

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

Ludmila de Souza Caputo

Atividade do óleo de copaíba no modelo de asma alérgica experimental induzido por ovalbumina em camundongos BALB/c

Juiz de Fora

2018

Ludmila de Souza Caputo

Atividade do óleo de copaíba no modelo de asma alérgica experimental induzido por ovalbumina em camundongos BALB/c

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa
Coorientador: Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Junior

Juiz de Fora

2018

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

de Souza Caputo, Ludmila.

Atividade do óleo de copaíba no modelo de asma alérgica experimental induzido por ovalbumina em camundongos BALB/c / Ludmila de Souza Caputo. -- 2018.

119 f. : il.

Orientador: José Otávio do Amaral Corrêa

Coorientador: Olavo dos Santos Pereira Junior

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. Asma. 2. Fitoterapia. 3. Terapia imunomoduladora. 4. Agentes anti-inflamatórios. I. do Amaral Corrêa, José Otávio, orient. II. dos Santos Pereira Junior, Olavo, coorient. III. Título.

**Atividade do óleo de copaíba no modelo de asma alérgica
experimental induzido por ovalbumina em camundongos
BALB/c**

Ludmila de Souza Caputo

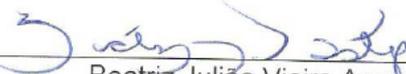
ORIENTADOR: José Otávio do Amaral Corrêa

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 31/07/2018



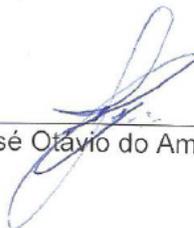
Chislene Pereira Vanelli



Beatriz Julião Vieira Aarestrup



Olavo dos Santos Pereira Junior



José Otávio do Amaral Corrêa

Dedico este trabalho a todos os indivíduos portadores de asma cuja qualidade de vida é prejudicada em detrimento da doença e a todos os profissionais da ciência que investem seu tempo e sua energia na busca pela melhoria de todo e qualquer recurso ou bem social.

AGRADECIMENTOS

Os últimos dois anos foram especiais por terem me conduzido a um lugar, até então longe de ser alcançado. A ajuda dos amigos, fez desse caminho uma jornada tangível e uma lembrança inesquecível! Por isso, venho agora agradecer a cada uma dessas pessoas que contribuíram para a concretização deste projeto:

Agradeço então a Deus, por me proporcionar inspiração e aguçar minha curiosidade pela ciência!

Aos meus pais, sou grata por acreditarem que meu esforço e dedicação me levariam a caminhos repletos de conhecimento. Obrigada pelo incentivo e também pelo investimento!

À família, ao Guto, ao meu namorado Lucas e também aos meus amigos, por compreenderem minha ausência em casa, compartilharem de cada uma das minhas conquistas e dividirem meus anseios.

Às profas. Beatriz, Maria Inês e ao Prof. Ademar, pelo exemplo profissional, pelos ensinamentos, por toda a disponibilidade e pelo grande auxílio na obtenção dos materiais no ICB, no CBR, ou por meio de parcerias externas.

À Dra. Chislene, pela contribuição na organização dos dados.

Aos funcionários e responsáveis de todos os laboratórios da Faculdade utilizados neste estudo. Muito obrigada pela acolhida!

A todos os colaboradores da Universidade que facilitaram tanto o meu trabalho e tornaram a convivência pelos corredores certamente mais agradável!

Aos colegas, em especial ao Álvaro e a Júlia, sem os quais talvez este trabalho não seria completo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela possibilidade da realização desse projeto.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Ao prof. Olavo, meu coorientador, pelo seu bom humor contagiante, amizade e por toda a colaboração para que este trabalho tivesse forma!

Por fim, agradeço especialmente, ao prof. José Otávio, no qual eu pude me espelhar ao longo desses dois anos! Que me compreendeu e me ensinou como ninguém a ser um profissional da ciência. Que me motiva, se preocupa com as minhas causas e dedica todo seu tempo em prol do conhecimento! Obrigada pela credibilidade e por compartilhar comigo as suas ideias!

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória alérgica das vias aéreas, considerada um problema de saúde pública, capaz de causar sofrimento significativo e altos custos para as famílias e para os sistemas de saúde. Problemas relacionados à dificuldade de acesso ao tratamento, além de baixa adesão e risco de baixa responsividade, em certos casos, justificam a pesquisa de novos compostos com propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias, mais acessíveis e de baixo custo. O óleo de copaíba (OC) é uma alternativa renovável, de origem natural, já amplamente utilizada na medicina popular com atividade anti-inflamatória, mas ainda não estudada para o tratamento desta doença. Através do modelo de asma alérgica com ovalbumina (OVA), que permite a indução das principais respostas das células T auxiliares (TH) envolvidas nesta inflamação, investigamos os efeitos do OC em camundongos BALB/c. O óleo essencial investigado teve sua composição verificada por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-FID) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS). Testes para toxicidade hepática, renal ou efeitos glicêmicos foram realizados nos camundongos empregando-se o OC por gavagem nas dosagens a serem utilizadas na investigação, 50 mg/kg e 100 mg/kg. Após a indução da asma alérgica, o potencial anti-inflamatório do OC foi avaliado pela contagem total e diferencial das células inflamatórias no lavado traqueal, pela produção de óxido nítrico (NO) e pela concentração das citocinas relacionadas a patogênese da asma alérgica, interleucina-4 (IL-4), interleucina-17 (IL-17), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), no lavado traqueal e no macerado pulmonar. Análises histopatológicas e histomorfométricas também foram realizadas em amostras pulmonares. A análise dos resultados obtidos mostrou que o tratamento com OC atenuou significativamente os sinais inflamatórios, reduzindo a contagem de células inflamatórias presentes no lavado traqueal, suprimindo a produção de NO e reduzindo a resposta mediada por células T, envolvidas na doença. Nos animais tratados houve também redução do infiltrado inflamatório no tecido pulmonar, com redução da área de parênquima alveolar. Não foi possível, entretanto, correlacionar um efeito dose-reposta devido ao fato de não serem demonstradas diferenças estatísticas entre as duas doses utilizadas (50 e 100 mg/Kg) na maioria dos resultados. Com base no exposto, este estudo concluiu ser o OC uma substância promissora no tratamento da asma, sendo ainda necessários estudos mais aprofundados para a elucidação completa do seu efeito no organismo.

Palavras-chave: Asma. Fitoterapia. Terapia imunomoduladora. Agentes anti-inflamatórios.

ABSTRACT

Asthma is an inflammatory allergic disease of the airways, considered a public health problem, capable of causing significant suffering and high costs for families and for health systems. Problems related to the difficulty of access to treatment besides low adherence and risk of low responsiveness in certain cases, justify the research of new compounds with anti-inflammatory and immunomodulatory properties, including accessible and low cost. Copaiba oil (OC) is a renewable alternative of natural origin widely used in folk medicine with anti-inflammatory activity but not yet studied for the treatment of this disease. Through the model of allergic asthma with ovalbumin (OVA), which allows the induction of the main T helper cells (TH) responses involved in this inflammation, we investigated the effects of OC in BALB/c mice. The essential oil investigated had its composition verified by gas chromatography with flame ionization detector (CG-FID) and gas chromatography coupled to the mass spectrometer (CG-MS). Tests for hepatic, renal, or glycemic effects toxicity were performed in the mice using OC by gavage at the dosages to be used in the investigation, 50 mg/kg and 100 mg/kg. After the induction of allergic asthma, the anti-inflammatory potential of OC was evaluated by the total and differential count of the inflammatory cells in the tracheal lavage, nitric oxide (NO) production and concentration of cytokines related to the pathogenesis of allergic asthma, interleukin-4 (IL-4), IL-17, interferon- γ (IFN- γ), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the tracheal lavage and pulmonary maceration. Histopathological and histomorphometric analysis were also performed on pulmonary samples. The analysis of the results showed that the OC treatment significantly attenuated the inflammatory signals, reducing the count of inflammatory cells present in the tracheal lavage, suppressing NO production and reducing the T cell-mediated response involved in the disease. In the treated animals there was also a reduction of the inflammatory infiltrate in the lung tissue, with reduction of the alveolar parenchyma area. It was not possible, however, to correlate a dose-response effect due to the fact that statistical differences between the two doses (50 and 100 mg/kg) were not demonstrated in most of the results. Based on the above, this study concluded that OC is a promising substance in the treatment of asthma, and further studies are needed to fully elucidate its effect on the body.

Keywords: Asthma. Herbal Therapy. Immunomodulatory Therapy. Anti-Inflammatory Agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração da anatomia pulmonar, vias aéreas normais e vias aéreas com asma....	20
Figura 2 - Subconjuntos de células TCD4 ⁺ envolvidos na asma alérgica.....	32
Figura 3 - Fase de sensibilização ao alérgeno.....	34
Figura 4 - Resposta imune minutos após a exposição ao alérgeno.....	36
Figura 5 - Resposta imune horas após a exposição ao alérgeno.....	42
Figura 6 - Vias de sensibilização e desafio mais utilizadas em camundongos para indução da asma alérgica.....	49
Figura 7 - Características físicas das Copaiibeiras e demonstração da coleta da oleorresina..	54
Figura 8 - Média (\pm D.P.) da concentração plasmática após a administração oral de <i>trans</i> -cariofileno livre em ratos Sprague-Dawley.....	64
Figura 9 - Incidências de corte e áreas selecionadas para análise em cada amostra do experimento.....	67
Figura 10 - Morfometria automática do parênquima.....	68
Figura 11 - Esquema da metodologia empregada para verificação do efeito anti-inflamatório do OC na asma alérgica.....	69
Figura 12 - Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de copaíba pesquisado.....	71
Figura 13 - CG-FID, cromatograma do óleo essencial de <i>Copaifera</i> sp.....	71
Figura 14 - CG-MS, cromatograma do óleo essencial de <i>Copaifera</i> sp.....	71
Figura 15 - Efeitos do OC sobre a produção de glicose e a função renal.....	72
Figura 16 - Efeitos do OC sobre a função hepática.....	73
Figura 17 - Efeitos do OC sobre a contagem das células inflamatórias no lavado traqueal....	74
Figura 18 - Efeitos do OC sobre o perfil celular do lavado traqueal.....	75
Figura 19 - Efeitos do OC sobre a produção de NO nas amostras de lavado traqueal e macerado pulmonar.....	76
Figura 20 - Efeitos do OC sobre a produção de IL-4, IL-17, IFN- γ e TNF- α no lavado traqueal.....	77
Figura 21 - Efeitos do OC sobre a produção de IL-4, IL-17, IFN- γ e TNF- α no macerado pulmonar.....	78
Figura 22 - Morfometria semiautomática quantitativa do infiltrado inflamatório peritubular (brônquios e bronquíolos) em secções pulmonares de camundongos BALB/c.....	79

Figura 23 - Amostras de pulmão de BALB/c. Imagem panorâmica.....	80
Figura 24 - Amostras de pulmão de BALB/c. Região peribronquiolar e perivascular.....	81
Figura 25 - Amostras de pulmão de BALB/c. Visualização do parênquima e da concentração celular.....	81
Figura 26 - Morfometria automática em secções pulmonares de camundongo BALB/c.....	82
Figura 27 - Porcentagem de parênquima por grupo de animais (n=5).....	83
Figura 28 - Efeitos do OC em áreas anatomicamente representativas (imagem panorâmica, brônquio, bronquíolo terminal, bronquíolo respiratório, parênquima) do pulmão asmático de camundongos BALB/c.....	83
Figura 29 - Representação esquemática da reação de Griess.....	115
Figura 30 - Recomendações do fabricante – protocolo geral para ELISA Sanduíche.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do óleo essencial de <i>Copaifera</i> sp.....	70
Tabela 2 – Recomendações do fabricante sobre o Kit ELISA sanduíche conforme a citocina investigada.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHR	Hiper-reatividade das vias aéreas
ALB	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase
APC	Células da imunidade inata apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato aminotransferase
BCL	Linfoma de células B (BCL-6)
BTS	British Thoracic Society (Sociedade Torácica Britânica)
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CDC	Centers For Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CG	Cromatografia gasosa
CG-FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CN	Controle negativo
COX	Ciclooxygenase
CP	Controle positivo
CRE	Creatinina
DEX	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EGF	Fatores de crescimento epidermais
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ET	Endotelina (ET-1)
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fosfatase alcalina
FcεRI	Receptores de alta afinidade para IgE
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
Foxp	Proteínas da família Fox (Foxp3)
GATA	Família de fatores de transcrição (GATA3)
GGT	Gama glutamil transferase
GLI	Glicose

GM-CSF	Fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos
HE	Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICS	Corticoide sistêmico inalatório
Ig	Imunoglobulina (IgE; IgG)
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1)
IκK	Complexo inibidor do fator nuclear kappa quinase (IκBKα; IκNKβ)
IL	Interleucina (IL-4; IL-17; IL-13; IL-5; IL-22; IL-26; IL-8; IL-6; IL-2; IL-33; IL-21; IL-25; IL-23; IL-10; IL-35; IL-11; IL-1β)
ILC	Células linfóides inatas
IN	Intranasal
IFN	Interferon (IFN-γ)
IP	Intraperitoneal
LABA	Broncodilatadores de ação prolongada
LOX	Enzima araquidonato lipoxigenase (5-LOX)
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTRA	Modificadores de leucotrienos
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κβ	Fator nuclear kappa β
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB)
PG	Prostaglandina
OC	Óleo de copaíba
OMS	Organização das Nações Unidas
OVA	Ovalbumina
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROR	Receptor órfão de ácido retinoico (ROR-γt)
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SUS	Sistema Único de Saúde
T-bet	Fator de transcrição da família T-box
Tc	Células T citotóxicas – CD8 ⁺ (Tc1; Tc2; Tc17)
TCR	Receptor de células T
T _{FH}	Células T auxiliar foliculares
TGF	Fator de transformação do crescimento (TGF-β; TGF-α)
TH	Células T auxiliaries – CD4 ⁺ (TH2; TH17; TH1)
TLR	Receptor Toll-like (TLR1)
TNF	Fator de necrose tumoral (TNF-α)
Treg	Células T regulatórias
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UR	Ureia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VO	Via oral
ZO	Zônula de oclusão (ZO-1)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA.....	20
2.2. DISTRIBUIÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E IMPACTOS DA DOENÇA.....	24
2.3. RESPOSTAS IMUNES DESENCADEADORAS DA ASMA.....	30
2.4. ASPECTOS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO.....	43
2.5. PESQUISA DE NOVOS TRATAMENTOS.....	44
2.6. PESQUISA DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM PRODUTOS NATURAIS.....	49
2.6.1. Propriedade anti-inflamatória e imunomodulatória de plantas do gênero <i>Copaífera</i>	53
3. OBJETIVOS	60
3.1. OBJETIVO GERAL.....	60
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
4. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO DE COPAÍBA.....	61
4.1.1. CG-FID	61
4.1.2. CG-MS	61
4.2. VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	62
4.3. INDUÇÃO DA ASMA E TRATAMENTO.....	63
4.4. CITOMETRIA E CITOLOGIA NO LAVADO TRAQUEAL.....	64
4.5. COLETA DOS PULMÕES E OBTENÇÃO DO MACERADO PULMONAR.....	65
4.6. DOSAGEM DE NITRITO (NO).....	65
4.7. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	66
4.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO TECIDO PULMONAR.....	66
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
5. RESULTADOS	70
5.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO DE COPAÍBA.....	70
5.2. VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	72
5.3. PERFIS CELULARES NO LAVADO TRAQUEAL APÓS INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR OVA E TRATAMENTO DAS VIAS AÉREAS.....	73
5.4. EFEITOS DO TRATAMENTO COM OC NA PRODUÇÃO DE NO.....	75
5.5. EFEITOS DO TRATAMENTO COM OC SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	76
5.6. EFEITOS DO TRATAMENTO COM OC SOBRE A AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO E A MORFOMETRIA AUTOMÁTICA.....	79
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	115
ANEXO A - MÉTODO DE GRIESS.....	115
ANEXO B - PROTOCOLO GERAL PARA ELISA SANDUÍCHE.....	116
ANEXO C - PARAFINIZAÇÃO DE TECIDO EM LÂMINA E COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA.....	118

1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença que afeta cerca de 300 milhões de pessoas no mundo e mais de 10 milhões de brasileiros (SILVA; SERPA; EMERSON, 2017). Sub-diagnosticada e subtratada (WHO, 2017), é considerada um problema de saúde pública global, capaz de afetar a vida das pessoas, ao colocá-las em risco de exacerbações causando sofrimento significativo e altos custos para as famílias e para os sistemas de saúde (SILVA; SERPA; EMERSON, 2017).

A doença possui manifestação heterogênea e é caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas em indivíduos suscetíveis à irritação quando expostos a diferentes estímulos (GINA, 2018a; LUNGUSA, 2018a). A exposição recorrente aos fatores irritantes resulta na desregulação da resposta imune com impacto sobre a arquitetura respiratória (RAEDLER; SCHAUB, 2014), gerando como consequência uma cascata de sintomas, dentre eles a dispneia e a sibilância (ASBAI, 2018; LUNGUSA, 2018a).

A asma alérgica é o fenótipo mais comum da doença (RAEDLER et al., 2015). Os indivíduos portadores deste fenótipo são mais susceptíveis à resposta inflamatória após o contato com o antígeno (LUNGUSA, 2018a), com predomínio das respostas exacerbadas mediadas por células T do tipo TH2 e TH17 para o combate destes antígenos, e apresentando um mecanismo de contrarregulação dessas respostas por TH1 e células T regulatórias (Treg) (JI et al., 2014).

A resposta inflamatória inicial é caracterizada pela sensibilização dos mastócitos com a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como as prostaglandinas (PGs) e os leucotrienos (LTs), seguida pela degranulação das células inflamatórias, a qual ocorre, principalmente pelo aumento da polarização das células TH2, por intermédio das citocinas IL-4 e IL-13, com a diferenciação das células B em Imunoglobulina E (IgE) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017). Nesta etapa, o recrutamento de eosinófilos para o local inflamado ocorre a partir da produção de IL-5 e outras citocinas, por TH2. E a liberação das suas enzimas tóxicas auxilia no dano ao epitélio respiratório (NAGATO et al., 2015).

O agravamento da inflamação está associado a indução da resposta TH17 com expressão de IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, linfotoxina-b e TNF- α , promovendo o recrutamento, ativação e migração de neutrófilos, além do recrutamento de células mononucleares e reparo tecidual (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015; NAGATO et al., 2015).

O estímulo à formação de radicais livres, oriundos do oxigênio ou nitrogênio, desencadeado pelo estresse oxidativo no processo inflamatório, agrava ainda mais o quadro e favorece o dano agudo do pulmão e a polarização dos linfócitos (NAGATO et al., 2015).

Embora pesquisas, como relatado anteriormente, demonstrem o papel contrarregulador de TH1, a participação desta resposta na asma ainda se apresenta controversa. É importante considerar que as vias aéreas dos asmáticos produzem mais IFN- γ (característico da resposta TH1), com maior aumento dos níveis séricos desta citocinas em crises agudas da doença. No modelo experimental de asma alérgica com OVA, caracterizado por um perfil eosinofílico/neutrofílico, a polarização simultânea de OVA/TH1 específica junto com TH2 em camundongos é capaz de exacerbar a hiper-reatividade brônquica (AHR), com ação conjunta de IFN- γ e IL-13 sobre a contração do músculo liso e a ativação de células do sistema imune inato (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

Apesar das células Treg induzirem a expressão de moléculas imunossupressoras e promoverem a redução da expressão gênica das respostas mediadas pelas células T, na tentativa de reduzir a inflamação, tem-se a hipótese de que tais células, em indivíduos asmáticos, não sejam suficientes para controlar a exacerbação da resposta alérgica. Alguns indivíduos doentes parecem não ter todas as células reguladoras funcionais ou até mesmo, apresentar uma indução de Treg prejudicada (MARTÍN-OROZCO; NORTE-MUÑOZ; MARTÍNEZ-GARCÍA, 2017).

Assim, acredita-se que a regulação da AHR na doença ocorra por meio da harmonização de todas as respostas mediadas por células T. E que aconteça por meio de mecanismos de superexpressão ou inibição, que incluem, a reprogramação de células efetoras para melhorar a defesa imunológica a diferentes patógenos, bem como a inibição da polarização para outros fenótipos, caracterizados pela expressão de citocinas próprias de cada resposta e pela ativação dos fatores de transcrição (DELVES et al., 2017).

A expressão da resposta TH1, por exemplo, parece inibir a proliferação de TH2 e ambos parecem ser antagonistas de TH17. Já em outros momentos a resposta TH1 pode instigar a ação de TH17 em doenças caracterizadas pela hiper-responsividade da resposta imune (DELVES et al., 2017). E há também uma relação mútua complexa entre as células Treg e TH17 que são correlacionadas durante a diferenciação, mas apresentam funções antagônicas (ZHU et al., 2017).

Esses mecanismos regulatórios podem ser de grande utilidade na elaboração de estratégias de tratamento para a doença, uma vez que possibilitam o favorecimento de um tipo

de resposta em detrimento das demais e, assim, propiciam o equilíbrio do sistema imunológico (MAJDALAWIEH; FAYYAD, 2015; TUNG et al., 2008).

Modelos de asma alérgica para estudo de alternativas de tratamento frequentemente usam OVA como antígeno de sensibilização sistêmica adicionado a um adjuvante. Esta proteína tem a vantagem de estar disponível em forma relativamente pura, com níveis muito baixos de endotoxinas contaminantes em preparações padrão (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2016), permitindo a indução de resposta imunológica mediada por células TH1, TH2 e TH17 (NAGATO et al., 2015).

Após a sensibilização, a administração repetida de alérgenos nos pulmões leva à eosinofilia das vias aéreas, à secreção de muco, à hiperplasia das células caliciformes, à AHR e, quando crônica, ao remodelamento do tecido pulmonar, possibilitando a mimetização da condição patológica. Além da resposta TH2, os camundongos, assim como os seres humanos, expressam citocinas da resposta TH17 no tecido pulmonar após a exposição a alérgenos (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010; ZHANG et al., 2017a). O desafio com altos níveis do mesmo antígeno sensibilizador é uma das opções utilizadas na potencialização da resposta alérgica aguda (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2016).

A linhagem de camundongos BALB/c é a mais comumente utilizada em estudos de asma, capazes de produzir altos níveis de anticorpos IgE contra OVA e concentrações mais altas de citocinas TH2 (IL-4 e IL-5) no lavado broncoalveolar (GUALDI et al., 2010).

Muitos ainda são os problemas relacionados a persistência dos sintomas nos indivíduos que sofrem com a doença, como por exemplo, barreiras no diagnóstico, dificuldades no acesso ao tratamento em determinadas regiões, baixa adesão a terapia medicamentosa, assim como o risco de baixa responsividade a certos tratamentos (GAN, 2014).

Em decorrência das barreiras ainda existentes, novos tratamentos de origem natural, com potencial para a estabilização pulmonar através de mecanismos imunomodulatórios vem sendo pesquisados (HE et al., 2017; JI et al., 2014; MA et al., 2014), tendo como uma de suas vantagens, melhor acessibilidade, pelo fato de que costumam ser melhor toleradas pelo organismo do que as substâncias sintéticas e apresentam baixo custo (CARVALHO, 2017).

Grande parte das espécies botânicas apresenta um sistema de defesa imunológica rudimentar tendo desenvolvido meios de defesa química para a sua preservação de ataques de animais ou micro-organismos. Esse mecanismo apesar de poder atribuir certa toxicidade aos

compostos químicos da planta, vem demonstrando efeito sobre o tratamento de algumas doenças, dentre elas as doenças caracterizadas por disfunções imunes (CARVALHO, 2017).

A oleorresina de plantas do gênero *Copaífera* é um exemplo de substância produzida para defesa vegetal (GOMES et al., 2007). Extraída do tronco das árvores (CARVALHO, 2017), ela é amplamente utilizada pelos nativos latino-americanos como agente curativo (WAGNER et al., 2017), sendo facilmente encontrada nos mercados populares de rua (TEIXEIRA et al., 2017).

Estudado nos últimos anos, em técnicas *in vitro* e *in vivo*, o OC tem demonstrado seu efeito imunomodulador nas respostas de TH17 e TH1, além de ação imunossupressora sobre a produção de NO e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DIAS et al., 2014) e sobre TNF- α , IL-6 e Fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) (GELMINI et al., 2013). O óleo ainda apresenta a vantagem de ser seguro para administração oral e tópica (VEIGA-JUNIOR et al., 2007) e no entanto, nunca foi avaliado em mediadores inflamatórios envolvidos em modelos de asma alérgica.

Em virtude da ação imunomodulatória apresentada pelo OC, com potencial inclusive sobre os marcadores inflamatórios envolvidos na asma, considerando-se o amplo emprego deste composto pela medicina popular, inclusive na resolução do desconforto respiratório proveniente desta doença, justifica-se o aprofundamento por meio de novas pesquisas sob o efeito anti-inflamatório deste produto de origem natural no modelo de asma alérgica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

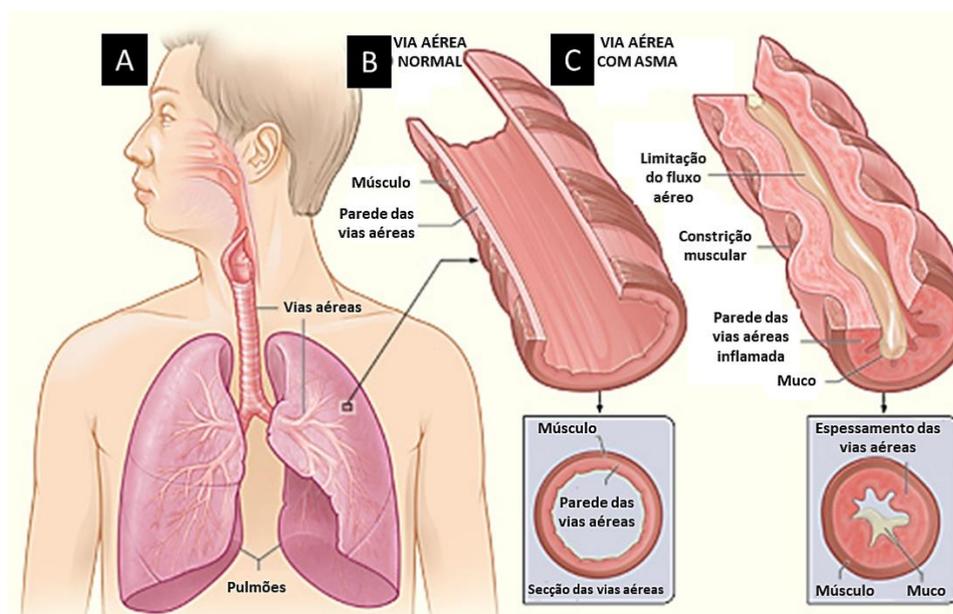
2.1. CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA

A asma é definida como um estado de obstrução reversível das vias aéreas (PATADIA; MURRILL; COREY, 2014) em indivíduos suscetíveis a irritação, quando expostos a substâncias ambientais denominadas gatilho (GINA, 2018a; LUNGUSA, 2018a).

A reação das vias aéreas à irritação é decorrente do estímulo de mediadores broncoconstritores e neurotransmissores que induzem a contração da musculatura lisa do tecido pulmonar, com hipertrofia e hiperplasia celular. Nos doentes também ocorre deposição de colágeno e proteoglicanos sob a membrana basal e sob outras camadas da parede da via aérea, com degradação da matriz celular (GINA, 2018b; TELLES FILHO, 2018a).

O tecido respiratório tende a se tornar mais vascularizado, havendo também aumento do número de células caliciformes no epitélio e hipertrofia das glândulas submucosas, com maior excreção de muco. É comum o extravasamento microvascular com acúmulo de líquido no interstício e luz das vias aéreas e consequente edema, em resposta aos mediadores inflamatórios, principalmente durante exacerbações agudas. Ocorre ainda infiltração de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, linfócitos, mastócitos e macrófagos. A oclusão luminal favorecida por todos estes eventos, gera a limitação fixa do fluxo aéreo com intenso desconforto torácico (GINA, 2018b; NHLBI, 2018).

Figura 1. Ilustração da anatomia pulmonar, vias aéreas normais e vias aéreas com asma.



Pulmões e vias aéreas (a); Secção transversal de uma via aérea normal (b); Secção transversal de uma via aérea durante uma crise asmática (c). Fonte: Adaptado de NHLBI, 2018.

A maioria dos pacientes com asma apresenta um comprometimento mais acentuado nas pequenas vias aéreas, entre 2 e 6 mm de diâmetro (TELLES FILHO, 2018a), principalmente, devido ao fato de que os bronquíolos possuem a musculatura relativamente mais desenvolvida que a musculatura dos brônquios, sofrendo maior impacto na contração muscular. Dos brônquios, os bronquíolos se ramificam em bronquíolos terminais, respiratórios e ductos alveolares (GLEREAN; SIMÕES, 2013). Nos bronquíolos terminais podem ser encontrados aglomerados celulares, conhecidos por corpos neuroepiteliais, formados por fibras colinérgicas com receptores para acetilcolina que estimulam a contração muscular (AARESTRUP, 2012).

Os principais sintomas oriundos da modificação da arquitetura pulmonar desencadeados pela irritação das vias aéreas são: dispneia, sibilos, tosse e hipersecreção de muco. A ocorrência destes episódios é denominada crise asmática (LUNGUSA, 2018a) e tende a variar na frequência e na gravidade, de pessoa para pessoa (SBPT, 2018; WHO, 2017).

Mesmo os sintomas se manifestando periodicamente, com normalização da função pulmonar, a inflamação subjacente da doença é contínua (LUNGUSA, 2018a) e o aumento da intensidade dos sintomas caracteriza estados de exacerbação com risco de obstrução fixa irreversível das vias aéreas (NHLBI, 2018).

Além do remodelamento permanente das vias respiratórias, a manifestação grave da doença aumenta a propensão do doente ao estado de mal asmático. Nesta situação há risco de hipoxemia (asma aguda grave), insuficiência respiratória, atelectasia, pneumotórax, arritmias cardíacas (PORTO; PORTO, 2014), anafilaxia e angioedema (RANG et al., 2016). Estes indivíduos também estão propensos a ter insônia e fadiga severa (FERGESON; PATEL; LOCKEY, 2017).

A presença de bradicardia pode indicar iminente parada respiratória e taquicardia com taquipneia sugerem exacerbações com risco moderado a grave, podendo haver inclusive, pulsação paradoxal e óbito. Casos de alteração do estado mental, com ou sem cianose implicam na hospitalização imediata do doente (FERGESON; PATEL; LOCKEY, 2017).

A severidade dos sintomas difere durante o dia e a noite, e pode variar ao longo do tempo, sendo importante o acompanhamento regular dos sintomas, principalmente pelo fato dos sinais não serem, em sua maioria, característicos da doença (GINA, 2018b; NHLBI, 2018). Os sintomas tendem a desaparecer espontaneamente ou em resposta ao tratamento medicamentoso durante semanas a meses (GINA, 2018a).

Os casos de gravidade intermitente englobam pessoas que conseguem controlar a doença sem medicação de controle à longo prazo. Já a considerada gravidade persistente inclui pessoas sob o uso dessa medicação e os indivíduos com asma não controlada são aqueles que não recebem essas medicações (CDC, 2015).

De forma geral, a manifestação da doença pode estar associada à predisposição genética e a fatores emocionais e sociais relacionados ao estilo de vida (BRASIL, 2015; GINA, 2018b), porém a natureza das contribuições etiológicas de cada um desses fatores está longe de ser completamente caracterizada (ROTHERS et al., in press).

Dos fatores de risco associados a doença, o fator genético é encarregado de 50% da susceptibilidade ao aparecimento dos sintomas. A hereditariedade estimada para a manifestação da doença varia em torno de 36 a 79% (CARVALHO et al., 2016).

O polimorfismo genético é um fator que amplia a susceptibilidade a asma. Variantes de genes da imunidade inata, por exemplo, dentre eles os genes que codificam o complexo inibidor do fator nuclear kappa quinase (I κ K), predominantemente caracterizado por I κ BK α e I κ BK β , e a variante TLR1 (tipo de receptor toll-like) tendem a interagir com infecções virais precoces (primeiros 12 meses de vida) de forma a provocar uma predisposição dos indivíduos à AHR (DALEY et al., 2012).

Polimorfismos sobre regiões cromossômicas também estão associados ao surgimento de asma alérgica e um exemplo são os desequilíbrios na ligação do locus 17q21-21, associadas a um endotipo de asma específico da infância. Esse locus abrange pelo menos 6 genes. A alteração da expressão de ácido ribonucleico (RNA) de alguns deles, como do gene orosomucoide tipo 1, da proteína fosfatase 1, reguladora da subunidade 1B e da proteína de ligação da zona pelúcida 2 parece favorecer mudanças nos níveis de TH2, aumentando os níveis de IgE e a contagem de eosinófilos em indivíduos portadores do genótipo de risco (PANGANIBAN et al., in press; SCHEDEL et al., 2015), principalmente quando expostos a infecção viral (BEST et al., 2017).

Outras variantes genéticas foram encontradas como a 2q12.1, 5q22.1, 5q31.1, 7q22.3, 9p24.1 e 11q13.5. Os genes relacionados a estes cromossomos estão envolvidos em diversas funções, como a regulação de citocinas inflamatórias, o controle da maturação e diferenciação celular, o reparo das cadeias de ácido desoxirribonucleico (DNA), dentre outras. É importante salientar, entretanto, que não se sabe ainda quantas variantes representam ao certo os fatores de risco genéticos universais para a asma (BEST et al., 2017).

As infecções respiratórias como as infecções pelo resfriado, gripe ou sinusite são os principais fatores ambientais que aumentam a susceptibilidade dos indivíduos à irritação

asmática. Outras condições de saúde como o refluxo ácido e a gravidez, que modifica a produção hormonal da mulher, também podem agravar os sintomas. Alergias alimentares, como a alergia a amendoim ou a mariscos podem irritar a mucosa de indivíduos susceptíveis, assim como o uso de medicamentos, dentre eles a aspirina ou anti-inflamatórios não esteroidais (LUNGUSA, 2018a).

A fumaça, de forma geral prejudica a respiração, a exemplo da fumaça de cigarros, lareiras a lenha e queima de folhas. Da mesma forma, a poluição do ar com escapes e fumos de veículos é danosa ao organismo. A variação extrema da temperatura e a alta umidade costumam irritar as vias aéreas, assim como mudanças na estação do ano, devido ao aumento de pólen no ar ambiente, principalmente durante a primavera e o outono. O contato com a saliva de animais, suas penas ou pelos é outro fator de risco para o surgimento da inflamação, junto à ambientes com maior concentração de ácaros, baratas, roedores ou mofo (LUNGUSA, 2018a).

Os ácaros da poeira domiciliar são a causa mais prevalente de sensibilização alérgica ininterrupta em asmáticos (DULLAERS et al., 2017). A umidade ambiente entre 55% e 75% e uma temperatura entre 15°C e 35°C propiciam o crescimento e o desenvolvimento da fauna acarina, assim como as condições climáticas associadas a características antrópicas (DUTRA, 2016).

