

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SAÚDE BRASILEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA**

Juliana Brovini Leite

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO
ÓLEO DE COPAÍBA E DO *TRANS*-CARIOFILENO NA DERMATITE ATÓPICA
EXPERIMENTAL**

JUIZ DE FORA

2019

Juliana Brovini Leite

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO
ÓLEO DE COPAÍBA E DO *TRANS*-CARIOFILENO NA DERMATITE ATÓPICA
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientadora: Prof. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Co-orientador: Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

JUIZ DE FORA

2019

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

Leite, Juliana Brovini.

Avaliação do potencial terapêutico da aplicação tópica do óleo de copaíba e do *trans*-cariofileno na dermatite atópica experimental / Juliana Brovini Leite. -- 2019.

81 f. : il.

Orientadora: Beatriz Julião Vieira Aarestrup

Coorientador: José Otávio do Amaral Corrêa

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2019.

1. Dermatite atópica. 2. Fitoterapia. 3. Anti-inflamatórios. 4. Óleo de copaíba. I. Aarestrup, Beatriz Julião Vieira, orient. II. Corrêa, José Otávio do Amaral, coorient. III. Título.

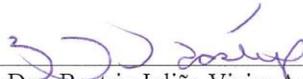
JULIANA BROVINI LEITE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO
ÓLEO DE COPAÍBA E DO TRANS-CARIOFILENO NA DERMATITE ATÓPICA
EXPERIMENTAL**

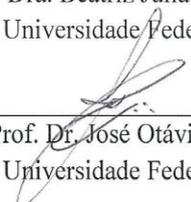
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Saúde - Área de Concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em 16 / 07 / 2019

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



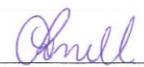
Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



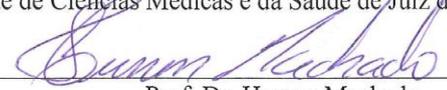
Prof. Dr. Akinori Cardozo Nagato
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Prof. Dra. Maria Inês da Cruz Campos
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Prof. Dra. Chislene Pereira Vanelli
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - SUPREMA



Prof. Dr. Hussen Machado
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - SUPREMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre a Deus, em primeiro lugar, por iluminar meu caminho. Ao professor José Otávio do Amaral Corrêa, por acreditar em mim e me indicar para fazer parte do grupo de pesquisa. Sem você eu não estaria aqui hoje. Ao professor Akinori Cardozo Nagato, pela amizade, ensinamentos, conselhos, disponibilidade e paciência inigualáveis. Com certeza tudo seria mais difícil sem você no laboratório. À professora Maria Inês da Cruz Campo pelas palavras de apoio e sorriso no rosto, o que tornou a caminhada mais leve. À professora Beatriz Julião Vieira Aarestrup, por ser como uma mãe para mim. Toda sua ajuda, seus ensinamentos, seu carinho ao lidar comigo, mesmo quando precisava chamar atenção, serão de uma gratidão eterna. Sem palavras para expressar o quanto você foi essencial durante todo esse processo e o quanto eu sentirei saudade. Ao professor Fernando Monteiro Aarestrup, agradeço primeiramente por ter me aceitado como aluna no grupo de pesquisa. Você é uma pessoa que desde o início eu admirava pelo profissional que é, e com o passar dos anos eu aprendi a admirá-lo também como ser humano. Você é, sem dúvida, um espelho para todos nós. Mesmo com inúmeras funções que sempre exerceu, nunca me negou ajuda, e sempre lembrava de perguntar: “Mirela está bem?” Você é de uma admiração inquestionável. Não posso deixar de agradecer ao meu marido, Daniel, aos meus pais, Márcia e Alfredo, e à minha irmã, Monique, pelo apoio e incentivo. Vocês sempre acreditaram em mim, muito mais que eu mesma. E, claro, que eu jamais esqueceria de agradecer minha benção maior, minha filha Mirela, que esteve comigo desde a barriga nessa caminhada. Sentir cada chute que você me dava enquanto eu fazia as imuno-histoquímicas, ou quando eu estava no microscópio fotografando e analisando imagens, eram um grande incentivo, e me davam força para me tornar uma profissional melhor e um dia você se orgulhar de mim. Peço desculpas por me ausentar tantas vezes minha filha, e agradeço por em cada olhar, me fazer entender que eu estava no caminho certo. A todos os alunos do laboratório, que estiveram juntos nesses quatro anos, em especial ao Álvaro César Dutra Presto e Wellington Dorigheto Andrade Vieira, que se tornaram mais que companheiros de laboratório, se tornaram grandes amigos. Às técnicas do CBR, Mariana da Fonseca Pereira e Samara Rodrigues do Nascimento,

muito obrigada por toda ajuda e amizade. Às professoras Vera Peters e Martha Guerra, pelos ensinamentos e dedicação ao CBR. Vocês, com certeza, contribuem para a formação de todos que por lá passam. Agradeço também a uma amiga especial, Patrícia Guedes Garcia, por todas as palavras de apoio e incentivo, e por sempre falar: vai dar tudo certo. Eu não tenho dúvidas que cada um de vocês contribuíram para eu chegar até aqui.

À todos, muito obrigada!

“Independente do desafio, aja no limite do esforço e seja competente. O resto é resultado”.

Thimer.

RESUMO

Introdução: Dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele, caracterizada por intenso prurido, lesões eczematosas, xerose, liquenificação. Além de alterações histológicas, a DA é marcada por alterações imunológicas, como aumento do número de mastócitos, aumento de IgE e subpopulações de linfócitos TCD4⁺. Como o uso de corticoides e imunomoduladores causam diversos efeitos colaterais, há necessidade pela busca de fitoterápicos com atividade antiinflamatória e reduzidos efeitos adversos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico do óleo de copaíba e do *trans*-cariofileno em lesões de pele na DA experimental. **Método:** Camundongos Balb/c (N = 32) foram divididos nos grupos G0 (sem DA); GI (grupo inflamado - LesAD), GII (dexametasona), GIII (tacrolimus), GIV (óleo de copaíba), GV (*trans*-cariofileno). A dermatite foi induzida com dinitroclorobenzeno e ovalbumina, por sete dias, e os tratamentos iniciados no oitavo dia, por sete dias. A eutanásia foi realizada no 15^o dia para obtenção da área lesionada para análise histopatológica (HE e azul de toluidina) e imuno-histoquímica (T-bet, GATA-3, IL-17, Foxp3 e peroxidase eosinofílica). **Resultados:** Amostras coradas por HE demonstraram no GI todas as características necessárias para diagnóstico da DA; GII foi semelhante ao GI, porém com tipo de infiltrado diferente; GIII exibiu infiltrado linfocítico intraepitelial; em GIV e GV houve boa recuperação epidérmica. Nas amostras coradas por azul de toluidina, foram observadas quantidades elevadas de mastócitos nos Grupos I, II, III e V em comparação com G0, enquanto que GIV, houve considerável diminuição dos mastócitos. Por imunohistoquímica, o óleo de copaíba reduziu significativamente a expressão de T-bet, GATA-3, Foxp3 e peroxidase eosinofílica. Já o *trans*-cariofileno reduziu a expressão de GATA-3, Foxp3 e peroxidase eosinofílica. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o óleo de copaíba e *trans*-cariofileno são potenciais substratos para novas drogas a serem utilizadas no tratamento da DA.

Keyword: Dermatite atópica. Fitoterapia. Antiinflamatórios. Óleo de copaíba.

ABSTRACT

Background: Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by intense pruritus, eczematous lesions, xerosis and lichenification. In addition to histological changes, AD is marked by immunological changes, such as an increased number of mast cells, increased IgE and changes in CD4⁺ T lymphocyte subpopulations. Because the use of corticosteroids and immunomodulators causes several side effects, there is a need for new phytotherapeutic agents with anti-inflammatory activities that lack adverse effects. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the therapeutic potential of copaiba oil and *trans*-caryophyllene in skin lesions from experimental AD. **Methods:** Balb/c mice (N = 32) were divided into groups: G0 (no AD), G1 (inflamed group, LesAD), GII (dexamethasone), GIII (tacrolimus), GIV (copaiba oil), and GV (*trans*-caryophyllene). Dermatitis was induced with dinitrochlorobenzene and ovalbumin for seven days, and treatments started on the eighth day for seven days. Euthanasia was performed on the 15th day to obtain the lesioned area for histopathological analysis (hematoxylin-eosin (HE) and toluidine blue) and immunohistochemistry (T-bet, GATA-3, IL-17, Foxp3 and eosinophilic peroxidase). **Results:** HE-stained samples showed all the characteristics necessary for the diagnosis of AD in G1; GII was similar to G1 but with a different infiltrate; GIII exhibited an intraepithelial lymphocytic infiltrate; and in GIV and GV, there was good epidermal recovery. In samples stained with toluidine blue, high numbers of mast cells were observed in G1, GII, GIII and GV compared to G0, whereas GIV exhibited a considerable decrease in mast cells. Copaiba oil significantly reduced T-bet, GATA-3, Foxp3 and eosinophilic peroxidase expression observed by immunohistochemistry. Conversely, *trans*-caryophyllene reduced GATA-3, Foxp3 and eosinophilic peroxidase expression. **Conclusions & Clinical Relevance:** The results suggest that copaiba oil and *trans*-caryophyllene are potential substrates for new drugs to be used in AD treatment.

