da caspase-1/IL-1 β na patogênese da Doença de Alzheimer, demonstrou-se que IL-1 β pode ser alvo no tratamento desta doença (GU *et al.*, 2021).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória que atua tanto na resposta imune inata como adaptativa. Tem enorme papel na indução da febre (ao nível do hipotálamo), na resposta inflamatória aguda e na liberação de proteínas de fase aguda pelo fígado, atua em receptores específicos da membrana das células estimulando a produção de citocinas e estimulam o crescimento dos linfócitos B (FAVALLI, 2020). Em um estudo que investigou o tratamento da Doença de Crohn, o autor demonstrou em um modelo de colite murina que o bloqueio de IL-6 com o anticorpo para o receptor de IL-6 anulou a resistência a apoptose das células T da lâmina própria, suprimiu a expressão de moléculas de adesão e previniu a inflamação intestinal. Ainda, ele investigou a aplicação clínica do inibidor e verificou-se que 80% dos pacientes que foram tratados tiveram uma melhora clínica significativa a uma taxa de 31% se comparada com o placebo (ITO, 2005). Na artrite reumatoide, a IL-6 apresenta papel chave na inflamação crônica. O bloqueio do receptor de IL-6 com os anticorpos monoclonais tocilizumab e sarilumab mostraram-se um importante avanço no tratamento da doença, trazendo melhoras nas manifestações extra-articulares e até mesmo no controle da glicemia, densidade óssea, cansaço e humor (FAVALLI, 2020).

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina pró-inflamatória que atua na diferenciação de células T virgens em células Th1, estimula a produção de IFN- γ e subsequente ativação de macrófagos. Também estimula a produção de TNF- α a partir das células NK. IL-12 tem papel essencial na ação antiangiogênica e na resposta Th1 contra o câncer (LU, 2017). Essa citocina está envolvida em todos os tipos de células killer T citotóxica e T-*helper* (células NK, TCD4+, TCD8+) que são cruciais para o desenvolvimento e progressão do câncer (MA *et al.*, 2019). Na patologia da Doença

de Alzheimer, caracterizada por uma suprarregulação de citocinas inflamatórias, dentre elas, a IL-12. Demonstrou-se num modelo de camundongo, que a inibição da via de sinalização de IL-12 mitigou a amiloidose cerebral (BERG *et al.*, 2012). Na psoríase, há uma suprarregulação de citocinas a nível local e sistêmico com papel crucial na patogênese da doença. Existe uma relação entre a severidade da doença e a concentração de IL-12, entre outras citocinas, no sangue dos pacientes (ARICAN *et al.*, 2005), deste modo, a redução da produção desta citocina poderia significar melhora nas manifestações clínicas da doença. Todavia, enquanto há doenças autoimunes causadas por superprodução de IL-12, há aquelas onde se almeja esta produção justamente por causa da resposta Th1 citotóxica que esta desencadeia. Em um estudo envolvendo ratos infectados com o vírus influenza, aqueles que receberam administração intranasal de IL-12 foram mais resistentes no combate à doença (HIROKI *et al.*, 2016). Em estudo anterior, avaliaram-se os efeitos da imunoterapia com IL-12 no combate a células cancerígenas residuais que podem surgir após a imunossupressão de um tratamento do tumor primário. Utilizando ratos F344 que foram tratados com IL-12 e inoculados com as células tumorais MADB106, evidenciou-se maior atividade de células NK e aumento da quantidade circulante destas, o que pode se aproximar de um potencial efeito profilático de proteção da metástase pós-cirurgia (SCHWARTZ *et al.*, 2008).

O OB não reduziu a produção de nenhuma das citocinas avaliadas. Essa ocorrência segue a mesma direção com o resultado do ensaio de proliferação realizado, cujas concentrações de OB não reduziram a proliferação celular dos esplenócitos estimulado. Assim, demonstrou-se no presente trabalho que o OB não possui atividade imunomodulatória *in vitro*. Corroborando este achado, não foram encontrados na literatura evidências que o OB apresenta atividade imunomodulatória. Apesar de alguns trabalhos na literatura evidenciarem a atividade anti-inflamatória do extrato de *Baccharis* (PAUL *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012; PADUA *et al.*, 2013), a partir dos resultados obtidos no presente trabalho não se pode atribuir tal atividade ao óxido de baccharis.