Aproximadamente 80% dos casos da doença estão relacionados às espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e ao *Dermatophagoides farinae* (BAÏZ et al., 2017). A natureza alergênica desses micro-organismos é proveniente de proteínas que podem ser encontradas em suas excretas, contendo extratos brutos *Dermatophagoides* inteiros e ligantes TLR que ativam a resposta imune inata (DULLAERS et al., 2017). Acredita-se que a indução da resposta inata ocorra por meio da via de transdução de sinal do Fator nuclear kappa β (NF- κ B) com a ativação de inflamassomas (SHENG-JIE; HUNG-RONG, 2017).

Quando os pellets fecais são inalados com as partículas de poeira, a serina e cisteína peptidases presentes nas fezes clivam a proteína de oclusão e a zônula de oclusão-1 (ZO-1)¹, provocando a ruptura das junções da ZO do epitélio respiratório. A perda da barreira epitelial protetora no pulmão expõe esse órgão aos alérgenos inalados e inicia a resposta imune (ROSS; PAWLINA, 2016) estimulando células epiteliais e células dendríticas e induzindo as respostas imunes TH2 e TH17 (DULLAERS et al., 2017).

¹ Junção que controla a passagem de substâncias através da camada epitelial e o movimento das balsas lipídicas contendo proteínas específicas dentro da própria membrana plasmática. A célula é capaz de segregar certas proteínas internas da membrana na superfície apical (livre) e restringir outras às superfícies laterais ou basal (ROSS; PAWLINA, 2016).

Outra preocupação de saúde ambiental comum em países em desenvolvimento, diferente do risco de sensibilização por ácaros, é a exposição de indivíduos a aerossóis dentro de casa. As partículas ultrafinas possuem a capacidade de penetrar profundamente no sistema respiratório e chegar a corrente sanguínea e órgãos secundários. Atividades de rotina como cozinhar e limpar, além do uso de velas e incensos acesos podem produzir alta concentração de partículas, que impactarão na saúde das pessoas, conforme o tempo e a intensidade de exposição (STABILE et al., 2015).

Fortes odores vindos de perfumes ou produtos para limpeza também podem afetar uma pessoa com asma. Exercícios físicos, dentre eles a prática de esportes ou caminhadas, também podem causar sintomas da doença, sendo importante monitorar inclusive a qualidade do ar a que se está exposto durante o exercício. Além disso, é importante o monitoramento de variações emocionais, como situações de estresse, medo, distúrbios depressivos e ansiosos pelo aumento da probabilidade do desenvolvimento dos sintomas à partir da aceleração da respiração (LUNGUSA, 2018a).

2.2. DISTRIBUIÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E IMPACTOS DA DOENÇA

Qualquer indivíduo está suscetível a asma, independente do grupo étnico, sexo, idade e local de moradia (EPA, 2018), porém, a doença é a desordem crônica mais comum na infância e sua prevalência vem aumentando progressivamente ao longo dos últimos 15 anos (NIEHS, 2018).

Estima-se que na população global atual de 7,6 bilhões de habitantes (ONU, 2017), aproximadamente 300 milhões de indivíduos, de diversas faixas etárias, sofram com asma, distribuídos entre 1 a 16% da população em diferentes países. As diferenças entre as regiões vem se reduzindo nas últimas décadas, com queda na prevalência sobre a Europa ocidental e aumento do número de casos em regiões cuja a prevalência era relativamente baixa (GINA, 2018b). Nos Estados Unidos da América (EUA) a doença parece afetar em torno de 8% da população e, aproximadamente, 90% das crianças e 50% dos adultos possuem o fenótipo de asma alérgica (GENETICS HOME REFERENCE, 2018).

As crianças nascidas prematuras estão mais propensas ao desenvolvimento da doença (HE et al., 2015). A morbidade respiratória crônica pode ser correlacionada a partos prematuros, anteriores a 37 semanas de gestação quando as crianças apresentam elevado risco de morrer devido ao desenvolvimento fetal incompleto com maior susceptibilidade a infecções (CARVALHO et al., 2016).

Apesar de desenvolver-se mais frequentemente na primeira infância, três quartos das crianças que desenvolvem asma, anterior aos sete anos, não costumam apresentar mais sintomas aos dezesseis (HE et al., 2015). Na infância há maior número de casos no sexo masculino. Possivelmente devido a maior produção de IgE e ao maior tônus e estreitamento das vias aéreas nos garotos. A partir dos 10 anos a relação diâmetro/comprimento passa a ser a mesma para ambos os sexos havendo mudanças no tamanho do tórax dos meninos (TELLES FILHO, 2018b).

Na adolescência, mesmo as crianças que manejam a asma responsavelmente a anos, podem enfrentar dificuldades no controle da doença, devido a alterações hormonais, mudanças de hábitos e comportamentos. A rebeldia e a necessidade de independência que acompanham essa fase podem dificultar a adesão ao tratamento e promover contratempos no enfrentamento da doença por parte do adolescente e de seus familiares. Nessa faixa etária são comuns crises asmáticas desencadeadas pela prática de esportes, cigarro e variações emocionais (LUNGUSA, 2018b).

Nos jovens e adultos há maior predominância dos sintomas no sexo feminino, principalmente entre os 18 a 24 anos (CDC, 2018) e também após os 40 anos. Nos indivíduos com idade ainda mais avançada, maiores de 60 anos, há ainda maior elevação do número de casos (TELLES FILHO, 2018b), uma vez que, o aumento da idade promove o enrijecimento da parede torácica, reduzindo a função muscular respiratória com perda do recolhimento elástico e remodelamento das vias áreas (GINA, 2018a).

Além disso, entre os idosos é mais difícil distinguir a asma de outras condições respiratórias, o que pode prejudicar o tratamento e favorecer a morte prematura (GAN, 2014). Na velhice a dispneia, falta de aptidão e atividade reduzida costumam ser consideradas normais (GINA, 2018a) e doenças como a bronquite crônica com enfisema em fumantes e a insuficiência cardíaca, por exemplo, são comumente confundidas com a asma nesta faixa etária, devido à similaridade de alguns sintomas (GINA, 2017a). A OMS (Organização das Nações Unidas) considera como grupos de maior risco, as crianças entre 10 a 14 anos e os idosos na faixa dos 75 aos 79 anos (GAN, 2014).

Com relação a prevalência por etnia, a doença ocorre em todas as raças e em todas as condições ambientais, sem muitas diferenças conforme a região (TELLES FILHO, 2018b). Segundo o último levantamento realizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos EUA há predomínio da doença sobre a raça negra e mestiça, consideradas minorias raciais (CDC, 2018).

A condição financeira também é fator determinante da manifestação dos sintomas, uma vez que os cuidados com a doença apresentam custos elevados, que podem ser uma barreira para alguns indivíduos obterem o assessoramento devido (CDC, 2018).

Para muitos governos, a doença não é considerada prioridade financeira de saúde e os adultos são a faixa etária que tende a ficar mais propensa a falta de assistência médica (CARDOSO et al., 2017). Nesses casos, as minorias raciais são as mais prejudicadas. Um em 4 negros e 1 em 5 hispânicos adultos não conseguem pagar por medicamentos para seu tratamento (CDC, 2018).

Da mesma forma, o acesso à educação, disponível em maior grau a população com renda elevada, é capaz de favorecer a compreensão sobre os aspectos relacionados a doença. A retenção do conhecimento garante maior procura por técnicas de diagnóstico e tratamentos, possibilitando a elaboração de planos de ação preventivos, junto a equipe médica, e reduzindo a probabilidade de internações de emergência. Indivíduos, portanto, que frequentaram a escola tem menor propensão ao desenvolvimento ou agravamento dos sintomas, e as crianças são mais propensas a aprender a lidar com os sintomas de asma que os adultos (CDC, 2018).

No geral, a asma está fortemente relacionada à invalidez, com perda da capacidade sobre a realização de diversas atividades de rotina, representando 1,8% da carga global de doenças. As taxas de letalidade variam conforme a região do globo e são reflexo, inclusive, das diferenças na gestão dos recursos em cada local (GINA, 2018b).

Na região da América Latina a prevalência da doença é superior a 10% em praticamente todos países em especial porque o acesso aos serviços de saúde e a medicamentos essenciais é limitado (CARDOSO et al., 2017).

Estima-se que no Brasil, país de grandes dimensões e de renda média, existem aproximadamente 20 milhões de asmáticos (SBPT, 2018), dos quais 20% possuem asma grave (XIMENES, 2018), sendo um dos locais com maior prevalência de asma em crianças (CARDOSO et al., 2017).

A última Pesquisa Nacional de Saúde sobre percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas (IBGE, 2014), apurou que a região Sul do país apresenta a maior prevalência da doença. A região possui 5,3% das pessoas com 18 anos ou mais de idade com diagnóstico médico de asma, em um total de 7.670 domicílios entrevistados.

Na mesma pesquisa, no Brasil inteiro, a prevalência de indivíduos diagnosticados com asma foi de 4,4%, em um total de 62.986 domicílios entrevistados. A região Sudeste é a segunda região de maior prevalência, 4,8% dos entrevistados foram diagnosticados com asma.

Nas demais regiões os resultados variaram, sendo estimados 4,5% casos na região Norte, 4,2% na região Centro-Oeste e 3,2% na região Nordeste, respectivamente (IBGE, 2014).

O maior índice de diagnóstico na região Sul, em especial no estado do Rio Grande do Sul (IBGE, 2014), pode ser em detrimento ao acesso aos serviços de saúde. No total, 56,2% dos domicílios, segundo a pesquisa, estão cadastrados em unidades de saúde da família (assistência pública de saúde) e, somente 32,8% da população possui cobertura dos planos de saúde (IBGE, 2015).

Em adição, a região Sul apresenta temperaturas predominantemente baixas em comparação às demais regiões do país, favorecendo o surgimento de crises asmáticas (ZHANG et al., 2014). Além disso, alguns maus hábitos parecem ocorrer com maior frequência nesta região, como consumo de álcool (28,4%), baixo consumo de frutas e hortaliças (65,8%), considerados sinônimo de uma alimentação saudável, e maior porcentagem de usuários de produtos derivados do tabaco (16,1%) (IBGE, 2014).

Na região Sul, 20% das crianças em idade escolar têm asma, muitas delas com doença não controlada e altas taxas de inatividade física, absenteísmo escolar e hospitalizações (CARDOSO et al., 2017).

De forma geral, a manifestação da doença na população gera preocupação principalmente porque o incômodo gerado pelo aparecimento dos sintomas inviabiliza a presença ou reduz a produtividade dos indivíduos em atividades de rotina (CDC, 2018; GINA, 2018b). Para aproximadamente 250.000 pessoas com asma severa, até mesmo subir as escadas pode parecer uma maratona, tornando mais difícil a sua locomoção (ASTHMA UK, 2018).

Cerca de 1 em cada 2 crianças perde pelo menos um dia de aula na escola, por ano, por causa da doença, e 1 em cada 3 adultos perde pelo menos um dia de serviço no ano. Ao todo, pelo menos 3 em cada 5 pessoas tem atividades habituais limitadas pela asma (CDC, 2018).

Em termos populacionais, no ano de 2008, essa estatística correspondeu a 10,5 milhões de faltas escolares e 14,2 milhões de ausências no trabalho nos EUA (CDC, 2018). Logo, observa-se que a doença reduz substancialmente a qualidade de vida dos doentes, não só pelas limitações físicas, como pelo incômodo desencadeado pelos sintomas, e gera prejuízos financeiros indiretos, pela falta de lucratividade durante os períodos em que os indivíduos asmáticos encontram-se debilitados (GINA, 2018b).

Por ano, a asma custa aos EUA US \$ 56 bilhões. Para se ter uma ideia de como esse valor é distribuído para cada um dos aspectos relacionados a doença, no ano de 2009

foram gastos US \$ 8,9 milhões com atendimento médico, US \$ 479.300 com hospitalizações e US \$ 1,9 milhões com atendimentos de emergência. As crianças foram mais frequentemente ao médico para tratamento do que os adultos e o custo médio anual de cuidados para uma criança com asma, no mesmo ano, foi de US \$ 1.039 (CDC, 2018).

Em escala mundial, a situação é preocupante devido a prevalência da doença ser considerada elevada e os gastos com seu tratamento ultrapassarem os gastos com a tuberculose e a síndrome da imunodeficiência adquirida juntos (GINA, 2017b).

O Reino Unido tem uma das maiores taxas de prevalência de sintomas de asma em crianças em todo o mundo. Nesta região os ataques de asma hospitalizam alguém a cada 8 minutos, em torno de 185 pessoas são admitidas no hospital por causa de ataques de asma todos os dias, e uma criança é internada a cada 20 minutos por causa de uma crise asmática (ASTHMA UK, 2018).

Lacunas nos cuidados com os doentes provenientes do investimento inadequado sobre a doença em alguns locais, ou resultantes de disparidades econômicas, levam ao controle indevido dos sintomas e, com isso reduzem o bem-estar dos doentes, além de aumentar o risco de internações de urgência e de mortes prematuras. O bom manejo da asma representa um desafio tanto para os indivíduos, quanto para os profissionais e as organizações de saúde, assim como para os governos (GINA, 2018b). Poucos estudos econômicos são conduzidos nas regiões não ocidentais, entretanto, há fortes evidências de que a asma impõe uma carga significativa inclusive nos países em desenvolvimento (GINA, 2018b), onde cerca de 2% de todo o dinheiro gasto em saúde é destinado ao tratamento da asma (GINA, 2017b).

De forma geral, os custos de cada região para controlar a doença dependem da sua prevalência, dos custos com os cuidados médicos e medicamentos, do nível individual de resposta ao tratamento e da capacidade de prevenção de exacerbações. É necessário compreender que o custo dos atendimentos de emergência são mais caros que ações preventivas, e que grande parte dos problemas desencadeados pela doença, como o impacto econômico e o número de mortes podem ser, em sua maioria, evitados (GINA, 2018b).

Estima-se que a asma cause 346.000 mortes em todo o mundo a cada ano (GINA, 2018b). Por dia, aproximadamente 9 pessoas morrem pela doença, havendo um maior número de mortes em mulheres. Possivelmente, devido a maior prevalência sobre este sexo. Pelo fato de a doença também ser mais comum em minorias étnicas, os adultos negros e os hispânicos possuem um maior número de internações pela doença, mas os negros são de 2 a 3 vezes mais propensos a morrer por asma do que qualquer outro grupo étnico (CDC, 2018).

No Brasil, a mortalidade pela doença (em todas as idades) é superior a 2.000 pessoas por ano (ASBAI, 2016), havendo em média 350.000 internações pela doença neste período, o equivalente a 2,3% do total de hospitalizações que ocorrem por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) (SBPT, 2018). O impacto financeiro dessas internações para a saúde pública nacional em 2014, entre janeiro a novembro, em que houveram 105,5 mil internações pela doença, girou em torno de R\$ 57,2 milhões (BRASIL, 2015).

O valor anual é ainda maior, ao se considerar os montantes desembolsados pelo governo mediante determinações judiciais de fornecimento a alguns pacientes de terapia específica não disponível no SUS (BRASIL, 2016). Acredita-se ainda que estes valores possam estar subestimados, por serem em sua maioria custos diretamente relacionados à doença, não levando em consideração aspectos relativos à saúde do indivíduo acometido, como por exemplo, a eficácia e efetividade do tratamento (OLIVEIRA; SANTOS; SILVA, 2014).

Porém, apesar dos gastos elevados do país com a doença, o número de óbitos e internações vem se reduzindo nos últimos 10 anos, em resposta a uma ação governamental de distribuição gratuita de alguns medicamentos para 90% dos asmáticos, visando justamente o controle dos sintomas em maior parte da população e, assim, reduzindo gastos com exacerbações (SPTRS, 2018). Além disso, os brasileiros também estão compreendendo melhor a doença nos últimos anos, o que tem favorecido a procura por diagnóstico e adesão ao tratamento. Em uma década, o número de internações por asma no Brasil caiu 49% (SBPT, 2018). Ainda assim, a doença permanece como um problema de saúde pública, continuando a ser uma das principais causas de internação de origem respiratória (SPTRS, 2018) em especial porque a disponibilização de tratamento adequado aos doentes ainda é restrita em muitos estados do país (SBPT, 2018).

O custo direto da asma é maior para os pacientes com a doença não controlada, devido à maior incidência das internações de urgência, uma vez que a gravidade da doença aumenta a necessidade de investimentos no tratamento. Porém, dentre os gastos contabilizados para os pacientes portadores de asma controlada, o gasto com a aquisição de medicamentos é o custo de maior impacto familiar, justamente devido ao rigor no controle dos sintomas (SANTOS et al., 2007). Além disso, as famílias também são afetadas pelos custos provenientes dos prejuízos gerados pelo absenteísmo dos doentes. Segundo a pesquisa do IBOPE, realizada no Brasil, 72% dos entrevistados com asma afirmaram que a doença prejudica suas atividades cotidianas, como trabalho e escola (GINA, 2017b).

Na cidade de Salvador constatou-se que os gastos diretos com asma grave consomem aproximadamente 24% da renda familiar dos pacientes de classe menos favorecida e isso aumenta para 29% quando se considera os gastos indiretos (FRANCO et al., 2009), entretanto, a recomendação da OMS é de que esse montante não exceda a 5% da renda familiar (SBPT, 2012). À longo prazo, os gastos elevados tendem a favorecer a interrupção do tratamento, agravando posteriormente a condição de saúde do doente (STIRBULOV et al., 2016).

De acordo com o inquérito de saúde nacional dos EUA, as barreiras no tratamento da doença incluem a incapacidade de pagar os medicamentos destinados ao controle dos sintomas e a dificuldade de arcar com a consulta de um médico de cuidados primários ou de um especialista (CDC, 2013).

Ainda que os indivíduos sejam assessorados por seguros de saúde, os custos relacionados ao tratamento da doença, não serão extintos (CDC, 2013) e, em países com realidades semelhantes a do Brasil, cuja cobertura de saúde pública deixa a desejar, faz-se necessária uma reorganização governamental que concentre maior atenção para a asma e seu impacto econômico e social, e consiga promover melhor qualidade de vida a todos os envolvidos (CARDOSO et al., 2017).

2.3. RESPOSTAS IMUNES DESENCADEADORAS DA ASMA

O aumento da sensibilidade das vias aéreas, que caracteriza a doença, é adquirido após estimulação que pode ser conferida por células do sistema imunológico, células pulmonares estruturais e/ou diretamente pelos alérgenos irritantes (MCKNIGHT et al., 2017).

Nesse contexto, mais de 100 diferentes mediadores contribuem para a sustentação do distúrbio inflamatório originado e para o surgimento das alterações clínicas e fisiopatológicas típicas da doença (GINA, 2018b).

Monócitos, granulócitos, células dendríticas, células natural killers, trombócitos, mastócitos e macrófagos alveolares específicos, são exemplos de células da imunidade inata, abundantes no trato respiratório, que produzem potentes mediadores pró-inflamatórios, contribuindo com o distúrbio imune originado da irritação das vias aéreas (RAEDLER; SCHAUB, 2014). Durante a defesa inata, as células linfoides inatas (ILCs), auxiliam na regulação dos fibroblastos e oferecem vias inflamatórias adicionais (RICHARDS, 2017).

A participação das células T na patologia da asma (imunidade adquirida) se faz necessária para a potencialização da resposta imune em decorrência das exposições sequenciais aos alérgenos. A hipersensibilidade mediada por células é impulsionada por um

balanço entre as respostas das células T e perfis celulares com respostas específicas a antígenos (RICHARDS, 2017).

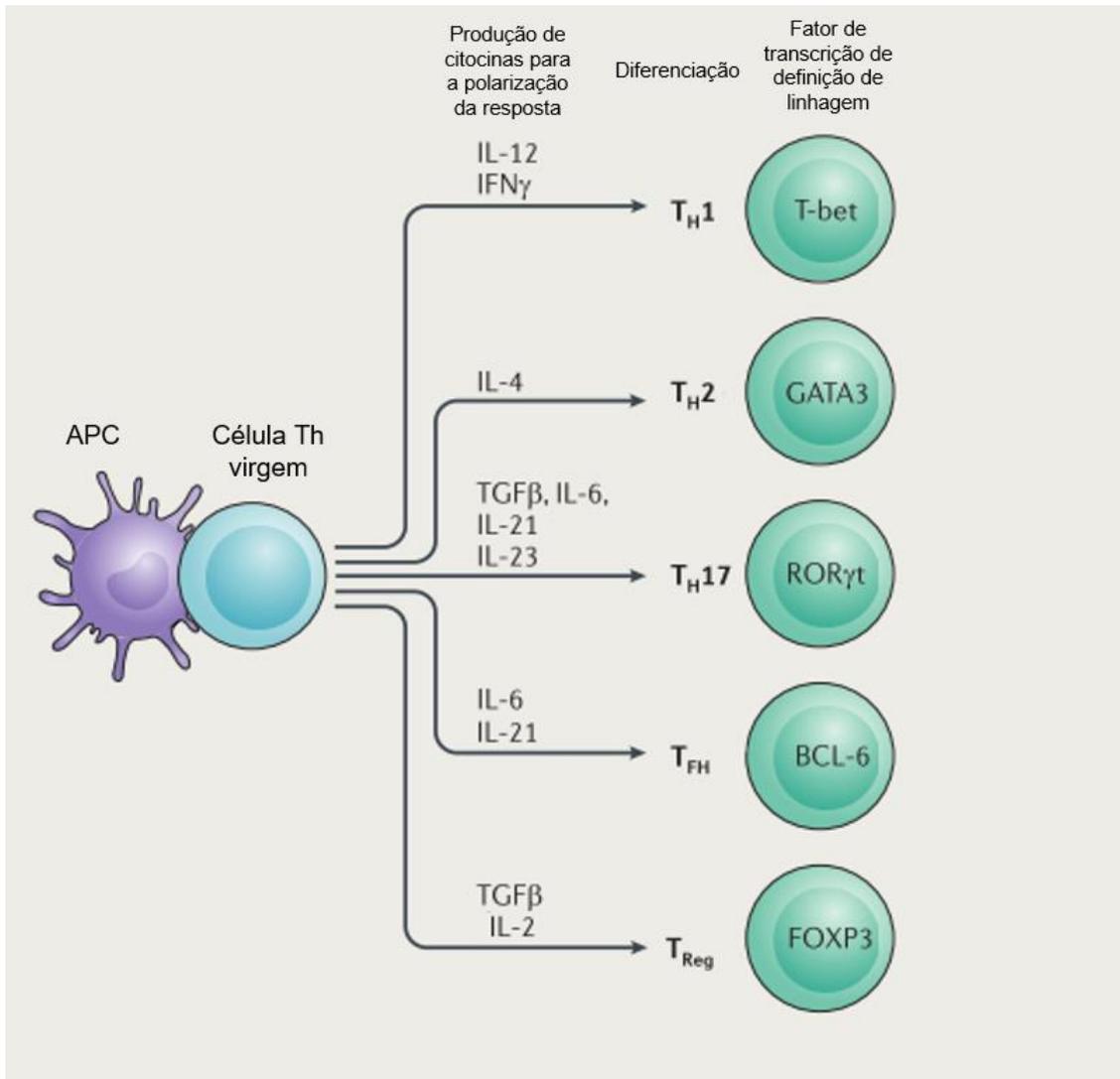
A resposta inicial ocorre mediante a identificação da presença de um corpo estranho no organismo. O que implica na sua captura e apresentação por células da imunidade inata apresentadoras de antígenos (APCs), as células T em movimentação contínua nos linfonodos. A ligação das células T com o seu peptídeo ativador gera interações estáveis induzindo a produção de citocinas. A IL-2, sintetizada poucas horas após a ativação das células T é crucial para a proliferação clonal destas células, formando um contingente celular para a resposta ao antígeno (DELVES et al., 2017).

Conforme os sinais coestimuladores das APCs, as interações das moléculas acessórias (DELVES et al., 2017) e o microambiente das citocinas prevalentes na resposta a corpos estranhos, as células T ativas serão diferenciadas em subconjuntos de células T auxiliares CD4+ (TH) (GUÉRY; HUGUES, 2015). Contribuem para a patologia da asma principalmente os subconjuntos TH1, TH2, TH17, células T auxiliar foliculares (T_{FH}) e Treg (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013).

As células T também poderão se diferenciar em células TCD8+ (citotóxicas, Tc), sendo estas Tc1, Tc2 e Tc17. Mediante a diferenciação, as células voltam a se movimentar rapidamente, migrando nos linfonodos e participando de outras interações (DELVES et al., 2017).

Cada subconjunto de células TH é controlado por fatores de transcrição de definição de linhagem específicos, mantendo uma expressão gênica distinta para cada grupo celular, que definirá a expressão de um perfil de citocinas característico, com marcadores de superfície próprios e diferentes funções de defesa. Nas células de resposta TH1 o principal fator de transcrição é T-bet (fator de transcrição da família T-box), enquanto na linhagem TH2 é a proteína de ligação GATA3 (fator de transcrição da família GATA), o receptor órfão de ácido retinoico- γ t (ROR γ t) transcreve a linhagem de células TH17, a proteína P3 da família Fox (Foxp3) transcreve as células Treg e o linfoma-6 de células B (BCL-6) transcreve as células T_{FH} (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013).

Figura 2. Subconjuntos de células TCD4⁺ envolvidos na asma alérgica.



TGF- β : Fator de transformação do crescimento. Fonte: Adaptado de LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013.

Os fenótipos de asma compartilham, predominantemente, a resposta do tipo TH2 (RAEDLER et al., 2015). As células dessa natureza coordenam as respostas a parasitas e outros patógenos extracelulares, vulneráveis a IgE. Estas células funcionam também como auxiliares das células B por fomentar a sua proliferação, permuta de classe e diferenciação em células efetoras. As principais citocinas secretadas por TH2 são a IL-4, IL-13 e IL-5 (DELVES et al., 2017).

A multiplicação exacerbada de TH2 na doença ocorre mediante a exposição frequente aos alérgenos, a captura dos mesmos e ao seu transporte aos linfonodos para processamento e apresentação dos peptídeos às células auxiliares TCD4⁺. A diferenciação dessas células em TH2 dá-se principalmente por intermédio de IL-4 e participação da citocina

linfopoiétina estromal tímica, secretada pelas células epiteliais do trato respiratório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

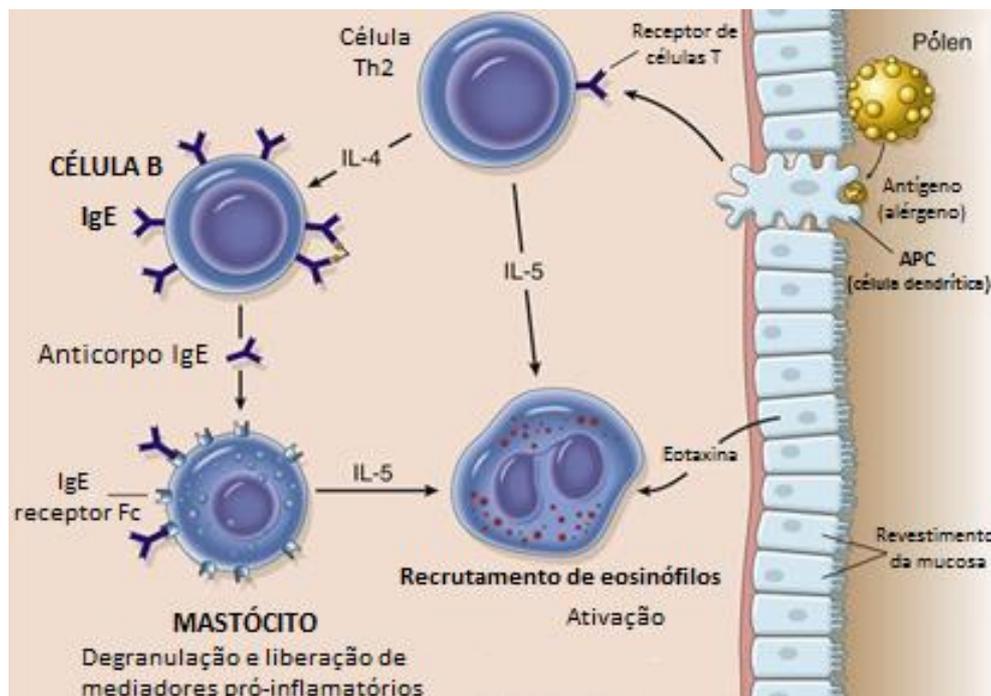
Nesse processo de diferenciação, as células TCD4⁺ também dão origem as T_{FHS}, as quais auxiliam na produção de anticorpos ao secretarem citocinas características de outros subconjuntos e as células T_{FH} são as principais assessoras das células B na produção de anticorpos de alta afinidade nos folículos linfóides (MURPHY; WEAVER, 2016).

Assim, tanto as células TH2 quanto as T_{FHS} originadas irão induzir as células B a obter IgE, principalmente por meio da produção de IL-4. A ligação dos IgEs aos receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI), expressos em mastócitos e basófilos, sensibiliza estas células à degranulação (MURPHY; WEAVER, 2016) havendo liberação de mediadores inflamatórios, dentre eles os LTs, as PGs, o fator de ativação plaquetária (PAF), as histaminas, os eicosanóides e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

Descobriu-se recentemente que expressão da proteína transmembranar CD23 é tão importante quanto o receptor FcεRI para ligação de IgE. Estudos vem associando inclusive casos alérgicos de asma de maior gravidade a polimorfismos específicos de CD23. Parece que a ligação por intermédio desse receptor induz as células B a acumularem IgE ligados a imunocomplexos. O objetivo é poupá-los temporariamente da degradação, para que através de uma liberação lenta desses antígenos ocorra aumento da coestimulação das células dendríticas para capturá-los, processá-los e apresentá-los aos linfócitos T, de forma a ampliar a diferenciação em células TH2 e a memória imunológica, durante a instalação do processo inflamatório (ENGEROFF et al., in press).

Os mastócitos ativados por IgE são encontrados na submucosa, no epitélio e mesmo na luz brônquica, onde, em um número considerável, interagem com alérgenos inalados antes mesmo da sua entrada no epitélio (TELLES FILHO, 2018a). Estímulos osmóticos que ocorrem simultaneamente ao impulso desencadeado pelos receptores de IgE auxiliam na ativação dos mastócitos e os mediadores inflamatórios liberados favorecem a broncoconstrição da musculatura lisa tecidual, induzida tanto pelo esforço muscular quanto por conexões neurais (GINA, 2018b).

Figura 3. Fase de sensibilização ao alérgeno.



Fonte: Adaptado de KUMAR; ABBAS; ASTER, 2017.

Assim como a IL-4, a IL-13 é facilitadora da produção de IgE. Esta citocina ainda desempenha um importante papel ligando-se a receptores de ILCs do tipo TH2 para induzir a sinalização celular, instigando as reações sobre o tecido pulmonar local como a hiperplasia das células caliciformes, o remodelamento posterior do tecido (RICHARDS, 2017), além da produção de muco (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

Semelhante as células TH1, as TH2 ainda produzem IL-3 e o fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que induzem a produção de neutrófilos e macrófagos de precursores da medula óssea (DELVES et al., 2017). Além disso, a expressão de GM-CSF parece ter um importante papel regulador na apoptose celular, auxiliando a retardar a taxa de morte celular durante a inflamação asmática (TELLES FILHO, 2018a). A PGD₂, principal mediadora do ácido araquidônico, produzida pela Ciclooxigenase (COX), também promove a quimiotaxia e acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

Agravando ainda mais a resposta inflamatória, a IL-5, também produzida por TH2, ativa os eosinófilos, que possuem grânulos com moléculas citotóxicas, liberadas nas superfícies dos patógenos, após o envolvimento dos receptores C3b do sistema complemento com patógenos opsonizados. Este mecanismo é especializado em combater patógenos de

maior comprimento, os quais, devido ao tamanho, não conseguem ser previamente fagocitados pelos macrófagos e neutrófilos já recrutados (DELVES et al., 2017).

As moléculas citotóxicas geradas pelos eosinófilos, como a eosinófilo peroxidase, causam AHR dos brônquios e ampliação da resposta imune mediada por células por efeito sobre as células dendríticas (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

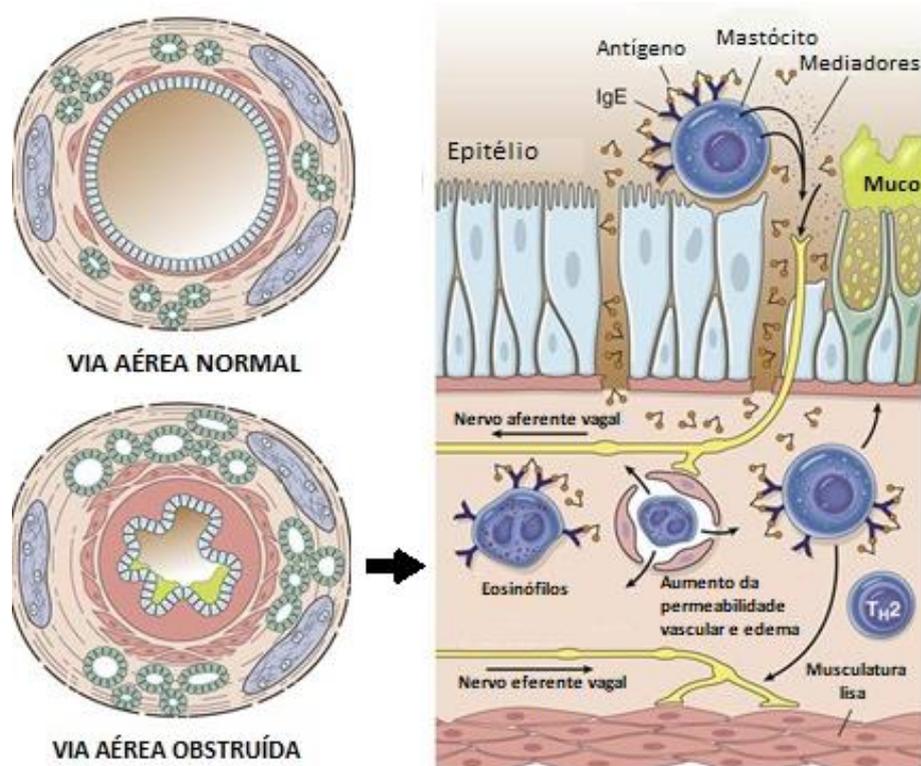
Os eosinófilos ainda são capazes de produzir TGF- α e TGF- β 1 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bem como uma gama de citocinas, incluindo a IL-13. O TGF- β 1 está associado à transformação de fibroblastos em miofibroblastos, os quais apresentam atividade sobre a síntese de colágeno que tende a se acumular e causar fibrose da mucosa brônquica. Além do mais, os miofibroblastos são fonte de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de células tronco, necessário para o crescimento, maturação e sobrevivência dos mastócitos (TELLES FILHO, 2018a).

A inflamação desencadeada também é caracterizada por alto consumo de oxigênio que resulta na formação de radicais livres (espécies reativas de oxigênio, ROS, e espécies reativas de nitrogênio, RNS), as quais a princípio devem auxiliar no combate ao patógeno. Porém, a produção em larga escala, gera acúmulo no organismo com danos para o tecido e às fitas de DNA, por reações de peroxidação lipídica, no ataque a biomoléculas e oxidação de proteínas (NAGATO, 2016). Um desses radicais livres é o NO, formado à partir de alterações nos grupos guanidina, da estrutura da L-arginina associada a moléculas de oxigênio (NIEDBALA et al., 2013).