Keywords: Atopic dermatitis. Phytotherapy. Antinflammatory. Copaiba oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Interação entre meio ambiente, pele, fatores genéticos e fatores imunológicos relacionados à DA	19
Figura 2: Mecanismos imunológicos envolvidos na DA.....	21
Figura 3: Subpopulações de linfócitos na resposta adaptativa, com suas respectivas citocinas produzidas e funções desempenhadas por elas, e fatores de transcrição que as induzem, juntamente com interleucinas.....	22
Figura 4: Pele demonstrando algumas características de DA.....	23
Figura 5: A) Pele normal com a presença de grânulos de filagrina, marcados por imuno-histoquímica, destacados na cor preta. B) Pele com dermatite atópica, sem grânulos de filagrina	25
Figura 6: Estrutura química do <i>trans</i> -cariofileno.....	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Compilado de trabalhos que demonstram atividade antiinflamatória de espécies de copaíbas e do <i>trans</i> -cariofileno	34
Quadro 2: Divisão dos grupos analisados e tratamentos específicos	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- % - Porcentagem
- µg - micrograma
- µg/mL - Micrograma por mililitro
- µL - Microlitro
- ANOVA - Análise de variância
- CA - Califórnia
- CBR - Centro de Biologia da Reprodução
- CCL27 - *Chemokine (C-C motif) ligand 27*
- CCR10 - *C-C Chemokine receptor type 10*
- CD-68 - Cluster of Differentiation 68
- CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
- COX-2 - Ciclo-oxigenase 2
- DA - Dermatite atópica
- DAB - Diaminobenzidina
- DNCB - Dinitroclorobenzeno
- EASI - *Eczema Area and Severity Index*
- EPX - Peroxidase eosinofílica
- EUA - Estados Unidos da América
- FDA - *Food and Drug Administration*
- FHN - Fator de hidratação natural
- FLG - Filagrina
- Foxp3 - *Forkhead box P3*
- g - Grama
- GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- h - horas
- H₂O₂ - Peróxido de oxigênio
- HE - Hematoxilina-eosina
- IFN-γ - Interferon gama

IgE - Imunoglobulina E

IL-1 - Interleucina 1

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

IL-17 - Interleucina 17

IL-18 - Interleucina 18

IL-2 - Interleucina 2

IL-21 - Interleucina 21

IL-22 - Interleucina 22

IL-23 - Interleucina 23

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

ISAAC - *International Study of Asthma and Allergy Diseases in Childhood*

LesAD – grupo inflamado, sem tratamento

LPS - Lipopolissacarídeo

mg - Miligrama

mg/Kg/dia - Miligrama por quilograma por dia

mL - Mililitro

NF-κB - Fator de necrose kappa beta

NIH - Instituto Nacional de Saúde

NO - Óxido nítrico

°C - Graus Celsius

OR - Óleo resina

OVA - Ovalbumina

p - Probabilidade

PBS - Phosphate buffered saline

PFA - Fator de agregação plaquetária

pH - Potencial hidrogeniônico

PTEA - Perda trans-epidérmica de água

RNAm - ácido ribonucleico mensageiro

ROR- γ t - *Nuclear receptor retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma*

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SCORAD - *Scoring Index of Atopic Dermatitis*

SM-GCer - Glucosil ceramida esfingomielina desacilase

sp - espécie

STAT-4 - *Signal transducer and activator of transcription 4*

STAT-6 - *Signal transducer and activator of transcription 6*

T-bet - *T-box transcription factor*

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

Th0 - T *helper* tipo 0

Th1 - T *helper* tipo 1

Th17 - T *helper* tipo 17

Th2 - T *helper* tipo 2

Th22 - T *helper* tipo 22

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Treg - T regulatório

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Alterações imunológicas	19
2.2 Características histopatológicas da dermatite atópica.....	23
2.3 Alterações na função de barreira epidérmica	24
2.4 Impactos na qualidade de vida	28
2.5 Tratamento da dermatite atópica	28
2.6 Busca por produtos naturais	31
2.7 Oléo-resina de copaíba e o <i>trans</i> -cariofileno	31
3. HIPÓTESE	Erro! Indicador não definido.
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo geral	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 Animais do experimento.....	37
5.3 Obtenção das amostras de pele.....	39
5.3.1 Análise histopatológica	40
5.3.2 Análise histoquímica.....	41
5.3.3 Análise imuno-histoquímica.....	42
5.4 Análise estatística	43
5.4.1 Análise estatística (mastócitos).....	43
5.4.2 Análise estatística (anticorpos IL-17, GATA-3, T-bet, TGF- β e peroxidase eosinofílica)	44
6. RESULTADOS.....	45
7. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	467
ANEXO 1.....	544

1. INTRODUÇÃO

Dermatite atópica (DA), ou eczema, é uma doença de pele que geralmente está associada à outras desordens atópicas, como rinite alérgica e asma (AKDIS et al., 2006). As manifestações clínicas da DA variam de acordo com a idade e geralmente três estágios são identificados. Na primeira infância, as primeiras lesões eczematosas geralmente surgem nas bochechas e no couro cabeludo, causando intenso prurido. Durante a infância, as lesões envolvem regiões de flexões, nuca e os aspectos dorsais dos membros. Na adolescência e na idade adulta, as placas liquenificadas afetam as flexuras, a cabeça e o pescoço. Em cada estágio, a coceira que continua ao longo do dia e piora à noite causa perda de sono e prejudica substancialmente a qualidade de vida do paciente (BIEBER, 2008).

As características da DA são uma forma crônica e recidivante de inflamação da pele, um distúrbio de função da barreira epidérmica que culmina na pele seca e a sensibilização mediada por imunoglobulina E (IgE) a alérgenos alimentares e ambientais (LEUNG; BIEBER, 2003). Algumas hipóteses são propostas como mecanismos da DA. Uma delas sustenta que o defeito primário reside em um distúrbio imunológico que causa sensibilização mediada por IgE, com a disfunção da barreira epitelial vista como consequência da inflamação local. A outra propõe que um defeito intrínseco nas células epiteliais leva à disfunção da barreira (BIEBER, 2008). Tanto as alterações imunológicas quanto os defeitos de barreira de pele estão fortemente associados a fatores genéticos ou ambientais (BOGUNIEWICZ; LEUNG, 2011).

Como forma de controlar a inflamação, o tratamento da DA envolve uso de corticosteroides e imunossupressores, à longo prazo. A terapia acarreta uma série de efeitos colaterais ao longo do seu uso, o que diminui a adesão dos pacientes ao tratamento (ASCHOFF et al., 2011; JENSEN et al., 2012; EICHENFIELD et al., 2014). O aumento da prevalência da doença, principalmente em países industrializados, e a pouca melhora observada nos pacientes que fazem uso do tratamento convencional, foi o fator mais decisivo para a busca por novos tratamentos.

Newman e Cragg (2012), defenderam fortemente a expansão da exploração da natureza como forma de buscar medicamentos eficazes para uma grande variedade de doenças. Entre tais produtos, o óleo-resina (OR) da copaíba constitui uma das mais importantes fontes renováveis de medicamento natural para as populações da região amazônica (GELMINI et al., 2013).

O OR extraído do caule dessas árvores é amplamente utilizado na medicina popular por habitantes da Amazônia devido à diversas ações, inclusive a anti-inflamatória, que é, sem dúvida, a mais difundida na medicina popular (VEIGA JUNIOR et al., 2007; YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). A atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba é, por muitos autores, atribuída ao seu constituinte, o *trans*-cariofileno (FERNANDES et al., 2007; VEIGA JUNIOR et al., 2007; GERTSCH et al., 2008; GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012). Assim, o estudo buscou avaliar os efeitos do óleo de copaíba e do *trans*-cariofileno em animais com DA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A DA é uma doença inflamatória crônica da pele, caracterizada por prurido intenso, lesões eczematosas, xerose e liquenificação (FUJITA, 2013; WU et al., 2014) que, geralmente, se iniciam nos primeiros anos de vida, mas podem ocorrer em qualquer idade (ZEPPA; BELLINI; LISI et al., 2011). Um total de 45% dos casos de DA inicia-se dentro dos seis meses de vida, 60% durante o primeiro ano de idade e 85% antes dos cinco anos de vida (ILLI et al., 2004). Está associada à outras doenças atópicas como a asma, rinite alérgica, urticária e reações alérgicas agudas aos alimentos (WU et al., 2014). Essa relação da presença de mais de um processo alérgico é conhecida como “marcha atópica” ou “marcha alérgica” (GUTOWSKA-OWSIAK; OGG, 2013; MU et al., 2014). O diagnóstico da doença é basicamente clínico; alguns exames laboratoriais, como dosagem de IgE e biópsia de pele, podem ser utilizados para auxiliar a confirmação da doença (EICHENFIELD et al., 2015).

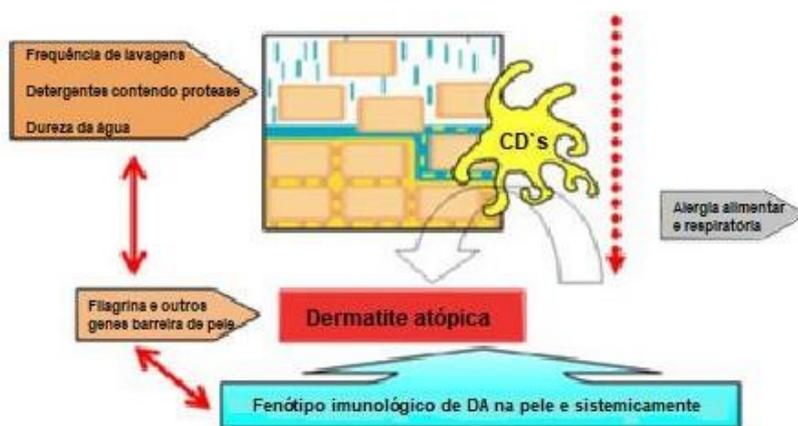
O termo atopia refere-se a uma tendência genética de desenvolver doenças alérgicas, tais como rinite alérgica, asma e dermatite atópica. Estas doenças atópicas resultam de uma interação entre a susceptibilidade genética do indivíduo e exposição à fatores ambientais, como ácaros, alimentos e pólen (JENEROWICZ et al., 2012). A exposição a inúmeros fatores ambientais tem desencadeado o aumento crescente das doenças alérgicas nas últimas cinco décadas (PAWANKAR et al., 2013).

Estima-se que a prevalência de DA em humanos seja de 3% em adultos e de 15 a 20% em crianças, sendo uma das doenças mais comuns no mundo ocidental, principalmente em países industrializados (EYERICH; NOVAK, 2013). A menor prevalência de DA em áreas rurais quando comparado à áreas urbanas sugere associação com a “hipótese da higiene”, a qual postula que a ausência da exposição na infância precoce a agentes infecciosos aumenta a susceptibilidade a doenças alérgicas (STRACHAN, 1989). No Brasil, entre adolescentes, a primeira fase do *International Study of Asthma and Allergy Diseases in Childhood* (ISAAC) possibilitou revelar prevalência de diagnóstico médico de DA oscilando entre 10% (Curitiba) e 14% (São Paulo). Entretanto, ao empregar-se o critério que combina

respostas afirmativas às questões “manchas com coceira na pele que apareceram e desapareceram nos últimos doze meses” e “manchas com localização característica” (critério combinado) a prevalência foi de 3,7% (CAMELO-NUNES et al., 2004).

Embora a patogênese da DA não esteja claramente definida, as principais causas abordadas na literatura englobam fatores genéticos, ambientais, distúrbios na barreira da pele e reações imunológicas (Figura 1) (CHOI et al., 2013; WU et al., 2014). Indivíduos sem o defeito de barreira de pele tem uma integridade total da epiderme, marcada por uma perda transepidermal mínima de água e adequada proteção contra microrganismos e alérgenos ambientais. Influências ambientais na integridade da barreira de pele, tais como uso frequente de detergentes e dureza da água, estão associados com o risco de DA, provavelmente devido à redução no fator de hidratação, aumento do pH da pele, e aumento da atividade da protease (FLOHR; MANN, 2014). Todavia, uma série de argumentos suportam a hipótese de que a origem primária dessa doença seja imunológica (EYERICH; NOVAK, 2013).

Figura 1: Interação entre meio ambiente, pele, fatores genéticos e fatores imunológicos relacionados à DA



Fonte: FLOHR; MANN, 2014.