7 CONCLUSÃO

Conforme apresentado nos resultados, nos ensaios de toxicidade, tanto o AC como o OB foram seguros nas concentrações testadas. No ensaio de proliferação, o AC apresentou inibição em 50 e 75 μM . Na produção de NO, o AC apresentou inibição em 75 μM e o OB em 75 μM . Na produção de citocinas, o AC em 75 μM inibiu IL-1 β , IL-6, IL-12 e em 50 μM inibiu IL-12.

Portanto, nos ensaios *in vitro* realizados neste estudo, diante do que podemos concluir, o ácido copálico apresenta potencial atividade imunomodulatória. Esses achados corroboram a atividade anti-inflamatória descrita do óleo de copaíba, uma vez que o ácido copálico é um de seus componentes principais. O óxido baccharis não demonstrou atividade imunomodulatória nos ensaios *in vitro* realizados neste trabalho. Embora na literatura está descrito que o extrato de *Baccharis* apresenta efeito anti-inflamatório, muito provavelmente o efeito se deve a outras substâncias que não sejam o óxido baccharis. Mais estudos são necessários para confirmar esta potencial atividade do ácido copálico e também para descobrir outras potenciais atividades do óxido baccharis, este último tão pouco estudado na literatura.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, F. *et al.* *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 443, 2015.
- AL-KHAMIS, F. A. The use of immune modulating drugs for the treatment of multiple sclerosis. **Neurosciences**, v. 21, n. 1, p. 4-9, 2016.
- ALVES, J. M. *et al.* *Copaifera multijuga* oleoresin and its constituent diterpene (-)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. **Mutation Research**, v. 819, p. 26-30, 2017.
- AMIRGOHORFRAN, Z. Herbal medicines for immunosuppression. **Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology**, v. 11, n. 2, p. 111-119, 2012.
- ANDRADE, V. A.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; COUTINHO-SILVA, R. Concepções discentes sobre imunologia e sistema imune humano. **Investigações em Ensino de Ciências**, v. 21, n. 3, pp. 01-22, 2016.
- ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P. Insights into Natural Products in Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 644, 2018.
- ARICAN, O. Serum Levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, Article ID 201561, p. 273-279, 2005.
- ASSAF, A. M.; AL-ABBASSI, R.; AL-BINI, M. Academic stress-induced changes in Th1- and Th2-cytokine response. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, p. 1237-1247, 2017.
- AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1321, 2016.

BAGATINI, J. A. *Baccharis articulata* L. **Flora Digital**. 2018. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php&especie=317> Acesso em: 14 abr. 2020

BAILEY, S. R. *et al.* Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, Article 276, 2014.

BASCONES-MARTINEZ, A.; MATILA, R.; MEURMAN, J. H. Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 19, n. 1, e24-e31, 2014.

BASSO, B. S. *et al.* Therapeutic effect of *Baccharis anomala* DC. extracts on activated hepatic stellate cells. **EXCLI Journal**, v. 18, p. 91-105, 2019.

BEDOYA; S. K. *et al.* Th17 Cells in Immunity and Autoimmunity. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, Article ID 986789, 2013.

BELLANGER, A. *et al.* Positive Fungal Quantitative PCR and Th17 Cytokine Detection in Bronchoalveolar Lavage Fluids: Complementary Biomarkers of Hypersensitivity Pneumonitis? **Journal of Immunological Methods**, v. 434, p. 61-65, 2016.

BERG, J. V. *et al.* Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. **nature medicine**, v. 18, n. 12, 2012.

BHAUMIK, S.; BASU, R. Cellular and Molecular Dynamics of Th17 Differentiation and its Developmental Plasticity in the intestinal immune Response. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 254, 2017.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1483-1495, 2014.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BRANCALION, A. P. *et al.* Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. **Urological Research**, v. 40, n. 5, p. 475-481, 2012.

BUDEL, J. M. *et al.* Essential Oils of Five *Baccharis* Species: Investigations on the Chemical Composition and Biological Activities. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2620, 2018.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, supl. 3, e20190105, 2019.

CANDÉIAS, S. M.; GAIPL, U. S. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 101-107, 2016.

CAPUTO, L. S. *et al.* Copaiba Oil Suppresses Inflammation in Asthmatic Lungs of BALB/c Mice Induced With Ovalbumin. **International Immunopharmacology**, v. 80, 2020.