As ROS e RNS também atuam como moduladores de proteínas, quinases lipídicas, fosfatases, receptores de membrana, canais iônicos e fatores de transcrição, incluindo NF- κ B, que regulam a expressão de citocinas inflamatórias (MIGUEL, 2010). Assim, agem como mediadores na patogênese da inflamação e contribuem para a lesão pulmonar aguda por meio de outras reações com o oxigênio (NAGATO, 2016).

A descamação das células epiteliais ciliadas que ocorre na doença é decorrente da ação das proteínas liberadas pelos grânulos dos eosinófilos, pelo TNF dos macrófagos, pelas proteases, ROS, ou em decorrência de edema da submucosa. Os eosinófilos infiltram as paredes edemaciadas dos microvasos e tecidos perivasculares e seu intenso recrutamento está associado a mudanças estruturais vasculares mais intensas. Os pacientes com asma apresentam brônquios com angiogênese exacerbada e é comum nesses indivíduos a visualização do recrutamento, ativação e lise de eosinófilos intravasculares, na luz das vênulas capilares (TELLES FILHO, 2018a).

Figura 4. Resposta imune minutos após a exposição ao alérgeno.



Fonte: Adaptado de KUMAR; ABBAS; ASTER, 2017.

Em decorrência das lesões causadas no epitélio, há perda da barreira de proteção expondo as estruturas mais profundas das vias aéreas aos fatores exógenos, como alérgenos, vírus e poluentes atmosféricos e também aos componentes endógenos como as enzimas proteolíticas, dentre elas a triptase (TELLES FILHO, 2018a). Esta enzima, uma serina protease neutra, liberada pelos mastócitos, contribui para a clivagem de fibrinogênio e ativação da collagenase, que favorecem o enrijecimento da parede das vias respiratórias. A chimase, outra serina, é capaz de converter angiotensina I em angiotensina II e degradar a membrana epidermal, além de estimular a secreção de muco nas vias aéreas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017). A gravidade da doença parece estar relacionada aos mediadores de mastócitos e as células TCD8+, em especial, Tc2, secretora de IL-13 e Tc1, secretora de IFN- γ (HINKS et al., 2015).

Por consequência, os indivíduos ficam ainda mais susceptíveis à reinfecção e manifestação crônica dos sintomas. Em resposta, o organismo procura meios para a reparação estrutural, sendo essa reparação contínua durante a inflamação crônica. O aumento da expressão de genes mucina, gerados pelos fatores de crescimento epidermais (EGFs) decorrente do dano epitelial e pelas IL-4 e IL-13, explica o aumento do número de células

caliciformes no epitélio da asma crônica severa, como forma de compensação ao dano (TELLES FILHO, 2018a).

O remodelamento brônquico desencadeado é caracterizado por um processo de fibrogênese, com espessamento da lâmina reticular da membrana basal, composta por uma densa camada de colágeno fibrilar (constituente mais abundante da matriz extracelular). É também evidenciado pela formação de edema, proliferação e congestão vascular da submucosa e lâmina própria, com aumento da permeabilidade capilar. O processo de remodelamento, é, portanto, um conjunto de alterações sob a estrutura, fisiologia e biomecânica do tecido pulmonar, que ocorrem por meio da combinação do aumento na ativação de fatores pró-fibrose de crescimento e do desequilíbrio entre a síntese e a degradação da matriz extracelular (TELLES FILHO, 2018a).

Apesar do mecanismo básico de iniciação da resposta inflamatória por TH2 acima descrito, novas vias de reação imune vêm sendo descobertas como contribuintes da doença e seus desfechos. O recente estudo de Mcknight e colaboradores (2017) levantou a existência de uma via alternativa à mediação da inflamação por IgE, proveniente da exposição sustentada de doses baixas ou altas de ácaros, que apresentaram potencial indutor para a ativação de mastócitos pulmonares na ausência de IgE, no contexto da doença alérgica grave. Embora a inoculação com uma grande dose de alérgeno tenha conduzido a produção substancial do anticorpo e de mastócitos pulmonares.

A ausência do anticorpo parece atenuar o dano tecidual na exacerbação da doença enquanto a AHR permanece. Além da IgE, acredita-se que outros fatores possam estar relacionados ao estímulo aos mastócitos, dentre eles a produção do anticorpo IgG, o sistema complemento e as citocinas, em particular, IL-4 e IL-13, associadas a resposta TH2, e que são secretadas por uma gama cada vez mais diversificada de tipos de células, incluindo as ILCs (JOHNSON; HARKER, 2017). O estudo de Mcknight e colaboradores (2017) levou a crer que manifestações mais precoces da doença possam depender exclusivamente de citocinas inflamatórias, ao invés de uma resposta com anticorpos.

Além da resposta do tipo TH2, também contribuem para a inflamação asmática as respostas do tipo TH1 e TH17 (MARTÍN-OROZCO; NORTE-MUÑOZ; MARTÍNEZ-GARCÍA, 2017; GINA, 2018b) e os macrófagos podem auxiliar nesse contexto de cooperação entre respostas, considerando que possuem habilidade para produzir não só mediadores pró-inflamatórios como anti-inflamatórios, incluindo citocinas das respostas TH2, TH1, TH17 e IL-33, sob diferentes condições (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

Logo após a exposição ao alérgeno, nas primeiras 17 a 20 horas após a estimulação do receptor de células T (TCR) para ativação das células TCD4+ virgens há uma competição entre o fator de transcrição T-bet e GATA-3 devido a uma acetilação de histonas transitória e não seletiva, para ambas as respostas TH1 e TH2, respectivamente (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013).

O fator de transcrição GATA3, auxilia na promoção do remodelamento tecidual ao inibir a expressão de T-bet e reduzir o recrutamento de células do tipo TH1 (NAGATO, 2016), uma vez que o IFN- γ é uma das citocinas que suprime a síntese de colágeno pelos fibroblastos, induzida por IL-4 (RICHARDS, 2017).

Mas o T-bet apresenta um papel fundamental no surgimento da doença devido a sua capacidade de regular o desenvolvimento de componentes do sistema imune inato, afetar o tráfego de células imunes, controlar a polaridade das respostas das citocinas e substituir um estado de diferenciação de células TH2 previamente programado (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013).

Havendo a expressão de células TH1 na asma, mediante sua ativação pelo fator de transcrição T-bet, poderá ocorrer um efeito cooperativo à resposta TH2, de atração e ativação de macrófagos e neutrófilos M2, através de mediadores solúveis, como TNF- α , por exemplo (NAGATO et al., 2015). Além disso, a citocina IFN- γ produzida por TH1 está associada à infiltração de granulócitos eosinofílicos no tecido inflamado (ZHU et al., 2017) e à contração muscular e ativação de células do sistema imune inato, agravando a AHR (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

No geral, a resposta imune mediada por células T efectoras tipo 1 é eficaz na eliminação de micro-organismos intracelulares (bactérias, protozoários e vírus) (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015), mas estas células podem atuar também como reguladoras ou iniciadoras de doenças de caráter autoimune, tumores ou sob a rejeição a transplantes (ZHU et al., 2017). Estas células são caracterizadas principalmente, pela produção de IFN- γ e TNF- α (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015).

Devido ao papel regulador que a resposta TH1 apresenta sobre desordens imunológicas, acredita-se que, sob determinadas condições, estas células, ao invés de estimuladoras, possam atuar como protetoras em síndromes alérgicas (ZHU et al., 2017), cessando, por exemplo, a eosinofilia e a produção de muco na asma, sem entretanto apresentar impacto sobre a AHR (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010). Portanto, a real participação dessas células no processo fisiopatológico da asma permanece controversa (ZHU et al., 2017).

No decorrer da inflamação asmática, as células TH17, parecem afetar tanto as vias aéreas superiores quanto inferiores (RICCIARDOLO et al., 2017), contribuindo para o agravamento da infecção primária e também para o estabelecimento das respostas em células de memória, em especial, pela expressão de IL-17 (MORTAZ et al., 2016). Porém, além das células TH17, as células $\gamma\delta$ T, células T natural killers, neutrófilos e macrófagos aparentam ter a capacidade de produzir IL-17, sob determinadas circunstâncias (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

Acredita-se que as células do tipo TH17 auxiliam na eliminação de patógenos não adequadamente tratados por TH1 e TH2, contribuindo como potentes indutoras da inflamação do tecido, associadas inclusive com doenças autoimunes e a manifestações crônicas da asma (NAGATO, 2016).

No fenótipo da asma alérgica, a IL-17, mais especificamente, o subtipo IL-17E (ou IL-25) (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010) parece contribuir com a indução da expressão de granulócitos eosinofílicos, ampliando a resposta promovida por TH2, durante a resposta inicial à inflamação (ZHU et al., 2017).

A IL-25 também é produzida por eosinófilos ativados, mastócitos e basófilos, após a reticulação de Fc ϵ RI e por células tronco c-Kit+, após estimulação com o fator de células tronco no pulmão. Esta citocina pode ser detectada na submucosa brônquica de pacientes asmáticos, estando seu receptor, IL-17RB presente em fibroblastos pulmonares primários humanos (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

A IL-17 ainda é importante por estimular citocinas pró-inflamatórias ou mieloproteases e aumentar a síntese de IL-6 e IL-11 em fibroblastos brônquicos (RICCIARDOLO et al., 2017), regulando os fibroblastos sinoviais e o catabolismo de cartilagem e controlando as células do tecido conjuntivo pulmonar à partir da ligação de subunidades do receptor IL-17R, IL-17RA/IL-17RC heterodímero *in vivo* auxiliando no remodelamento tecidual (RICHARDS, 2017).

Em adição a resposta, TH17 é capaz de produzir IL-21, GM-CSF, IL-22 (GUÉRY; HUGUES, 2015), IL-26 e TNF (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015). Tanto a IL-21 quanto a IL-22 parecem modular a cascata de IL-17 na asma, principalmente nos indivíduos com maior propensão a exacerbações e a IL-22 ainda auxilia a promover a proliferação epitelial e o reparo tecidual (RICCIARDOLO et al., 2017).

O grau de deposição de colágeno sobre o epitélio está relacionado a expressão das citocinas TGF- β 1 e β -2, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento

semelhante a insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB), endotelina 1 (ET-1) e IL-4 (TELLES FILHO, 2018a).

O TGF- β é um potente agente pró-fibrose, que estimula os fibroblastos a promover a síntese e secreção de várias proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno tipo I e III, fibronectina, vitronectina, tenascina e proteoglicanos. O aumento da concentração de IL-17 pode ser em detrimento de estímulos de TGF- β e maior concentração de colágeno tipo I (RICHARDS, 2017).

As alterações sobre a arquitetura do tecido podem ser reversíveis mediante o tratamento dos sintomas da doença. Porém, há uma teoria de que as mesmas possam ocorrer de forma independente da inflamação, como evento decorrente da evolução natural da doença, contribuindo para o desenvolvimento e persistência da condição inflamatória, o que inviabilizaria o tratamento com medicamentos de caráter anti-inflamatórios capazes de atenuar o processo (TELLES FILHO, 2018a).

A diferenciação, amplificação e manutenção das células T virgens em TH17 são mais eficientes mediante a expressão de TGF- β , IL-21 e IL-6 (NAGATO et al., 2015), adicionalmente, a IL-23 parece ser importante na manutenção da resposta TH17 e seu caráter patogênico (GUÉRY; HUGUES, 2015).

Observa-se, porém, que a expansão das células TH17 humanas nos locais inflamatórios é limitada. Tem-se a hipótese de que estas células possuem fraca capacidade em produzir IL-2, em resposta à sinalização de TCRs, e de que apresentam também capacidade reduzida de participação no ciclo celular. Outra razão importante para explicar a raridade das células TH17 nos sítios inflamatórios é sua alta plasticidade (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015).

Em contraste com as células TH1 e TH2, consideradas linhagens estáveis, as células TH17 conseguem se diferenciar principalmente em células TH1 ou Treg, mas também em células TH2 ou T_{FH}, dotando-as de funções múltiplas e opostas, permitindo respostas distintas, conforme o estímulo recebido (GUÉRY; HUGUES, 2015).

Para auxílio na regulação da AHR, os indivíduos portadores de asma alérgica parecem sintetizar um maior número de células Treg, pelo aumento da expressão de Foxp3 e CD25 (RAEDLER et al., 2015). Pela sua capacidade de inibição das demais respostas mediadas por células T, as células Treg mantêm a tolerância imunológica do organismo e previnem a incidência de doenças autoimunes quando o sistema imunológico está em homeostase (ZHU et al., 2017).

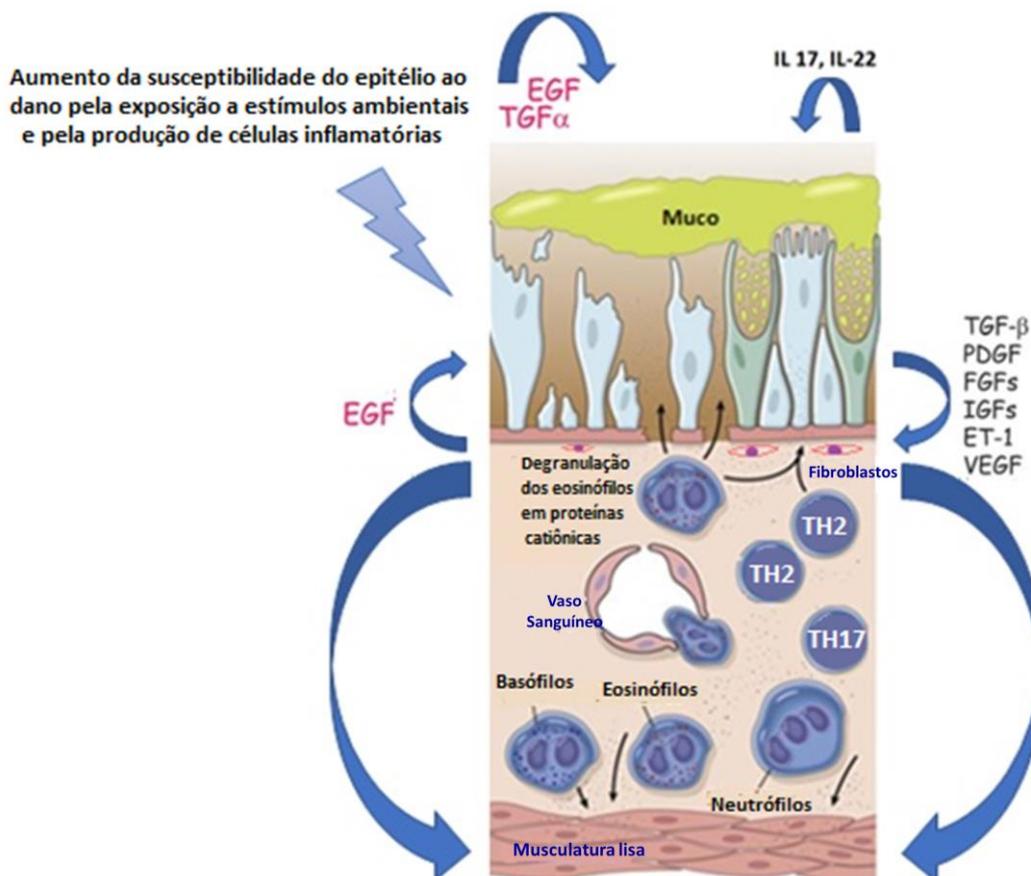
Quando um estado inflamatório se instala no organismo, leva, porém, a produção da proteína de fase aguda IL-6, a qual tende a inibir a proliferação das células Treg e, de forma antagonista, conjuntamente com o TGF- β , estimula a diferenciação das células TH17. Por isso, nos indivíduos asmáticos, espera-se que os níveis de mRNA (RNA mensageiro) e de IL-17 estejam substancialmente aumentados no tecido pulmonar, no lavado traqueal e no soro (ZHU et al., 2017) e que o mecanismo de contrarregulação da inflamação por Treg ainda se mostre, de certa forma, insuficiente para controlar a exacerbação da resposta e o aparecimento dos sintomas (RAEDLER et al., 2015).

Ainda assim, as células Treg tendem a aumentar sua expressão e função mediante a exposição ao alérgeno. Contudo, a descontinuação da exposição reduz o estímulo celular a Treg, fato que também pode favorecer a AHR contínua promovida pelas demais respostas envolvidas na patologia. Mesmo aumentadas nas alergias, a desregulação sobre os fatores de transcrição também podem causar perda da regulação promovida pelas Treg, por indução inadequada da expressão celular ou redução do potencial inibitório destas células, ou ambos os efeitos (MARTÍN-OROZCO; NORTE-MUÑOZ; MARTÍNEZ-GARCÍA, 2017).

A ação das células Treg é mediada por múltiplos mecanismos que envolvem a liberação de citocinas supressoras (IL-10, TGF- β e IL-35) e moléculas citolíticas (granzimas A e B) ou por modulação negativa das APCs através da expressão de moléculas inibidoras, como o linfócito T citotóxico associado ao antígeno 4 e a proteína de ativação de linfócitos 3. Estas células também agem privando citocinas tróficas (IL-2 por CD25) e modulando vias metabólicas (CD73 e CD39) ou controlando a expressão de fatores de transcrição e receptores (MARTÍN-OROZCO; NORTE-MUÑOZ; MARTÍNEZ-GARCÍA, 2017).

Logo, pode-se perceber que, alterações no estado das relações TH1, TH2, Treg e TH17 desempenham papéis importantes nos mecanismos imunológicos da asma (ZHU et al., 2017), e que vias alternativas de resposta imune adicionais podem coexistir e interagir na reação imunológica (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010), alterando inclusive a fisiopatologia da doença (HINKS et al., 2015).

Figura 5. Resposta imune horas após a exposição ao alérgeno.



Representação do remodelamento pulmonar promovido pelos fatores de crescimento e síntese de proteínas da matriz celular. Fonte: Adaptado de HOLGATE et al., 2010; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2017.

Os diferentes fenótipos e endotipos que caracterizam a doença vem sendo fontes de pesquisa importantes para a compreensão das diversas formas de manifestação da doença nos indivíduos e para o desenvolvimento de tratamentos com respostas terapêuticas mais precisas. A fenotipagem tradicional classifica os pacientes portadores de asma com base nos fatores desencadeantes (alérgenos, exercícios, infecções, etc.) e na apresentação clínica, com associações sobre os marcadores inflamatórios envolvidos. A endotipagem refina a classificação associando as informações fenotípicas a mecanismos fisiopatológicos. No geral, pode-se dizer que a doença é caracterizada por duas grandes categorias de endotipos (STOKES; CASALE, 2016).

A primeira é especificada pela elevação da expressão da resposta TH2 com maior concentração de eosinófilos na expectoração e vias aéreas dos pacientes. O emprego de terapias antagonistas de IL-5, IL-13, por exemplo, apresenta benefícios clínicos nesta população. Nesse contexto, os eosinófilos circulantes têm sido considerados importantes

biomarcadores para o monitoramento da eficácia terapêutica de anti-interleucinas, corticoides, dentre outros tratamentos (STOKES; CASALE, 2016).

A segunda categoria, pode ser considerada como um perfil TH2 baixo, manifestada pelo aumento de neutrófilos ou por um perfil paucigranulocítico com níveis normais de eosinófilos e neutrófilos no escarro e nas vias aéreas. Mediadores específicos implicados na patogênese da inflamação neutrofílica incluem IL-8, IL-23, IL-17 e IL-22. Indivíduos com esse perfil, tendem a ter resistência ao tratamento com corticoides. Já a inflamação com caráter paucigranulocítico parece apresentar melhora diante da terapia broncodilatadora intensiva (antagonistas muscarínicos de longa duração e/ou β -agonistas de ação prolongada). Esses pacientes, semelhantes àqueles com inflamação predominante neutrofílica, tendem a ter uma maior resistência aos corticoides e podem ter indicação para termoplastia brônquica (STOKES; CASALE, 2016).

2.4. ASPECTOS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO

A gestão padrão da doença engloba o seu diagnóstico, a padronização do tratamento, conforme a severidade, baseado nas diretrizes para asma, políticas educativas, apoio governamental em tratamentos à longo prazo, a disponibilidade de medicamentos essenciais para tratamento, profissionais de saúde treinados e um sistema de acompanhamento regular dos pacientes (GAN, 2014).

Os medicamentos essenciais recomendados ao tratamento da doença, segundo a OMS, são indicados para asma persistente, por serem eficazes na redução do número de ataques e na gravidade dos sintomas (GAN, 2014). É preciso iniciar o tratamento diário regular dos pacientes o mais rápido possível após a confirmação do diagnóstico, afim de que resultados mais promissores possam ser alcançados (GINA, 2018a). Isso engloba, inclusive a necessidade de melhoria do acesso e da adesão aos tratamentos disponíveis, duas premissas básicas para a manutenção da doença sob controle (TAVARES et al., 2016).

Para a obtenção da eficácia terapêutica deve-se prezar pelo uso de medicamentos que apresentem efetividade e segurança, devendo ser empregados inclusive como ação preventiva à crise asmática e que apresentem custo coerente à condição social (GINA, 2018a).

Os medicamentos disponíveis no mercado para tratar a doença são normalmente classificados em três categorias: a) medicação de controle, usados na manutenção regular por controlar os sintomas e reduzir o risco de exacerbação e declínio da função pulmonar; b) medicações de resgate, indicadas, se necessário, para alívio de sintomas exacerbados; e c)

terapias para asma grave, para exacerbações persistentes, apesar do tratamento otimizado com altas doses de medicamentos de controle (GINA, 2018a).

A Sociedade Torácica Britânica (BTS) descreve o tratamento, de forma resumida, em cinco passos terapêuticos a serem seguidos em adultos e crianças com asma crônica para controle da doença. Conforme a diretriz proposta, doenças de grau leve podem ser controladas exclusivamente com broncodilatadores de ação curta (passo 1). Caso o paciente precise ser medicado mais de uma vez por dia, deverá ter sua terapia associada a um corticoide sistêmico inalatório (ICS). Modificadores de leucotrienos (LTRA) ou baixas doses de teofilina², podem ser uma alternativa ao uso dos corticoides (passo 2) (BTS, 2016).

Asmas que permanecerem sem controle após o tratamento inicial devem ser tratadas com broncodilatadores de ação prolongada (LABA) associados à terapia com baixas doses de corticoides. Apesar dessa associação ser preferida, podem ser utilizadas nesta etapa doses moderadas ou altas de ICS isolado, ou baixas doses de ICS associadas a LTRA ou a teofilina (passo 3). Caso o controle da doença ainda esteja insatisfatório, é necessário aumentar a dose de ICS/LABA ou alternativamente, aumentar a dose de ICS/LTRA ou teofilina (passo 4). A necessidade de terapias específicas como omalizumabe, ou adicionais como corticoides orais são consideradas o passo 5 (BTS, 2016).

Normalmente, os ataques graves de asma demoram a ocorrer, considerando o início da doença a partir do aparecimento de sintomas iniciais de menor severidade, havendo tempo para o tratamento adequado sem hospitalização. O acompanhamento na atenção primária de saúde é vital para prevenção de exacerbações da doença oriundas de tratamentos inadequados (BTS, 2016).

As terapias complementares e alternativas disponíveis incluem acupuntura, homeopatia, medicina herbal, medicina ayurvédica, ionizadores, osteopatia e manipulação quiroprática, espeleoterapia, dentre outros tratamentos que ainda não participaram de estudos para conclusão de eficácia. O emprego de placebos em estudos multicêntricos atrelados a abordagem holística do terapeuta tem auxiliado nos estudos de novos princípios ativos com ação anti-inflamatória (GINA, 2018b).

2.5. PESQUISA DE NOVOS TRATAMENTOS

Aspectos científicos e éticos regulam as pesquisas de tratamentos inovadores e impõe obstáculos na elucidação de certos aspectos da doença. Há inconvenientes, por exemplo, na coleta de amostras para a investigação de certos órgãos de pacientes asmáticos,

² Metilxantina com estrutura similar a cafeína e a teobromina (TELLES FILHO, 2018c).

como os bronquíolos. E também não é viável a realização de múltiplas análises paralelas, no mesmo paciente, para a obtenção de amostras de tecido ao longo do tempo (TORRES; PICADO; MORA, 2005).

Estudos celulares e moleculares simultâneos estão sujeitos a problemas no transporte das amostras, e os estudos funcionais sobre o sistema respiratório em humanos ainda são difíceis de serem realizados. Também existem limitações no tamanho da população recrutada para amostra e problemas com a heterogeneidade com relação às populações doente e controle, a serem avaliadas. Além disso, não é possível o emprego de drogas em pacientes antes da verificação da segurança do produto, por meio dos ensaios clínicos (TORRES; PICADO; MORA, 2005).

Em detrimento da acessibilidade, custo dos cuidados, facilidades no transporte, armazenamento e manuseio, os camundongos tornaram-se o modelo animal adotado universalmente. Nestas investigações, a diferença anatômica apresentada entre os humanos e os camundongos ainda é, entretanto, um problema na transposição dos resultados de uma pesquisa com animais (GUALDI et al., 2010).

Em relação aos humanos, os camundongos têm uma ramificação das vias aéreas significativamente mais simples (JOHNSON; HARKER, 2017). Suas vias aéreas são grandes em relação a sua extensão corporal e a resistência das mesmas é relativamente baixa. Fator esse que dificulta evidências diretas da obstrução do fluxo aéreo quando estes animais são induzidos a asma (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2016).

Uma barreira encontrada nas pesquisas com camundongos em modelos de asma advém da preferência pelo manuseio de animais em idade adulta, não sendo possível prever em detalhes, com os estudos atualmente disponíveis, o comportamento das terapias farmacológicas para o tratamento da asma em crianças (faixa etária mais afetada pela doença). E esse fator ainda é agravado pela variação dos fenótipos da doença, o que tem exigido análises mais específicas, difíceis de serem observadas em animais isogênicos (GUALDI et al., 2010).

Ainda assim, os estudos de asma alérgica empregando camundongos têm permitido a identificação de importantes características patológicas e aspectos subjacentes a asma ao conseguirem mimetizar, em sua maioria, características marcantes da doença, como o remodelamento das vias aéreas, a hiperplasia de células caliciformes e a proliferação das células da musculatura lisa. Os modelos empregados para induzir o quadro inflamatório têm possibilitado inclusive a diferenciação dos fenótipos/endotipos da doença, com a visualização

de determinantes de cada resposta imunológica envolvida, como a degranulação de mastócitos, por exemplo (JOHNSON; HARKER, 2017).

Por isso, justifica-se o estudo aprofundado da doença nesses animais na tentativa de serem identificados novos alvos para intervenções terapêuticas, e também para a descoberta de marcadores para exames pré-clínicos e para a avaliação de novos tratamentos potenciais (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2016).

Os modelos em camundongos mais amplamente empregados na asma são baseados na indução da inflamação alérgica aguda das vias aéreas, após exposição a curto prazo a antígenos sensibilizantes (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2016).

A administração sistêmica de antígenos de proteínas, tais como a OVA, e subsequente desafio por inalação é um exemplo de modelo, capaz de reproduzir muitas características da resposta inflamatória das vias aéreas ao alérgeno (TOWARD; BROADLEY, 2004). A OVA é a principal proteína da clara do ovo, da superfamília das serpinas (GUALDI et al., 2010) e seu caráter alergênico é relativamente fraco (MCKNIGHT et al., 2017).

Por não ser um alérgeno que desencadeia comumente a asma em humanos, não é considerada o alérgeno ideal, por alguns autores. Inclusive pela tendência que apresenta de desencadear tolerância imunológica em camundongos em exposição crônica. Por isso, alérgenos alternativos continuam sendo pesquisados, a exemplo do *Dermatophagoides pteronyssinus* (GUALDI et al., 2010).

O emprego da OVA, entretanto, tem a vantagem desta proteína estar disponível na sua forma relativamente pura, apresentando níveis de endotoxinas contaminantes muito baixos em preparações padrão, permitindo a indução da resposta TH2 de forma preponderante. Diferentemente, as preparações à partir de alérgenos ambientais são muitas vezes intrinsecamente pró-inflamatórias, via mecanismos inatos, e também apresentam grande variabilidade em seus constituintes moleculares, o que torna a interpretação da resposta inflamatória alérgica mais complexa nestes casos (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2016).

No modelo com OVA, a administração concomitante de coadjuvantes ou imunopotenciadores não específicos, como o sulfato de alumínio (alúmen), é comumente adotada como recurso para aumentar a intensidade da resposta imune ao alérgeno (TORRES; PICADO; MORA, 2005). Esta imunização estimula a polarização de células TH2 e o aumento da produção de IgE específica para a OVA. Uma vez que os animais são sensibilizados por meio desta combinação, a administração repetida de OVA (alérgeno) nos pulmões conduz a uma estimulação robusta da memória celular TH2 que induz às alterações inflamatórias

características da asma alérgica humana (HALIM et al., 2014; KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

Recentemente, foi demonstrado que a expressão de CD23 (o receptor de baixa afinidade por IgE) por células não hematopoiéticas promove a indução de doença alérgica das vias aéreas em murinos quando a sensibilização ativa à OVA é alcançada por injeção peritoneal com alúmen, e quando pequenas quantidades de antígeno são entregues às vias aéreas (MCKNIGHT et al., 2017).

Por sua vez, a expressão de FcεRIα nos mastócitos mostrou-se importante na indução da asma alérgica quando a OVA é administrada repetidas vezes nas vias aéreas em pequenas quantidades, sem sensibilização sistêmica prévia. Os mastócitos também demonstraram ser importantes na indução da doença em camundongos sensibilizados à OVA por injeção intraperitoneal sem adjuvante, sendo a asma, nesse caso, induzida somente pela inalação de doses do antígeno administradas por via intranasal (IN) (MCKNIGHT et al., 2017).

Nos casos em que a mastocitose pulmonar, o aumento dos níveis séricos de IgE e a asma alérgica intensa são induzidas por altas doses de OVA, a IgE por si só parece não aumentar a degranulação dos mastócitos, ficando esta função atribuída possivelmente a outros mediadores como a IgG, o sistema complemento e citocinas específicas (MCKNIGHT et al., 2017). Assim, embora haja uma relação causal entre a IgE e a asma alérgica os modelos animais de asma com ovalbumina têm revelado a contribuição de diferentes classes de imunoglobulinas em camundongos (DULLAERS et al., 2017).

A linhagem de camundongos BALB/c é a mais utilizada em estudos de asma, capaz de produzir níveis elevados de anticorpos IgE contra OVA e maiores concentrações de citocinas TH2 no lavado broncoalveolar. Além da resposta do tipo TH2, a exposição a OVA em camundongos BALB/c, também conduz a resposta TH17, pois a sensibilização e o desafio com OVA aumentam a expressão de RNAm de IL-25 (IL-17E) no pulmão, relacionado a ampliação da inflamação eosinofílica nas vias aéreas (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

A contribuição aos efeitos inflamatórios promovidos por TH2, também é decorrente da produção de IL-17A (contribui para AHR e para o aumento da produção de muco), da produção de IL-1β (relacionado ao reparo do epitélio alveolar e à produção de outras citocinas pró-inflamatórias), da produção de TNF-α (motivador da resposta imune inata) e da produção de IL-6 (contribui para a resposta de fase aguda e participa da iniciação da cascata inflamatória). Além disso, a IL-17A e o TNF-α podem apresentar efeito sinérgico, o que amplia ainda mais a produção de células T e estimula em maior proporção a geração de

IL-6 (ZHANG et al., 2017a). A produção de IL-17 e IL-22, por TH17, por sua vez, está relacionada à severidade da asma, devido a indução da neutrofilia nas vias aéreas (MANNI et al., 2017). O desafio com OVA também pode promover a produção de proteína IL-33 no pulmão, cuja expressão se correlaciona com a manutenção da asma (KIM; DEKRUYFF; UMETSU, 2010).

No geral, os pesquisadores apresentam maior preferência em trabalhar com animais fêmeas, em idade adulta, por apresentarem convívio mais dócil e facilidade na manipulação (GUALDI et al., 2010). Além desta característica, recentemente, foi demonstrado por Warren e colaboradores (2017) que fêmeas BALB/c induzidas com OVA tendem a apresentar uma resposta inflamatória mais acentuada que os machos da espécie, reforçando a vantagem na adoção deste sexo.

Quando induzidas a asma, as fêmeas demonstraram maior concentração sérica de IgE OVA-específica, maior concentração de NO no pulmão e maior AHR, havendo aumento das células B, menores níveis de células dendríticas e baixa frequência de ILC2 no lavado traqueal. Já no tecido pulmonar as fêmeas apresentaram aumento da frequência de ILC2, além do aumento das células B. Um teste *ex vivo* ainda demonstrou aumento significativo dos níveis de IL-5 e IL-13 produzidos por ILC2 mediante estímulo da IL-33, destacando um potencial específico na localização e ativação de ILC2 na asma alérgica conforme o sexo (WARREN et al., 2017).

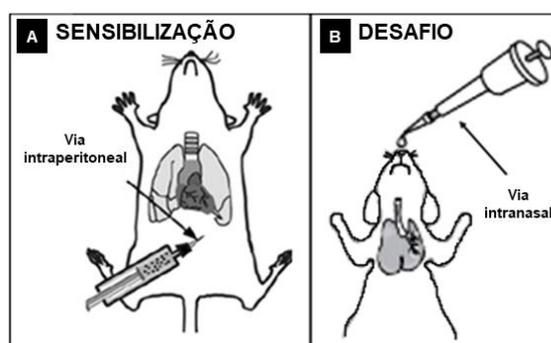
Por fim, bons estudos são capazes de conduzir a bons resultados quando se define de forma clara o que se deseja investigar de forma a adotar o modelo mais adequado para a condução do resultado esperado (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008). E nesse contexto, a rota de sensibilização e a escolha do antígeno podem oferecer diferentes questões sobre a patogênese da asma (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2016).

É importante reconhecer que todos os modelos animais de asma possuem limitações inerentes, o que torna difícil a definição de um modelo ideal. Em princípio, nenhuma espécie é capaz de desenvolver espontaneamente a doença de forma semelhante a asma humana. E, de certa forma, os modelos de potencialização a curto prazo apresentam restrição em relação a modelos de asma crônica, devido à ausência de histórico crônico de inflamação nos animais anterior a indução da asma aguda (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2016).

No entanto, apesar das limitações do modelo com OVA, muitas pesquisas baseadas no seu emprego, possibilitaram a descoberta de diversos aspectos relacionados à asma e seu tratamento (SHINAGAWA; KOJIMA, 2003), como por exemplo, a via

intraperitoneal (IP) e IN, as quais são as vias mais comumente utilizadas para a sensibilização e desafio ao alérgeno em camundongos, respectivamente. A sensibilização à OVA é adquirida através de mais de uma exposição por via intraperitoneal. A dose IP para sensibilização varia de acordo com o estudo a ser realizado, sendo entre 1 µg e 100 µg (volume de 200 µl) a cada sensibilização. As doses entre 10 µg e 50 µg são mais aconselhadas. O desafio via IN é um procedimento de simples execução que se baseia na aspiração da OVA para o pulmão, por inserção da solução na narina do animal, durante anestesia geral, quando é atingida a inibição dos reflexos da via aérea superior (GUALDI et al., 2010).