2.1 Alterações imunológicas

A DA é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela infiltração e acúmulo de eosinófilos, linfócitos T e mastócitos, e a severidade da doença é marcada pelo influxo adicional de neutrófilos (SOUWER et al., 2010).

Classicamente, é caracterizada por um desequilíbrio entre as populações de linfócitos T *helper* do tipo 1 (Th1) e T *helper* do tipo 2 (Th2), desencadeada por antígenos ambientais, que em condições normais seriam incapazes de desencadear um processo imune (SOUWER et al., 2010). Porém alguns estudos mostram também a presença de linfócitos T *helper* do tipo 17 (Th17) e linfócitos T *helper* do tipo 22 (Th22) desempenhando um papel importante na manutenção da inflamação na DA. Todas essas populações de linfócitos T são provenientes de células T virgens (Th0), por meio de estímulos como as citocinas e fatores de transcrição (TODA et al., 2003; BONIFACE et al., 2005; NOGRALES et al., 2008; SIMON et al., 2014).

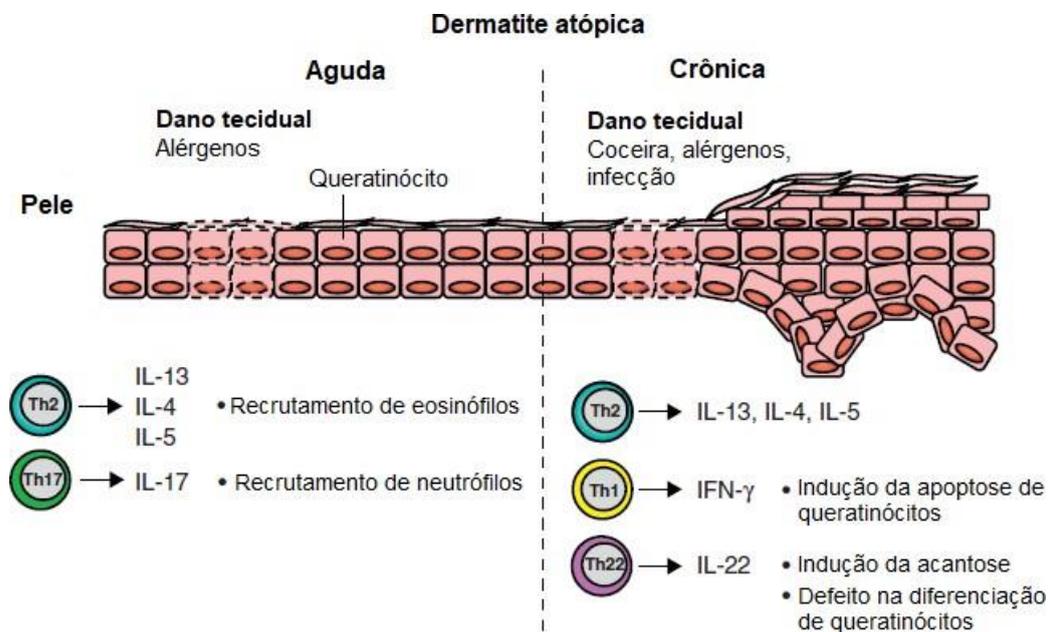
A interleucina 12 (IL-12) secretada por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos B, juntamente com o fator de transcrição T-bet e STAT-4 induz a diferenciação de Th0 para Th1, o qual produz citocinas como o interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são responsáveis por ativar macrófagos e induzir a apoptose de células teciduais. Já a indução de células Th2 ocorre quando a interleucina 4 (IL-4) interage com seu receptor, ativando o fator de transcrição STAT-6, que junto com o fator de transcrição GATA-3, estimulam a produção de citocinas de perfil Th2, como a IL-4, IL-5 e IL-13, responsáveis pela elevação dos níveis de IgE e infiltração de eosinófilos. Os mastócitos, por apresentarem receptor de alta afinidade para IgE em sua superfície, são ativados por ela e sofrem degranulação, liberando fator de agregação plaquetária (PFA), histaminas, prostaglandinas E2 e leucotrienos, os quais contribuem para intensificar o processo alérgico. Linfócitos Th2 também produzem IL-10, que é inibidora da ativação de macrófagos, inibindo, portanto, a ação de citocinas secretadas por Th1 (MOSMANN; COFFMAN, 1989; KORN et al., 2009).

Citocinas de padrão Th17 são sintetizadas após ativação dessa linhagem de linfócitos pelas citocinas IL-6, *transforming growth factor beta* (TGF- β), IL-21 e IL-23, juntamente com o fator de transcrição ROR- γ t. As citocinas produzidas por Th17, como a IL-17, são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos; por isso esse padrão de linfócitos T sustenta a inflamação, já que o influxo de neutrófilos coincide com a severidade da doença. A IL-17 também é importante na defesa contra patógenos extracelulares, e como está ausente na fase crônica, ocorre frequente colonização e infecção por *Staphylococcus aureus* nos pacientes com DA nessa

fase da doença. Além disso, Th17 também secreta IL-22, que possui efeitos pró e anti-inflamatórios, participando da indução de agentes antimicrobianos, indução da acantose e defeito na diferenciação de queratinócitos. Seus efeitos pró-inflamatórios são em menor grau quando comparados aos efeitos da IL-17, pois IL-22 não atrai células imunes. Linfócitos Th22, encontrados em fase crônica da DA, também secretam IL-22 (MANGAN et al., 2006; VELDHOFEN et al., 2006; KORN et al., 2009).

Os primeiros estudos reconheciam linfócitos Th2 presentes somente em fase aguda da doença (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Hoje, sabe-se que há citocinas de perfil Th2 presentes em fase crônica da DA, como mostra a Figura 2, justificada pela presença de quimiocina CCL27, sintetizada por Th2, que possui um ligante na quimiocina CCR10, sintetizada por Th22. Assim, se CCL27 está presente em lesões de pele de pacientes com DA, e se células Th22 particularmente expressam CCR10, isso pode explicar a presença de Th2 e Th22 na fase crônica da doença (HOMEY et al., 2002).

Figura 2: Mecanismos imunológicos envolvidos na DA

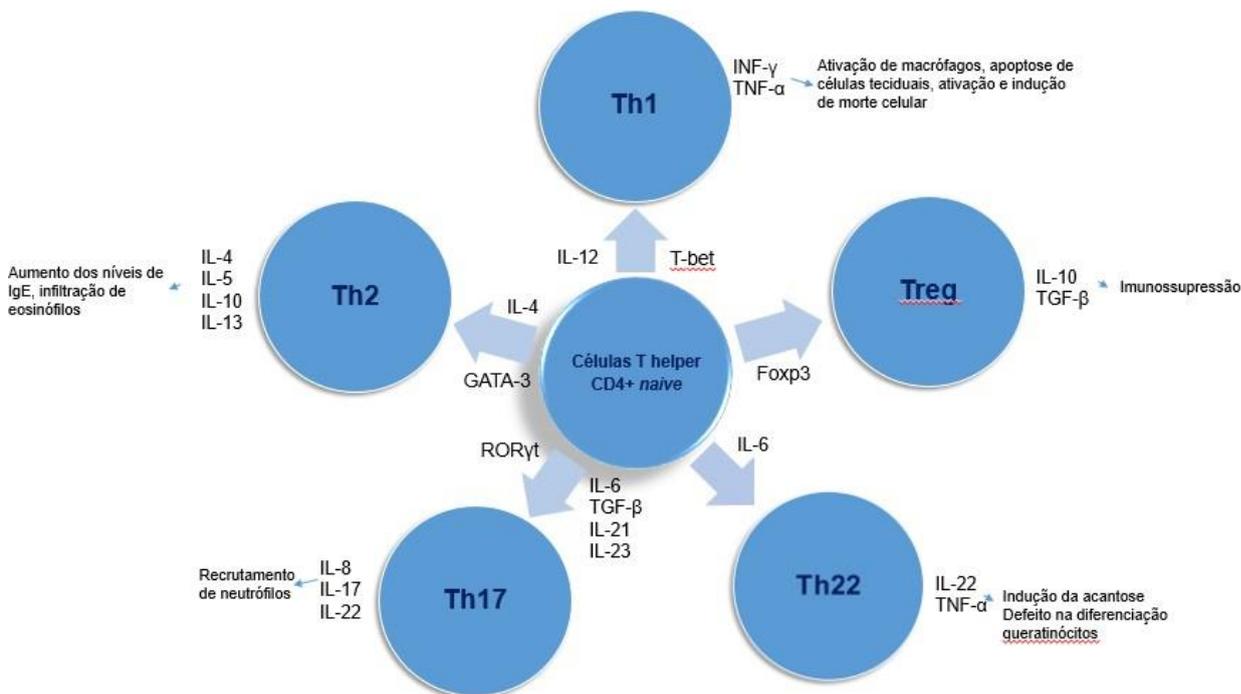


Fonte: SOUWER et al., 2010.

Em meio aos subtipos de linfócitos T diferenciados a partir de células Th0, encontram-se também os linfócitos T regulatórios (Treg), que são subpopulações de

linfócitos que se apresentam na tentativa de controlar a expressão dos outros subtipos de linfócitos T, por meio da secreção de citocinas IL-10 e TGF- β , responsáveis, respectivamente, pela supressão de Th1 e supressão de Th1, Th2 e Th17. Observa-se, então, que linfócitos Th17 e Treg são células interconectadas, pois, na presença de TGF- β , os linfócitos T virgens podem ser direcionados a expressarem um fator de transcrição, o Foxp3, e se tornarem uma célula Treg. O que leva as células T virgens a diferenciarem em Th17 ou Treg, é a presença e combinação das citocinas estimulatórias (KORN et al., 2009). Na presença de TGF- β , juntamente com IL-6 e IL-21, leva à diferenciação de Th0 à Th17 (BETELLI et al., 2006; KORN et al., 2009), ao passo que altas concentrações de TGF- β , e ausência de IL-6 e IL-21, induz a diferenciação de Th0 em Treg, por induzir o fator de transcrição Foxp3, específico de Treg (KRETSCHMER et al., 2005). A Figura 3 ilustra os subtipos de linfócitos T diferenciados de Th0 na DA, bem como os fatores de transcrição e citocinas que induzem as diferenciações, e as citocinas secretadas por cada subpopulação linfocitária.