CARVALHO, L. S. A. *et al.* Parthenolide Modulates Immune Response in Cells From C57BL/6 Mice Induced With Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Planta Medica**, v. 83, n. 8, p. 693-700, 2017.

CHAN, L. L.; RICE, W. L.; QIU, R. Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PloS One*, v. 15, n. 1, e0227950, 2020.

CHAPLIN, D. D. Overview of the Immune Response. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 152 (2 Suppl 2), S3-23, 2010.

CHE; C.; ZHANG, H. Plant Natural Products for Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019.

CHEN, K. *et al.* IL-17 Receptor Signaling in the Lung Epithelium Is Required for Mucosal Chemokine Gradients and Pulmonary Host Defense against *K. pneumoniae*. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 5, p. 596-605, 2016.

CHU; W. Tumor Necrosis Factor. **Cancer Lett**, v. 328, n. 2, p. 222-225, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRONKITE, D. A.; STRUTT, T. M. The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, article ID, 2018.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-226, 2012.

DIAS, D. S. *et al.* Copaiba Oil Suppresses Inflammatory Cytokines in Splenocytes of C57BL/6 Mice Induced with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12814-12826, 2014.

DIEFENBACH, A. L. *et al.* Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 4, p. 586-596, 2018.

DING, A. H. *et al.* Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **American Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 177, 2013.

ELSAYED, E. A. *et al.* Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. **Mediators of Inflammation**, 2014.

FALEIRO, L.R., ARAÚJO, L. H. R., VARAVALLO, M. A. The Anti-TNF- α therapy in the rheumatoid arthritis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 77-94, 2011.

FAVALLI, E. G. Understanding the Role of Interleukin-6 (IL-6) in the Joint and Beyond: A Comprehensive Review of IL-6 Inhibition for the Management of Rheumatoid Arthritis. **Rheumatology Therapy**, v. 7, p. 473-516, 2020.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, 163-169, 1965.

FRATTARUOLO, L. *et al.* Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Flavanones from *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) Leaf Phytocomplexes: Identification of Licoflavanone as a Modulator of NF- κ B/MAPK Pathway. **Antioxidants**, v. 8, p. 186, 2019.

GAUTAM, R. JACHAK, S. M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 5, p. 767-820, 2009.

GOSSLAU, A. *et al.* The Importance of Natural Product Characterization in Studies of Their Anti-Inflammatory Activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 1, p. 74-82, 2011.

GU, X. *et al.* Caspase-1/IL-1 β represses membrane transport of GluA1 by inhibiting the interaction between Stargazin and GluA1 in Alzheimer's disease. **Molecular Medicine**, v. 27:8, doi: 10.1186/s10020-021-00273-8, 2021.

GUIMARÃES, A. L. *et al.* Antimicrobial Activity of Copaiba (*Copaifera officinalis*) and Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) Oils against *Staphylococcus Aureus*: Importance in Compounding for Wound Care. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 20, n. 1, p. 58-62, 2016.

GUIMARÃES-SANTOS, A. Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

GUSHIKEN, L. F. S. *et al.* Skin Wound Healing Potential and Mechanisms of the Hydroalcoholic Extract of Leaves and Oleoresin of *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze in Rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, Article ID 6589270, 2017.

GUTIERREZ, F. R. S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 (Suppl. I), p. 236-245, 2009.

HAMID, O. *et al.* Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 2, p. 134-144, 2013.

HERRERA-MARTÍNEZ, M. *et al.* Screening of antitopoisomerase, antioxidant, and antimicrobial activities of selected triterpenes and saponins. **Revista latino-americana de química**, v. 40, n. 3, 2012.

HIROKI, I. *et al.* The protective effects of intranasal administration of IL-12 given before influenza virus infection and the negative effects of IL-12 treatment given after viral infection. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 9, p. 1487-1496, 2016.

HODI, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p. 711-723, 2010.

HOU, J. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Aurantio-Obtusin from Seed of *Cassia obtusifolia* L. through Modulation of the NF- κ B Pathway. **Molecules**, v. 23, p. 3093, doi:10.3390, 2018.

HUANG, B. *et al.* Licochalcone A Prevents the Loss of Dopaminergic Neurons by Inhibiting Microglial Activation in Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Parkinson's

Disease Models. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 18, v. 10, p. 2043, 2017.