Figura 6. Vias de sensibilização e desafio mais utilizadas em camundongos para indução da asma alérgica.



Modelo de sensibilização por injeção IP de OVA (a). Fonte: Adaptado de DYKXHOORN; LIEBERMAN, 2006; Modelo de desafio por administração via IN de OVA (b). Fonte: Adaptado de BRANCA et al., 2010.

2.6. PESQUISA DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM PRODUTOS NATURAIS

Diferente da gestão ideal, muitos países não possuem os medicamentos essenciais recomendados pela OMS para o tratamento da asma. Além disso, muitos medicamentos não têm sua fabricação padronizada, estando disponíveis em diferentes concentrações no mercado, o que dificulta a sua prescrição e a compreensão do paciente sobre o tratamento adotado (GAN, 2014).

No geral, muitos asmáticos não têm recebido o tratamento adequado devido a variação nos subtipos da doença, limitante para a progressão dos alvos terapêuticos (RAYEES et al., 2014). Porém, também vem sendo observada má gestão dos cuidados em saúde, principalmente em países de baixa renda, que tem disponibilizado tratamento aos indivíduos somente em casos de urgência, deixando o indivíduo susceptível ao quadro infeccioso da doença e seus inconvenientes e contribuindo para o encarecimento da assistência. Em alguns lugares, a situação é ainda mais crítica. Nem todos os indivíduos possuem acesso à terapia disponível e, por vezes, tendem a adquirir medicamentos de baixa qualidade (GAN, 2014).

É importante salientar que as terapias disponíveis atualmente para asma são paliativas, com retorno dos sintomas após a interrupção do tratamento, e, se utilizadas a longo prazo, estão associadas a efeitos adversos significativos, como fraturas ou perdas ósseas, glaucoma (RAYEES et al., 2014) e cardiotoxicidade (FERGESSON; PATEL; LOCKEY, 2017), os quais representam barreiras para adesão ao tratamento, principalmente, porque muitos desses efeitos não são passíveis de prevenção, em especial em populações específicas, de maior vulnerabilidade, como os fumantes (HE et al., 2017).

As plantas são consideradas uma das formas clássicas de terapia alternativa à população e o conhecimento sobre a ação das mesmas designa, em muitos casos, no único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MANZANO et al., 2016).

Por essa razão, estudos capazes de confirmar o potencial efeito dos compostos de fontes naturais têm recebido destaque no meio científico. As substâncias naturais são precursoras de diversas tecnologias com o intuito de aprimorar a prática da alimentação e a cura de doenças na sociedade, originando fórmulas terapêuticas naturais ou até mesmo, produtos similares, de origem sintética (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004).

Para se ter uma ideia da grande disponibilidade de extratos que podem ser empregados em pesquisas, Mendelsohn e Balick (1995) propuseram que, se cada espécie da floresta tropical, o que equivale a um número aproximado de 125 mil, apresentar pelo menos 3 partes que podem ser investigadas (raízes, caules/folhas e frutos), e que cada uma destas partes pode fornecer pelo menos 2 tipos de extrato (um apolar e outro polar), chegaria-se a probabilidade da existência de 750 mil extratos para pesquisa. Ao todo, haveria 375 milhões de testes individuais a serem realizados, somente em plantas das florestas tropicais.

Supõe-se, entretanto, que este resultado, possa estar subestimado, visto que autores sugerem que as florestas abrigam em torno de 600 mil espécies (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004). Embora a porcentagem de espécies caracterizadas tenha crescido devido à maior quantidade de pesquisas em andamento, acredita-se que ainda existe um grande número de compostos vegetais cuja aplicação e segurança não estão bem elucidadas (ATANASOV et al., 2015). Estima-se que apenas 6%, das aproximadamente 300.000 espécies de árvores existentes, foram sistematicamente investigadas farmacologicamente, e apenas 15% investigadas fitoquimicamente (CRAGG; NEWMAN, 2013).

O fato é que no Brasil existe um verdadeiro “império vegetal”, no qual grande parte da população busca seus remédios, havendo um grande número de espécies de uso medicinal. Assim, essas plantas são uma boa oportunidade científica e tecnológica para o

desenvolvimento de medicamentos para tratar problemas de saúde, principalmente em países de terceiro mundo, por serem acessíveis a população. É importante levar em conta que a droga vegetal é um produto melhor tolerado pelo organismo do que as drogas de origem sintética (CARVALHO, 2017), fazendo as pesquisas acerca do assunto ainda mais atraentes.

Os produtos utilizados no mercado para fins terapêuticos, aspirina, codeína, digitoxina e eugenol são exemplos de fármacos obtidos a partir de fontes vegetais. Outras duas descobertas muito significantes foram os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina), e a podofilotoxina, que originou dois derivados semissintéticos, isolados de *Podophylum peltatum*, o etoposido e o teniposido, empregados no tratamento do câncer (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004).

Em se tratando de produtos naturais de origem vegetal, nem sempre os princípios ativos, determinantes da atividade farmacológica do produto, são quimicamente definidos, sendo atribuída a droga bruta (planta seca), ou ao extrato total, que se apresentam como misturas complexas de substâncias na atividade farmacológica do produto (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004).

Atualmente, no ramo das pesquisas, existem disponíveis bibliotecas complexas com dados de inúmeros organismos e seus constituintes bioativos únicos, e ou seus análogos sintéticos, produzidos inicialmente por métodos químicos combinatórios. Esse recurso tem facilitado abordagens complementares entre métodos naturais e sintéticos na busca pela otimização dos tratamentos hoje disponíveis (CRAGG; NEWMAN, 2013).

No que diz respeito à asma, os β -agonistas, salbutamol e salmeterol, empregados no controle dos sintomas, são provenientes do estudo com produtos naturais. A planta *Ephedra sínica*, muito utilizada na medicina tradicional chinesa, serviu de base para a síntese desses fármacos. Outro medicamento utilizado no tratamento da asma oriundo de produtos naturais é o cromoglicato, de ação broncodilatadora, desenvolvido a partir de estudos com a planta *Ammi visnaga L.* (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os corticoides inalados e agonistas do receptor adrenérgico β_2 permanecem como o pilar do tratamento da asma (ROGERIO et al., 2009). Mas outras pesquisas em busca de alternativas para o tratamento da doença continuam sendo feitas. Um estudo bio guiado com o extrato hidroalcoólico das raízes de *Waltheria indica* avaliou o efeito da atividade enzimática sobre a inibição da contração do músculo liso (enzima fosfodiesterase 4A1 α), e nos processos inflamatórios (enzima fosfolipase A2 e enzima araquidonato 5-lipoxigenase, 5-LOX), verificando inclusive sua atividade sobre o relaxamento da traqueia isolada de ratos e sugeriu ser a utilização do extrato eficaz no tratamento tradicional de asma e outras condições

inflamatórias, atribuídas, em parte, à presença de (-)- epicatequina nas raízes (ZONGO et al., 2014).

A erva medicinal chinesa, *Astragalus membranaceus*, popularmente empregada no tratamento de doenças anti-inflamatórias, também tem demonstrado valor terapêutico no tratamento da asma mediante estudo. Seu extrato foi capaz de inibir a expressão de NF- κ B e suprimir sua translocação do citoplasma para o núcleo em amostras de tecido pulmonar, atenuando a hiperplasia e a AHR, reduzindo os eosinófilos e os linfócitos no lavado broncoalveolar. O tratamento com o extrato reduziu a expressão dos principais iniciadores de citocinas estimulados por TH2 (IL-4 e IL-5) (YANG et al., 2013).

Outro estudo investigou os efeitos do óleo de *Nigella sativa*, como alternativa de suplementação terapêutica à asma, pelo fato do mesmo ser tradicionalmente empregado no tratamento de doenças inflamatórias. No mesmo, a adição de *Nigella sativa* gerou progressos sobre o controle da asma, sendo observada tendência na melhoria da função pulmonar, associada a uma notável normalização da eosinofilia sanguínea, apesar da necessidade da realização de mais estudos para melhores esclarecimentos sobre as particularidades desta forma de tratamento (KOSHAK et al., 2017). Este é mais um exemplo de como os estudos com produtos naturais podem descobrir novas formas de tratamento e podem aumentar o êxito sobre o controle dos sintomas associados a doença.

É importante ressaltar que os produtos naturais contribuem não apenas para o desenvolvimento e a obtenção de novos fármacos, mas também para a compreensão de novos mecanismos de ação, bem como para a elucidação de processos fisiológicos (SIMÕES et al., 2017).

Diversas plantas apresentam capacidade de suprimir ou estimular componentes do sistema imunológico envolvidos em respostas celulares e/ou humorais, uma vez que este sistema age de forma integrada. Porém, embora a atividade imunomodulatória de muitas espécies já seja conhecida, pouco se sabe a respeito dos mecanismos pelos quais estas plantas exercem tal atividade (MAJDALAWIEH; FAYYAD, 2015).

O óleo essencial derivado de *C. verbenacea* e seus compostos isolados α -humuleno e *trans*-cariofileno apresentam efeito anti-inflamatório, inclusive em modelos de doença alérgica. Os estudos conseguiram demonstrar que o óleo essencial de *C. verbenacea* reduziu a pleurisia induzida por OVA, inibindo a exsudação e migração celular de eosinófilos e células mononucleares. Os ativos também reduziram os níveis de citocinas inflamatórias através da inibição de NF- κ B (ROGERIO et al., 2009).

A investigação de substâncias capazes de controlar o influxo de eosinófilos, que envolve a expressão de citocinas e proteínas, com marcantes efeitos inflamatórios e indução de danos no tecido pulmonar, apresenta-se como uma alternativa promissora para o tratamento de doenças inflamatórias de origem alérgica (ROGERIO et al., 2009), uma vez que os eosinófilos são um dos principais contribuintes da inflamação de caráter alérgico (YANG et al., 2013).

A ligustrazina, um alcaloide presente na erva chinesa chuanxiong é um exemplo de uma planta com ampla aplicação na medicina popular, cujo estudo científico comprovou efeito sobre a redução da asma alérgica, induzida por OVA em camundongos C57BL/6, com ação imunomodulatória sobre as respostas TH1/TH2/Treg e TH17, relacionadas a doença. O tratamento com o alcaloide levou redução do influxo de eosinófilos e neutrófilos, devido a promoção do reequilíbrio dos perfis de citocinas e das razões dos fatores de transcrição Tbet/GATA-3 e Foxp3/ROR γ t, contrarregulados na asma (JI et al., 2014).

2.6.1. Propriedade anti-inflamatória e imunomodulatória de plantas do gênero *Copaífera*

As espécies de *Copaífera L.* são nativas das regiões tropicais da América Latina e África Ocidental. As copaibeiras são árvores de crescimento lento que conseguem alcançar entre 25 a 40 metros de altura e ter vida longa de até 400 anos. Seu tronco mede de 0,4 a 4 metros de diâmetro, é áspero e de coloração escura. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares. A floração e frutificação das copaíbas ocorrem a partir dos 5 anos de idade, florescendo entre os meses de outubro e julho e frutificando entre junho e outubro, com variações dentro destes intervalos, dependendo da região e clima, com ausência de florescimento anual, em algumas regiões. Os frutos contêm uma semente ovoide envolvida por um arilo abundante e colorido (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Existem mais de 60 espécies da planta catalogadas no mundo inteiro (TEIXEIRA et al., 2017). No Brasil, ocorrem mais de vinte espécies do gênero, na forma de arbustos ou árvores frondosas (CARVALHO, 2017). As espécies *C. officinalis L.*, *C. guianensis Desf.*, *C. reticulata Ducke*, *C. multijuga Hayne*, *C. confertiflora Bth.*, *C. langsdorffii Desf.*, *C. coriacea Mart.* e *C. cearensis Huber exDucke* são as espécies mais abundantes (LEANDRO et al., 2012). Popularmente denominadas copaíbas, podem ser conhecidas por diversos outros nomes em diferentes regiões (CARVALHO, 2017).

Em princípio a origem do nome copaíba é proveniente do tupi cupa-yba e significa árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão ao óleo que é guardado em seu

interior. O óleo e suas propriedades medicinais eram bastante difundidos entre os índios latino-americanos no século XVI, época da colonização europeia na região. A descoberta da terapêutica indígena permitiu que os primeiros médicos que trabalharam no Brasil contornassem parcialmente a escassez dos remédios que eram empregados na Europa, mas cujo suprimento à Colônia era intermitente (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A oleorresina que a planta produz é um exsudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis, encontrada em canais secretores localizados em todas as partes da árvore, chamados canais esquizogênicos ou esquizolisogênicos. Estes canais são formados pela dilatação de espaços intercelulares (meatos) que se intercomunicam no meristema. No tronco há maior saliência do aparelho secretor, que geralmente localizam-se nas suas cascas ou no lenho (CARVALHO, 2017; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A obtenção da oleorresina é denominada escoamento primário ou normal quando canais esquizogênicos aparecem no início do desenvolvimento vegetal e permanecem ao longo da vida da planta. Porém, se o aparelho secretor da planta não se desenvolve, mas, posteriormente, surge um novo aparelho secretor, motivado por causas externas, o escoamento é considerado secundário ou primário (CARVALHO, 2017).

A maior parte da oleorresina é obtida do tronco, através do processo de extração total, com a derrubada da árvore, o que esgota sua capacidade de produção consecutiva. Estima-se que uma única árvore possa gerar em média até 40 ou 50 litros de óleo por ano, com variações de rendimento conforme espécie. A quantidade do oleorresina obtida pode ser influenciada por fatores como o aumento de luminosidade e a diminuição de nitrogênio no solo. Estudos com *C. multijuga* obtiveram maiores quantidades de óleo na estação chuvosa em árvores localizadas em terreno argiloso (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Figura 7. Características físicas das Copaibeiras e demonstração da coleta da oleorresina.



Tronco da Copaibeira (a). Fonte: Adaptado de ÁRVORES DO BRASIL, 2018; Folhas e flores (b). Fonte: Adaptado de ÁRVORES DO BRASIL, 2018; Frutos (c). Fonte: Adaptado de TERAPIA COM AROMAS, 2014; Sementes (d). Fonte: Adaptado de ANDRADE, 2013; Extração da oleorresina (e). Fonte: Adaptado de ANDRADE, 2013.

Desde que foi descoberta, esta substância vem sendo amplamente empregada na medicina popular, por meio da administração tópica e oral, no tratamento de diversas enfermidades, inclusive asma e bronquite (LEANDRO et al., 2012), apresentando baixo custo, fácil acesso e com um poder terapêutico, cujas propriedades biológicas estão amplamente descritas na literatura (BOTELHO et al., 2010). Sua principal atribuição é a ação anti-inflamatória e antisséptica, sendo a mesma ação terapêutica normalmente atribuída a todas as espécies (CARVALHO, 2017).

O óleo é uma das fontes renováveis com ação terapêutica mais importantes para as populações da região Amazônica (GELMINI et al., 2013), onde a sua produção é considerada abundante (ALMEIDA et al., 2012). Principalmente, nesta região, a oleorresina pode ser adquirida no mercado, envasado em sua forma bruta, em cápsulas para uso interno e na forma de óvulos vaginais. Sendo também utilizada na formulação de xaropes expectorantes e como aditivo em sabonetes medicinais (CARVALHO, 2017).

Evidências clínicas não padronizadas e não-clínicas recomendam uma dose de 320 mg de óleo, até 4 vezes ao dia para o tratamento de casos inflamatórios e quadros infecciosos. Na homeopatia a oleorresina é utilizada dinamizada para tratar cistite, coriza, bronquite, tosse e urticária. A oleorresina também pode estar sob a forma de emulsão aquosa, na concentração de 12,5%, sendo denominada mistura copaíba ou mistura Lafayette. Essa formulação é útil como diurético, na dose de 8 ml/dia, mas também pode ser empregada em infecções do aparelho respiratório e geniturinário (CARVALHO, 2017).

Na região Amazônica a dose oral administrada para tratar inflamações internas, bronquites e tosses é de apenas 2 gotas, misturadas em uma colher de mel, em jejum, diariamente. Podendo também serem utilizadas 3 gotas, misturadas com água morna, pela manhã, para curar bronquite crônica, asma e tosse (CARVALHO, 2017).

Apesar da diversidade de espécies existentes no Brasil, das significativas diferenças de composição química que ocorrem entre elas (devido a variações ambientais ou outros fatores), a oleorresina tem sido utilizada na medicina popular e na indústria de cosméticos como se fosse uma única droga vegetal (CARVALHO, 2017).

Atualmente o investimento em estudos científicos vem conseguindo comprovar os efeitos farmacológicos atribuídos à planta. O estudo químico mais antigo que se tem registro com descrição da oleorresina de copaíba foi feito em 1829 e se refere ao composto como ácido copaívico. Posteriormente, os sesquiterpenos e diterpenos presentes no óleo foram descritos pela literatura, (LEANDRO et al., 2012). A fração de óleo essencial é composta, então, basicamente, por sesquiterpenos de hidrocarbonetos e oxigenados, enquanto a fração

resina, por ácidos diterpênicos, sendo que as espécies apresentam diferenças na proporção dos sesqui e diterpenos (CARVALHO, 2017).

O primeiro estudo que objetivou a verificação da atividade anti-inflamatória da oleorresina de copaíba foi realizado por Basile e colaboradores (1988). O mesmo se baseou na verificação dos efeitos da oleorresina administrada por via oral (VO) no tratamento de edemas, induzidos em patas de rato, por meio de carragenina. A resposta inflamatória induzida por carragenina está associada ao aumento da produção de PGs, derivadas de COX-1 e COX-2 e pela elevação dos níveis de NO (FERNANDES et al., 2007). Outros estudos demonstraram que a atividade farmacológica das oleorresinas varia conforme as diferentes espécies de copaíba adotadas, os diferentes agentes flogísticos empregados e as mudanças sazonais (LEANDRO et al., 2012; VEIGA-JUNIOR et al., 2007).

Baylac e Racine (2003) conseguiram demonstrar em experimentos que o óleo essencial de *C. officinalis* promoveu a inibição *in vitro* da 5-LOX, importante enzima da cascata inflamatória. Enquanto o estudo de Castro-e-Silva e colaboradores (2004) verificaram a capacidade da oleorresina de copaíba de desacoplar a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, com provável inibição da proliferação hepatocelular após hepatectomia parcial em ratos.

Silva e colaboradores (2009) avaliaram o efeito protetor do óleo de *C. langsdorffii* sobre abas da pele necrosada, oriundas do dorso de ratos Wistar. Os autores verificaram que a resina de óleo apresentou antilipoperoxidação discreta, com intensa atividade antioxidante e anti-inflamatória na isquemia e reperfusão de retalhos cutâneos randomizados, ação promissora almejada em cirurgias plásticas.

Em 2010, Gomes e colaboradores estudaram a espécie *C. multijuga*, por meio da extração de uma fração hexânica, uma clorofórmica e uma metanólica. Segundo o autor, as três frações inibiram significativamente o número de contorções induzidas por ácido acético e a segunda fase de resposta induzida por formalina, em camundongos Swiss. Também houve inibição do edema da pata dos animais com aumento da permeabilidade vascular, induzida por diversos agentes flogísticos como a carragenina, a histamina e a serotonina. Tal fato sugere que o efeito nociceptivo é mediado por receptores opioides e que a atividade anti-inflamatória ocorra por meio da inibição das vias histaminérgicas e serotoninérgicas.

Kobayashi e colaboradores (2011) investigaram os efeitos anti-inflamatórios de *C. multijuga* em ratos Wistar e os dados demonstraram que as doses testadas de 100 e 200 mg/kg, na concentração de 200 µl/ml de óleo essencial, apresentaram efeitos anti-inflamatórios *in vivo* e *in vitro* baseados na redução da migração de leucócitos para a cavidade

pleural de ratos e para a solução contendo agente o quimiotático LPS (lipolissacarídeo), respectivamente.

Estudos vem priorizando a verificação do potencial anti-inflamatório em cada composto, presente no óleo, uma vez que a atividade farmacológica, dentre elas o potencial anti-inflamatório, das plantas do gênero *Copaífera* tem sido atribuídas preponderantemente aos sesquiterpenos, especialmente ao composto de maior concentração presente na oleorresina extraída da planta, o *trans*-cariofileno (LUCCA et al., 2015).

O estudo de Veiga-junior e colaboradores, publicado no ano de 2007, avaliou a atividade anti-inflamatória da oleorresina de três diferentes espécies de *Copaíba*, *C. multijuga*, *C. cearensis* e *C. reticulata*. A oleorresina da *C. multijuga*, na concentração de 100 mg/Kg de peso, foi o de maior potência na inibição da produção de NO e da inflamação aguda da pleura, induzida por zimosano em camundongos. Segundo os autores, o referido aconteceu, provavelmente, devido à maior concentração de *trans*-cariofileno em sua composição, se comparada às outras duas espécies estudadas.

Fernandes e colaboradores (2007), avaliaram as propriedades anti-inflamatórias de α -humuleno e *trans*-cariofileno, isolados de *Cordia verbenácea*, administrados VO, em ratos e camundongos. No experimento, o edema foi induzido por carragenina, bradicinina e histamina e a resposta inflamatória, estimulada por OVA. Ambos os sesquiterpenos foram eficazes na redução da resposta edematogênica, induzida por bradicinina e OVA, e na redução do PAF. Foi sugerida uma resposta duradoura desses compostos, inclusive na fase tardia do edema, acreditando-se que os efeitos antiedematosos observados estão relacionados com a interferência sobre a produção dos mediadores inflamatórios, tais como histamina, PGs, cininas, NO, citocinas, entre outros.

Porém, ainda no estudo citado, apenas o α -humuleno reduziu a formação do edema causado por injeção de histamina, algo que permitiu inferir que os dois compostos têm diferentes mecanismos de ação. Na tentativa de compreender melhor os mecanismos envolvidos, foi observado que na indução do edema por carragenina, os efeitos anti-inflamatórios parecem não estar relacionados com a inibição do influxo para o local inflamatório, pois os dois compostos não alteraram a migração de neutrófilos. Apenas doses mais elevadas de *trans*-cariofileno (> 100 mg/Kg) reduziram significativamente o aumento da atividade da mieloperoxidase nos animais tratados com carregenina. Ambos os compostos reduziram a produção de PGE-2, inibiram a expressão da COX-2, da enzima óxido nítrico sintase induzível e a ação de TNF- α na resposta imune desencadeada pelo edema. O α -humuleno ainda foi capaz de inibir a IL-1 β (FERNANDES et al., 2007).

Em um trabalho semelhante, Medeiros e colaboradores (2007), conseguiram verificar a regulação positiva dos receptores de cinina B1, por parte do α -humuleno e a inibição da ativação de NF- κ B, por ambos os compostos, fato que ratifica a suposição de que tais compostos atuam por mecanismos de ação distintos, o que pode ter relação inclusive com a disponibilidade dos mesmos quando administrados VO (FERNANDES et al., 2007).

Semelhante aos anti-inflamatórios, comumente empregados no tratamento de distúrbios anti-inflamatórios, os quais são potentes inibidores da liberação de citocinas e PGs, como os inibidores da COX e os glicocorticoides, os compostos α -humuleno e *trans*-cariofileno inibem a PGE-2 da COX-2. Porém, as propriedades farmacocinéticas desses compostos precisam ser melhor estabelecidas (FERNANDES et al., 2007).

Ku e Lin (2013) investigaram o efeito anti-inflamatório de 27 terpenos por meio da modulação dos perfis de secreção de citocinas TH1, em especial IL-2 e IFN- γ , e de citocinas TH2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-10, utilizando esplenócitos primários de murinos e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Foi identificado que o *trans*-cariofileno, assim como outros terpenos, inibiu significativamente tanto IL-2, quanto IL-10, sugerindo um potencial anti-inflamatório por inibição da resposta imune das células T.

Fontes e colaboradores (2017) demonstraram o efeito imunomodulatório *in vitro* e *in vivo* do óleo do *trans*-cariofileno, sobre os mediadores H₂O₂, NO, IFN- γ , TNF- α e IL-17 produzidos por esplenócitos de camundongos com encefalomielite autoimune experimental (EAE), modelo para estudo de Esclerose Múltipla, mostrando ser esse composto promissor no tratamento de doenças inflamatórias e desmielinizantes. Anteriormente, Dias e colaboradores (2014) já haviam demonstrado *in vitro* o potencial da oleorresina em inibir os mediadores acima citados.

Percebe-se, entretanto, que apesar da literatura estar atribuindo o efeito do óleo principalmente aos seus compostos majoritários, sua ação moduladora pode ser devido à sua mistura complexa de compostos com efeitos sinérgicos ou aditivos entre o *trans*-cariofileno e outros constituintes químicos presentes (DIAS et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2017).

Mesmo em meio a tantos estudos investigativos, percebe-se a necessidade de outras pesquisas capazes de auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória de fontes vegetais, tidas como misturas complexas.

Além deste potencial de atividade, a oleorresina das copaibeiras também tem apresentado efeito bacteriostático contra bactérias de interesse clínico e efeito bactericida contra fitopatógenos (FONSECA et al., 2015).

Em um estudo sobre o efeito do óleo na sepsis, o autor concluiu ser este material útil sob administração subcutânea profilática, por ter garantido o aumento da sobrevivência em comparação a ratos que não receberam o óleo ou que o receberam por gavagem (BOTELHO et al., 2014). A oleorresina ainda está relacionada a efeitos antitumorais, sendo relatado inibição do volume do tumor e redução do número de nódulos (LIMA et al., 2003).

Novos estudos vêm sendo voltados ao favorecimento do desenvolvimento de formulações farmacêuticas, conforme a demanda e às doenças cujos tratamentos precisam ser aperfeiçoados. No caso da asma que se manifesta em diferentes fenótipos, com variadas respostas terapêuticas e dificuldades de acesso ao tratamento empregado, novas pesquisas tendem a ser promissoras para a proposição de tratamentos alternativos àqueles já existentes. Uma vez que o óleo de copaíba tem demonstrado inibir alguns dos mediadores inflamatórios presentes na asma alérgica e é extensamente empregado na medicina popular para tratar distúrbios do aparelho respiratório, torna-se importante analisar seu efeito no modelo de asma aguda induzida por OVA.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos imunomodulatórios do óleo de copaíba, em camundongos BALB/c, no modelo de asma alérgica aguda por OVA.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar os compostos presentes, assim como sua porcentagem, na amostra de OC adquirida para o estudo;
- b) Verificar a segurança das doses a serem administradas, mediante a realização de testes bioquímicos (taxa de glicose, função renal e hepática);
- c) Verificar os efeitos do OC sobre a contagem e o perfil celular do lavado traqueal obtido de animais em modelo de asma e tratados com os respectivos compostos;
- d) Avaliar os efeitos do OC sobre os níveis dos mediadores IL-4, IL-17, IFN- γ , TNF- α e NO em sobrenadante de lavado traqueal e de macerado pulmonar;
- e) Investigar os efeitos do OC, no tecido pulmonar, por meio da histopatologia e da morfometria semiautomática e automática.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO DE COPAÍBA

O óleo de Copaíba, lote 16E09-B027-009523, foi adquirido da empresa Pharmanostra (São Paulo, Brasil). Duas amostras do óleo foram separadas por cromatografia gasosa (CG), sendo uma amostra destinada a análise por CG-FID e outra por CG-MS.

4.1.1. CG-FID

A amostra do óleo foi diluída em éter etílico e analisada em um cromatógrafo de gás Shimadzu GC2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um auto-amostrador AOC-20s, FID.

Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5 (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m de comprimento x 0,25 mm i.d. x 0,25 μ m de espessura do filme) e as seguintes condições de operação: temperatura da coluna programada para subir de 60 a 240°C a 3°C/min, mantendo-se a 240°C por 5 min; gás hélio (99,999%) como transportador a uma taxa de fluxo de 1,0 ml/min; modo de injeção, utilizando-se o volume de injeção de 0,1 μ l (proporção dividida de 1:10) com as temperaturas do injetor correspondendo a 240°C e do detector a 280°C. As concentrações relativas dos componentes foram obtidas pela normalização da área de pico (%) e as áreas corresponderam a média das análises triplicadas CG-FID.

4.1.2. CG-MS

A amostra do óleo foi diluída em éter etílico e analisada em um cromatógrafo de gás Shimadzu GC2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um auto-amostrador AOC-20i.

Empregou-se a coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m de comprimento x 0,25 mm i.d. x 0,25 μ m de espessura do filme). Foi adotado o modo de ionização eletrônica a 70eV e utilizado o gás hélio (99,999%) como gás de arraste a um fluxo constante de 1,0 ml/min. O volume de injeção foi de 0,1 μ l (proporção dividida de 1:10). As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram ajustadas para 240°C e 280°C, respectivamente. O programa de temperatura do forno foi o mesmo descrito no subitem 4.1.1. Os espectros de massa foram realizados com um intervalo de varredura de 0,5 s, na faixa de 40 a 600 Da. A identificação dos componentes do óleo de copaíba baseou-se em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS sob as mesmas condições de

operação do CG em relação a uma série homóloga de n-alcenos (C8-C20). As estruturas foram confrontadas com as bibliotecas espectrais Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 (MCLAFFERTY, 2008), e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura. Compostos padrão disponíveis no laboratório também foram coeluídos com o OC para confirmar a identidade de alguns componentes do óleo essencial.

4.2. VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO*

Foram utilizados no experimento 15 camundongos (N=15) da linhagem C57BL/6, fêmeas, saudáveis, entre 6 a 8 semanas de idade, de procedência do Biotério do Centro de Biologia e Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Os animais foram mantidos durante o período de experimentação no Biotério do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF, conforme as exigências do conselho de ética em experimentação animal: armazenados em gaiolas de polipropileno, climatizadas, com temperatura em torno de 22°C e iluminação mista promovida por luz natural e lâmpadas fluorescentes controladas automaticamente para acenderem às 6h e apagarem às 18h. Eles foram armazenados nas gaiolas sobre camas de maravalhas selecionadas, porém não esterilizadas, mamadeira de água e cocho para ração do tipo paletizada, tendo livre acesso a comida e a água.

O experimento consistiu na distribuição aleatória dos animais em três grupos, contendo, cada um, 5 animais por gaiola, submetidos aos esquemas de tratamento previstos para o modelo de asma adotado, com duração de 12 dias e administração dos tratamentos por gavagem, VO. O primeiro grupo consistiu no grupo controle negativo (CN) e foi tratado com diluente (2% Tween 80). Os outros dois grupos foram tratados com o OC, um grupo na dosagem de 50 mg/Kg e outro na dosagem de 100 mg/Kg, conforme demonstrado na Figura 11.

O sangue dos animais foi coletado no 13º dia, mediante anestesia, IP, com 50 mg/Kg de quetamina e 3,33 mg/Kg de xilazina, sendo o animal posteriormente eutanasiado com sobredose de ambas as anestésias e ruptura do diafragma. Cada amostra coletada foi centrifugada a 2500 rpm (1090 x g), por 10 min (Centrífuga excelsa II, 206BL, FANEM, SP, BR) e o soro foi congelado a -86°C para ser posteriormente examinado para identificação de variações na concentração da glicose (GLI), alteração da função renal (creatinina, CRE e ureia, UR) e hepática (aspartato aminotransferase, AST, alanina aminotransferase, ALT, gama glutamil transferase, GGT, fosfatase alcalina, FA e albumina, ALB) dos animais, sendo

empregado um analisador BT 3000 plus (Wiener Lab Group, Rosário, AR) para a dosagem laboratorial. Utilizou-se um método enzimático colorimétrico para as dosagens.

O emprego dos animais diante das condições apresentadas foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Pró-reitoria de Pesquisa da UFJF, protocolo n° 044/2015.

4.3. INDUÇÃO DA ASMA E TRATAMENTO

Para o modelo de asma e verificação da eficácia do tratamento foram utilizados 25 camundongos da linhagem BALB/c (N=25), fêmeas, adultas entre 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo CBR da UFJF. Os animais ficaram mantidos, durante o período de experimentação, no Biotério do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF, sob as mesmas condições descritas anteriormente no subitem 4.2., tendo sido alocados de forma aleatória, 5 animais por gaiola. Finalizado o tempo de quarentena, as gaiolas contendo 5 animais cada foram delineadas ao acaso entre os grupos experimentais. O primeiro grupo consistiu no controle negativo (CN), o segundo no controle positivo (CP), o terceiro no grupo de tratamento controle, realizado com dexametasona (DEX), o quarto no grupo de tratamento com OC na menor concentração (50 mg/Kg) e o quinto no grupo de tratamento com OC na maior concentração (100 mg/Kg). A composição dos grupos está detalhada na Figura 11.

O emprego dos animais diante das condições apresentadas foi aprovado pelo CEUA da Pró-reitoria de Pesquisa da UFJF, protocolo n° 015/2016.

A indução da asma foi realizada com base no modelo de asma aguda com sensibilização por administração sistêmica de antígenos de proteínas, nesse caso, a OVA e, subsequente desafio por injeção de OVA nas vias aéreas (REBER et al., 2012) (Figura 11).

Os animais foram sensibilizados por meio de injeções, IP, aplicadas nos dias 0, 7 e 14 do experimento. As injeções continham 50 µg de OVA associada a 2 mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) (adjuvante), diluídos em 0,2 ml de tampão fosfato-salino (PBS) (pH: 7,2). O grupo controle negativo recebeu volume correspondente de cloreto de sódio 0,9% (NaCl 0,9%) estéril, associado ao adjuvante no lugar da OVA.

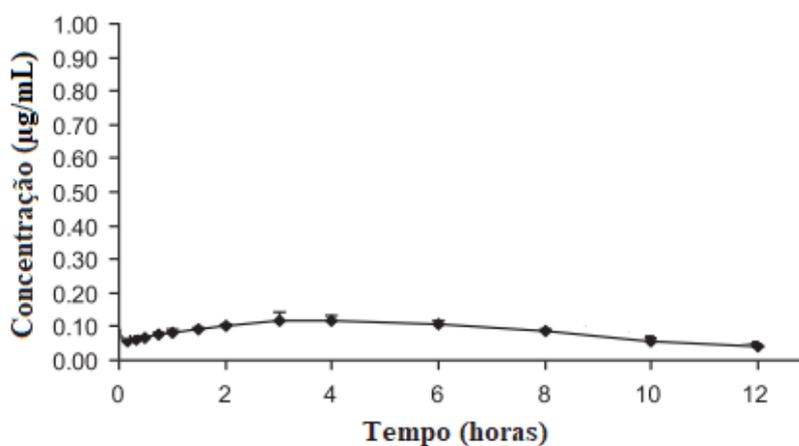
Para serem desafiados os animais foram anestesiados com 150 µL da solução quetamina (50 mg/Kg)/xilazina (3,3 mg/Kg) (REBER et al., 2012). Um volume de 12,5 µL da solução de OVA (0,4 mg/ml) foi administrado em cada narina. O grupo controle negativo recebeu volume correspondente de NaCl 0,9%. A administração da OVA ou de NaCl 0,9% IN

foi realizada ao longo de duas semanas (dias 16 a 27), na frequência de 3 vezes por semana, tendo por base sempre o último desafio (Figura 11).