Figura 3: Subpopulações de linfócitos na resposta adaptativa, com suas respectivas citocinas produzidas e funções desempenhadas por elas, e fatores de transcrição que as induzem, juntamente com interleucinas



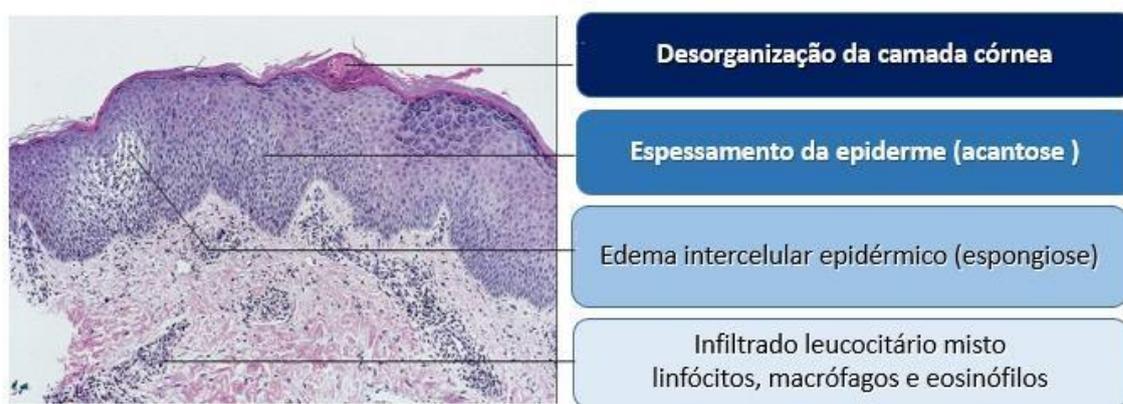
Fonte: Adaptado de: MOSMANN; COFFMAN, 1989; BETTELLI et al., 2006.

Em pacientes com DA, os linfócitos Treg encontram-se comprometidos ou alterados. Três hipóteses apontadas na literatura justificam tal comprometimento. A primeira é a teoria da higiene, em que a não exposição da criança nos primeiros anos de vida à microrganismos, leva a um defeito na produção de Treg, e, conseqüentemente, à não regulação de Th2, aumentando a susceptibilidade à doenças alérgicas. A segunda é a mutação, rara, no gene que codifica o fator de transcrição Foxp3, específico de Treg. E por fim, uma menor eficácia na inibição de células Th2 pelas Treg, pelo fato de alguns indivíduos atópicos mostrarem respostas vigorosas de Th2 ao alérgeno (HAWRYLOWICZ; O'GARRA, 2005).

2.2 Características histopatológicas da dermatite atópica

Pacientes com DA apresentam alterações histopatológicas como hiperplasia epitelial, edema intercelular (espongiose), perda de coesão intercelular (acantólise) e, conseqüentemente, espessamento da epiderme (acantose), degeneração hidrópica, presença de crosta, erosão, hiperqueratose, infiltrado linfocitário na derme e linfócitos intraepiteliais (AKDIS et al., 2006; BIEBER, 2008) (Figura 4).

Figura 4: Pele demonstrando algumas características de DA



Fonte: ELSEVIER SAÚDE, 2019.

2.3 Alterações na função de barreira epidérmica

A barreira epidérmica é a primeira linha de defesa contra microrganismos e alérgenos, sendo integrante essencial da imunidade inata (GUTOWSKA-OWSIK; OGG, 2013).

Os queratinócitos, células presentes na epiderme, formam uma estrutura multicamadas altamente especializada para fornecer forte suporte mecânico, assim como a proteção contra a evaporação e penetração de antígenos. A formação de tal sistema se baseia no crescimento e diferenciação dessas células, as quais, fisiologicamente, se encaminham em direção às camadas superiores da epiderme, iniciando na camada basal, seguindo para a espinhosa, granular e, finalmente, para a última, o estrato córneo, onde os queratinócitos sofrem apoptose, liberando queratina na superfície da pele. Este processo de queratinização forma o revestimento córneo, formado por queratinócitos fragmentados e por remanescentes de outras estruturas celulares as quais fornecem membranas lipídicas (lamelas) (GUTOWSKA-OWSIK; OGG, 2013).

Outros componentes, tais como as junções e moléculas de aderência que realizam a ligação entre as células das diferentes camadas, também são fundamentais para a organização da epiderme (GUTOWSKA-OWSIK; OGG, 2013). O desenvolvimento de uma epiderme saudável se baseia, entre outros fatores, no equilíbrio entre a proliferação e a maturação dos queratinócitos (NAKAHIGASHI et al., 2011).

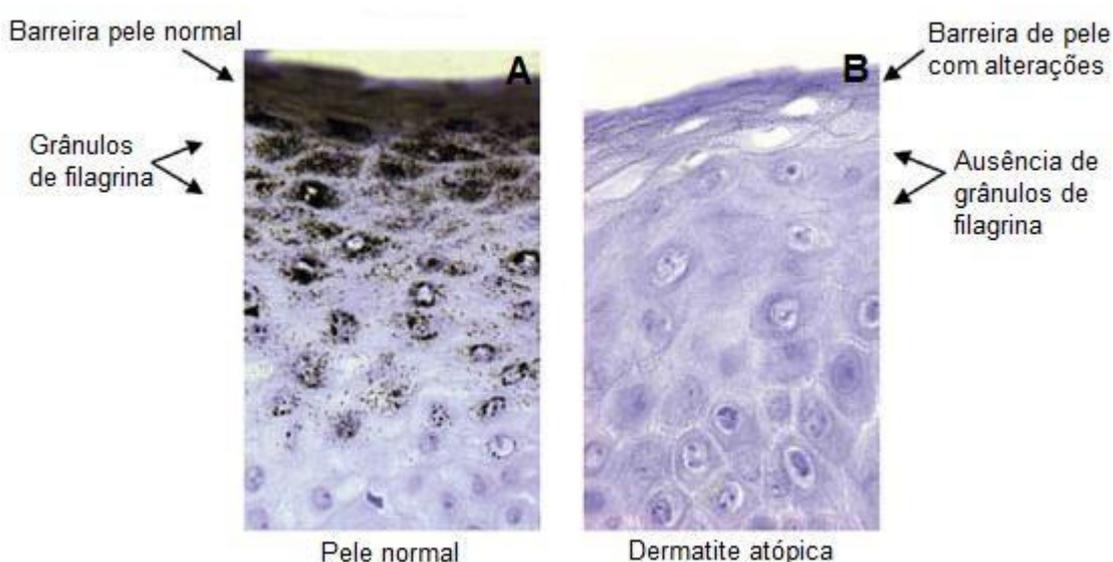
Diversos genes relacionados com anormalidades estruturais na epiderme têm sido estudados na patogênese da DA. Dentre eles, o gene que codifica a proteína filagrina (FLG) é o mais comumente associado a ela. Ele produz, inicialmente, a proteína profilagrina que é processada no estrato granuloso em proteína FLG. Esta contribui para a função de barreira do estrato córneo da pele, bem como para a integridade da epiderme, constituindo um importante marcador na diferenciação de queratinócitos. Uma barreira da pele intacta protege a pele contra a penetração ambiental de substâncias irritantes, alérgenos e contra a perda trans-epidérmica de água (PTEA) (CHO; CHO, 2013).

A PTEA está relacionada ao dano na barreira lipídica do estrato córneo e a consecutiva diminuição da adesão dos corneócitos. Essas alterações atuam como biomarcadores da severidade e intensidade da DA o que reflete em uma aparência clínica de pele seca e escamosa (CHO; CHO, 2013; GUTOWSKA-OWSIK; OGG, 2013).

Os peptídeos derivados da FLG agregam o citoesqueleto de queratina, causam a conversão de células granulares em células achatadas escamosas e anucleadas, ou seja, contribuem para a formação dos corneócitos. No estrato córneo, caspase 14 e calpaína 1 degradam unidades desses peptídeos em aminoácidos hidrofílicos livres, os quais formam o Fator de Hidratação Natural (FHN). O FHN é crucial para a manutenção da hidratação e dos níveis de pH da epiderme superior e, especialmente, o ácido urocânico, para a proteção da pele contra a luz ultravioleta (KYPRIOTOU et al., 2013).

Mutações na FLG e consequente perda de função têm sido associadas com o risco de desenvolvimento de DA (MARGOLIS et al., 2014; MU et al., 2014). A figura 5 mostra uma pele normal, com a presença da proteína, e outra pele com dermatite atópica, sem a proteína.

Figura 5: A) Pele normal com a presença de grânulos de filagrina, marcados por imuno-histoquímica, destacados na cor preta. B) Pele com dermatite atópica, sem grânulos de filagrina



Fonte: McLean, 2010.

Essas mutações têm sido relatadas em 8 a 48% dos pacientes com DA, o que enfatiza a importância dessa proteína na manutenção da integridade da epiderme (WEIDINGER et al., 2007). A deficiência da FLG tem sido associada ao aumento dos níveis de RNAm para IL-17 em lesões de pele após aplicação epicutânea de ovalbumina (OVA) (OYOSHI et al., 2009). Além da IL-17, a IL-22 também se mostrou regular negativamente a expressão de genes, *in vitro*, envolvidos na formação de monômeros de FLG, o que poderia afetar a geração do FHN (GUTOWSKA-OWSIK; OGG, 2013; MU et al., 2014).

No entanto, como existe um grande número de pacientes com DA que não apresentam esta predisposição geneticamente determinada (mutação do gene de FLG) para uma permeabilidade epidérmica disfuncional, mas ainda demonstram a diminuição da expressão de FLG, faz-se admitir que fatores adquiridos também possam desempenhar um papel na doença, o que reforça o papel do processo imune. Citocinas presentes na pele durante a inflamação alérgica, como IL-4 e IL-13 se mostraram agentes perturbadores da manutenção da integridade da barreira epidérmica (HOWELL et al., 2007; SOUWER et al., 2010; GUTOWSKA-OWSIK; OGG, 2013; MARGOLIS et al., 2014; MU et al., 2014).

O conteúdo lipídico do estrato córneo também é essencial para a integridade da epiderme. Desequilíbrios desse conteúdo são observados na DA, principalmente na fração de ceramidas. Há indício de que esse fenômeno ocorra devido a um aumento da atividade da enzima glucosil ceramida esfingomielina desacetilase (SM-GCer), resultando numa supressão de vias metabólicas que conduzem à produção de ceramidas na pele (GUTOWSKA-OWSIK; OGG, 2013).

As ceramidas, com longas cadeias de ácidos graxos, na camada mais externa do estrato córneo humano, são responsáveis pela manutenção de um ambiente hidrófobo e desempenham um papel importante no desenvolvimento e manutenção de uma barreira de permeabilidade à água (TAWADA et al., 2014; UCHIDA, 2014).

Para Park et al. (2010), a IL-4 inibe a síntese de ceramidas e essa afirmação parte de estudos que realizaram aplicação exógena dessa citocina, em que esta impediu a recuperação da barreira permeável após perturbações agudas. De acordo com Tawada et al. (2014), na DA é abundante a presença de IFN- γ e, ao testar a influência de diferentes citocinas (IL-1, IL-4, IL-5, IL-8, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α ,

GM-CSF), somente o IFN- γ foi capaz de diminuir a expressão de enzimas envolvidas na formação da cadeia de ácido graxo das ceramidas. Para estes autores, a quantidade e o perfil da porção de ácido graxo das ceramidas desempenham função crítica no estrato córneo.