ITO, H. Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody. **Journal of Gastroenterology**, v. 40, (Suppl XVI), p. 32-34, 2005.

JANTAN; I. AHMAD, W. BUKHARI, S. N. A. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 655, 2015.

JULIER, Z. *et al.* Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 13-28, 2017.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 6008, 2019.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 43, n. 2, 2016.

KEOGAN, D. M.; GRIFFITH, D. M. Current and Potential Applications of Bismuth-Based Drugs. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 15258-15297, 2014.

KELLY, P.; MEADE, K. G.; O'FARRELLY, C., 2019. Non-canonical Inflammasome-Mediated IL-1 β Production by Primary Endometrial Epithelial and Stromal Fibroblast Cells Is NLRP3 and Caspase-4 Dependent. **frontiers in Immunology**, v. 10, Article 102, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00102>, 2019.

KINGSTOM, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

KOBAYASHI, C. *et al.* Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306-313, 2011.

KONDĚLKOVÁ, K. *et al.* Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 53, n. 2, p. 73-77, 2010.

LEANDRO, L. M. *et al.* Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.

LEE, K. Discovery and Development of Natural Product-derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 3, p. 500-516, 2010.

LONGO, D. L. **Avaliação da citotoxicidade e expressão de citocinas induzidas por resina composta fotopolimerizável**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

LU, X. Impact of IL-12 in Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 17, n. 8, p. 682-697, 2017.

MA, X. *et al.* Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Research 2015**, v. 4 (F1000 Faculty Rev), p. 1465, 2019.

MALEK, T. R. *et al.* CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. **Immunity**, v. 17, p. 167-178, 2002.

MARSHALL, J. S. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14 (Suppl 2), p. 49, 2018.

MARTINEZ, M. J. A.; BESSA, A. L.; BENITO, P. B. Biologically active substances from the genus *Baccharis* (Compositae). **Studies in Natural Products**, v. 30, p. 703-759, 2005.

MARTÍNEZ-RUIZ, A. Post-Translational Nitric Oxide-Dependent Modifications In Immune System. **Redox Biology**, v. 5, p. 418-419, 2015.

MATHEMA, V. B. *et al.* Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities. **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 560-565, 2012.

MCGAHON, A. J. *et al.* The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *in Vitro*. **Methods in Cell Biology**, v. 46, n. C, p. 153-174 , 1995.

MEDEIROS, G. M. Isolamento, síntese e avaliação da atividade biológica de diterpenos do tipo labdano. 2019. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Juiz de Fora – *campus* Governador Valadares.

MENGESHA, B. G.; CONTI, H. R. The Role of IL-17 in Protection against Mucosal *Candida* Infections. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 52, 2017.

MISSIMA, F. *et al.* Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 463-468, 2010.

MOHAMED, S. I. A.; JANTAN, I. HAQUE, A. Naturally occurring immunomodulators with antitumor activity: An insight on their mechanisms of action. **International Immunopharmacology**, v. 50, p. 291-304, 2017.

MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs? **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 12, p. 1475-1489, 2011.

MOSMANN, T. 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.

NAIDOO, J.; PAGE, D. B.; WOLCHOK, J. D. Immune modulation for cancer therapy. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 12, p. 2214-2219, 2014.

NAKAMURA, M. T. *et al.* Copaiba Oil and Its Constituent Copalic Acid as Chemotherapeutic Agents against Dermatophytes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, 2017.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, 2012.

NICHOLSON, L. B. The immune system. **Essays in Biochemistry**, v. 60, p. 275-301, 2016.

NISAR, B.; SULTAN, A.; RUBAB, S. L. Comparison of Medicinally Important Natural Products versus Synthetic Drugs-A Short Commentary. **Natural Products & Chemistry Research**, v. 6, n. 2, 2017.

NIRSCHL, C. J.; DRAKE, C. G. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 18, p. 4917-4924, 2013.

NORMANTON, M.; MARTI, L. C. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. **Einstein**, v. 11, n. 2, p. 237-246, 2013.

OLIVEIRA, C. B. *et al.* Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1113-1123, 2012.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Effect of the *Copaifera langsdorffii* Desf. Leaf Extract on the Ethylene Glycol-Induced Nephrolithiasis in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

ORTUÑO-SAHAGÚN, D. *et al.* Natural Immunomodulators. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, Article ID 7529408, 2017.