Os tratamentos foram administrados diariamente, duas vezes ao dia (12 x 12h), ao longo de 12 dias (dias 16 a 27), sendo a primeira dose administrada 120 min após cada desafio com OVA/NaCl 0,9% (MATSUBARA et al., 2008), havendo equivalência de horários nos dias sem desafio.

A repetição da dose foi avaliada como necessária, para todos os tratamentos, com base em dados de concentração plasmática do *trans*-cariofileno, composto majoritário do OC, investigada por Liu e colaboradores, (2013), ao ser administrado, VO, na concentração de 50 mg/Kg, em ratos Sprague-Dawley (n=6). O estudo realizado, demonstrou que a concentração do composto se aproxima de 0 µg/ml após 12h de administração (Figura 8).

Figura 8. Média (\pm D.P.) da concentração plasmática após a administração oral de *trans*-cariofileno livre em ratos Sprague-Dawley.



Amostra = 6 animais. Fonte: LIU et al. (2013).

As dosagens de cada tratamento foram definidas por meio de revisão da literatura que apresentaram eficácia *in vivo* e segurança, próximas as condições consideradas ideais para a realização deste estudo (FU et al., 2014; KORIDECK; PETERSON, 2009; GOMES et al., 2008, 2007).

Findado o tratamento, no 28º dia, 24 horas após o último desafio (realizado no 27º dia) os animais foram eutanasiados com sobredose de quetamina (50 mg/Kg) e xilasina (3,3 mg/Kg).

4.4. CITOMETRIA E CITOLOGIA NO LAVADO TRAQUEAL

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e os membros fixados em abdução, com hiperextensão de cabeça para facilitar a visualização do pescoço e do tórax.

Mediante assepsia com álcool 70%, as traqueias foram expostas por secção cirúrgica na linha média e afastamento da pele e tecidos adjacentes. O canal traqueal foi lavado três vezes, com 500 µL de PBS (pH: 7,2) por vez, sendo o conteúdo de cada lavagem aspirado e armazenado em microtubos de 2 ml.

Da quantidade aspirada, 20 µL foi utilizado para a contagem total de células inflamatórias, realizada em câmara de Neubauer. O restante do conteúdo foi centrifugado a 1500 rpm (190 x g), por 10 min, a 4°C (Microcentrífuga NT 800, Nova Técnica, Piracicaba, BR), sendo o sobrenadante armazenado separadamente em microtubos e estocado a -86°C para determinação das citocinas (IL-4, IL-17, IFN- γ e TNF- α) e verificação da formação de radicais livres. O material decantado foi utilizado para a verificação do perfil celular (citologia) por coloração com panótico. Tanto o reconhecimento das células inflamatórias quanto as contagens diferenciais foram realizados em lâminas por microscopia de luz (Microscópio biológico trinocular, Physis, 0900082) (magnitude 1000x), por um analista treinado.

4.5. COLETA DOS PULMÕES E OBTENÇÃO DO MACERADO PULMONAR

Findada a coleta do lavado traqueal, uma nova incisão foi realizada sobre a pele da linha média do tórax a partir do processo xifoide até aproximadamente 2 cm inferiormente, para que a pele abdominal pudesse ser rebatida lateralmente e a região subdiafragmática pudesse ficar exposta. Rebatendo-se o fígado inferiormente e desinserindo o músculo do diafragma foi realizada toracotomia esquerda e direita, rebatendo-se as costelas superiormente para a exposição anatômica do pulmão e do coração. A coleta dos pulmões ocorreu mediante pinçamento do mediastino e desinserção das estruturas anatômicas adjacentes.

Os pulmões direitos foram destinados para processamento histopatológico e os pulmões esquerdos foram macerados em PBS (pH: 7,2) e centrifugados a 7500 rpm (4725 x g), por 10 min (Microcentrífuga NT 800, Nova Técnica, Piracicaba, BR). O sobrenadante decorrente desse processo foi armazenado separadamente em microtubos, a -86°C para posterior determinação das citocinas (IL-4 IL-17, IFN- γ e TNF- α) e verificação da produção de NO.

4.6. DOSAGEM DE NITRITO (NO)

A dosagem de óxido nítrico foi a técnica escolhida para monitoramento do estresse oxidativo decorrente da inflamação asmática. A técnica foi realizada com base no método de Griess (GRIESS, 1879), o qual avalia o acúmulo de nitrito (ANEXO A). A

absorbância da solução teste foi medida a 492 nm utilizando um leitor de microplacas (TP Reader NM) e a concentração de nitrito foi calculada usando nitrito de sódio através de curva padrão.

4.7. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

As concentrações de IL-4, IL-17, IFN- γ e TNF- α foram dosadas pelo método ELISA (ANEXO B), de acordo com a recomendação do fabricante. A solução de 100 μ l de ABTS (3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) dissolvido em tampão citrato 0,05 M (pH 4,0) com 0,01% de H₂O₂ foi aplicada para visualização da reação. A densidade óptica foi medida a 405 nm com espectrofotômetro (leitor de microplacas TP Reader NM). Os níveis de sensibilidade para os kits IL-4, IL-17, IFN- γ e TNF- α foram de 16 pg/ml (de acordo com as informações do fabricante).

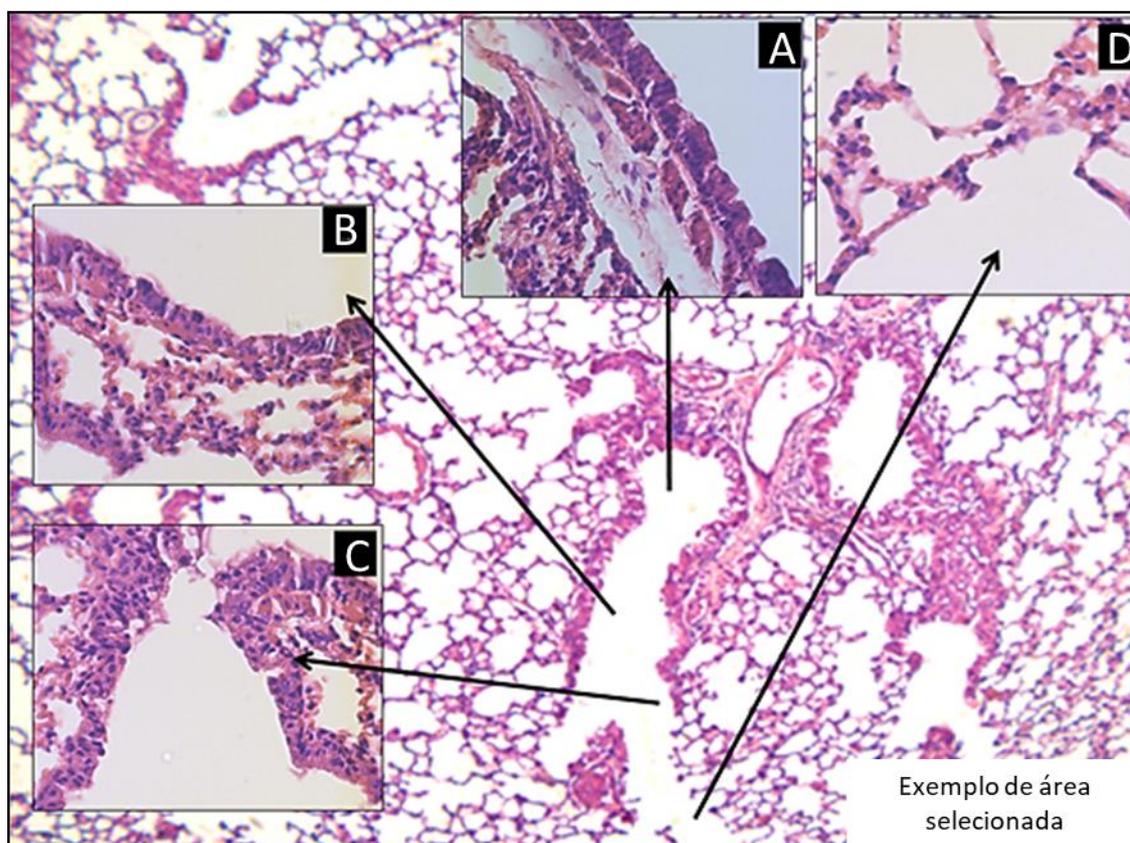
4.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DO TECIDO PULMONAR

Para realização da análise histopatológica, os pulmões direitos foram seccionados longitudinalmente e fixados em formalina a 4%, dando sequência ao procedimento de rotina. Este tecido foi clivado longitudinalmente em seu maior eixo, a fim de expor a árvore brônquica e seus bronquíolos e sacos alveolares em maior extensão (ANEXO C).

O material emblocado em parafina foi submetido à microtomia com 5 μ m de espessura. Após a confecção da lâmina, cortes correspondentes a cada amostra foram separados para realização de coloração em hematoxilina e eosina (HE) (LUNA, 1968). Classicamente utilizada tanto para tecidos normais quanto para tecidos patológicos; nesta técnica, os núcleos coram-se em roxo escuro (basofílicos) e o citoplasma em róseo (eosinofílicos).

Os cortes foram analisados em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumentos de 100x, 200x e 400x, em toda sua extensão por dois observadores com experiência e formação em histopatologia, para avaliação geral da amostra. Todas as amostras foram digitalizadas (sistema computadorizado Axion Cam ICc 5, Zeiss, Berlim, Alemanha), em aumento de 100x para visualização panorâmica da amostra (Figura 9) e, em aumento de 400x, foram capturadas imagens de uma secção de brônquio (Figura 9a), uma secção de bronquíolo terminal (Figura 9b), duas secções de bronquíolos respiratórios (Figura 9c), e duas regiões de parênquima (Figura 9d), em cada amostra.

Figura 9. Incidências de corte e áreas selecionadas para análise em cada amostra do experimento.



Pulmão. Coloração HE. Aumento original 100x. Detalhes, aumento de 400x (a,b,c,d). Fonte: Elaborado pelo próprio autor e colaboradores, 2018.

As imagens capturadas foram submetidas a morfometria por meio do programa Zen 2012 (Blue Edition), aprovado pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH), Bethesda, EUA.

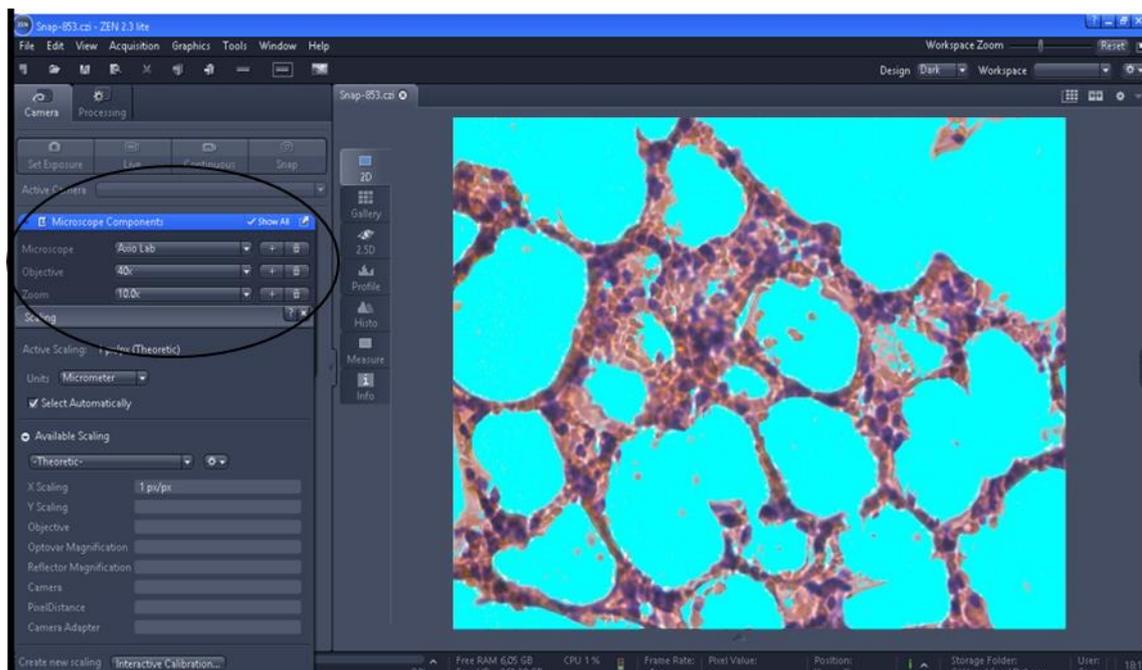
Nos brônquios e bronquíolos foram analisadas, descritivamente, vasodilatação e congestão, edema intersticial ou intraluminal, descamação do epitélio brônquico, hipertrofia das células caliciformes, secreção de muco intraluminal, contração e encurtamento da musculatura lisa espiral, perda de cílios nas superfícies epiteliais. Nos bronquíolos foram analisadas as mesmas características, destacando-se que, em amostras saudáveis, estes segmentos não apresentam células caliciformes e o suporte conjuntivo e muscular são extremamente discretos ou mesmo ausentes.

O infiltrado inflamatório foi avaliado descritivamente conforme localização (se difuso, perivascular, peribrônquico e quanto ao tipo celular predominante) e por meio de morfometria semiautomática (seleção manual e contagem automática de acordo com a escala selecionada) as células inflamatórias foram quantificadas em seus compartimentos, a saber:

"zona externa" dos bronquíolos, entre o músculo liso e a região da fixação alveolar, e "zona interna" dos brônquios, entre o músculo liso e o epitélio. Os dados foram quantificados em uma secção de brônquio, uma secção de bronquíolo terminal, duas secções de bronquíolos respiratórios de cada amostra e expressos em média aritmética simples por grupo.

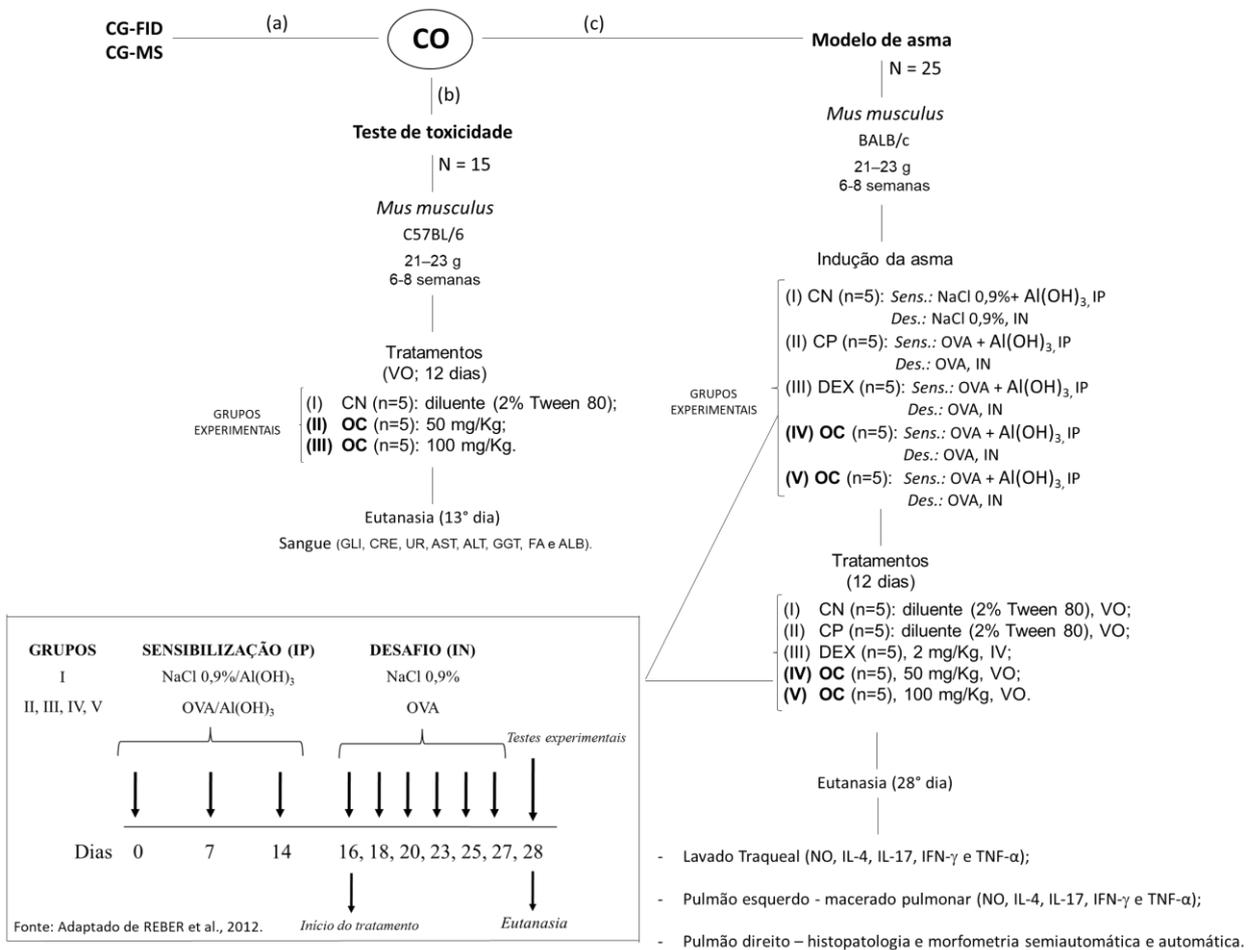
Ainda, cinco regiões alveolares de cada amostra foram submetidas à morfometria automática pelo mesmo sistema de imagem para quantificação da área de parênquima. A densidade da área do parênquima pulmonar (V_{vpar}) em cada campo foi calculada subtraindo a área ocupada pelo espaço aéreo (A_{ar}) (Figura 10) da área total do campo microscópico (A_{imagem}), então: ($V_{vpar} = A_{imagem} - A_{ar}$). Os resultados foram expressos em μm^2 e também convertidos em porcentagem, de acordo com a seleção da escala e o aumento da digitalização (Figura 10, círculo), obtendo-se a média aritmética simples por grupo.

Figura 10. Morfometria automática do parênquima.



Exemplo de área delimitada automaticamente (marcação em preenchimento azul, luz do parênquima) pelo programa Zen 2012. Pulmão. Coloração HE. Aumento original 400x. Detalhe: calibragem de acordo com a magnificação da captura da imagem. Fonte: Elaborado pelo próprio autor e colaboradores, 2018.

Figura 11. Esquema da metodologia empregada para verificação do efeito anti-inflamatório do OC na asma alérgica.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2018.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média aritmética e erro padrão da média (S.E.M), sendo analisados por ANOVA bidirecional (software GraphPad InStat 3.10, San Diego), pela aplicação do teste de Tukey para comparações múltiplas, com o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO DE COPAÍBA

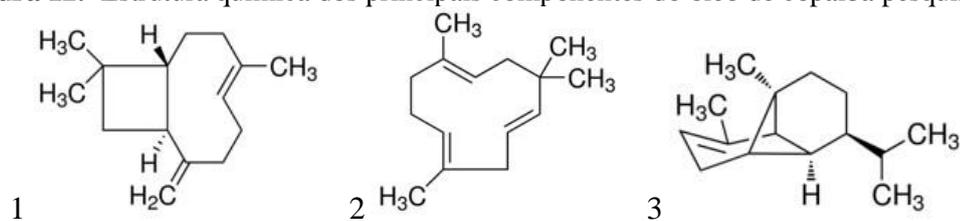
A composição química do óleo de copaíba está representada na Tabela 1. Ao todo foram identificados 16 picos nas corridas cromatográficas realizadas, correspondendo a treze hidrocarbonetos sesquiterpênicos, dois sesquiterpenos oxigenados e um álcool sesquiterpênico. Os principais compostos identificados foram o *trans*-cariofileno (1, 62,8%), α -humuleno (2, 9,1%) e α -copaeno (3, 5,1%) (Figura 12). Devido a sua concentração, o *trans*-cariofileno foi o pico com maior tempo de retenção, 31,58 min (CG-FID) e 36,22 min (CG-MS) (Figuras 13 e 14).

Tabela 1. Composição do óleo essencial de *Copaifera* sp.

RT (min)	Composto	RI _{exp}	RI _{lit}	% RA
32.55	α -Cubebeno	1350	1350 ¹	0.5
33.09	α -Ilangeno	1355	1351 ²	0.3
34.30	α -Copaeno	1379	1379 ¹	5.1
35.02	β -Elemeno	1395	1396 ³	1.7
36.22	<i>trans</i> -Cariofileno	1424	1426 ³	62.8
36.85	Bergamoteno	1439	1439 ⁴	4.4
37.68	α -Humuleno	1459	1457 ⁵	9.1
38.62	Germacreno D	1482	1483 ⁵	1.0
38.83	Biciclogermacreno	1487	1490 ⁶	3.6
39.89	β -Bisaboleno	1513	1510 ²	1.1
40.18	γ -Cadineno	1520	1522 ⁴	0.9
40.52	δ -Cadineno	1529	1524 ²	2.4
41.90	Germacreno B	1564	1565 ¹	2.4
42.49	Cariofileno álcool	1579	1575 ⁴	0.6
42.95	(-)-Cariofileno óxido	1591	1591 ³	3.6
43.98	Humuleno epoxido II	1619	1616 ⁷	0.5

RT: tempo de retenção (min); RI_{exp}: Índices de retenção determinados em relação aos *n*-alcanos (C₈–C₂₀) na coluna Rtx-5MS; RA: área relativa (área do pico em relação à área total do pico no cromatograma por GC-FID), media dos resultados obtidos em triplicata; RI_{lit}: Índices de retenção com base na literatura: ¹SOARES et al., 2013; ²XAVIER-JUNIOR et al., 2017; ³BARDAJÍ et al., 2016; ⁴ALMEIDA et al., 2012; ⁵VEIGA-JUNIOR et al., 2007; ⁶SANT'ANNA et al., 2007; ⁷WANG et al., 2015.

Figura 12. Estrutura química dos principais componentes do óleo de copaíba pesquisado.



Fonte: Adaptado de SIGMA-ALDRICH, 2018.

Figura 13. CG-FID, cromatograma do óleo essencial de *Copaifera* sp.

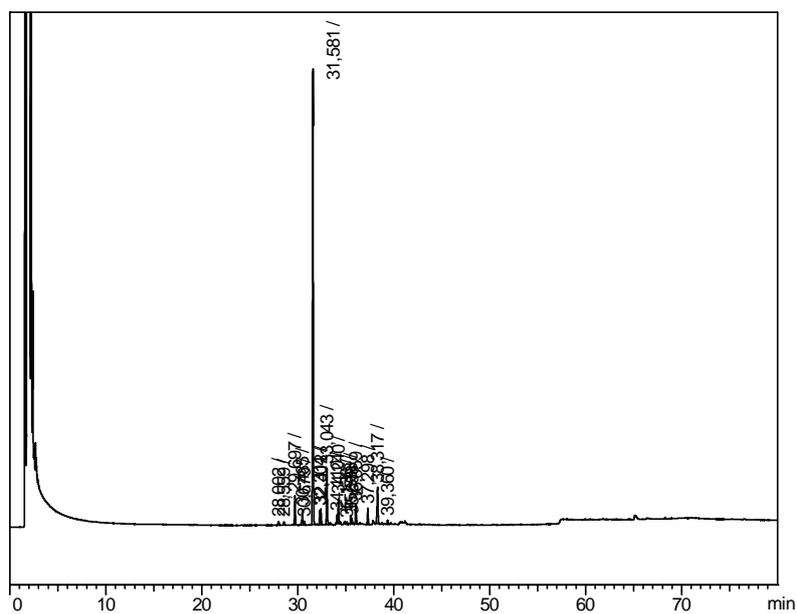
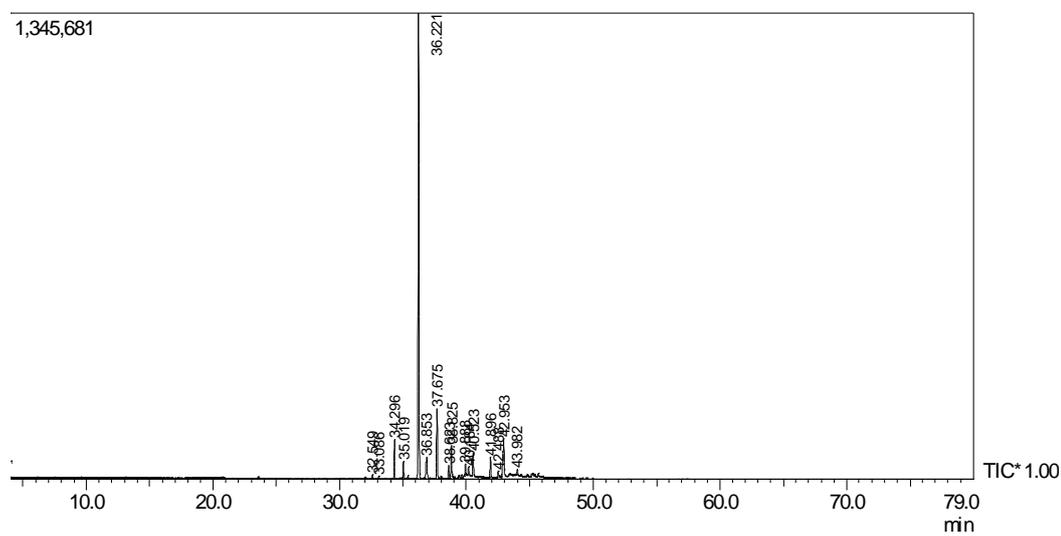


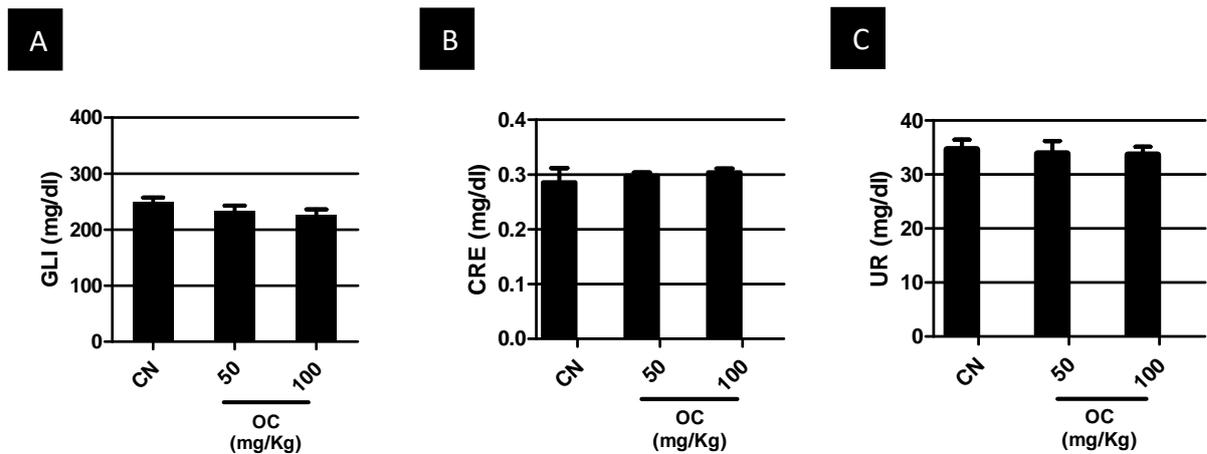
Figura 14. CG-MS, cromatograma do óleo essencial de *Copaifera* sp.



5.2. VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO*

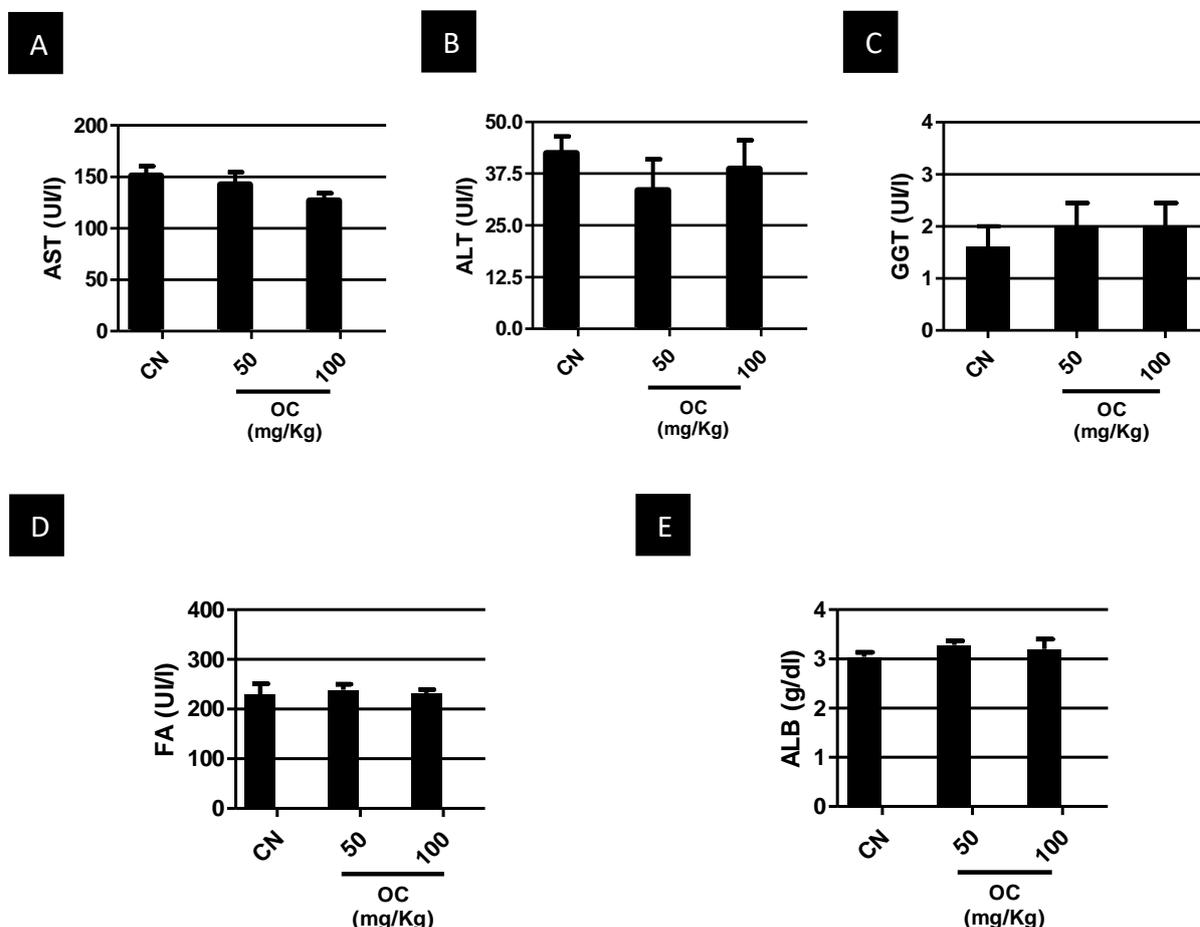
O uso da oleoresina nas doses previstas (50 mg/kg e 100 mg/kg), ao longo de 12 dias, não demonstrou alterações sobre os níveis de glicose e dos parâmetros renais e hepáticos avaliados, não apresentando resultados significativos ($p > 0,05$) entre os grupos, conforme ilustrado a seguir (Figuras 15 e 16).

Figura 15. Efeitos do OC sobre a produção de glicose (GLI) (a) e a função renal: creatinina (CRE) (b) e ureia (UR) (c).



Os dados são apresentados em valores médios \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figura 16. Efeitos do OC sobre a função hepática: aspartato aminotransferase (AST) (a), alanina aminotransferase (ALT) (b), gama glutamil transferase (GGT) (c), fosfatase alcalina (ALK) (d) e albumina (ALB) (e).



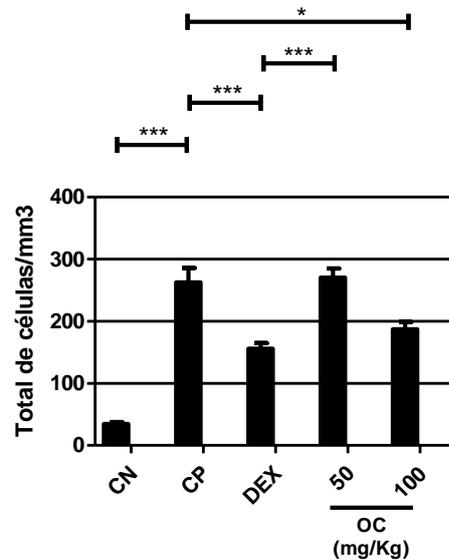
Os dados são apresentados em valores médios \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.3. PERFIS CELULARES NO LAVADO TRAQUEAL APÓS INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR OVA E TRATAMENTO DAS VIAS AÉREAS

A sensibilização e o desafio com OVA levaram a um aumento significativo da inflamação das vias aéreas, demonstrado pelo aumento no total de células inflamatórias do lavado traqueal no grupo CP em relação ao CN ($p < 0,001$) (Figura 17).

O tratamento com a dexametasona foi capaz de reduzir significativamente a presença de células inflamatórias totais ($p < 0,001$). O tratamento com o OC na dose de 100 mg/kg também reduziu significativamente o número de células inflamatórias ($p < 0,05$), com efeito semelhante à DEX ($p > 0,05$). Por outro lado, os animais tratados com a dose de 50 mg/kg não apresentaram redução da quantidade de células, em comparação ao grupo doente (CP), tratado com diluente (Figura 17).

Figura 17. Efeitos do OC sobre a contagem das células inflamatórias no lavado traqueal.