Além dos queratinócitos, das filagrinas e de lipídeos presentes na pele, os peptídeos antimicrobianos, como as catelicidinas e as defensinas, participam da integridade da barreira epidérmica e contribuem para uma permeabilidade adequada. Disfunções desses componentes levam a deficiências hereditárias, traumas, comprometimento do sistema imune, alterações de pH e surgimento de infecções, devido à perda de função de barreira epidérmica. A entrada de antígenos na epiderme promove a ativação de células imunes, levando ao aumento da secreção de mediadores inflamatórios, o que pode induzir o desenvolvimento da DA ou outras desordens imunes como alergias alimentares, rinite alérgica e asma (HAMMAD; LAMBRECHT, 2008; MCGRATH; UITTO, 2008).

Um dos grandes problemas desencadeados pela DA é o estabelecimento de infecções cutâneas, tanto localizadas quanto disseminadas. Noventa por cento dos pacientes são colonizados e/ou infectados por *S. aureus*, sendo que diferentes fatores são indicados como possíveis contribuintes para esse grande número. Dentre eles, as citocinas de padrão Th2, como IL-4 e IL-13, apresentam um efeito permissivo sobre a invasão microbiana na barreira epidérmica por diminuir a produção de catelicidina e *trans*-defensina, entre outros peptídeos antimicrobianos. Essas mesmas citocinas também estão sendo relacionadas com o aumento da toxina estafilocócica, a qual induz a morte dos queratinócitos através da via de sinalização *Signal Transducer and Activation of Transcription* (STAT 6) (PARK et al., 2010; CZARNOWICKI et al., 2014).

Para Park et al. (2010), citocina de perfil Th2, como a IL-10, inibe a produção de citocinas de padrão Th1, como IFN- γ e IL-18, as quais por sua vez são mediadores que beneficiam a expressão de peptídeos antimicrobianos. Ou seja, as citocinas Th2 agem tanto diretamente sobre a expressão dos peptídeos antimicrobianos quanto indiretamente através da supressão da via Th1.

Todas essas alterações na integridade da barreira epidérmica contribuem para a penetração de alérgenos e microrganismos na pele.

2.4 Impactos na qualidade de vida

Um dos maiores impactos da DA sobre a qualidade de vida é a perda do sono, devido ao prurido e associações com outras doenças alérgicas, a qual afeta a família como um todo. Depressão, ansiedade, diminuição da qualidade de vida e aspectos relacionados à morbidade, podem ser comparáveis aos ocasionados por outras doenças não transmissíveis como, por exemplo, diabetes e asma (BARBEAU; LALONDE, 2006; WILLIAMS, 2013).

Em estudo realizado por Yano et al. (2013), com adultos, no Japão, foram avaliados os efeitos da DA no comprometimento da produtividade total no trabalho levando em consideração a abstenção (porcentagem de horas perdidas) e a presença (porcentagem de comprometimento durante o período do trabalho) e o comprometimento total de atividade, que representa prejuízo nas atividades diárias de pessoas não empregadas. Os autores observaram impactos negativos tanto na produtividade do trabalho quanto na atividade, e estes tendem a ser maiores dos que os observados em pacientes com psoríase e que podem se aprofundar ainda mais em pacientes com DA severa.

2.5 Tratamento da dermatite atópica

As terapias atualmente padronizadas para o tratamento da DA não levam à cura sendo utilizadas com objetivo de reduzir o quadro inflamatório e aliviar os sinais e sintomas. Por se tratar de uma doença crônica, os tratamentos precisam ser seguros e bem tolerados. A terapia básica da DA inclui o uso de emolientes e hidratação constante da pele. Uso tópico de corticosteroides e inibidores de calcineurina (tacrolimus e pimecrolimus) foram as primeiras linhas terapêuticas descritas para o tratamento da DA em fase aguda, com efeitos imunomodulatórios (HANIFIN et al., 2001; DARSOW et al., 2005; LUGER et al., 2015).

Os primeiros corticosteroides tópicos foram descritos na década de 50 e, desde então são amplamente utilizados no tratamento da DA. São agentes

anti-inflamatórios, pois atuam nas células dendríticas, monócitos, macrófagos e linfócitos T e impedem a síntese de interleucinas (TANG et al., 2014; CARVALHO et al., 2017). Os corticosteroides controlam os principais sintomas da DA, como o prurido e as lesões eczematosas, mas podem apresentar efeitos colaterais, especialmente locais e sistêmicos, incluindo afinamento da pele, acne, estrias, infecções secundárias e sensação de queimação quando utilizados na região da face (ASCHOFF et al., 2011; JENSEN et al., 2012). Seu uso deve ser a longo prazo em pele previamente afetada para redução do risco de recaídas subsequentes (GLAZENBURG et al., 2009; TANG et al., 2014). Apesar desta classe medicamentosa ser eficaz no tratamento da DA, os potenciais efeitos colaterais têm levado a uma rejeição ao uso dos corticosteroides e reduzida aderência ao medicamento (AUBERT-WASTIAUX et al., 2011). Foi observado, por meio de questionários aplicados, que 80,7% dos pais ou pacientes apresentam medo do uso, e que 36% não aderiam ao tratamento em decorrência disto (AUBERT-WASTIAUX et al., 2011; EICHENFIELD et al., 2014).

Os inibidores da calcineurina, por sua vez, utilizados a partir do ano de 2000, são utilizados nos surtos para o controle da inflamação na DA, porém não são a primeira escolha. A calcineurina é uma proteína citoplasmática presente em diversas células, incluindo linfócitos e células dendríticas e, após sua ativação, atua como um fator de transcrição de interleucinas inflamatórias, tais como IL-2, IL-3, IL-4 e TNF- α . Inibir a calcineurina significa minimizar a ação do linfócito e este processo deve ser feito de maneira controlada para garantir a melhora das crises de DA, sem comprometer a função imunológica do organismo (EICHENFIELD et al., 2014; SIGURGEIRSSON et al., 2015; SIEGFRIED et al., 2016). Encontram-se disponíveis, para uso tópico, dois inibidores de calcineurina, o pimecrolimus e o tacrolimus. No Brasil, o pimecrolimus pode ser indicado a partir dos três meses de idade e com única apresentação, em creme, na concentração de 1%. O tacrolimus é indicado a partir dos dois anos de idade, com apresentações em pomada contendo 0,03% (uso pediátrico em face de adultos), e 0,1% (uso em maiores de 16 anos, corpo) da droga. Como não apresentam os mesmos efeitos colaterais que a corticoterapia tópica, podem ser utilizados com maior segurança na face, nos genitais e nas áreas próximas a mucosas (CARVALHO et al., 2017). A terapia também deve ser feita a longo prazo para evitar o risco de recaídas subsequentes (TANG et al., 2014).

Desde 2006, o *Food and Drug Administration* (FDA) exige que estas medicações apresentem um aviso na caixa sobre risco teórico de malignidades (incluindo linfomas e câncer de pele não-melanoma), porém esta associação não foi observada em revisões e metanálises realizadas desde então (SIEGFRIED et al., 2016). Nos Estados Unidos, estas drogas são indicadas nos pacientes que apresentam contra-indicações ou efeitos colaterais com o uso de corticosteroides tópicos (EICHENFIELD et al., 2014; SIGURGEIRSSON et al., 2015; SIEGFRIED et al., 2016).

Em casos mais graves em que a doença não consegue ser controlada por tratamento tópico, faz-se necessário o uso de terapia sistêmica, com administração de corticosteroides e imunossuppressores, como a ciclosporina (AYLETT et al., 1992; BERTH-JONES et al., 1996; ZAKI et al., 1996). A ciclosporina é um polipeptídeo cíclico lipofílico que inibe as vias dependentes da calcineurina, resultando em níveis reduzidos de várias citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-2 e IFN- γ , e promove a inibição da ativação de células T (ROEKEVISCH, 2014; SIMON; BIEBER, 2014). Estudo de revisão sistemática recomendou a ciclosporina como tratamento para DA moderada a grave, em que a terapêutica convencional foi ineficaz ou inapropriada (ROEKEVISCH et al., 2014). Porém, deve ser realizado monitoramento da função renal e da pressão arterial e considerar que, em crianças, as vacinas podem não ser eficazes durante o seu uso, decorrente da imunossupressão (AKDIS et al., 2006).

Em 2017, foi aprovado pelo FDA o emprego do anticorpo Dupilumab, antagonista do receptor IL-4 e IL-13, para o tratamento de DA e asma, apresentando resultados extremamente satisfatórios. Entretanto, para as formas leve e moderada da DA, são escassas as opções, contando apenas com o uso de imunomoduladores tópicos, como o tacrolimus e pimecrolimus, e corticoides (JOHNSON et al., 2019).

Como as opções terapêuticas são limitadas, especialmente nos casos de DA crônica, apesar do aumento da prevalência dessa condição, e a pouca melhora observada nos pacientes que fazem uso de medicamentos convencionais para DA, foram os fatores mais decisivos para a busca por tratamentos alternativos.

2.6 Busca por produtos naturais

Newman e Cragg (2012) defenderam fortemente a expansão da exploração da natureza como fonte de novos agentes ativos que possam servir como um guia ou suporte para elaboração, extremamente necessária, de medicamentos eficazes para uma grande variedade de doenças. O conhecimento popular, principalmente relacionado à biodiversidade da Amazônia, tem sido utilizado como uma importante ferramenta no desenvolvimento de produtos farmacêuticos (LIMA et al., 2011).

Entre tais produtos, o óleo-resina (OR) da copaíba constitui uma das mais importantes fontes renováveis de medicamento natural para as populações da região amazônica. Nos Estados Unidos se tornou uma droga oficial na U.S.P. de 1820 a 1910 e, em 1940, foi admitido no *National Formulary*. Em 1972, o OR foi aprovado como suplemento alimentar pelo FDA, após avaliação de sua segurança e, mais recentemente, foi também aprovado na Itália pelo Ministério da Saúde Italiano (GELMINI et al., 2013).

2.7 Oléo-resina de copaíba e o *trans*-cariofileno

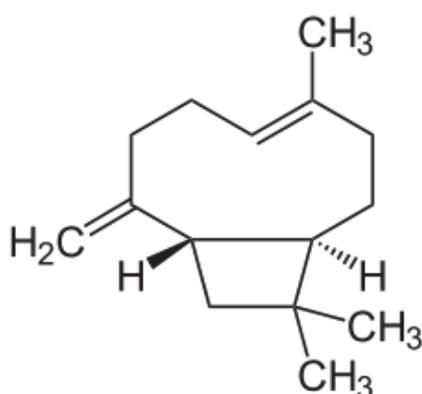
As copaíbas (*Copaifera* sp., Fabaceae) são árvores nativas da América do Sul. No Brasil, a copaíba é uma árvore nativa e está localizada na região sudeste, centro-oeste e, principalmente, região amazônica. O OR extraído do caule dessas árvores é amplamente utilizado na medicina popular por habitantes da Amazônia devido à suas ações antissépticas do aparelho urinário, cicatrizante, antiinflamatória, antitumoral (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012), antipsoríase (LEANDRO et al., 2012; GELMINI et al., 2013) e antimicrobiana (LORENZI; MATOS, 2008). Dentre estas, a atividade antiinflamatória é, sem dúvida, a mais difundida na medicina popular (VEIGA JUNIOR et al., 2007; YAMAGUCHI; GARCIA, 2012).