OWYANG, A. M. *et al.* XOMA 052, a potent, high-affinity monoclonal antibody for the treatment of IL-1 β -mediated diseases. **MAbs**, v. 3, n. 1, p. 49-60, 2011.

PADUA, C. B. *et al.* Baccharis trimera improves the antioxidant defense system and inhibits iNOS and NADPH oxidase expression in a rat model of inflammation. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 975-984, 2013.

PAPPAS, D. A.; GERALDINO-PARDILLA, L.; BATHON, J. M. Immune modulation of rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 6, p. 873-889, 2011.

PAVANELLI, W. R. *et al.* The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 14, n. 6, 2010.

PAUL, E. L. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. **Inflammation**, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2009.

PHAM, J. V. *et al.* A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, Article 1404, 2019.

PELAIA, G. *et al.* Cellular Mechanisms Underlying Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, 2009.

PLITAS; G. RUDENSKY, A. Y. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. **Cancer Immunology Research**, v. 4, n. 9, p. 721-725, 2016.

POLITANO, A. D. *et al.* Use of Silver in the Prevention and Treatment of Infections: Silver Review. **Surgical Infection**, v. 14, n. 1, p. 8-20, 2013.

QI, J. *et al.* microRNA-210 negatively regulates LPS-induced production of proinflammatory cytokines by targeting NF- κ B1 in murine macrophages. *FEBS Letter*, v. 586, n. 8, p. 1201-1207, 2012.

RABELO, A. C. S.; COSTA, D. C. A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. **Chemico-biological Interactions**, v. 296, p. 65-75, 2018.

REZENDE, T. P. *et al.* Protective effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves extract against carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental animals. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9257-9272, 2014.

ROCHA E SILVA, M. *et al.* Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **The American Journal of Physiology**, v. 156, n. 2, p. 261-273, 1949.

RUSS, B. E. *et al.* T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. **Frontiers in Genetics**, v. 4, Article 218, 2013.

SALOMON, B. L. *et al.* Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. **Frontiers in Immunology**, v. 9, Article 444, 2018.

SANTOS, D. A. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 543-550, 2010.

SAWAI, S. *et al.* Molecular characterization of an oxidosqualene cyclase that yields shionone, a unique tetracyclic triterpene ketone of *Aster tataricus*. **FEBS Letters**, v. 585, n. 7, p. 1031-1036, 2011.

SCHWARTZ, Y. *et al.* Prophylactic IL-12 treatment reduces postoperative metastasis: mediation by increased numbers but not cytotoxicity of NK cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 107, n. 2, p. 211-223, 2008.

SENEDESE, J. M. *et al.* Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1,2-dimethylhydrazine-induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 13, n. 1, p. 3, 2013.

SENFF-RIBEIRO, A. *et al.* Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 91, n. 2, p. 297-304, 2004.

SHAN, X. *et al.* Establishment and Preliminary Application of a Quantitative Real-Time PCR Method for Detecting the Transcriptions of Th1/Th2 Cytokines in RAW264.7 Cells. **Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology**, v. 29, n. 4, p. 430-433, 2013.

SHEVACH, E. M. Foxp3⁺ T regulatory cells: still many unanswered questions—aperspective after 20 years of study. **Frontiers Immunology**, v. 9, p. 1048, 2018.

SILVA FILHO, A. A. *et al.* *In-vitro* Trypanocidal Activity Evaluation of Crude Extract and Isolated Compounds From *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1195-1199, 2004.

SILVA FILHO, A. A. *et al.* Antimicrobial Activity of the Extract and Isolated Compounds From *Baccharis Dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 63, n. 1-2, p. 40-46, 2008.

SOSTRES, C. *et al.* Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121-132, 2010.

SOUZA; A. B. *et al.* Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9611-9619, 2011.

SOUZA, F. C.; LIMA, E. S. Synthesis, Characterization and in vitro, in vivo and in silico Anti-Inflammatory Studies of the Novel Hybrid Based on Ibuprofen and 3-Hydroxy-Copalic Acid Isolated from Copaiba Oil (*Copaifera multijuga*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, n. 7, p. 1335-1344, 2020.

SOUZA, M. G. M. *et al.* ent-Copalic acid antibacterial and anti-biofilm properties against *Actinomyces naeslundii* and *Peptostreptococcus anaerobius*. **Anaerobe**, v. 52, p. 43-49, 2018.