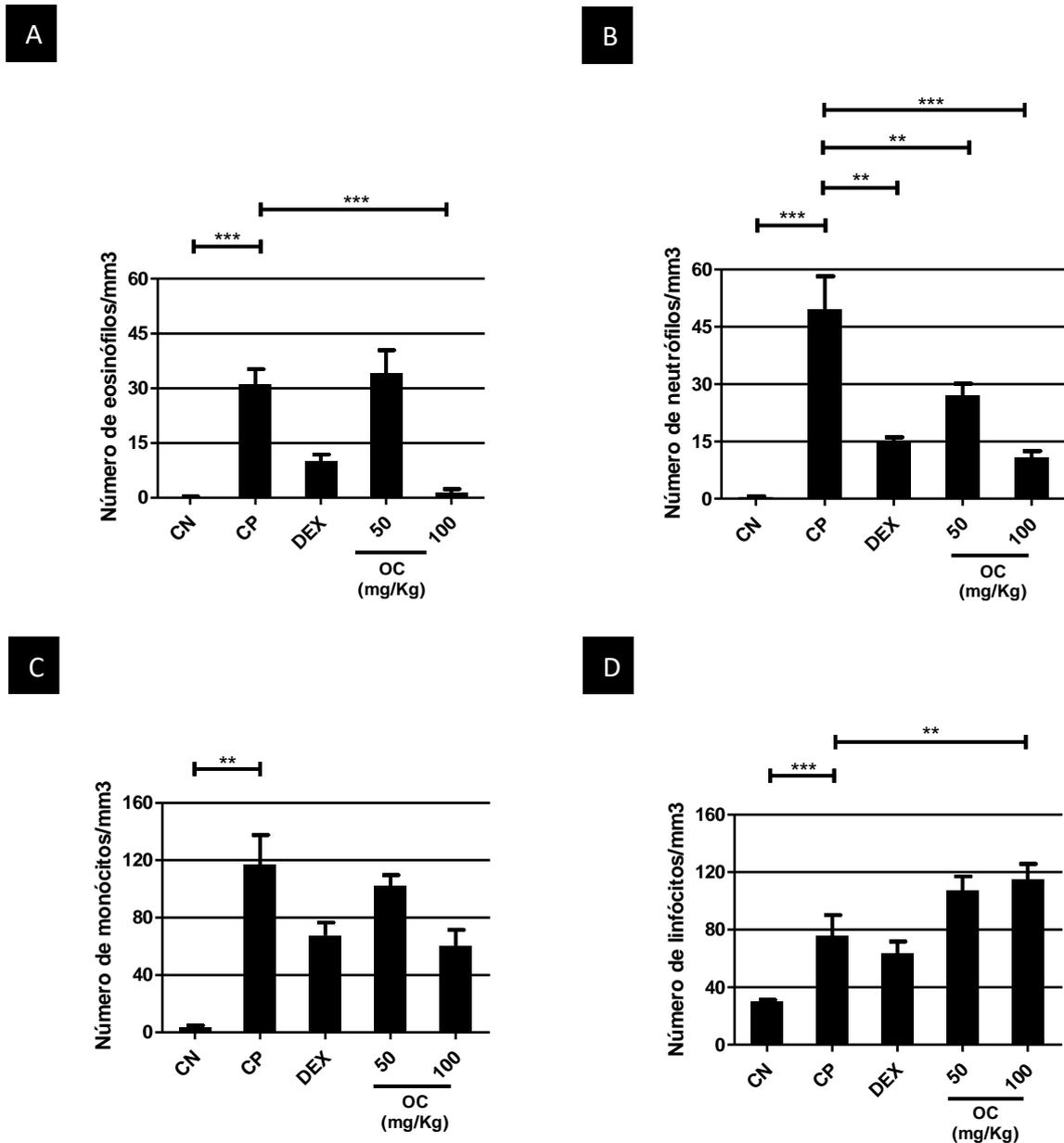


Os dados são apresentados em valores médios \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Observando o perfil celular presente no infiltrado inflamatório do lavado traqueal (Figura 18) foi possível observar que, em relação ao CN, todos os animais doentes apresentaram maior quantidade de eosinófilos ($p < 0,001$) (Figura 18a), neutrófilos ($p < 0,001$) (Figura 18b), monócitos ($p < 0,01$) (Figura 18c) e linfócitos ($p < 0,001$) (Figura 18d).

O óleo de copaíba na dose de 100 mg/Kg foi capaz de reduzir significativamente, em relação ao CP, a quantidade de eosinófilos ($p < 0,001$) (Figura 18a) e neutrófilos ($p < 0,001$) (Figura 18b). A dose de 50 mg/Kg de OC teve um efeito significativo apenas no número de neutrófilos ($p < 0,01$), causando uma redução com desempenho semelhante ao tratamento com a dexametasona ($p > 0,05$) (Figura 18b). O tratamento com OC em ambas as concentrações gerou aumento do número de linfócitos, sendo que a concentração de 100 mg/Kg foi, inclusive, significativamente diferente do grupo CP ($p < 0,01$) (Figura 18d).

Figura 18. Efeitos do OC sobre o perfil celular do lavado traqueal: eosinófilos (a), neutrófilos (b), monócitos (c) e linfócitos (d).



Os dados são apresentados em valores médios \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

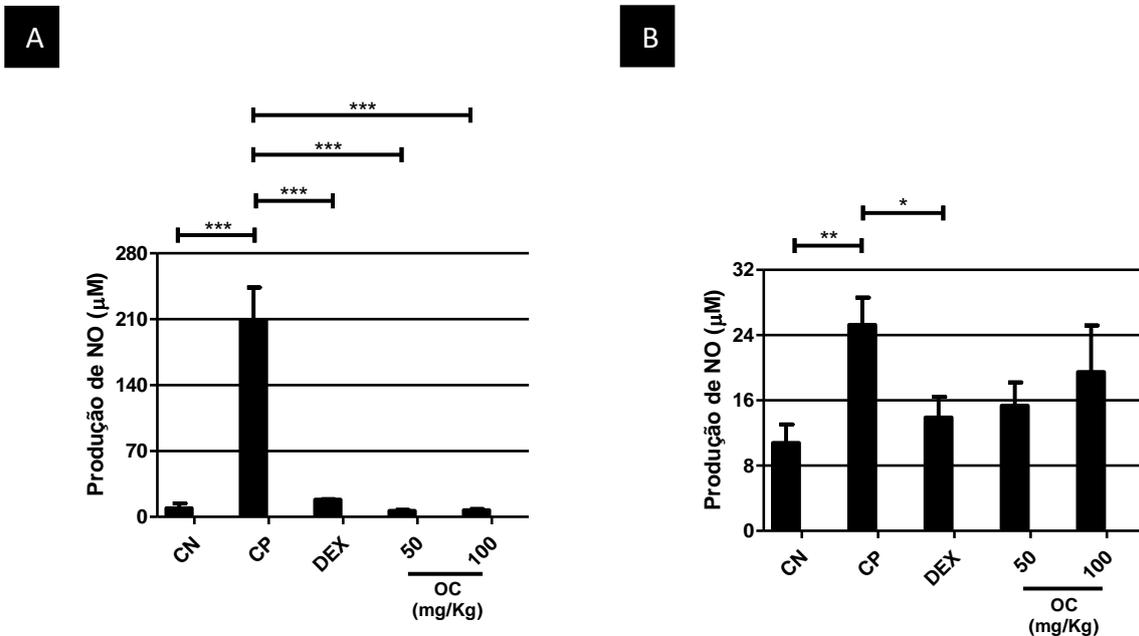
5.4. EFEITOS DO TRATAMENTO COM OC NA PRODUÇÃO DE NO

Em ambas as amostras, de lavado traqueal e macerado pulmonar, os animais do controle positivo produziram níveis significativos de NO ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente), em comparação com a produção basal do grupo CN (Figura 19).

No lavado traqueal todos os tratamentos testados foram eficazes na inibição do NO quando comparados ao CP ($p < 0,001$) (Figura 19a). Em compensação, no macerado

pulmonar o efeito do OC sobre a produção de NO não foi considerado significativo, apesar de não ter apresentado diferenças estatísticas em comparação a DEX (Figura 19b).

Figura 19. Efeitos do OC sobre a produção de NO nas amostras de lavado traqueal (a) e de macerado pulmonar (b).



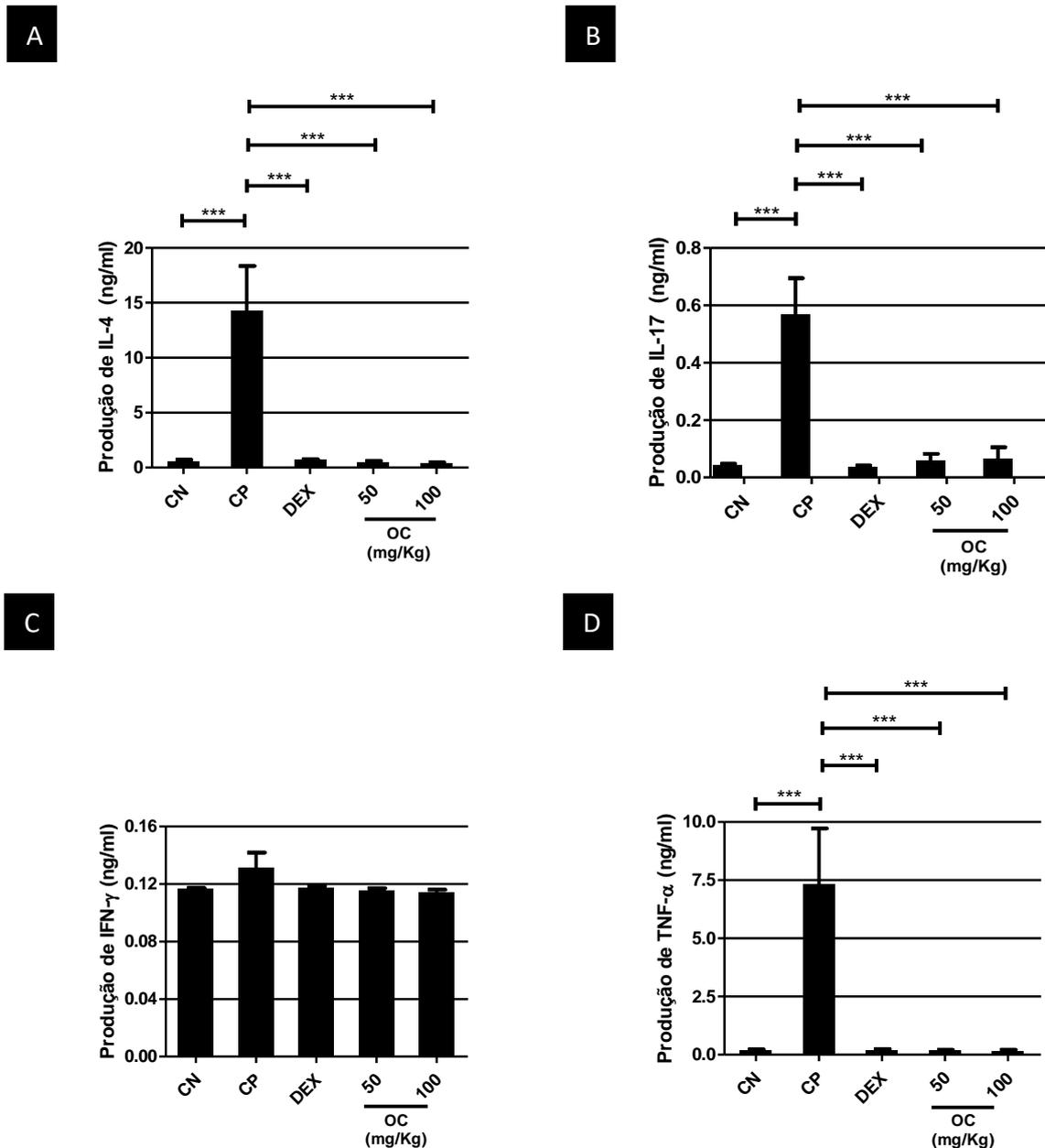
Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.5. EFEITOS DO TRATAMENTO COM OC SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Nas amostras de lavado traqueal houve aumento significativo da concentração de IL-4 (Figura 20a), IL-17 (Figura 20b) e TNF- α (Figura 20d) nos animais controle positivo ($p < 0,001$), quando comparadas a concentração encontrada no grupo controle negativo. O aumento de IFN- γ (Figura 20c) não apresentou relevância estatística.

O tratamento com OC em ambas as concentrações apresentou efeito inibitório sobre IL-4 (Figura 20a), IL-17 (Figura 20b) e TNF- α (Figura 20d) ($p < 0,001$), semelhante a dexametasona ($p > 0,001$), reduzindo a produção de todas as citocinas aumentadas nos animais controle positivos (Figura 20). Porém, os tratamentos não apresentaram atividade significativa sobre a concentração de IFN- γ , cujos níveis não variaram entre os grupos trabalhados (Figura 20c).

Figura 20. Efeitos do OC sobre a produção de IL-4 (a), IL-17 (b), IFN- γ (c) and TNF- α (d) no lavado traqueal.



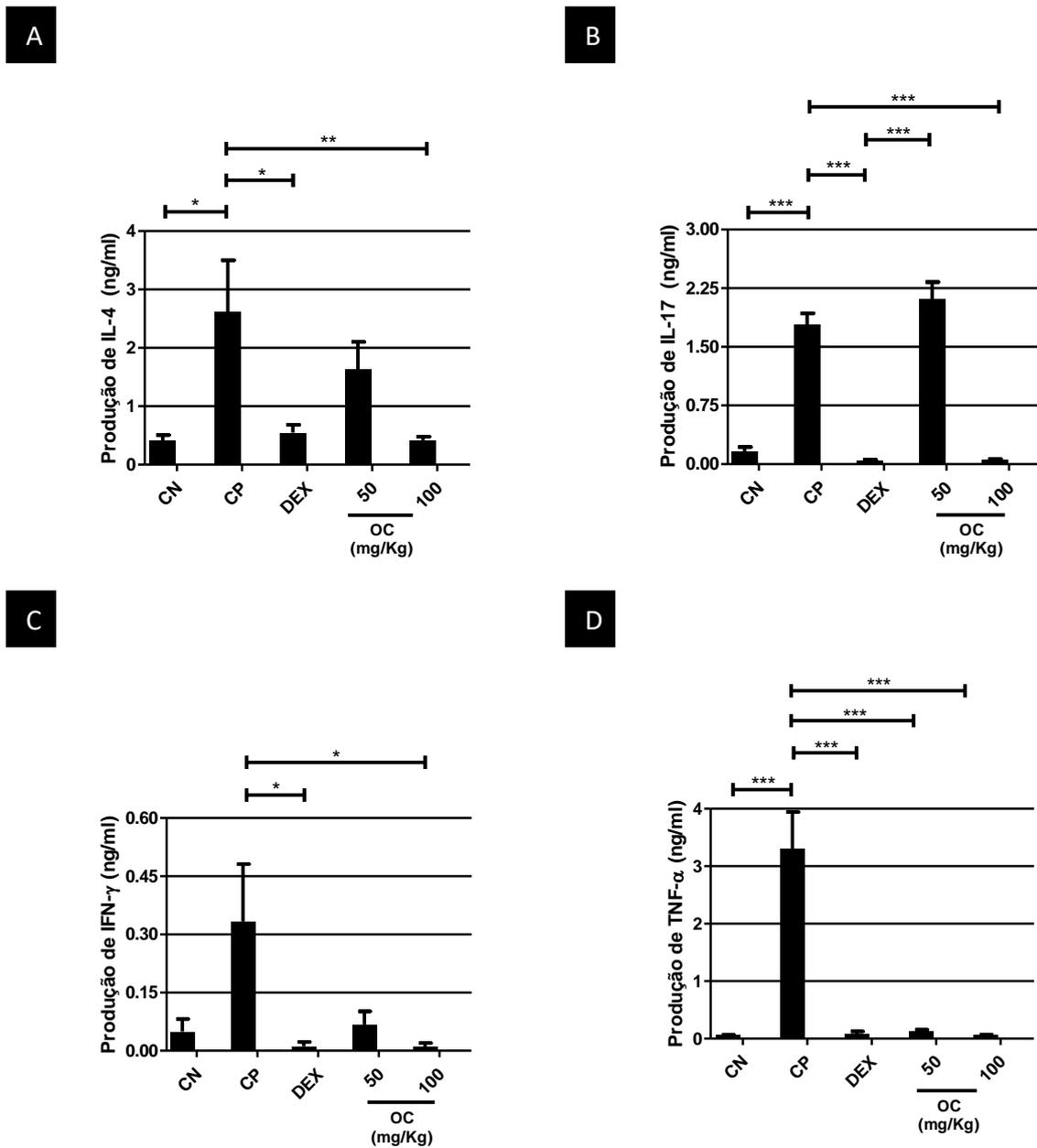
Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Nas amostras de macerado pulmonar, também foi observado aumento nos níveis de IL-4 ($p < 0,05$) (Figura 21a), IL-17 ($p < 0,001$) (Figura 21b) e TNF- α ($p < 0,001$) (Figura 21d) nos animais CP, em comparação ao grupo CN. Embora os animais CP tenham apresentado uma produção maior de IFN- γ , em relação ao CN, esta não foi considerada significativa ($p > 0,05$) (Figura 21c).

O tratamento com a maior dose de OC (100 mg/Kg) e com a DEX inibiu a produção de todas as citocinas avaliadas no macerado quando comparadas ao grupo CP

(Figura 21), reduzindo até mesmo a produção de IFN- γ ($p < 0,05$) (Figura 21c). O tratamento com OC na dose de 50 mg/Kg reduziu significativamente somente a produção de TNF- α ($p < 0,001$) (Figura 21d), mas, ainda assim, a variação dos níveis das citocinas por OC 50 mg/Kg não apresentou diferenças estatísticas em relação aos demais tratamentos na maioria dos casos ($p > 0,05$) (Figura 21).

Figura 21. Efeitos do OC sobre a produção de IL-4 (a), IL-17 (b), IFN- γ (c) e TNF- α (d) no macerado pulmonar.



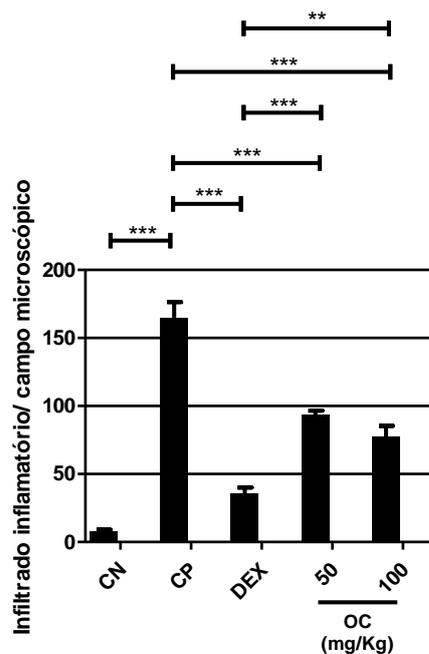
Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.6. EFEITOS DO TRATAMENTO COM OC SOBRE A AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO E A MORFOMETRIA AUTOMÁTICA

Os dados da morfometria semiautomática quantitativa das secções pulmonares dos camundongos confirmam o padrão inflamatório no grupo de animais doentes (CP), apresentando um infiltrado inflamatório significativo nos pulmões asmáticos ($p < 0,001$) (Figura 22) e proporcional ao perfil anteriormente apresentado nas amostras de lavado traqueal (Figura 17).

Todos os tratamentos foram significativamente eficazes ($p < 0,01$) na redução da celularidade inflamatória no tecido pulmonar (Figura 22). O OC não apresentou diferenças significativas de desempenho entre as concentrações testadas ($p > 0,05$).

Figura 22. Morfometria semiautomática quantitativa do infiltrado inflamatório peritubular (brônquios e bronquíolos) em secções pulmonares de camundongos BALB/c.



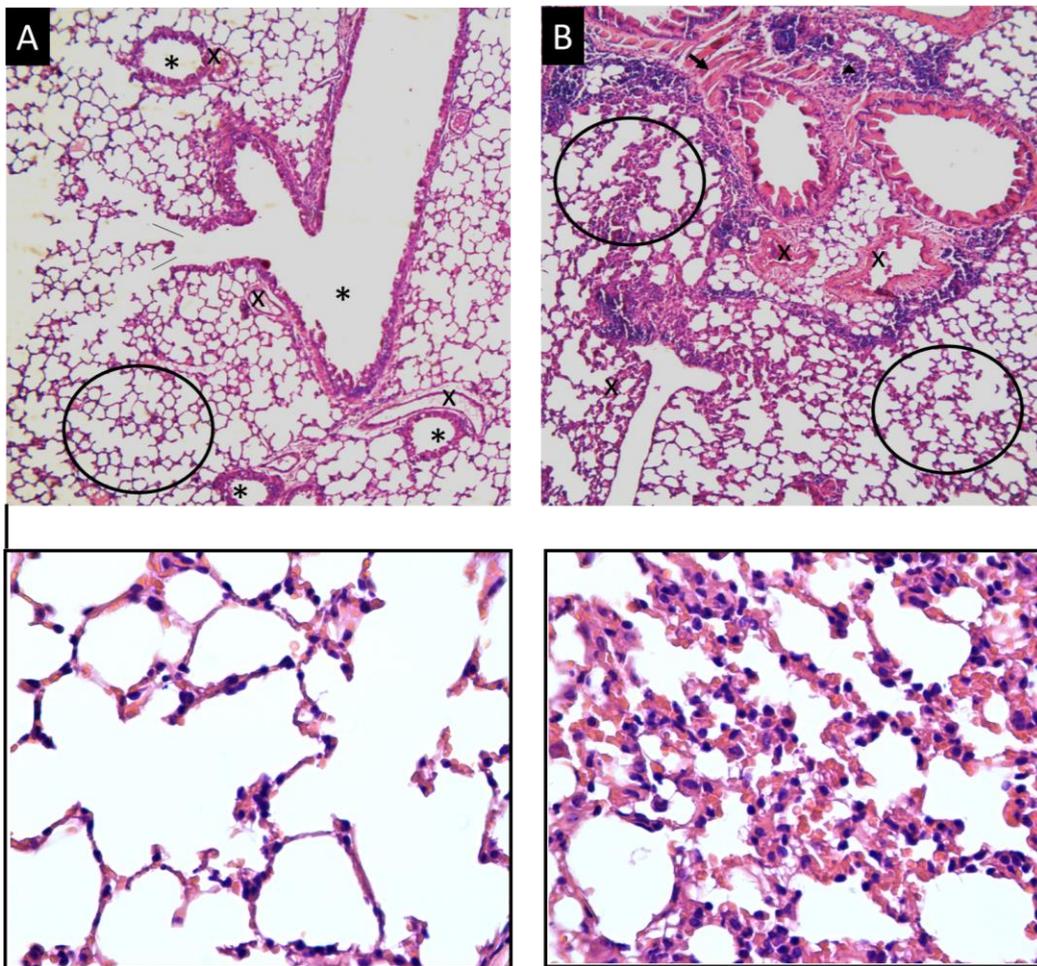
Resultados expressos em média \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A análise histopatológica dos cortes do tecido pulmonar possibilitou a visualização no animal sadio (CN) da árvore respiratória (Figura 23a, asterisco) e do sistema circulatório normais (Figura 23a, x), com uma área de parênquima bem delimitada (Figura 23a, círculo, Figura 23a, detalhe) sendo possível a visualização do ducto alveolar (Figura 23a, traço), havendo um número de leucócitos compatível com a normalidade (Figura 24).

Por meio desta análise, foi possível a confirmação de que o modelo com OVA empregado, foi capaz de induzir à asma nos camundongos BALB/c, resultando no aumento da concentração de células inflamatórias no tecido (Figura 23b, detalhe; também demonstrado

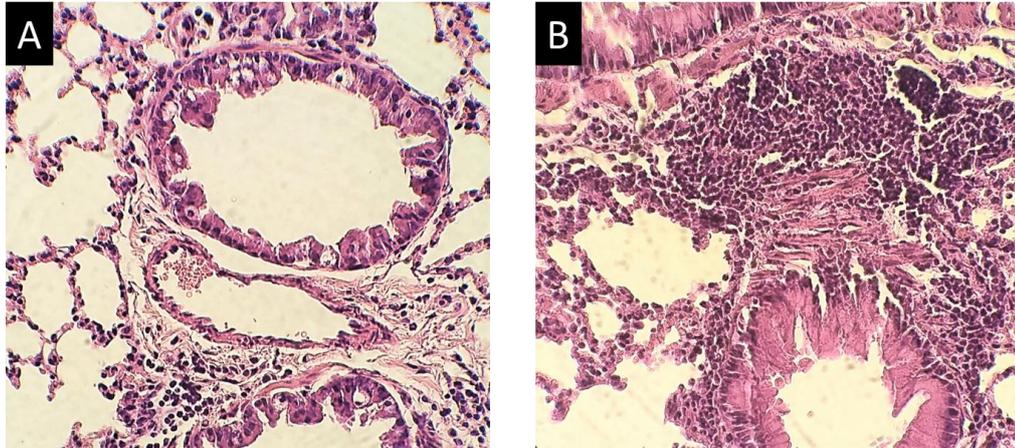
pela Figura 22 e 24) e em alterações sobre a arquitetura respiratória (Figura 23; também demonstrado pelas Figuras 24, 25 e 28). Foi possível visualizar nos animais CP a hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa, principalmente próximo aos bronquíolos (Figura 23b, seta), com possível aumento do contingente de células de poeira (Figura 23b, triângulo), presença de congestão vascular (Figura 23b, x), assim como o espessamento da parede alveolar (Figura 23b, círculos; Figura 23b, detalhe; Figura 26). A análise histopatológica ainda revelou aumento do número de células polimorfonucleares na extensão do pulmão dos animais CP, com um perfil de células misto prevalecendo na região perivascular e peribrinquiolar (Figura 25b).

Figura 23. Amostra de pulmão de camundongo BALB/c. Imagem panorâmica.



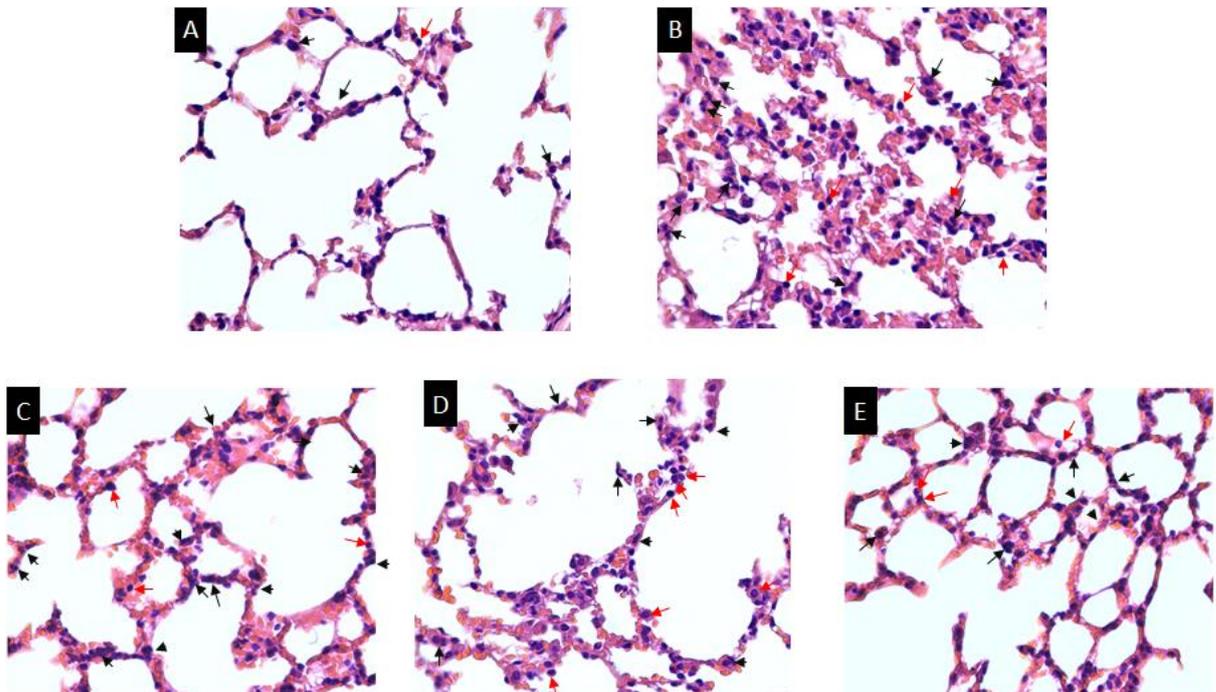
Pulmão saudável (a). Coloração HE. Aumento de 100X. Detalhe: parênquima saudável, aumento de 400x; Pulmão asmático (b). Coloração HE. Aumento de 100X. Detalhe: parênquima inflamado, aumento de 400x.

Figura 24. Amostra de pulmão de camundongo BALB/c. Região peribronquiolar e perivascular.



Coloração HE. Aumento de 400x. Região peribronquiolar e perivascular do pulmão saudável com acúmulo de células pró-inflamatórias compatível com a normalidade (a); Região peribronquiolar do pulmão asmático com grande acúmulo de células pró-inflamatórias (b).

Figura 25. Amostra de pulmão BALB/c.

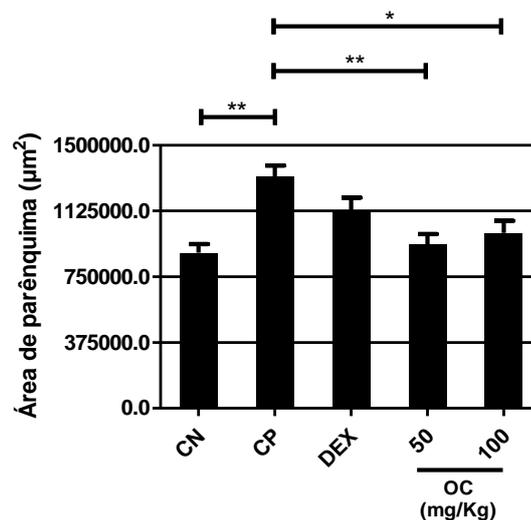


Visualização do parênquima e da concentração celular. Coloração HE. Ampliação de 400x. As setas vermelhas indicam as células monomorfonucleares e as setas pretas as células polimorfonucleares.

Parênquima saudável (a); Parênquima asmático (b); Parênquima tratado com dexametasona (c); Parênquima tratado com CO 50 mg/Kg (d); Parênquima tratado com CO 100 mg/Kg (e).

Através da morfometria automática foi observada diferença estatística ($p < 0,01$) da área de parênquima entre os grupos CN e CP (Figura 26). Esta análise também possibilitou a visualização sobre a diferença das áreas de parênquima entre os grupos tratados. O tratamento com OC nas duas dosagens testadas reduziu a área do parênquima quando comparados ao CP. O OC de 50 mg/Kg reduziu com significância $p < 0,01$ e a concentração de 100 mg/Kg reduziu com significância $p < 0,05$. Diferentemente, o tratamento com a dexametasona não mostrou relevância estatística na redução da área de parênquima ($p > 0,05$), apesar de também não ter apresentado diferenças significativas ao ser comparado com os tratamentos com OC ($p > 0,05$) (Figura 26).

Figura 26. Morfometria automática em secções pulmonares de camundongos BALB/c.



Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Os animais do grupo CP apresentaram espessamento da área de parênquima de 55%, enquanto o CN apresentou 37% de parênquima. O grupo de animais tratado com OC 50 mg/Kg apresentou 39% e com OC 100 mg/Kg, 44% (Figura 27).

Figura 27. Porcentagem de parênquima por grupo de animais (n=5).

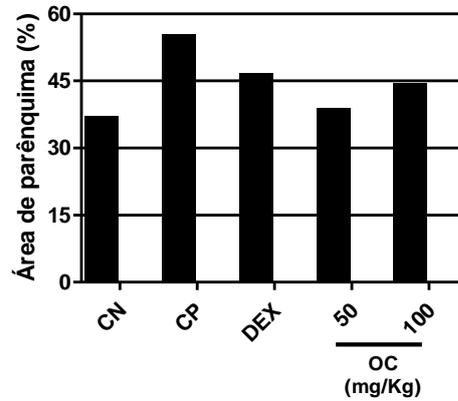
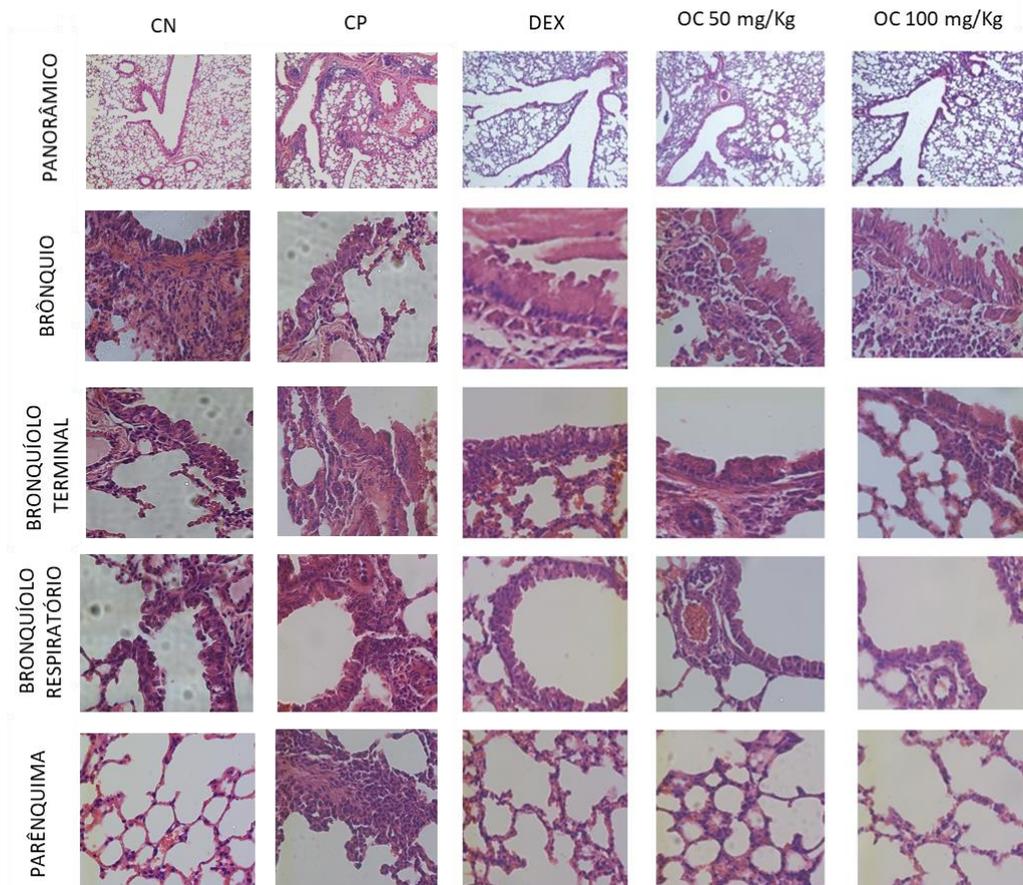


Figura 28. Efeitos do OC em áreas anatomicamente representativas (imagem panorâmica, brônquio, bronquíolo terminal, bronquíolo respiratório, parênquima) do pulmão asmático de camundongos BALB/c.



Coloração HE. Panorâmico, aumento de 100x. Brônquio, bronquíolo respiratório, bronquíolo terminal e parênquima, aumento de 400x.

Resumidamente, a Figura 28 permite a visualização da redução da congestão pulmonar gerada na asma que foi promovida pelos tratamentos com DEX e OC. Apesar da

morfometria automática ter demonstrado redução da área de parênquima mais expressiva no grupo de animais tratados com OC 50 mg/Kg, a diferença entre os grupos de tratamento não foi significativa (Figura 26) e na Figura 25 é possível visualizar mais detalhadamente que o tratamento com OC na dose de 100 mg/Kg gerou um perfil celular mais aproximado da normalidade.

6. DISCUSSÃO

No Brasil, grande parte da população busca seus tratamentos na flora, havendo um número considerável de espécies vegetais de renomado uso medicinal. O óleo de copaíba (obtido do gênero *Copaifera*) é um dos medicamentos mais utilizados pela população da Amazônia brasileira, que em sua grande maioria não tem acesso a produtos farmacêuticos e a serviços de saúde (CARVALHO, 2017).

As espécies do gênero *Copaifera* podem predominar conforme a região, mas normalmente costumam coexistir, fazendo com que os óleos comercializados nos mercados regionais sejam misturas das espécies comuns na área da coleta. Apesar da existência de mais de 20 espécies no Brasil, o óleo tem sido empregado popularmente como se fosse proveniente de uma única droga vegetal (CARVALHO, 2017).

Porém, uma vez que as diferenças provenientes da composição química geram oscilações sobre a resposta terapêutica e sobre a toxicidade farmacológica, a caracterização do produto conforme seu perfil químico é imprescindível para uma utilização segura e eficaz destas oleorresinas (CARVALHO, 2017).