Os OR são compostos por uma grande quantidade de hidrocarbonetos sesquiterpenos que constituem, aproximadamente, 90% do total do OR, seguidos dos diterpenos que estão presentes em menor concentração. O *trans*-cariofileno é o

constituente majoritário dentre os sesquiterpenos (SACHETTI et al., 2011; SOUSA et al., 2011; DIAS et al., 2012). Entretanto, a composição do OR pode sofrer variações decorrentes, principalmente, das espécies de árvores, da época da coleta e também das características geográficas e climáticas em que estas se encontram (SACHETTI et al., 2011).

O *trans*-cariofileno (Figura 6) é um sesquiterpeno bicíclico, constituinte comum de muitos óleos essenciais e de plantas alimentícias. Várias atividades biológicas tais como antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante, anticarcinogênica, antiespasmódica, antiviral, propriedade anestésica local e habilidade de penetração na pele são a ele atribuídas (CHO et al., 2007; HORVÁTH et al., 2012; PANT et al., 2014). De acordo com Fernandes et al. (2007), o *trans*-cariofileno apresentou marcante atividade antiinflamatória quando administrado oralmente na dose de 50 mg/kg, levando à redução do edema de pata traseira, induzido por injeção de salina (0,9%) e carragenina (300µg/pata) comparando com a pata que só recebeu injeção de 100 µL de salina. Essa substância também foi capaz de inibir a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e o óxido nítrico sintase (NOS), importantes enzimas envolvidas nos processos inflamatórios, e o TNF-α, citocina envolvida em processos pró-inflamatórios, sintetizada por macrófagos e linfócitos T.

Figura 6: Estrutura química do *trans*-cariofileno



Fonte: NIST, 2018.

Estudos *in vitro* sugerem que o *trans*-cariofileno seja um canabinoide com pronunciado efeito antiinflamatório exercido através da inibição seletiva de

receptores canabinoides do tipo 2, os quais acarretam a subsequente inibição das vias pró-inflamatórias, o que normalmente levam a produção de IL-1, IL-6, IL-8, e TNF- α (GERTSCH et al., 2008; GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012). Carvalho et al. (2005) avaliaram o uso do óleo de copaíba em diferentes doenças induzidas em camundongos, dentre estas, a dermatite. O modelo de dermatite produzido nos animais foi o induzido por óleo de cróton, o qual gera um processo inflamatório agudo com a presença de mediadores da COX. O tratamento tópico com o OR da copaíba (517 mg/kg, 1035 mg/kg e 1802 mg/kg) produziu 52%, 58% e 62% de inibição do processo inflamatório, respectivamente. Os autores atribuíram os resultados à presença de terpenos, tais como o *trans*-cariofileno. Veiga Junior et al. (2007), ao estudarem diferentes espécies de copaíbas, concluíram que a espécie que obteve a maior atividade antiinflamatória, foi aquela que continha o mais alto teor de *trans*-cariofileno, 57,5%.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram o efeito imunomodulatório do óleo de copaíba e do *trans*-cariofileno. Dias et al., 2014, demonstraram os efeitos imunomodulatórios do óleo de copaíba na produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), TNF- α , IFN- γ e IL-17 em culturas de células de camundongos C57Bl/6 com encefalomielite autoimune experimental. Níveis de NO, H₂O₂, TNF- α , IFN- γ e IL-17 foram significativamente reduzidos após tratamento com óleo de copaíba, o que sugere que o óleo age nos mecanismos de desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental pela inibição de IFN- γ , TNF- α e IL-17, modulando a resposta imune em ambas as células Th1 e Th17 (DIAS et al., 2014). Fontes et al. (2017), observaram redução dos níveis de NO, H₂O₂, IFN- γ , TNF- α e IL-17, em camundongos C57Bl/6 com encefalomielite autoimune experimental, após tratamento com *trans*-cariofileno.

Um compilado de trabalhos, na literatura, que demonstraram a atividade antiinflamatória do OR extraído de diferentes espécies de copaíba e do *trans*-cariofileno, pode ser visualizado no Quadro 1.

Quadro 1: Compilado de trabalhos que demonstram atividade antiinflamatória de espécies de copaíbas e do *trans*-cariofileno

AUTOR	MEDIADOR QUÍMICO OU CÉLULAS INIBIDOS	MODELO UTILIZADO	ESPÉCIE DE COPAÍBA/ <i>TRANS</i> -CARIOFILENO
GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012	Redução da necrose tecidual, macrófagos e neutrófilos	Lesão induzida por neurotoxin N-Methyl-D-Aspartate, no cérebro e na medula espinhal	Copaifera reticulata Ducke
MEDEIROS et al., 2007	Migração de neutrófilos para a região inflamada e ativação da NF-κB	Edema de pata induzido por lipopolissacarídeo (LPS)	<i>trans</i> -cariofileno
VEIGA JUNIOR et al., 2007	Produção de óxido nítrico (NO)	Inflamação da cavidade pleural induzida por zymosan	Copaifera reticulata Ducke (↓85% NO)
	Número total de leucócitos	Inflamação da cavidade pleural induzida por zymosan	- Copaifera cearenses Huber ex Ducke - Copaifera multijuga Hayne
	Número de neutrófilos	Inflamação da cavidade pleural induzida por zymosan	- Copaifera cearenses Huber ex Ducke - Copaifera multijuga Hayne - Copaifera reticulata Ducke
CHO et al., 2007	Infiltrado inflamatório e IL-6	Colite induzida por sulfato de dextram	<i>trans</i> -cariofileno
BAYLAC, RACINE, 2003	5-lipoxigenase	In vitro	Copaifera officinalis
DIAS et al., 2014	NO, H ₂ O ₂ , INF-γ, TNF-α e IL-17	Encefalomielite autoimune experimental	Óleo de copaíba
FONTES et al., 2017	NO, H ₂ O ₂ , INF-γ, TNF-α e IL-17	Encefalomielite autoimune experimental	<i>trans</i> -cariofileno

Considerando promissores os resultados alcançados em diferentes modelos experimentais, nos quais o OR de copaíba/*trans*-cariofileno demonstraram atividade antiinflamatória, destacamos ser relevante estudar os possíveis efeitos dessas substâncias sobre o processo inflamatório na dermatite atópica.

3. HIPÓTESE

A atividade antiinflamatória do *trans*-cariofileno e do óleo de copaíba levam à melhora das lesões dermatológicas na DA via diminuição da expressão de T-bet, GATA-3, IL-17, e peroxidase eosinofílica modulando, *in situ*, os perfis Th que participam da história natural da doença.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico do óleo de copaíba e do *trans*-cariofileno em lesões de pele com dermatite atópica experimental em camundongos BALB/c.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar, histopatologicamente, a ação antiinflamatória do óleo de copaíba e do *trans*-cariofileno, aplicados topicamente nas lesões de pele de dermatite atópica experimental;

Avaliar e quantificar os perfis Th1, Th2, Th17 e Treg pela expressão de Tbet, GATA-3, IL-17 e Foxp3, *in situ*, em amostras de lesões de pele, provenientes do modelo proposto, por meio de muno-histoquímica.

Avaliar a atividade de eosinófilos, pela expressão de peroxidase eosinofílica, em amostras de lesões de pele também por meio de imuno-histoquímica.

Comparação do efeito antiinflamatório do óleo de copaíba e *trans*-cariofileno com os grupos tratados com dexametasona e tacrolimus.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), no Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UFJF, pelo parecer número 016/2014.

5.1 Animais do experimento

Foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas (N = 32), oito semanas de vida, com peso entre 18 – 22 g. Durante a confecção das lâminas, duas lâminas, de dois animais, foram perdidas devido ao preparo incorreto de confecção. A escolha dessa linhagem se baseou na literatura a qual descreve que camundongos Balb/c sensibilizados pela ovalbumina, desenvolvem comportamento prurítico e lesões na pele, caracterizadas pelo espessamento epidérmico e dérmico, infiltração de células T CD4+, eosinófilos e regulação positiva das citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Perfil este, bastante similar ao processo de dermatite atópica no período de fase aguda (JIN et al., 2009).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (47x34x18 cm), em um número de um por gaiola. As gaiolas permaneceram em estantes climatizadas, com exaustão de ar, umidade, ventilação e temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas; ração (industrial) e água (filtrada) *ad libitum*; ciclo claro/escuro de 12 horas (claro de 06:00 às 18:00 h). Os protocolos e procedimentos utilizados foram realizados por pessoal treinado e de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

5.2 Indução da dermatite atópica e divisão de grupos para tratamento

A dermatite foi induzida pela aplicação tópica no dorso tricotomizado, por sete dias consecutivos, de solução de 100µL de DNCB (2,4,dinitroclorobenzeno a 1% em acetona : azeite de oliva, 3:1) e 100µL OVA (ovalbumina).

Os tratamentos foram iniciados no oitavo dia, logo após o período de indução da dermatite, com aplicação tópica das substâncias uma vez por dia, durante sete dias consecutivos. A divisão dos grupos e os tratamentos estão especificados no Quadro 2. Observa-se que no grupo V há quatro animais devido à perda de duas lâminas durante a confecção incorreta das lâminas.

Quadro 2. Divisão dos grupos analisados e tratamentos específicos

Grupo 0 <ul style="list-style-type: none">• (n=2)• Grupo controle (sem indução da <u>DA</u>)
Grupo I <ul style="list-style-type: none">• (n=6)• Grupo inflamado (<u>LesAD</u>)
Grupo II <ul style="list-style-type: none">• (n=6)• Grupo tratado com <u>dexametasona</u> pomada 0,1%• 50 mg, cada, sobre a superfície inflamada, sendo aplicado 2,083 mg de princípio ativo por quilograma do animal por dia de tratamento.

<p>Grupo III</p> <ul style="list-style-type: none"> • (n=6) • Grupo tratado com <u>tacrolimus</u> pomada 0,1% • 50 mg, cada, sobre a superfície inflamada, sendo aplicado 2,083 mg de princípio ativo por quilograma do animal por dia de tratamento.
<p>Grupo IV</p> <ul style="list-style-type: none"> • (n=6) • Grupo tratado com óleo de copaíba 100 mg/kg/dia
<p>Grupo V</p> <ul style="list-style-type: none"> • (n=4) • Grupo tratado com <u>trans-cariofileno</u> 50 mg/kg/dia

Ainda, para determinar as dosagens do óleo de copaíba e *trans*-cariofileno foi realizado um estudo prévio, por membros do nosso grupo de pesquisa (FONTES et al., 2017), em que foram testadas duas concentrações para o óleo resina (50mg/Kg e 100mg/Kg) e duas concentrações para o seu constituinte, o *trans*-cariofileno, (25mg/Kg e 50mg/Kg). A partir dos resultados anti-inflamatórios obtidos para cada concentração foram definidos os grupos do estudo, acima citados, com as respectivas dosagens, de acordo com a concentração que apresentou melhores resultados.