SUN, L. *et al.* Interleukin 12 (IL-12) Family Cytokines: Role in Immune Pathogenesis and Treatment of CNS Autoimmune Disease. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 249-255, 2015.

TEIXEIRA, F. B. *et al.* Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 313, 2017.

TRINDADE, R.; SILVA, J. K.; SETZER, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1511, 2018.

TOPALIAN, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2443-2454, 2012.

VARGAS, F. S. *et al.* Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194-6210, 2015.

VEIGA JUNIOR, V. F. *et al.* Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.

VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, n. 4, p. 200-201, 2012.

VESLEY, M. D. *et al.* Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 235-271, 2011.

WANG, K. *et al.* Natural Products as Targeted Modulators of the Immune System. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, Article ID 7862782, 2018.

WATERS, R. S. *et al.* The effects of interleukin-2 on immune response regulation. **Mathematical Medicine and Biology: a Journal of the IMA**, v. 35, n. 1, p. 79-119, 2018.

WRIGHT, G. D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 55-57, 2019.

XIE, J. *et al.* IGF2BP1 promotes LPS-induced NF κ B activation and pro-inflammatory cytokines production in human macrophages and monocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 513, n. 4, p. 820-826, 2019.

XU, J. *et al.* Stat4 Is Critical for the Balance between Th17 Cells and Regulatory T Cells in Colitis. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6597-6606, 2011.

XU, Y. *et al.* MicroRNA-93 inhibits inflammatory cytokine production in LPS-stimulated murine macrophages by targeting IRAK4. **FEBS Letter**, v. 588, n. 9, p. 1692-1698, 2014.

XUE, Y. *et al.* Silencing of STAT4 Protects Against Autoimmune Myocarditis by Regulating Th1/Th2 Immune Response via Inactivation of the NF- κ B Pathway in Rats. **Inflammation**, v. 42, n. 4 p. 1179-1189, 2019.

YAN, D. *et al.* STAT3 and STAT6 signaling pathways synergize to promote cathepsin secretion from macrophages via IRE1 α activation. **Cell Reports**, v. 16, n. 11, p. 2914-2927, 2016.

ZHANG, J. *et al.* GSPE Inhibits HMGB1 Release, Attenuating Renal IR-Induced Acute Renal Injury and Chronic Renal Fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, pii: E1647, 2016.

ZIEGLER, S. F.; BUCKNER, J. H. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 594-598, 2009.

ANEXO A – Certificado da Comissão Ética no Uso de Animais



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA**

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 30/06/2020, analisou o protocolo nº. 009/2020 intitulado “Estudo das propriedades imunomodulatórias do extrato bruto e constituintes isolados a partir do extrato bruto de espécime vegetal”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de José Otávio do Amaral Corrêa, a ser realizado no período de 20/07/2020 a 20/07/2022. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 24 camudongos C57Bl/6 machos com 5 a 7 semanas de vida, projeto a ser realizado na Faculdade de Farmácia - UFJF. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 009/2020-CEUA about “Estudo das propriedades imunomodulatórias do extrato bruto e constituintes isolados a partir do extrato bruto de espécime vegetal”, under responsibility of José Otávio do Amaral Corrêa, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 06/30/2020. For the development of this research 24 males of C57Bl/6 mice with 5 to 7 weeks old, will be delivered as requested in the period of 07/20/2020 to 07/20/2022. The Project will be performed at Faculdade de Farmácia - UFJF. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora, 20 de julho de 2020.

Coordenadora
CEUA

Vice-Coordenadora
CEUA

ANEXO B – Parecer



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS -CEUA**

PARECER

O protocolo nº09/2020 intitulado “Estudo das propriedades imunomoduladoras do extrato bruto e constituintes isolados a partir do extrato bruto de espécime vegetal.”, sob a responsabilidade do Coordenador(a) José Otavio do Amaral Corrêa recebido em 24/06/2020, foi avaliado na reunião de 30/06/2020 e **aprovado**.

O Certificado definitivo será enviado posteriormente.

Juiz de Fora, 01 de Julho de 2020.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José Otavio do Amaral Corrêa'.

Coordenação CEUA-UFJF

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ana Carolina'.

Vice- Coordenação CEUA-UFJF