Essa caracterização é feita com o emprego de métodos analíticos validados, capazes de quantificar com precisão os compostos presentes nos extratos do OC. O conhecimento da composição do produto viabiliza o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de origem natural e a verificação posterior de que a composição do extrato não foi alterada após a sua incorporação na formulação, mantendo a qualidade do produto durante o processo produtivo (XAVIER-JUNIOR et al., 2017).

O estudo de Sousa e colaboradores (2011) validou o CG-FID, para quantificação de três sesquiterpenos, *trans*-cariofileno, α -copaeno e α -humuleno, considerados pelo autor marcadores químicos da fração volátil do OC. Os autores sugerem o emprego do método como alternativa para o controle de qualidade de diferentes oleorresinas de copaíba comercialmente disponíveis.

No geral, o CG-FID e o CG-MS têm sido amplamente utilizados na determinação de óleos essenciais, devido às suas vantagens de alta eficiência e rapidez (SOUSA et al., 2011). O estudo de Xavier-Junior e colaboradores (2017) sugere o uso conjunto de ambas as técnicas acima, argumentando que outros compostos podem vir a ser detectados através da combinação entre as duas. Porém, afirma que o CG-FID costuma ser mais empregado na quantificação de compostos, por ser um método mais acessível, apesar do CG-MS ser o

método mais eficiente para análises qualitativas e quantitativas dos compostos naturais de composição complexa.

A análise da amostra do óleo de copaíba por CG-FID e CG-MS, no presente estudo, identificou três compostos majoritários, sendo o *trans*-cariofileno (62,8%), o α -humuleno (9,1%) e o α -copaeno (5,1%) (Tabela 1 e Figura 12), corroborando com os estudos anteriormente publicados por Sousa e colaboradores (2011), que adquiriram comercialmente diferentes amostras de oleorresina de *Copaifera langsdorffii*, e Veiga-Junior e colaboradores (2007) que coletaram amostras de oleorresina de 3 espécies, *Copaifera multijuga*, *Copaifera reticulata* e *Copaifera cearenses*, em diferentes regiões do Brasil.

O estudo de Oliveira e colaboradores (2017), baseado em uma análise temporal da variabilidade química do óleo de *C. langsdorffii*, observou que fatores como a sazonalidade, o ritmo circadiano, a fase fenológica, a composição do solo e a radiação solar durante o cultivo das árvores, de fato provocam pequenas variações na composição do óleo, porém, alguns constituintes, como o *trans*-cariofileno e o α -humuleno, por exemplo, estão presentes na planta na maior parte do ano, ainda que em alguns períodos suas concentrações estejam reduzidas.

Barbosa e colaboradores, (2013) também verificaram a composição química de diferentes oleorresinas obtidas da espécie *C. multijuga*, em diferentes locais e em diferentes condições climáticas e, assim como Oliveira e colaboradores (2017), observaram que alguns compostos eram comuns em todas as oleorresinas estudadas. O *trans*-cariofileno, o α -humuleno e o α -copaeno estavam entre esses compostos.

Algo importante de se considerar é o fato de que os sesquiterpenos, *trans*-cariofileno e α -bergamoteno não são restritos ao gênero e, por isso, são comuns a todas as amostras de OC (CARVALHO, 2017). Corroborando com essa informação, o bergamoteno foi encontrado na análise cromatográfica como o quarto composto de maior concentração neste estudo (4,4%) (Tabela 1).

As diferenças entre a proporção e incidência de compostos em cada estudo ainda podem ser em decorrência de diferenças nos métodos de extração/identificação dos compostos que foram utilizados em cada pesquisa, detalhes que também podem influenciar a composição final das amostras (XAVIER-JUNIOR et al., 2017).

Devido às variações apresentadas, a literatura chama atenção para a necessidade do ajuste de dose com base na composição química, e também, para a padronização das condições de cultivo do óleo, afim de se atingir um grau de eficácia semelhante em todos os tratamentos de atividade anti-inflamatória com OC (BARBOSA et al., 2013).

O conhecimento sobre a composição química do óleo por espécie também pode auxiliar na previsão dos eventos tóxicos relacionados ao tratamento. Carvalho (2017), por exemplo, analisou uma amostra de óleo comercial de Manaus, na qual havia predomínio de compostos sesquiterpênicos e, juntamente, analisou uma amostra de óleo de *C. duckei*, composta principalmente por ácidos diterpênicos. A administração de ambas as amostras, durante um período de 15 dias, VO, em ratos Wistar fêmeas, nas doses de 550 mg/Kg (óleo comercial) e 543 mg/Kg (óleo *C. duckei*) não modificou significativamente os parâmetros hematológicos dos animais. Leves alterações sobre os parâmetros bioquímicos (redução na taxa de triglicérides e CRE e aumento de AST e ALT) foram, porém, observadas em especial no grupo tratado com *C. duckei*. O autor acredita que a presença de furanos (ácido poliáltico, chrolequínico e hardwinico), neste último grupo, poderia estar relacionada à maior toxicidade do mesmo.

Independente da espécie, o OC pode apresentar casos de toxicidade proveniente do seu uso VO, sendo o efeito atribuído, especialmente, aos compostos terpênicos, cuja metabolização está relacionada a sobrecarga hepática e renal, sendo recomendado o monitoramento do uso e uma administração no tempo máximo de 30 dias consecutivos. O óleo também pode ser irritante às membranas mucosas, afetando o estômago e os intestinos, gerando distúrbios gastrointestinais, náuseas, dores no estômago e diarreia. Além disso, está associado a dermatite de contato em indivíduos alérgicos (CARVALHO, 2017).

O emprego do OC nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg sobre o modelo de indução e tratamento de asma escolhido no presente estudo (ao longo de 12 dias corridos) não apresentou toxicidade sobre a taxa de glicose ou sobre a atividade renal (Figura 15) ou hepática (Figura 16). Isto pode ser notado pela observação de que não houveram diferenças significativas entre os grupos controle negativo e tratados, aliado ao fato de que os valores se apresentaram dentro dos limites de referência retratados na literatura (CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL, 2011; SPINELLI et al., 2012).

Outros estudos vêm testando diferentes doses do OC em camundongos, sem também demonstrar eventos adversos graves aos animais. Teixeira e colaboradores (2017) testaram a toxicidade oral aguda do OC (*C. reticulata*) em camundongos albinos Suíços (*Mus musculus*) na dose de 2000 mg/Kg/dia e nenhum dos animais testados morreu ou teve qualquer sinal ou sintoma de toxicidade, durante o teste de 48 horas. As doses utilizadas no presente estudo foram 40 e 20x menores, respectivamente que a dose testada por Teixeira e colaboradores (2017), empregadas porém, por um período de tempo superior a 48 horas (12 dias).

Anteriormente, Destryana e colaboradores (2014) já haviam verificado a toxicidade subaguda do OC (*C. reticulata/C. langsdorffii*), na dosagem de 50 mg/Kg (menor dose adotada pelo estudo agora realizado), em camundongos BALB/c, fêmeas, de 8 semanas, porém, administrada ao longo de 14 dias, via IP. E, assim como no presente estudo, os parâmetros bioquímicos por eles investigados, nitrogênio sanguíneo urinário, CRE, AST e ALT permaneceram dentro do valor de referência.

Porém, no levantamento da literatura realizado, e dentro dos parâmetros de toxicidade avaliados, não foram encontrados estudos para a verificação de possíveis alterações bioquímicas em camundongos, mediante o uso do OC, VO, em concentrações superiores a 50 mg/Kg, durante um período prolongado de tempo, justificando também por essa razão, a verificação da toxicidade, principalmente na dose de 100 mg/Kg de OC, no presente estudo.

Além disso, considerar somente os resultados de toxicidade acima obtidos, pode levar a omissão de algum componente sob o qual pode-se atribuir caráter tóxico, uma vez que, conforme descrito anteriormente, a composição do óleo é variável, em maior grau, conforme a espécie e, não se sabe ao certo, qual espécie corresponde ao óleo estudado, sendo, por isso, importante nova avaliação acerca desses parâmetros.

Posterior à verificação da segurança do tratamento, a asma experimental pôde ser induzida por OVA em 25 camundongos BALB/c, para investigação do efeito anti-inflamatório do OC. Nos animais, que caracterizavam o CP, a indução da asma foi mostrada inicialmente pelo aumento significativo do número de células inflamatórias no lavado traqueal, frente aos animais saudáveis ($p < 0,001$) (Figura 17). O grupo de células, considerado característico da AHR desencadeada por OVA nas vias aéreas, presente nos animais CP, aumentou a agregação de eosinófilos ($p < 0,001$) (Figura 18a), neutrófilos ($p < 0,001$) (Figura 18b), monócitos ($p < 0,01$) (Figura 18c) e linfócitos ($p < 0,001$) (Figura 18d) em relação aos animais saudáveis (CN).

Em termos quantitativos os neutrófilos e os monócitos foram as células que aumentaram em maior proporção (Figura 18, b e c). Os neutrófilos são as primeiras células da imunidade inata recrutadas para os pulmões durante eventos asmáticos, sendo portanto tendência seu aumento em modelos de inflamação pulmonar aguda (RADERMECKER et al., 2018). Já os monócitos são capazes de alcançar rapidamente o tecido pulmonar apresentando diferentes funções pró-inflamatórias, incluindo o potencial de acelerar a migração de neutrófilos para os pulmões e contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio (YURYEVA et al., 2015).

Em relação à proporção de eosinófilos observada, fenotipicamente, a asma alérgica é caracterizada pela presença de eosinófilos, de forma que, mesmo pacientes com mais de 3% de eosinófilos no escarro são considerados eosinofílicos e podem ter uma alta contagem de neutrófilos, de cerca de 60% (RADERMECKER et al. 2018).

Realidade clínica que também está presente em modelos animais, segundo estudos prévios. Yu e Chen (2018) realizaram um estudo em camundongos BALB/c, induzidos em alguns dos fenótipos relacionados à asma alérgica. Proporcionalmente, o fenótipo mais próximo dos resultados obtidos no presente estudo foi aquele caracterizado por uma mistura de células eosinofílicas e neutrofílicas, o qual foi induzido pelos autores com OVA e LPS e resultou em um perfil de 20% de eosinófilos e 50% de neutrófilos no lavado traqueal.

Apesar do LPS não ter sido utilizado neste estudo para a exacerbação dos sintomas, uma maior aproximação com o fenótipo supracitado foi observada devido a uma maior proporção de neutrófilos do que os eosinófilos nos animais CP (Figura 18, a e b) a qual se acredita ter sido alcançado devido à maior exposição ao agente sensibilizante (OVA), responsável por levar a uma resposta inflamatória mais robusta (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2016).

A dexametasona e o tratamento com OC na maior concentração (100 mg/Kg) conseguiram reduzir o número de células inflamatórias totais aumentadas no lavado traqueal de forma significativa com nível de significância igual a $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente (Figura 17).

Já sobre os diferentes perfis celulares característicos do modelo de asma adotado, o OC, na concentração de 100 mg/Kg, reduziu o número de eosinófilos ($p < 0,001$) (Figura 18a) e neutrófilos ($p < 0,001$) (Figura 18b), em comparação ao contingente celular encontrado no grupo CP. Em compensação, a dexametasona e a concentração de 50 mg/Kg foram eficazes somente sobre a redução dos neutrófilos ($p < 0,01$) (Figura 18b). Ainda assim, o fato de ambas as concentrações de OC terem apresentado efeito sobre a redução de neutrófilos demonstra o potencial do óleo em atenuar a severidade da doença, uma vez que os neutrófilos estão associados às manifestações mais graves (VERES et al., 2017).

O OC em ambas as concentrações gerou aumento do número de linfócitos. A maior concentração (100 mg/Kg) foi, inclusive, significativamente diferente do grupo CP ($p < 0,01$) (Figura 18d). O estudo de Wei e colaboradores (2015) testou uma formulação para tratar a asma a base de uma combinação de plantas (*Astragalus membranaceus*, *Radix astragali*, *Herba epimedii* e *Rehmannia glutinosa*) e o efeito desta droga sobre os BALB/c, nas

concentrações mais elevadas (10 g/Kg e 20 g/Kg), não se diferenciou estatisticamente do controle positivo, apesar de demonstrar pequena redução do número de linfócitos.

Anteriormente, Veiga-junior e colaboradores (2007) haviam testado o efeito anti-inflamatório da oleorresina de diferentes espécies de copaibeiras sobre camundongos Swiss com pleurisia e verificado a capacidade de supressão da oleorresina de copaíba sobre neutrófilos e leucócitos. A inflamação desencadeada no modelo por eles adotado, com Zymosan, induziu uma resposta de caráter agudo com aumento acentuado do número de leucócitos totais, acúmulo de neutrófilos e extravasamento de proteínas. A oleorresina de *C. multijuga* foi o mais potente dentre as três espécies testadas, apresentando resposta na menor concentração por eles testada (100 mg/Kg), capaz de inibir 45% do total de leucócitos e 73% do acúmulo de neutrófilos.

O fato do trabalho de Veiga-junior e colaboradores, (2007) ter demonstrado diferenças de efeito, conforme espécie e dose adotadas, gera a lacuna, se o óleo testado neste estudo, poderia apresentar efeito sobre o número de linfócitos na asma, se fosse proveniente de outra espécie ou se testado em outras concentrações, indicando a necessidade de novos estudos para verificação de possíveis diferenças de efeito. No trabalho do autor acima citado a espécie *Copaifera reticulata* apresentou redução sobre o acúmulo de leucócitos e neutrófilos apenas na dose de 400 mg/Kg, por exemplo.

No presente estudo entretanto, o fato da concentração de 100 mg/Kg ter aumentado significativamente o número de linfócitos em comparação ao grupo com asma, tratado com diluente (CP), também gera a hipótese de que o OC pode atuar por meio de um mecanismo contrarregulador, por provável indução de TH1 ou Treg, gerando acúmulo de células e outros mediadores cuja natureza é antagônica ao perfil eosinofílico/neutrofílico da asma alérgica. São por isso, necessários estudos capazes de investigar de forma mais abrangente a relação entre o perfil das respostas inflamatórias e a atividade anti-inflamatória do OC.

Rogério e colaboradores (2009) verificaram o efeito isolado dos principais compostos do OC (*trans*-cariofileno e α -humuleno) em modelo experimental de asma com OVA, na dose de 50 mg/Kg. O tratamento com α -humuleno durante 5 dias reduziu o número de eosinófilos no lavado traqueal dos camundongos doentes. No entanto, não houve diferença significativa no tratamento com *trans*-cariofileno. Ambos os tratamentos ainda reduziram sutilmente a quantidade de neutrófilos em comparação com o controle positivo e a proporção de células mononucleares também não variou significativamente entre os grupos. O estudo

dos compostos isoladamente pode auxiliar na compreensão da contribuição de cada componente do óleo sobre o efeito anti-inflamatório pesquisado.

No presente estudo, a indução da asma nos camundongos também foi caracterizada pelo aumento na produção de NO no grupo controle positivo, tanto nas amostras de lavado traqueal (Figura 19a) quanto de macerado pulmonar (Figura 19b), com significância $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao controle negativo. No epitélio, a ação do NO é vasodilatadora, aumentando a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, o edema na inflamação, favorecendo em conjunto a produção de PGs pró-inflamatórias (KOBAYASHI et al., 2011).

O modelo de asma empregado, comprovadamente induz a inflamação com aumento de NO, conforme já relatado em outros estudos que mediram a sua concentração no escarro e no sangue comparando animais saudáveis e animais com asma (CHAUHAN et al., in press; KANDHARE et al., 2013; ZHANG et al., 2017b). A presença de NO apresenta modesta relação com fenótipos da doença caracterizados pela predominância da resposta imune TH2 e, conseqüentemente, ao aumento dos níveis de eosinófilos no escarro e no sangue (GINA, 2018a).

Possivelmente, em razão da associação do NO com o escarro, houve maior detecção de NO no lavado traqueal do que no macerado pulmonar, neste estudo, no grupo CP (Figura 19). Da mesma forma, os tratamentos testados obtiveram maior efeito inibitório sobre as amostras do lavado ($p < 0,001$), em relação ao grupo CP (Figura 19a). Apresentando uma tendência na redução da produção de NO no macerado pulmonar, a qual, porém, não foi significativa (Figura 19b).

Um resultado semelhante sobre a inibição de NO no modelo de asma alérgica, por um tratamento de origem natural, sendo, porém, o teste de detecção realizado no sangue, foi obtido por Chauhan e colaboradores, (in press). O que não invalida a comparação com as amostras de lavado deste estudo, já que a produção também apresenta maior relação com o sangue. A curcumina testada pelos autores suprimiu os níveis de NO em 21% com relação ao grupo controle positivo, apresentando efeito comparável ao da dexametasona, que reduziu em 18%. No presente estudo, a redução dos níveis de NO no lavado pelo OC foi em torno de 80%.

O potencial do OC em suprimir a produção de NO em estados inflamatórios, já havia sido testado *in vitro*. Veiga-Junior e colaboradores (2007) avaliaram a capacidade da produção de NO por macrófagos peritoneais de BALB/c, estimulados com LPS e tratados com oleorresina de três diferentes espécies de copaibeiras. A oleorresina de *C. multijuga* foi a

mais potente, capaz de inibir a produção de NO na menor concentração testada, 5 µg/ml. A oleorresina de *C. cearensis* inibiu significativamente a produção de NO a 50 µg/ml e a de *C. reticulata* conseguiu inibir na concentração de 500 µg/ml, apresentando o efeito inibitório mais significativo na maior concentração testada (85%).

O estudo de Dias e colaboradores (2014), investigou a produção de NO em esplenócitos de camundongos C57BL/6, induzidos no modelo de EAE e verificou que o OC foi eficaz na supressão da produção de NO nas três concentrações por eles testadas, 25, 50 e 100 µg/Kg, especialmente a 100 µg/Kg. Destryana e colaboradores (2014) investigaram a produção de NO em culturas celulares de macrófagos de murinos RAW 264.7 estimulados com LPS e o OC também mostrou supressão significativa sobre a produção de NO em todas as concentrações testadas, 0, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/ml. *In vivo*, no modelo de inflamação asmática, porém, a capacidade supressora do OC ainda não havia sido mensurada.

A literatura caracteriza a inflamação da asma alérgica como eosinofílica/neutrofílica, em razão das respostas TH2 e TH17 envolvidas (JI et al., 2014; NAGATO et al., 2015; VERES et al., 2017). O aumento de eosinófilos e monócitos está atribuído, em maior grau, a resposta TH2, enquanto que o número crescente de neutrófilos e outras células inflamatórias monomorfonucleares é esperado principalmente como resultado da secreção de IL-17, TNF- α e IL-8 (NAGATO et al., 2015). A IL-17 também pode contribuir para o aumento do número de eosinófilos no lavado traqueal de acordo com modelos de asma em ratos, levando-nos a acreditar que o mesmo pode acontecer em camundongos, como já observado em outros estudos (ZHU et al., 2017).

Corroborando com o padrão misto de resposta celular inflamatória (eosinofílico/neutrofílico) encontrado anteriormente, o modelo de asma empregado gerou aumento da resposta mediada por células T do tipo TH2 e TH17, o que pôde ser observado pela maior concentração de IL-4 ($p < 0,001$, nas amostras de lavado traqueal e $p < 0,05$, nas amostras de macerado pulmonar) e de IL-17 ($p < 0,001$, tanto no lavado quanto no macerado), respectivamente, nos animais CP em comparação aos grupo CN (Figuras 20 e 21), mantendo a conformidade dos dados com a característica observada na literatura (JI et al., 2014; WANG et al., 2016).

Nos camundongos, a IL-4 é necessária para a polarização da resposta e produção dos anticorpos IgG1 e IgE para OVA, sendo importante também para preparar a parede do vaso para o extravasamento de eosinófilos (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015) e a IL-17 está relacionada à produção de eosinófilos/neutrófilos no modelo, sendo marcador da manifestação moderada a severa da doença (RICCIARDOLO et al., 2017).

Ainda de acordo com a literatura, a indução com OVA neste estudo promoveu aumento de TNF- α (Figuras 20 e 21) (CHAUHAN et al., in press; LEE et al., 2011; MANNI et al., 2014). Esta citocina é produzida principalmente por macrófagos (MANNI et al., 2014), podendo ser produzida por TH17 e TH1 (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015).

Na asma alérgica sua expressão está mais intimamente relacionada à gravidade dos sintomas por possuir efeito sinérgico com a IL-17A, influenciando no influxo de neutrófilos para os pulmões e no remodelamento das vias aéreas (MANNI et al., 2014). O aumento de sua concentração também está relacionado a indução da produção de NO (CHAUHAN et al., in press), o que ajuda a ratificar a correlação de todas as condições inflamatórias verificadas, com o modelo de asma alérgica experimental.

No estudo em questão, não foram encontradas diferenças significativas na produção de IFN- γ após a indução dos animais a asma alérgica ($p > 0,05$) (Figuras 20c e 21c), apesar de leve tendência ao aumento dos níveis desta citocina, principalmente no macerado pulmonar. Comparativamente Yu; Chen (2018) também não obtiveram variação acentuada de IFN- γ no modelo de asma eosinofílica com OVA, também com tendência ao aumento da concentração desta citocina.

Uma parte da literatura verifica o aumento de IL-4 (resposta TH2), concomitante a redução de IFN- γ (resposta TH1) na asma, como consequência da contrarregulação entre as respostas imunes (HE et al., 2017; JI et al., 2014; YANG et al., 2013). Possivelmente, alterações na execução metodológica de cada estudo, associada principalmente ao manuseio dos animais e a aplicação do modelo com OVA para a indução da asma podem ter favorecido as diferenças relatadas sobre o nível de IFN- γ . Apesar disso, o aumento de IFN- γ é uma tendência no modelo com OVA caracterizado por predomínio de eosinófilos e neutrófilos, demonstrando que os resultados obtidos neste estudo também mantém coerência com os dados presentes na literatura (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

A atividade imunomodulatória do OC no modelo de asma experimental foi evidenciada pela redução da concentração das citocinas IL-4, IL-17 e TNF- α , no lavado traqueal dos animais CP, por ambas as concentrações (50 e 100 mg/Kg) ($p < 0,001$), confirmando seu efeito sobre TH2 e TH17 (Figura 20). Nas amostras do macerado pulmonar esta ação ficou menos evidente, pois o OC de 100 mg/Kg permaneceu eficaz na redução das mesmas citocinas (Figura 21a, b e d), porém, o OC de 50 mg/Kg, apresentou ação apenas sobre o TNF- α ($p < 0,001$) (Figura 21d).

Esse efeito mostra mais uma vez que, apesar da maior dose de OC (100 mg/Kg) obter melhor resultado no controle da inflamação, a dose de 50 mg/Kg, ao inibir, ainda que somente TNF- α , contribui para a minimização do quadro inflamatório, uma vez que esta citocina possui relação com a severidade da doença.

Ainda que o IFN- γ não tenha aumentado de forma significativa no CP, a redução da concentração desta citocina no macerado pulmonar, mediante o tratamento com 100 mg/Kg de OC, demonstrou a contribuição do óleo sobre a inibição de mediadores TH1, ideal no controle do modelo adotado com OVA em que há tendência ao aumento de IFN- γ . O efeito obtido foi idêntico ao efeito com o emprego da dexametasona ($p < 0,05$) (Figura 21c).

Com relação as pesquisas de produtos naturais para o tratamento da asma, observa-se uma variação de efeito sobre as repostas mediadas por células T, o que demonstra diferentes caracteres imunomodulatórios destes produtos, conforme composição e mecanismo de ação, podendo ainda haver variação do efeito em decorrência da metodologia escolhida pelos pesquisadores para monitorar a condição inflamatória.

O tratamento de camundongos C57BL/6, asmáticos, com ligustrazina, por exemplo, gerou redução sobre a resposta TH2 e, na dose mais alta, inibiu também a resposta TH17, sugerindo, conforme o pesquisador, potencial efeito sobre ambas as vias de contrarregulação, TH1/TH2 e Treg/TH17 (JI et al., 2014).

O tratamento de camundongos ICR com *Pulvis Fellis* sugeriu potencial efeito regulatório sobre o balanço TH1/TH2, pela planta ser capaz de reduzir citocinas relacionadas a TH2 e aumentar o IFN- γ relacionado a TH1, sendo capaz de reduzir ainda os níveis de TNF- α em amostras de lavado traqueal (HE et al., 2017).

O extrato de *Astragalus propinquus* foi capaz de inibir a resposta TH2 (IL-4; IL-5), suprimindo também a expressão e a translocação de NF- κ B em amostras de tecido pulmonar de camundongos BALB/c (YANG et al., 2013).

A erva *Nepeta bracteata* contribuiu para o reequilíbrio da resposta TH17/Treg via diminuição das células TH17 e aumento das células Treg, com efeito ainda sobre o remodelamento pela supressão de TGF- β (WANG et al., 2016).

O efeito imunomodulatório do OC em outras doenças de caráter inflamatório também vem sendo estudado e os resultados encontrados nesta pesquisa corroboram com os dados já relatados. Dias e colaboradores (2014) verificaram que o OC foi eficaz em modular respostas inflamatórias mediadas por células TH17 (IL-17) e TH1 (IFN- γ , TNF- α) no modelo de EAE.

Ku; Lin, (2013) testaram o efeito de sesquiterpenos isolados em esplenócitos de camundongos inflamados com LPS e verificaram a capacidade do tratamento com *trans*-cariofileno inibir concomitantemente citocinas características de TH1 e TH2, deixando a hipótese de que as espécies de OC, cujo *trans*-cariofileno é o seu constituinte majoritário, poderiam também ser eficazes na modulação de tais respostas.

Não foi possível neste trabalho estimar se o tratamento com OC apresenta capacidade de ajuste da correlação TH1/TH2 e TH17/Treg, uma vez que a redução significativa dos níveis IFN- α , na concentração de 100 mg/Kg, levou a crer que OC apresenta tendência em inibir TH1, não sendo possível constatar antagonismo entre as respostas TH1/TH2, além disso, a concentração de Treg não foi mensurada para que fosse comparada à resposta TH17. Portanto, fazem-se necessários estudos futuros, mais detalhados, acerca do envolvimento do OC no mecanismo de regulação das células T na asma.

A análise da morfometria semiautomática demonstrou aumento significativo de células inflamatórias totais sobre o tecido pulmonar no grupo controle positivo em relação ao grupo saudável (CN) ($p < 0,001$) (Figura 22). Resultado que corrobora com o infiltrado inflamatório encontrado no lavado traqueal (Figura 17) e com o levantamento realizado na literatura em camundongos BALB/c induzidos a asma com OVA (HUANG et al., 2014; LIN et al., 2017; WANG et al., 2016). Todos os tratamentos testados reduziram o infiltrado inflamatório desencadeado no modelo ($p < 0,001$) (Figura 22).

O exame histopatológico do tecido pulmonar dos camundongos asmáticos (CP) também revelou aumento da concentração de células inflamatórias no tecido (Figura 23b, detalhe também demonstrado pela Figura 24a e 25b) com um perfil misto de células inflamatórias, presentes ao longo de todo o tecido (Figura 25b), havendo, porém, predomínio de células sobre a região perivascular e peribronquiolar (Figura 24b).

Também foram visualizadas hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa, principalmente próximo aos bronquíolos (Figura 23b, seta), com possível aumento do contingente de células de poeira (Figura 23b, triângulo), aumento da congestão vascular (Figura 23b, x), assim como o espessamento da parede alveolar (Figura 23b, círculos; Figura 23b, detalhe).

Da mesma forma, outros estudos com BALB/c induzidos a asma com OVA também descreveram um aumento da concentração de células inflamatórias totais e alterações da arquitetura do tecido pulmonar nos animais doentes (FU et al., 2014; HUANG et al., 2014; MA et al., 2014; WANG et al., 2016; WEI et al., 2015; ZHANG et al., 2017a).

Segundo Yu; Chen, (2018) um infiltrado inflamatório presente ao longo de toda a extensão das vias respiratórias, conforme foi visualizado no presente estudo (Figuras 23b e 28), é característico de inflamações em que há recrutamento de neutrófilos, refletindo o caráter mais severo do quadro e a predominância de células inflamatórias em torno dos brônquios e vasos, reflete, em maior grau, a resposta eosinofílica, também predominante no modelo adotado.

O comportamento acima descrito, confirma a tendência da doença experimental, induzida no modelo com OVA, ter gerado um perfil misto de células inflamatórias e análise do acúmulo celular ainda possibilitou verificar que os animais tratados com OC na concentração de 100 mg/Kg apresentaram um perfil celular mais próximo da normalidade (Figura 25).

Anteriormente, Teixeira e colaboradores (2017) verificaram o efeito do OC na dosagem de 200 mg/Kg, VO, no tratamento de lesões traumáticas da língua de ratos Wistar, conseguindo observar, através da análise histopatológica qualitativa em HE, a capacidade da oleorresina da espécie *C. reticulata* em reduzir o infiltrado inflamatório crônico oriundo das lesões e em favorecer o reparo do tecido.

Estudos capazes de delinear de forma mais aprofundada o perfil celular presente no tecido pulmonar e quantificar a proporção de cada célula em todos os grupos do experimento, poderiam contribuir para compreender se a regulação das células no lavado traqueal, promovida pelo tratamento com OC, ocorrem de forma proporcional a regulação promovida sobre o tecido.

Neste estudo, julgou-se necessária a análise complementar da região periférica do tecido pulmonar, incluindo a área de parênquima, pelo o fato de que essas vias aéreas distais apresentam maior volume e área de superfície do que as grandes vias aéreas, e que a presença de edema e inflamação levam ao espessamento deste tecido, afetando a transmissão das forças de recolhimento elástico, de forma a isolar a via aérea dos efeitos do recolhimento elástico pulmonar e da inspiração profunda (RIGHETTI, 2012).

Em concordância com o cenário apresentado por Righetti (2012) o presente estudo verificou espessamento da área de parênquima no grupo CP (55%) em relação ao grupo CN (37%) ($p < 0,01$) (Figuras 26 e 27). O tratamento dos animais com OC, nas duas dosagens testadas, reduziu a área, quando comparado ao CP e apesar do cálculo da porcentagem de área de parênquima ter demonstrado que o OC na concentração de 50 mg/Kg gerou uma área de parênquima mais aproximada da área gerada no CN, a estatística não identificou diferença significativa de efeito entre as concentrações de OC testadas (Figuras 26 e 27). Já o

tratamento com a dexametasona não mostrou relevância estatística na redução da área de parênquima, apesar de também não ter apresentado diferenças significativas ao ser comparada com os tratamentos com OC ($p > 0,05$) (Figura 26).

Ainda segundo Righetti (2012), justamente pelo fato de alguns esteroides inalatórios apresentarem maior deposição sobre as vias aéreas centrais e não sobre o tecido periférico, o estudo de tratamentos alternativos para a asma pode ser de grande relevância no alcance das vias aéreas distais. Na revisão da literatura realizada para este trabalho não foram encontradas evidências sobre a deposição da dexametasona no tecido pulmonar. O resultado obtido com o OC sobre o parênquima sugere o alcance deste tecido, podendo apresentar-se como uma via alternativa de tratamento à dexametasona. Entretanto, são necessários mais estudos acerca da distribuição de ambos os tratamentos (dexametasona x OC) sobre o pulmão dos camundongos para a confirmação dos fatos.

Mediante a todas as evidências apresentadas de indução da inflamação nas vias aéreas dos camundongos e analisando o desempenho dos tratamentos, o OC apresenta-se como uma possibilidade de tratamento da asma.

Com relação às doses estudadas, apesar das concentrações administradas nos camundongos para teste de eficácia serem normalmente mais altas que as doses de analgésicos e anti-inflamatórios tradicionais, é importante levar em conta que as plantas são misturas complexas, podendo ser o efeito atribuído a um ou mais compostos, e, por isso, doses muito baixas podem não gerar resposta (GOMES et al., 2010). Estudos sobre a ação isolada dos seus compostos majoritários podem auxiliar na determinação do efeito conforme a composição do óleo.

Apesar da administração VO estar sujeita a influência de fatores como o pH estomacal e a lipossolubilidade, o que pode afetar a biodisponibilidade dos compostos estudados (GOMES et al., 2010), esta é uma via de administração relativamente confortável e acessível. O OC, administrado por esta via está relacionado a um índice de eventos adversos relativamente baixos e apresenta a vantagem de ser um produto abundante e atraente no mercado por seu baixo custo (CARVALHO, 2017).

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível concluir que o OC possui como compostos predominantes o *trans*-cariofileno, α -humuleno e α -copaeno. Foi observado também, que nas condições deste experimento não foram evidenciadas toxicidade renal ou hepática. No entanto, novos estudos de toxicidade devem abordar características mais amplas.

O modelo de asma alérgica, adotando o OC, foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório, associado a menor produção de citocinas, tanto em lavado quanto no macerado pulmonar e a menor produção de NO no lavado. Estes achados também se relacionam ao menor infiltrado inflamatório no tecido pulmonar e a um parênquima menos espesso nos animais tratados. Não foi possível, entretanto, correlacionar um efeito dose-reposta devido ao fato de não serem demonstradas diferenças estatísticas entre as duas doses utilizadas (50 e 100 mg/Kg).

Portanto, foi possível demonstrar um claro efeito do OC em reduzir os parâmetros inflamatórios no modelo experimental de asma com OVA, com efeito semelhante, em sua maioria, a dexametasona. Assim, o OC estabelece-se como uma substância promissora no tratamento da doença, sendo ainda necessários estudos mais aprofundados acerca do seu mecanismo de ação, distribuição sobre o tecido e outros aspectos, para a elucidação completa do seu efeito no organismo.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B. J. *Histologia essencial*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 476p.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*. 9. ed. Filadelfia: Elsevier, 2017. 608p.

ALMEIDA, M. R. et al. Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. *Genetics and Molecular Biology*, v. 35, n. 3, p. 664–672, 2012.

ANDRADE, A. *Benefícios do óleo de copaíba*. Disponível em: <<http://divinoparto.blogspot.com/2013/08/beneficios-do-oleo-de-copaiba.html>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, C.; ROMAGNANI, S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 135, n. 3, p. 626–35, 2015.

ÁRVORES DO BRASIL, I. E ESTUDOS SOBRE ÁRVORES NATIVAS BRASILEIRAS. *Copaifera langsdorfii*. Disponível em: <<http://www.arvores.brasil.nom.br/new/copaiba/index.htm>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

ASBAI (Associação Brasileira de Alergia e Imunologia). *Artigos - Material Educativo Como faço para saber se tenho asma?* Disponível em: <<http://www.asbai.org.br/secao.asp?s=81&id=1188>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

ASBAI (Associação Brasileira de Alergia e Imunologia). *Asma mata 2 mil pessoas por ano no Brasil*. Disponível em: <<http://www.asbai.org.br/secao.asp?s=81&id=942>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

ASTHMA UK. *Asthma: facts and statistics*. Disponível em: <<https://www.asthma.org.uk/about/media/facts-and-statistics/>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1582–614, 2015.

BAÏZ, N. et al. Early oral exposure to house dust mite allergen through breast milk: A potential risk factor for allergic sensitization and respiratory allergies in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 139, n. 1, p. 369–72, 2017.

BARBOSA, P. C. S. et al. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. *Chemistry and Biodiversity*, v. 10, n. 7, p. 1350–60, 2013.