No 15º dia após início do experimento, os animais foram eutanasiados utilizando cetamina e xilazina, com aprofundamento anestésico (90:10mg/Kg), aplicadas intraperitonealmente.

5.3 Obtenção das amostras de pele

A área da pele do dorso na qual foi induzida a dermatite foi removida excisionalmente, após a eutanásia, e as amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina para obtenção de lâminas histológicas para análise histopatológica e imuno-histoquímica.

5.3.1 Análise histopatológica

A coloração por hematoxilina e eosina (HE), foi realizada utilizando formalina neutra tamponada a 10%, soluções ácido-álcool a 1% (ácido clorídrico 1mL diluído em etanol a 70% - 99mL), água amoniacal (hidróxido de amônio 2mL diluído em 800mL de água destilada), carbonato de lítio saturado (1,54g diluído em 100mL de água destilada), eosina-floxina hematoxilina de Harris (5,0g diluída em 50mL de etanol a 100%), alúmen de potássio (100g diluído em 1000mL de água destilada) e óxido mercúrico 2,5g. Foi usado um recipiente de 2000mL para o alúmen e a água e um recipiente pequeno para o álcool e a hematoxilina. O alúmen foi dissolvido completamente na água destilada com auxílio de uma placa quente e um agitador magnético; enquanto a hematoxilina foi misturada vigorosamente no álcool à temperatura ambiente. O alúmen e a água destilada foram então removidos da fonte de calor e lentamente combinados à solução de hematoxilina e álcool. Em seguida, as duas soluções foram retornadas à fonte de calor até entrar em ebulição. O próximo passo foi novamente remover da fonte de calor e acrescentar lentamente o óxido de mercúrio. Após o acréscimo do óxido de mercúrio, a solução foi colocada novamente em fonte de calor até atingir a coloração púrpura escura e, em seguida, resfriada imergindo o recipiente em uma bacia com água fria. Na solução final foi acrescentado 20mL de ácido acético glacial para intensificar a coloração dos núcleos. Com a solução pronta, o próximo passo foi desparafinar os cortes e hidratar até a água destilada. Foi, então, realizada a coloração com hematoxilina de Harris durante 10 minutos (após ser filtrada) e, em seguida, lavada em água da torneira por 4 minutos, diferenciada em álcool ácido com um mergulho, lavada rapidamente com água da torneira, em seguida colocada em solução fraca de água amoniacal até os cortes ficarem azul brilhantes, lavada novamente em água da torneira por 10 minutos, colocada em álcool etílico a 80% por 1 minuto e contracorada em solução de eosina-floxina durante 2 minutos. No processo final, as lâminas foram desidratadas e clarificadas, por meio de duas passagens, de 2 minutos cada, em álcool etílico absoluto e em xilol e, em seguida, montadas em meio resinoso.

Toda a extensão do corte das lâminas coradas em HE foi analisada em aumento de 100X em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha), através do

programa Software ZEN Lite (*Blue Edition*, Instituto Nacional de Saúde (NIH), Bethesda, EUA), um sistema de captura, processamento e análises de imagens para microscopia digital e avaliadas, descritivamente, as características histopatológicas classicamente descritas nas lesões de pele da DA: hiperqueratose, crosta, erosão, hiperplasia epitelial, espongirose, acantose, acantólise, infiltrado celular na derme, infiltrado linfocítico intraepitelial (BIEBER, 2008; YOO et al., 2014; BERGOT et al., 2015). Todo o tecido, de cada lâmina, foi analisado, por dois examinadores, para avaliar as características histopatológicas presentes e áreas representativas de cada amostra foram digitalizadas em aumento de 100X e 400X demonstrando tais características.

5.3.2 Análise histoquímica

Foi realizada a coloração histoquímica com azul de toluidina para quantificação do número de mastócitos presentes na derme papilar e reticular. A distribuição de frequência do número de mastócitos por campo histológico foi quantificada em 15 campos aleatórios em todas as lâminas de cada grupo.

Para essa coloração foi utilizado 0,1g do azul de toluidina diluído em 100mL de água destilada. Inicialmente, a lâmina contendo o tecido epitelial foi desparafinada e, em seguida, hidratada com água destilada. Logo após, corada com azul de toluidina por 30 minutos, e enxaguada com água destilada após transcorrido o tempo citado. O corte foi coberto com lamínula sobre uma gota de água destilada e moldurado com cera aquecida.

Nas lâminas coradas com toluidina foi realizada a contagem de mastócitos, destacados por sua metacromasia. Foram analisadas as dermes papilar e reticular para contagem das células nos Grupos I, II, III, IV e V.

Os mastócitos foram quantificados em aumento de 400X, no mesmo microscópio e programa das lâminas avaliadas pela coloração por HE.

5.3.3 Análise imuno-histoquímica

Por imuno-histoquímica foram avaliados, *in situ*, nas amostras das lesões de pele de DA, a resposta imune de células Th1, Th2, Th17 e Treg por meio da expressão de T-bet, GATA-3, IL-17 e Foxp3, respectivamente, e a infiltração de IgE, pela expressão de peroxidase eosinofílica. Para avaliação de cada anticorpo, foram analisados oito campos, em dois animais de cada grupo, e quantificado o número de células marcadas positivamente com o anticorpo, pelo número de células totais (ELBENDARY et al., 2016). A porcentagem encontrada era representativa do anticorpo em cada grupo analisado. Para a realização da imuno-histoquímica as lâminas contendo a amostra tecidual foram, inicialmente, desparafinadas em estufa a 60°C durante 1 hora. Em seguida, desparafinadas em três banhos de xilol, 5 minutos cada, e hidratadas em álcool nas concentrações 100%, 90% e 70%, 3 minutos cada. O passo final da hidratação das lâminas foi um banho em água destilada por 2 minutos. Após desparafinadas e hidratadas foi realizado o bloqueio com o peróxido de hidrogênio a 30% em metanol (2,5mL de peróxido de hidrogênio diluído em 47,5mL de metanol), durante dois tempos de 30 minutos cada. Em seguida as lâminas foram colocadas em *phosphate buffered saline* (PBS) dentro do banho-maria a 92°C, por 40 minutos, para recuperação antigênica. Após transcorrido o tempo, resfriadas durante 20 minutos e os tecidos marcados ao redor com caneta hidrofóbica. Antes do bloqueio das proteínas, em que o tecido foi coberto com o reagente bloqueador por 15 minutos (utilizando o reagente *Background Sniper*), foi realizada uma lavagem das lâminas em PBS por 1 minuto. Em seguida o excesso do reagente foi retirado com papel toalha e aplicado o anticorpo primário sobre os tecidos durante 1 hora. O anticorpo aplicado foi diluído, previamente, em PBS (15,0μL de anticorpo diluído em 1485,0μL de PBS). Todos os anticorpos (anti-T-bet, anti-GATA-3, anti-IL-17, anti-TGF-β e anti-peroxidase eosinofílica), de concentração 200 μg/mL, foram importados da indústria Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA. Novo banho em PBS, por 2 minutos, foi realizado após o tempo marcado. O próximo passo foi a adição, no tecido, do anti-anticorpo (*Link Universal Trekkie*) por 20 minutos em câmara úmida e, após esse tempo, novo banho em PBS durante 2 minutos. A avidina (*Trek Avidin HRP Label Streptavidin*), para marcação do

complexo antígeno + anticorpo + anti-anticorpo, foi adicionada cobrindo o tecido nas lâminas em câmara úmida por 10 minutos; em seguida lavadas durante 2 minutos e adicionado o cromógeno (Betazoide DAB), diluído, previamente, em substrato (1 gota do cromógeno em 1mL de substrato). O cromógeno foi deixado no tecido durante 5 minutos e, após transcorrido o tempo, as lâminas foram lavadas em dois banhos com água destilada, 2 minutos cada, e um terceiro banho com PBS durante 2 minutos. Após as lavagens, foi adicionado sobre as lâminas a Hematoxilina de Erlich, filtrada, durante 2 minutos, para contraporar o tecido. A retirada do excesso de corante foi realizada em dois banhos de água destilada, 5 minutos cada. No processo final, as lâminas foram desidratadas três vezes em álcool 100%, 1 minuto cada, e em três banhos de xilol, 1 minuto cada. Para visualização, no microscópio, o tecido foi coberto com lamínula adicionando entelan, para fixação da mesma. As lâminas foram analisadas em aumento de 400X, no mesmo microscópio e programa das lâminas avaliadas em HE e toluidina.

As células com coloração castanha intracitoplasmática foram consideradas positivas para a expressão dos anticorpos primários pesquisados.

5.4 Análise estatística

5.4.1 Análise estatística (mastócitos)

A aquisição, processamento e análise das fotomicrografias foram realizadas no Software ZEN Lite (*Blue Edition*), um sistema de captura, processamento e análises de imagens para microscopia digital. Os dados foram agrupados de acordo com os grupos experimentais. Em seguida os dados, organizados no Microsoft Excel, foram expressos em médias aritméticas \pm desvio padrão. A normalidade dos dados não paramétricos (distribuição de frequência do número de mastócitos) foi testada pelo teste *Kolmogorov–Smirnov*, a diferença entre os grupos foi verificada pelo *Kruskal-Wallis test*, e a diferença entre grupos experimentais, tomados dois a dois, foi verificada através do *Dunn's Multiple Comparison Test*. A diferença entre as

médias aritméticas dos dados paramétricos foi testada através da análise de variância ANOVA. Foi considerado um intervalo de confiança de 95%, e significativo quando o valor de $p < 0,05$. Os dados estatísticos foram analisados no Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA).

5.4.2 Análise estatística (anticorpos IL-17, GATA-3, T-bet, TGF- β e peroxidase eosinofílica)

A aquisição das fotomicrografias foram realizadas no Software ZEN Lite (*Blue Edition*), um sistema de captura, processamento e análises de imagens para microscopia digital. Os dados foram agrupados de acordo com os grupos experimentais. Em seguida os dados foram expressos em médias aritméticas \pm desvio padrão. Para análise dos anticorpos T-bet, GATA-3, Foxp3 e peroxidase eosinofílica (EPX) foi realizado o teste D'Agostino & Pearson omnibus para verificar a normalidade dos dados. A variância entre os grupos foi verificada pelo teste One-way ANOVA (T-bet: $p=0,0013$; GATA-3 e Foxp3: $p < 0,0001$; EPX: $p=0,0001$) e o pós teste através do *Tukey's Multiple Comparison Test*. A normalidade dos dados do anticorpo IL-17 foi verificada pelo teste *Kolmogorov-Smirnov*. A variância entre os grupos foi verificada pelo teste *Kruskal-Wallis* ($p=0,0043$), e o pós-teste pelo *Dunn's Multiple Comparison Test*. Foi considerado um intervalo de confiança de 95%, e significativo quando o valor de $p < 0,05$. Os dados estatísticos foram analisados no Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA).