BARDAJÍ, D. K. R. et al. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. *Anaerobe*, v. 40, p. 18–27, 2016.

BASILE, A. C. et al. Antiinflammatory activity of oleoresin from brazilian *copaifera*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 22, n. 1, p. 101–9, 1988.

BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragment extracts. *International Journal of Aromatherapy*, v. 13, n. 2–3, p. 138–42, 2003.

BEST, L. G. et al. Genetic variants and risk of asthma in an American Indian population. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, v. 119, n. 1, p. 31–6, 2017.

BOTELHO, N. M. et al. Efeito subagudo de altas doses do óleo de copaíba nos níveis de enzimas hepáticas em soro de ratos. *Rev. Para. Med. (Impresso)*, v. 24, n. 3/4, p. 1–7, 2010.

BOTELHO, N. M. et al. Copaiba oil effect under different pathways in mice subjected to sepsis. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 29, n. 8, p. 528–31, 2014.

BRANCA, R. T. et al. Molecular MRI for sensitive and specific detection of lung metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 8, p. 3693–7, 2010.

BRASIL. *Asma atinge 6,4 milhões de brasileiros*. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/editoria/saude/2015/01/asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

BRASIL. “*Ações judiciais impactam em até R\$ 7 bilhões no SUS*”, diz ministro. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/25275-ministro-da-saude-fala-sobre-impacto-de-aco-es-judiciais-no-sus>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

BTS (British Thoracic Society). British guideline on the management of asthma. *Scottish Intercollegiate Guidelines Network*, Setembro, 2016.

CARDOSO, T. A. et al. The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 43, n. 3, p. 163–8, 2017.

CARVALHO, J. C. T. *Fitoterápicos anti-inflamatórios (aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas)*. 2a ed. São Paulo: Pharmabooks, 2017. 463p.

CARVALHO, L. L. et al. Caracterização epidemiológica de escolares da rede pública e privada em relação à asma. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 6, 2016.

CASTRO-E-SILVA, O. et al. Antiproliferative Activity of *Copaifera duckei* Oleoresin on Liver Regeneration in Rats. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 1, p. 92–4, 2004.

CDC (Centers For Disease Control and Prevention). *Asthma Severity among Children with Current Asthma*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/asthma/asthma_stats/severity_adult.htm>. Acesso em: 30 maio. 2018.

CDC (Centers For Disease Control and Prevention). *Insurance coverage and barriers to care for people with asthma*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/asthma/asthma_stats/insurance_coverage.htm%0A?>. Acesso em: 7 jun. 2018.

CDC (Centers For Disease Control and Prevention). *Asthma's Impact on the Nation Data from the CDC National Asthma Control Program*. Disponível em: <http://www.cdc.gov/asthma/impacts_nation/asthmafactsheet.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2018.

CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL, INC. *Research models, C57BL/6 Mice*. Disponível em: <<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/C57BL6MouseModelInformationSheet.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

CHAUHAN, P. S. et al. (In press). Intranasal curcumin regulates chronic asthma in mice by modulating NF- κ B activation and MAPK signaling. *Phytomedicine*, 21 Jun 2018; doi 10.1016/j.phymed.2018.06.022.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1830, n. 6, p. 3670–95, 2013.

DALEY, D. et al. Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 130, n. 6, p. 1284–93, 2012.

DAVID, J. P. DE L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos Fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. *Infarma*, v. 16, n. 9, p. 71–6, 2004.

DELVES, P. J. et al. *Roitt's Essential Immunology*. 13. ed. Chichester: Wiley Blackwell, John Wiley & Sons, 2017. 576p.

DESTRYANA, R. et al. Antioxidant and anti-inflammation activities of ocotea, copaiba and blue cypress essential oils in vitro and in vivo. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 91, n. 9, p. 1531–42, 2014.

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. 12814–26, 2014.

DULLAERS, M. et al. House dust mite–driven asthma and allergen-specific T cells depend on B cells when the amount of inhaled allergen is limiting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 140, n. 1, p. 76–88, 2017.

DUTRA, M. S. *Avaliação da acarofauna em ecossistemas domiciliares do município de Porto Alegre/RS, Brasil*. 2016. 64f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança) - Faculdade de Medicina, Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DYKXHOORN, D. M.; LIEBERMAN, J. Silencing viral infection. *PLoS Medicine*, v. 3, n. 7, p. 1000–4, 2006.

ENGEROFF, P. et al. (In Press). A novel recycling mechanism of native IgE-antigen complexes in human B cells facilitates transfer of antigen to dendritic cells for antigen presentation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 23 Oct 2017; doi 10.1016/j.jaci.2017.09.024.

EPA (United States Environmental Protection Agency). *What Is Asthma?* Disponível em: <<https://www.epa.gov/asthma/what-asthma>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

FERGESON, J. E.; PATEL, S. S.; LOCKEY, R. F. Acute asthma, prognosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 139, n. 2, p. 438–47, 2017.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, v. 569, n. 3, p. 228–36, 2007.

FONSECA, R. G. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of copaiba oil: Implications on product quality control. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, v. 14, n. 3, p. 215–25, 2015.

FONTES, L. B. A. et al. β -Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 91, p. 257–64, 2017.

FRANCO, R. et al. The economic impact of severe asthma to low-income families. *Allergy*, v. 64, n. 3, p. 478–83, 2009.

FU, Q. et al. Anti-asthmatic effects of matrine in a mouse model of allergic asthma. *Fitoterapia*, v. 94, p. 183–9, 2014.

GAN (Global Asthma Network). *The Global Asthma Report Asthma*. 2014. Disponível em: <<http://globalasthmareport.org/>>. Acesso em: 18 out 2016.

GELMINI, F. et al. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 440, n. 2, p. 170–8, 2013.

GENETICS HOME REFERENCE. *Allergic asthma*. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/allergic-asthma?_ga=2.131423311.1974831786.1528210737-211659298.1528210737#genes>. Acesso em: 6 jun. 2018.

GINA (Global Initiative for Asthma). *Asma -Diagnóstico Errado pode Matar*. 2017a. Disponível em: <<https://www.ginanobrasil.org.br/2017/04/26/asma-diagnostico-errado-pode-matar/>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

GINA (Global Initiative for Asthma). *Os efeitos negativos da asma na economia*. 2017b. Disponível em: <<https://www.ginanobrasil.org.br/2017/05/30/os-efeitos-negativos-da-asma-na-economia/>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

GINA (Global Initiative for Asthma). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. 2018a. Disponível em: <<https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>. Acesso em: 25 mai. 2018.

GINA (Global Initiative for Asthma). *Global strategy for asthma management and prevention, online appendix*. 2018b. Disponível em: <<https://ginasthma.org/2017-online-appendix-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>. Acesso em: 25 mai. 2018.

GLEREAN, A.; SIMÕES, M. J. *Fundamentos de histologia para estudantes da área da saúde*. 1. ed. São Paulo: Santos, 2013. 372p.

GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, n. 3, p. 486–92, 2007.

GOMES, N. M. et al. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, n. 1, p. 179–84, 2008.

GOMES, N. M. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, n. 1, p. 177–83, 2010.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt “Ueber einige Azoverbindungen”. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 12, n. 1, p. 426–28, 1879

GUALDI, L. P. et al. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada Murine models for asthma research: An updated critical analysis. *Scientia Medica*, v. 20, n. 3, p. 236–42, 2010.

GUÉRY, L.; HUGUES, S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

HALIM, T. Y. F. et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*, v. 40, n. 3, p. 425–35, 2014.

HE, H. et al. Preterm Birth with Childhood Asthma: The Role of Degree of Prematurity and Asthma Definition. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 192, n. 4, 2015.

HE, J. et al. Pulvis Fellis Suis extract attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in murine model of asthma. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 207, p. 34–41, 2017.

HINKS, T. S. C. et al. Innate and adaptive T cells in asthmatic patients: Relationship to severity and disease mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 136, n. 2, p. 323–33, 2015.

HOLGATE, S. T. et al. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clinical Science*, v. 118, n. 7, p. 439–50, 2010.

HUANG, X. et al. Astragaloside IV attenuates allergic inflammation by regulation Th1/Th2 cytokine and enhancement CD4+CD25+Foxp3 T cells in ovalbumin-induced asthma. *Immunobiology*, v. 219, n. 7, p. 565–71, 2014.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção de estado de saúde, estilo de vida e doenças crônicas*. Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. 181p.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Pesquisa Nacional de Saúde 2013: acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências*. Coordenação de Trabalho e Rendimento: Rio de Janeiro: IBGE, 2015. 100p.

Ji, N. F. et al. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model. *International Immunopharmacology*, v. 21, n. 1, p. 76–81, 2014.

JOHNSON, J. R.; HARKER, J. A. Allergic airway disease: More than meets the IgE? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 57, n. 6, p. 631–2, 2017.

KANDHARE, A. D. et al. Anti-asthmatic effects of type-A procyanidine polyphenols from cinnamon bark in ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in laboratory animals. *Biomedicine and Aging Pathology*, v. 3, n. 1, p. 23–30, 2013.

KIM, H. Y.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Microbiology: with diseases by taxonomy*, v. 11, n. 7, p. 577–84, 2010.

KOBAYASHI, C. et al. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. *Pharmaceutical Biology*, v. 49, n. 3, p. 306–13, 2011.

KORIDECK, H.; PETERSON, J. D. Noninvasive quantitative tomography of the therapeutic response to dexamethasone in ovalbumin-induced murine asthma. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 329, n. 3, p. 882–9, 2009.

KOSHAK, A. et al. *Nigella sativa* Supplementation Improves Asthma Control and Biomarkers: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Phytotherapy Research*, v. 31, n. 3, p. 403–9, 2017.

KU, C. M.; LIN, J. Y. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. *Food Chemistry*, v. 141, n. 2, p. 1104–13, 2013.

KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current drug targets*, v. 9, p. 485–94, 2008.

KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. Mouse models of acute exacerbations of allergic asthma. *Respirology*, v. 21, n. 5, p. 842–49, 2016.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. *Robbins Basic Pathology Robbins*. 10. ed. Filadelfia: Elsevier, 2017. 935p.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. *Nature Immunology*, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2015.

LAZAREVIC, V.; GLIMCHER, L. H.; LORD, G. M. T-bet: A bridge between innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 11, p. 777–89, 2013.

LEANDRO, L. M. et al. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules*, v. 17, n. 4, p. 3866–89, 2012.

LEE, M. Y. et al. Anti-asthmatic effects of *Angelica dahurica* against ovalbumin-induced airway inflammation via upregulation of heme oxygenase-1. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 4, p. 829–37, 2011.

LIMA, S. R. M. et al. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 9, p. 1048–53, 2003.

LIN, S. C. et al. CTGF upregulation correlates with MMP-9 level in airway remodeling in a murine model of asthma. *Archives of Medical Science*, v. 13, n. 3, p. 670–6, 2017.

LIU, H. et al. Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of β -caryophyllene/ β -cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 450, n. 1–2, p. 304–10, 2013.

LUCCA, L. G. et al. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 104, p. 144–148, 2015.

LUNA, L. G. *Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3. ed. Nova York: McGraw Hill, 1968, 258p.

LUNGUSA (American Lung Association). *What is asthma?* Disponível em: <<http://www.lung.org/lung-health-and-diseases/lung-disease-lookup/asthma/>>. Acesso em: 19 mar. 2018a.

LUNGUSA (American Lung Association). *Asthma and Teens*. Disponível em: <<http://www.lung.org/lung-health-and-diseases/lung-disease-lookup/asthma/living-with-asthma/managing-asthma/asthma-and-teens.html%0AAsthma>>. Acesso em: 6 jun. 2018b.

MA, C. H. et al. Ma Huang Tang ameliorates asthma through modulation of Th1/Th2 cytokines and inhibition of Th17 cells in ovalbumin-sensitized mice. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 12, n. 5, p. 361–6, 2014.

MAJDALAWIEH, A. F.; FAYYAD, M. W. Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *International Immunopharmacology*, v. 28, n. 1, p. 295–304, 2015.

MANNI, M. L. et al. The Complex Relationship Between Inflammation And Lung Function In Severe Asthma. *Mucosal Immunol.*, v. 7, n. 5, p. 1186–98, 2014.

MANNI, M. L. et al. Bromodomain and Extra-Terminal Protein Inhibition Attenuates Neutrophil-dominant Allergic Airway Disease. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1–8, 2017.

MANZANO, P. et al. Toxicidade aguda e avaliação anatomopatológica em camundongos tratados com extrato da *Qualea grandiflora* Mart. *Arch Health Invest*, v. 5, n. 1, p. 37–42, 2016.

MARTÍN-OROZCO, E.; NORTE-MUÑOZ, M.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. *Frontiers in Pediatrics*, v. 5, n. 117, p. 1–18, 2017.

MATSUBARA, T. et al. Absorption, Migration and Kinetics in Peripheral Blood of Orally Administered Ovalbumin in a Mouse Model. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 72, n. 10, p. 2555–5, 2008.

MCLAFFERTY, F.W. *Wiley Registry of Mass Spectral Data*. 8. ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 2008.

MCKNIGHT, C. G. et al. House Dust Mite–Induced Allergic Airway Disease Is Independent of IgE and FcεR1α. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 57, n. 6, p. 674–82, 2017.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*, v. 151, n. 5, p. 618–27, 2007.

MENDELSON, R.; BALICK, M. The Value of Undiscovered Pharmaceuticals in Tropical Forests. *Economic Botany*, v. 49, n. 2, p. 223–8, 1995.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, v. 15, n. 12, p. 9252–87, 2010.

MORTAZ, E. et al. The roles of T helper 1, T helper 17 and regulatory T cells in the pathogenesis of sarcoidosis. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, v. 15, n. 4, p. 334–9, 2016.

MURPHY, K.; WEAVER, C. *Janeway's Immunobiology*. 9. ed. Nova York: Garland Science, 2016. 924p.

NAGATO, A. C. et al. Hyperoxia promotes polarization of the immune response in ovalbumin-induced airway inflammation, leading to a TH₁₇ cell phenotype. *Immunity, Inflammation and Disease*, v. 3, n. 3, p. 321–37, 2015.

NAGATO, A. C. *A hiperóxia promove a polarização da resposta imune na inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina, direcionada para o fenótipo de células Th17*. 2016. 69f. Tese (Doutorado em Saúde Brasileira) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

NHLBI (National Heart Lung and Blood Institute). *Asthma*. Disponível em: <<https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/asthma>>. Acesso em: 29 mai. 2018.

NIEDBALA, W. et al. Nitric oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function. *J Immunol*, v. 191, n. 1, p. 164–70, 2013.

NIEHS (National Institute of Environmental and Health Sciences). *Asthma*. Disponível em: <<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/conditions/asthma/index.cfm#footnote2>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

OLIVEIRA, L. G. S. et al. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. *Industrial Crops and Products*, v. 97, p. 455–64, 2017.

OLIVEIRA, M. L.; SANTOS, L. M. P.; SILVA, E. N. Bases metodológicas para estudos de custos da doença no Brasil. *Revista de Nutricao*, v. 27, n. 5, p. 585–95, 2014.

ONU (Organização das Nações Unidas). *ONU News - População mundial atingiu 7,6 bilhões de habitantes*. Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2017/06/1589091-populacao-mundial-atingiu-76-bilhoes-de-habitantes>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

PANGANIBAN, R. A. et al. (In press) A functional splice variant associated with decreased asthma risk abolishes the ability of gasdermin B to induce epithelial cell pyroptosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 9 Jan 2018, doi 10.1016/j.jaci.2017.11.040.

PATADIA, M. O.; MURRILL, L. L.; COREY, J. Asthma. Symptoms and presentation. *Otolaryngologic Clinics of North America*, v. 47, n. 1, p. 23–32, 2014.

PEPROTECHINC. *General Sandwich ELISA Protocol*. Disponível em: <www.peprotech.com>. Acesso em: 05 fev. 2018.

PORTO, C. C.; PORTO, A. L. *Vademecum de Clínica Médica*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 1107p.

PRADELA FILHO, L. A. et al. Determinação Voltamétrica de Nitrito Empregando o Íon [Fe(CN)₆]³⁻ como Mediador Eletroquímico. *Orbital - The Electronic Journal of Chemistry*, v. 7, n. 1, p. 10–20, 2015.

RADERMECKER, C. et al. Role of neutrophils in allergic asthma. *Current Opinion in Immunology*, v. 54, p. 28–34, 2018.

RAEDLER, D. et al. Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 135, n. 1, p. 81–91, 2015.

RAEDLER, D.; SCHAUB, B. Immune mechanisms and development of childhood asthma. *The Lancet Respiratory Medicine*, v. 2, n. 8, p. 647–56, 2014.

RANG, R. et al. *Rang e Dale: Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 784p.

RAYEES, S. et al. Linking GATA-3 and interleukin-13: Implications in asthma. *Inflammation Research*, v. 63, n. 4, p. 255–65, 2014.

REBER, L. L. et al. A Dissociated Glucocorticoid Receptor Modulator Reduces Airway Hyperresponsiveness and Inflammation in a Mouse Model of Asthma. *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 7, p. 3478–87, 2012.

RICCIARDOLO, F. L. M. et al. *Identification of IL-17F/frequent exacerbator endotype in asthma*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 140, n. 2, p. 395–406, 2017.

RICHARDS, C. D. Innate Immune Cytokines, Fibroblast Phenotypes, and Regulation of Extracellular Matrix in Lung. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 37, n. 2, p. 52–61, 2017.

RIGHETTI, R. F. *Tratamento com inibidor da Rho quinase em cobaias com inflamação alérgica crônica: modulação da inflamação eosinofílica, da expressão de citocinas inflamatórias, da matriz extracelular e do estresse oxidativo no parênquima pulmonar*. 2012. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROGERIO, A. P. et al. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. *British Journal of Pharmacology*, v. 158, n. 4, p. 1074–87, 2009.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. *Ross/Histologia - Texto e Atlas - Correlações com Biologia Celular e Molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 1000p.

ROTHERS, J. et al. (In press). Maternal cytokine profiles during pregnancy predict asthma in children of nonasthmatic mothers. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 4 Jun 2018; doi 10.1165/rcmb.2017-04100C.

SANT'ANNA, B. M. P. et al. Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 5, p. 984–9, 2007.

SANTOS, L. A. et al. Direct costs of asthma in Brazil: A comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 40, n. 7, p. 943–8, 2007.

SBPT (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 38, n. supl. 1, p. S1–S46, 2012.

SBPT (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia). *Asma*. Disponível em: <<https://sbpt.org.br/portal/publico-geral/doencas/asma/%0AESPACO>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

SCHEDDEL, M. et al. Polymorphisms related to ORMDL3 are associated with asthma susceptibility, alterations in transcriptional regulation of ORMDL3, and changes in TH2 cytokine levels. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 136, n. 4, p. 893–903, 2015.

SHENG-JIE, Y.; HUNG-RONG, Y. House dust mite allergen induces inflammasome activation and NFkB signal transduction in monocytes. *Journal of Immunology*, v. 198, n. 1 Supplement 1, 2017.

SHINAGAWA, K.; KOJIMA, M. Mouse Model of Airway Remodeling: Strain Differences. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 168, n. 8, p. 959–67, 2003.

SIGMA-ALDRICH. *Compra*. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/27814?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

SILVA, E. C. DE F.; SERPA, F. S.; EMERSON, M. DE F. E. *Viver bem com asma: perguntas e respostas*. Vitória: Emescam, 2017. 56p.

SILVA, J. J. DE L. et al. Effects of *copaifera langsdorffii* desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plastic Surgery*, v. 33, n. 1, p. 104–9, 2009.

SIMÕES, C. et al. *Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOARES, D. C. et al. Trans- β -caryophyllene: An effective antileishmanial compound found in commercial copaiba Oil (*Copaifera* spp.). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, 2013.

SOUSA, J. P. B. et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, n. 4, p. 653–9, 2011.

SPINELLI, M. O. et al. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. *Scientia Plena*, v. 8, p. 1–8, 2012.

SPTRS (Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Rio Grande do Sul). *A asma no Brasil*. Disponível em: <<http://sptrs.org.br/noticias/207-a-asma-no-brasil>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

STABILE, L. et al. Effects of the exposure to indoor cooking-generated particles on nitric oxide exhaled by women. *Atmospheric Environment*, v. 103, p. 238–46, 2015.

STIRBULOV, R. et al. Cost of severe asthma in Brazil—systematic review. *Journal of Asthma*, v. 53, n. 10, p. 1063–70, 2016.

STOKES, J. R.; CASALE, T. B. Characterization of asthma endotypes: implications for therapy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, v. 117, n. 2, p. 121–5, 2016.

TAVARES, N. U. L. et al. Factors associated with low adherence to medicine treatment for chronic diseases in Brazil. *Revista de Saude Publica*, v. 50, n. supl 2, p. 1–11, 2016.

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, n. 1, 2017.

TELLES FILHO, P. A. *Asma Brônquica - características patológicas*. Disponível em: <http://www.asma-bronquica.com.br/PDF/caracteristicas_patologicas.pdf>. Acesso em: 29 mai. 2018a.

TELLES FILHO, P. A. *Asma Brônquica - epidemiologia*. Disponível em: <<http://www.asma-bronquica.com.br/PDF/epidemiologia1.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2018b.

TELLES FILHO, P. A. *Asma brônquica - tratamento da asma*. Disponível em: <http://www.asma-bronquica.com.br/medical/tratamento_especifico_asma_gravidez.html>. Acesso em: 24 jun. 2018c.

TERAPIA COM AROMAS. *Copaíba é a nova aposta da medicina fitoterápica*. Disponível em: <<http://www.terapiacomaromas.com.br/copaiba-e-nova-aposta-da-medicina-fitoterapica/>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

TORRES, R.; PICADO, C.; MORA, F. DE. Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans. *Archivos de bronconeumología*, v. 41, n. 3, p. 141–52, 2005.

TOWARD, T. J.; BROADLEY, K. J. Early and late bronchoconstrictions, airway hyper-reactivity, leucocyte influx and lung histamine and nitric oxide after inhaled antigen: Effects of dexamethasone and rolipram. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 34, n. 1, p. 91–102, 2004.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, v. 851, n. 1–2, p. 51–70, 2007.

TUNG, Y. T. et al. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 9, p. 3908–13, 2008.

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. 248–54, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. 273–86, 2002.

VERES, T. Z. et al. Allergen-Induced CD4⁺ T Cell Cytokine Production within Airway Mucosal Dendritic Cell–T Cell Clusters Drives the Local Recruitment of Myeloid Effector Cells. *The Journal of Immunology*, v. 198, n. 2, p. 895–907, 2017.

WAGNER, V. P. et al. Effects of Copaiba Oil Topical Administration on Oral Wound Healing. *Phytotherapy Research*, v. 31, n. 8, p. 1283–88, 2017.

WANG, C. F. et al. Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Zanthoxylum dissitum* leaves and roots against three species of storage pests. *Molecules*, v. 20, n. 5, p. 7990–99, 2015.

WANG, J. et al. Inhibition of Asthma in OVA Sensitized Mice Model by a Traditional Uyгур Herb *Nepeta bracteata* Benth. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2016, 2016.

WARREN, K. J. et al. Sex Differences in the Localization and Activation of Type 2 Innate Lymphoid Cells in Experimental Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 139, n. 2, Supplement, Page AB82, 2017.

WEI, Y. et al. Bu-Shen-Yi-Qi formulae suppress chronic airway inflammation and regulate Th17/Treg imbalance in the murine ovalbumin asthma model. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 164, p. 368–77, 2015.

WHO (World Health Organization). *Asthma*. Disponível em: <<http://www.who.int/en/newsroom/fact-sheets/detail/asthma>>. Acesso em: 25 maio. 2018.

XAVIER-JUNIOR, F. H. et al. Development of a Gas Chromatography Method for the Analysis of Copaiba Oil. *Journal of Chromatographic Science*, v. 55, n. 10, p. 969–78, 2017.

XIMENES, V. *Asma afeta 20 milhões de pessoas no Brasil*. Disponível em: <<http://diariodonordeste.verdesmares.com.br/cadernos/vida/online/asma-afeta-20-milhoes-de-pessoas-no-brasil-1.1958285>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

YANG, Z.-C. et al. Astragalus extract attenuates allergic airway inflammation and inhibits nuclear factor κ B expression in asthmatic mice. *The American journal of the medical sciences*, v. 346, n. 5, p. 390–5, 2013.

YU, Q. L.; CHEN, Z. Establishment of different experimental asthma models in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 15, n. 3, p. 2492–8, 2018.

YURYEVA, K. et al. Expression of adenosine receptors in monocytes from patients with bronchial asthma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 464, n. 4, p. 1314–20, 2015.

ZHANG, C. et al. The effects of chrysophanol on ovalbumin (OVA)-induced chronic lung toxicology by inhibiting Th17 response. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 27, n. 5, p. 327–4, 2017a.

ZHANG, Q. et al. Propofol inhibits NF- κ B activation to ameliorate airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma mice. *International Immunopharmacology*, v. 51, n. May, p. 158–64, 2017b.

ZHANG, Y. et al. Effects of meteorological factors on daily hospital admissions for asthma in adults: A time-series analysis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, 2014.

ZHU, J. et al. Altered expression of regulatory T and Th17 cells in murine bronchial asthma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 14, n. 1, p. 714–22, 2017.

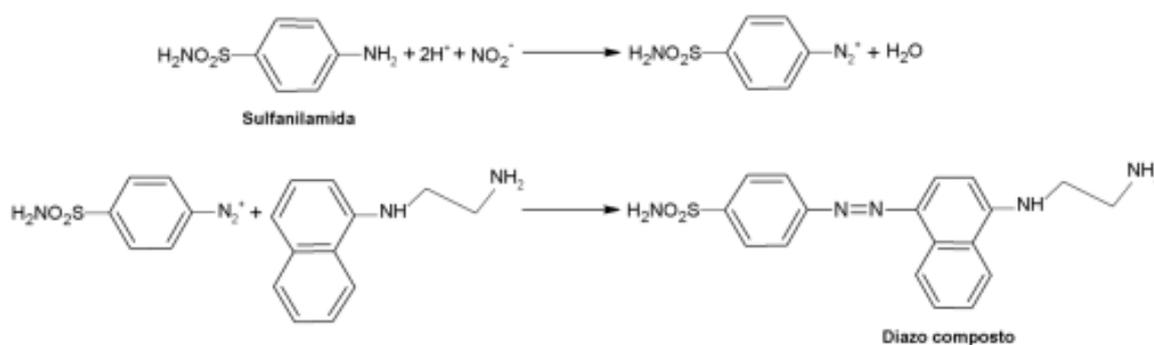
ZONGO, F. et al. Bioguidage search of active compounds from *Waltheria indica* L. (Malvaceae) used for asthma and inflammation treatment in Burkina Faso. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 28, n. 3, p. 323–30, 2014.

ANEXOS

ANEXO A - MÉTODO DE GRIESS

Na reação original de Griess, o nitrito reage com uma amina aromática (sulfanilamida), formando um íon diazônio. Este composto reage posteriormente com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina e produz uma coloração vermelho-violeta intensa. Este teste possibilita o estabelecimento de uma reação direta da presença de nitrito em uma amostra biológica com a ocorrência de um processo inflamatório no local onde a amostra foi obtida (PRADELA FILHO et al., 2015; TSIKAS, 2007). Em proporção, o reagente de Griess consiste na mistura (1:1) de N- (1-naftil) etilenodiamina a 0,1% (p/v) com sulfanilamida a 1% (p/v) em 5 % ácido fosfórico.

Figura 29. Representação esquemática da reação de Griess, descrita por Johann Peter Griess em 1879.



ANEXO B - PROTOCOLO GERAL PARA ELISA SANDUÍCHE

A dosagem de IL-4 IL-17, IFN- γ e TNF- α realizada no sobrenadante do homogeneizado pulmonar e lavado traqueal seguiu as recomendações do fabricante (PeProtechinc., Rocky Hill, NJ, EUA) descritas a seguir.

Figura 30. Recomendações do fabricante – protocolo geral para ELISA Sanduíche.



STANDARD AND ANTIBODIES

PeProTech's Recombinant Protein¹

PeProTech's Antigen Affinity Purified Polyclonal or Monoclonal Antibody¹

PeProTech's Biotinylated Antigen Affinity Purified Polyclonal Antibody¹

**PeProTech's Standards and Antibodies should be reconstituted according to the data sheets which accompany each product.

RECOMMENDED MATERIALS

ELISA microplates (Nunc MaxiSorp Prod. # 439454, or Corning Prod. # 3590)²;

Tween-20 (Sigma Cat. # P-7949);

BSA (Sigma Cat. # A-7030);

Avidin-HRP conjugate (Sigma Cat. # A-7419)¹;

ABTS Liquid Substrate Solution (Sigma Cat. # A3219)²;

Dulbecco's PBS [10x] (Gibco BRL Cat. #14200-075);

Sealing Film².

RECOMMENDED SOLUTIONS

All solutions should be at ambient temperature prior to use.

PBS: Dilute 10xPBS to 1xPBS, pH 7.20 in sterile water².

Wash Buffer: 0.05% Tween-20 in PBS²

Block Buffer: 1% BSA in PBS*²

Diluent: 0.05% Tween-20, 0.1% BSA in PBS*²

*Sterile filter and store at 4°C for up to 1 week.

¹Included in Standard and Mini ELISA Development Kits

²Included in ELISA Buffer Kit

PLATE PREPARATION

1. Dilute capture antibody (polyclonal) with PBS to a concentration of 1 μ g/ml. Immediately, add 100 μ l to each ELISA plate well. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.

(Monoclonal Antibody – at least 2 μ g/ml).

2. Aspirate the wells to remove liquid and wash plates 4 times. Each wash consists of adding 300 μ l wash buffer per well, followed by aspiration. After the last wash invert plate to remove residual buffer and blot on paper towel.

3. Add 300 μ l blocking buffer to each well. Incubate 1 hour at R.T.

4. Aspirate and wash plate 4 times (as in step 2).

General Sandwich ELISA Protocol

ELISA PROTOCOL

Standard/Sample: Serial dilute standard from 0.01 µg/ml to zero in diluent. Add 100 µl of standard or sample to each well in triplicate. Incubate at room temperature for at least 2 hours.

Detection: Wash plate four times. Dilute detection antibody (biotinylated) in diluent to a concentration of 0.5 µg/ml (500 ng/ml). Immediately add 100 µl per well. Incubate at room temperature for 2 hours.

Avidin-HRP Conjugate: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute Avidin-HRP conjugate 1:2000 in diluent. Add 100 µl per well. Incubate 30 min at room temperature.

ABTS Liquid Substrate: Aspirate and wash plate 4 times. Add 100 µl of substrate solution to each well. Incubate at room temperature for color development. Monitor color development with an ELISA plate reader at 405 nm with wavelength correction set at 650 nm.

NOTE: Reliable standard curves are obtained when O.D. readings do not exceed 0.2 units for the zero standard concentrations, or 1.2 units for the highest standard concentration. The plate should be monitored at 5 minute intervals until desired O.D. readings are obtained. The typical range is 5-40 minutes. O.D. readings may vary.

De acordo com as recomendações do fabricante, as concentrações de citocinas empregadas foram as seguintes:

Tabela 2. Recomendações do fabricante sobre o Kit ELISA sanduíche conforme a citocina investigada.

NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO	CITOCINA RELACIONADA	QUANTIDADES EMPREGADAS
900-K49	IL-4	-Anticorpo de captura: 1,0 µg/ml -Anticorpo de detecção: 0,5 µg/ml
900-K392	IL-17	-Anticorpo de captura: 1,0 µg/ml
900-K98	IFN-γ	-Anticorpo de detecção: 0,25 µg/ml
900-K54	TNF-α	

Fonte: Adaptado de PEPROTECHINC., 2018.

ANEXO C - PARAFINIZAÇÃO DE TECIDO EM LÂMINA E COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA

A técnica de parafinização do tecido em lâmina é realizada seguindo-se as seguintes etapas:

1- Fixação

- a) Após a coleta do material biológico, o mesmo é fixado com o objetivo de manter a estrutura e a composição mais próxima a do tecido *in vivo* e impedir a ação de bactérias e enzimas proteolíticas (autólise) que poderiam provocar a degradação tecidual.
- b) A fixação foi feita através da imersão da peça em formol. O volume de fixador empregado foi 4 vezes maior que o volume do fragmento de tecido a ser fixado. O fixador inicia a sua ação da periferia para o centro do material. As porções periféricas do material são primeiramente fixadas em relação as suas porções mais internas.
- c) A boa penetração de qualquer fixador está diretamente relacionada ao tamanho e espessura do material. Os fixadores atuam estabelecendo ligações transversais entre as proteínas intra e intercelulares. Quando a amostra é espessa, realiza-se a sua clivagem para permitir a melhor penetração do fixador.

2- Desidratação

- a) Processo necessário para a retirada de toda a água do tecido. É realizada através de banhos de álcool em concentrações crescentes, de etanol 70% a etanol 100%;

3- Diafanização

- a) A diafanização ou clareamento é realizada com a finalidade de substituir o etanol presente na amostra por uma substância intermediária que seja miscível tanto em etanol como na substância utilizada na etapa seguinte (inclusão) para enrijecer a amostra. O Xilol, que costuma ser empregado nesse processo tem a função de ponte entre o álcool e a parafina. Ao final desta etapa, os tecidos tornam-se transparentes/translúcidos atingindo um alto índice de refração;

4- Parafinização

- a) A parafina tem a função de tornar a amostra rígida e, dessa forma, permitir o corte em lâminas finas no micrótomo. Ao ser imersa em parafina fundida e colocada em uma estufa a 56-60°C, o calor promove a evaporação do xilol e a ocupação dos espaços teciduais por parafina. O tecido embebido por parafina se torna rígido após ser retirado da estufa.
- b) Esta etapa permite a impregnação de parafina nos tecidos sendo necessários dois banhos de uma hora cada; esta inclusão em parafina é feita em moldes apropriados até sua completa solidificação e estes moldes devem ser mantidos sob refrigeração até a realização dos cortes em micrótomos.

5- Microtomia

- a) Nesta etapa os blocos de tecido são levados ao micrótomo para serem cortados em cortes finos que podem variar de 1 a 10 micrômetros.

6- Coloração

- a) Para a visualização e diferenciação do tecido que se deseja observar, as lâminas são coradas com corantes específicos.
- b) Os corantes são hidrossolúveis e podem ser acidófilos (eosina) ou basófilos (hematoxilina) sendo a técnica de coloração dupla pela hematoxilina e eosina (HE) a mais utilizada na rotina de laboratório e a mais indicada para avaliação de tecido pulmonar. A técnica de coloração consiste em desparafinizar em dois banhos de xilol por 15 min, reidratar o tecido em banhos de 1 min em álcoois com concentrações crescentes, lavar por 5 min em água corrente, corar em hematoxilina por 6 min, lavar em água corrente até remover os excessos do corante, diferenciar os tecidos em solução diferenciadora, lavar por 5 min em água corrente, corar em eosina por 4 min, remover o excesso da eosina em banhos de álcoois com concentrações crescentes (70%, 95%, 100%), remover a oxidação das lâminas em três banhos de xilol, montar com lamínula e resina copal.

Descrição da técnica padronizada no laboratório de histopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, 2018.