6. RESULTADOS

Os resultados são apresentados na forma de artigo (ANEXO 1).

7. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o óleo de copaíba e *trans*-cariofileno são potenciais substratos para novas drogas a serem utilizadas no tratamento da DA. Tais fitofármacos têm a vantagem de apresentarem a ausência de efeitos colaterais em comparação aos corticoides. Adicionalmente, o óleo de copaíba e o *trans*-cariofileno apresentam baixo custo quando comparados aos imunomoduladores.

REFERÊNCIAS

- AKDIS, C. A. et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. **J Allergy Clin Immunol.** v. 118, n. 1, p. 152-169, 2006.
- ASCHOFF, R. et al. Evaluation of the atrophogenic potential of hydrocortisone 1% cream and pimecrolimus 1% cream in uninvolved forehead skin of patients with atopic dermatitis using optical coherence tomography. **Exp Dermatol.** v. 20, n. 10, p. 832-836, 2011.
- AUBERT-WASTIAUX, H. et al. Topical corticosteroid phobia in atopic dermatitis: a study of its nature, origins and frequency. **Br J Dermatol.** v. 165, n. 4, p. 808- 814, 2011.
- AYLETT, S. E.; ATHERTON, D. J.; PREECE, M. A. The treatment of difficult atopic dermatitis in childhood with oral beclomethasone dipropionate. **Acta dermato-venereologica Supplementum.** v. 176, p. 123-125, 1992.
- BARBEAU, M.; LALONDE, H. Burden of Atopic dermatitis in Canada. **Int J Dermatol.** v. 45, n.1, p. 31-36, 2006.
- BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. **Int J Aromatherapy.** v. 13, n. 2/3, p. 138-142, 2003.
- BERGOT, A. S. et al. HPV16 E7 expression in skin induces TSLP secretion, type 2 ILC infiltration and atopic dermatitis-like lesions. **Immunol Cell Biol.** v. 93, n. 6, p. 540-547, 2015.
- BERTH-JONES J. et al. Cyclosporine in severe childhood atopic dermatitis: a multicenter study. **Journal of the American Academy of Dermatology.** v. 34, n. 6, p. 1016-1021, 1996.
- BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cell. **Nature.** v. 441, n. 7090, p. 235-238, 2006.
- BIEBER, T. M. D. Atopic dermatitis. **N Engl J Med.** v. 358, p. 1483-1494, 2008.
- BOGUNIEWICZ, M.; LEUNG, D. Y. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. **Immunol Rev.** v. 242, n. 1, p. 233-246, 2011.
- BONIFACE, K. et al. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. **J Immunol.** v. 174, n. 6, p. 3695-3702, 2005.

CAMELO-NUNES, I. C. et al. Prevalence of atopic eczema and associated symptoms in school children. **J Pediatr (Rio J)**. v. 80, n. 1, p. 60-64, 2004;

CARVALHO, J. C. T. et al. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytother Res**. v. 19, n. 11, p. 946–950, 2005.

CARVALHO, V. O. et al. Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte II: abordagem terapêutica. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Arq Asma Alerg Immunol**. v. 1, n. 2, p. 157-182, 2017.

CHO, E.; CHO, S. H. Effects of Korean red ginseng extract on the prevention of atopic dermatitis and its mechanism on early lesions in a murine model. **J Ethnopharmacol**. v. 145, n. 1, p. 294-302, 2013.

CHO, J. Y. et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life Sci**. v. 80, n.10, p. 932-939, 2007.

CHOI, J. H. et al. Topical application of *Pleurotus eryngii* extracts inhibits 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice by the regulation of Th1/Th2 balance. **Food Chem Toxicol**. v. 53, p. 38-45, 2013.

CZARNOWICKI, T.; KRUEGER, J. G.; GUTTMAN-YASSKY, E. Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: an evolving story with important clinical implications. **J Allergy Clin Immunol Pract**. v. 2, n. 4, p. 371-379, 2014.

DARSOW, U. et al. Position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. v. 19, n. 3, p. 286-295, 2005.

DIAS, D. O. et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Anal Chim Acta**. v. 721, p. 79-84, 2012.

DIAS, D. S. et al. Copaiba Oil Suppresses inflammatory cytokines in splenocytes of C57B1/6 mice induced with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Molecules**. v. 19, p. 12814-12826, 2014.

EICHENFIELD, L. F. et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies. **J Am Acad Dermatol**. v. 71, n. 1, p. 116- 32, 2014.

EICHENFIELD, L. F. et al. Translating Atopic Dermatitis Management Guidelines Into Practice for Primary Care Providers. **Pediatrics**. v. 136, n 3, p. 554-565, 2015.

ELBENDARY, A. et al. Expression of T-bet and GATA-3 in early mycosis fungoides and spongiotic dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 74, n. 5, p. 1012-1014, 2016.

EYERICH, K.; NOVAK, N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. **Allergy**. v. 68, n. 8, p. 974-982, 2013.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur J Pharmacol**. v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FLOHR, C.; MANN, J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. **Allergy**. v. 69, n. 1, p. 3-16, 2014.

FONTES, L. B. A. et al. beta-Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. **Biomedicine & pharmacotherapy**. v. 91, p. 257-264, 2017.

FUJITA, H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. **J Dermatol Sci**. v. 72, n. 1, p. 3-8, 2013.

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. **Int J Pharm**. v. 440, n. 2, p. 170-178, 2013.

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GLAZENBURG, E. J. et al. Efficacy and safety of fluticasone propionate 0.005% ointment in the long-term maintenance treatment of children with atopic dermatitis: differences between boys and girls? **Pediatr Allergy Immunol**. v. 20, p. 59-66, 2009.

GUIMARÃES-SANTOS, A. et al. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evid Based Complement Alternat Med**. v. 2012, p. 918174, 2012.

GUTOWSKA-OWSIK, D.; OGG, G. S. Cytokine regulation of the epidermal barrier. **Clin Exp Allergy**. v. 43, n. 6, p. 586-598, 2013.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. **Nat Rev Immunol**. v. 8, n. 3, p. 193-204, 2008.

HANIFIN, J. M. et al. The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. EASI Evaluator Group. **Experimental dermatology**. v. 10, n. 1, p. 11-18, 2001.

HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**. v. 5, n. 4, p. 271-283, 2005.

HOMEY, B. et al. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. **Nat Med**. v. 8, n. 2, p. 157-165, 2002.

HORVÁTH, B. et al. β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. **Free Radic Biol Med.** v. 52, n. 8, p. 1325-1333, 2012.

HOWELL, M. D. et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. **J Allergy Clin Immunol.** v. 120, p. 150-155, 2007.

ILLI, S. et al. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. **J Allergy Clin Immunol.** v. 113, n. 5, p. 925-931, 2004.

JENEROWICZ, D. et al. Environmental factors and allergic diseases. **Ann Agric Environ Med.** v. 19, n. 3, p. 475-481, 2012.

JENSEN, J. M. et al. Gene expression is differently affected by pimecrolimus and betamethasone in lesional skin of atopic dermatitis. **Allergy**, v. 67, n. 3, p. 413-423, 2012.

JIN, H. et al. Animal models of atopic dermatitis. **J Invest Dermatol.** v. 129, n. 1, p. 31-40, 2009.

JOHNSON, B. B. et al. Treatment-resistant atopic dermatitis: challenges and solutions. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology.** v. 12, p. 181-192, 2019.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol.** v. 27, p. 485-517, 2009.

KRETSCHMER, K. et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. **Nat Immunol.** v. 6, p. 1219-1227, 2005.

KYPRIOTOU, M.; BOÉCHAT, C.; HUBER, M.; et al. Spontaneous atopic dermatitis-like symptoms in a/a ma ft/ma ft/J flaky tail mice appear early after birth. **PLoS One.** v. 8, n. 7, p. e67869, 2013.

LEANDRO, L. M. et al. Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (Copaifera spp.) oleoresins. **Molecules.** v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.

LEUNG, D. Y.; BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Lancet.** v. 361, n. 9352, p. 151-160, 2003.

LIMA, C. S. et al. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). **Phytomedicine.** v. 18, n. 12, p. 1013-1023, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas.** 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008.

LUGER, T. et al. Pimecrolimus in atopic dermatitis: consensus on safety and the need to allow use in infants. **Pediatr Allergy Immunol.** v. 26, n. 4, p. 306-315, 2015.

MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**. v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.

MARGOLIS, D. J. et al. Filaggrin-2 variation is associated with more persistent atopic dermatitis in African American subjects. **J Allergy Clin Immunol**. v. 133, n. 3, p. 784-789, 2014.

MCGRATH, J. A.; UITTO, J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier functions and disease. **Trends Mol Med**. v. 14, n.1, p. 20-27, 2008.

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. **Br J Pharmacol**. v. 151, n. 5, p. 618-627, 2007.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**. v. 7, p.145-173, 1989.

MU, Z. et al. Molecular biology of atopic dermatitis. **Clin Rev Allergy Immunol**. v. 47, n. 2, p. 193-218, 2014.

NAKAHIGASHI, K. et al. Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. **J Invest Dermatol**. v. 131, n. 4, p. 865-873, 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). **Webbook**: spectral database fo organic compounds. Disponivel em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry>>. Acesso em: 14 de maio 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**. v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NOGRALES, K. E. et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyteresponse pathways. **Br J Dermatol**. v. 159, n. 5, p. 1092-1102, 2008.

OYOSHI, M. K.; MURPHY, G. F.; GEHA, R. S. Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. **J Allergy Clin Immunol**. v. 124, p. 485-493, 2009.

PANT, A. et al. Beta-caryophyllene modulates expression of stress response genes and mediates longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Exp Gerontol**. v. 57, p. 81-95, 2014.

PARK, K. Y. et al. Changes of antimicrobial peptides and transepidermal water loss after topical application of tacrolimus and ceramide-dominant emollient in patients with atopic dermatitis. **J Korean Med Sci**. v. 25, n. 5, p. 766-771, 2010.

PAWANKAR, R. et al. **White book on allergy. Wisconsin:** World Allergy Organization, 2013. Disponível em: <<https://www.worldallergy.org/UserFiles/file/WhiteBook2-2013-v8.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2019.

ROEKEVISCH, E. Efficacy and safety of systemic treatments for moderate-to-severe atopic dermatitis: a systematic review. **The Journal of allergy and clinical immunology.** v. 133, n. 2, p. 429-438, 2014.

SACHETTI, C. G. et al. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food Chem Toxicol.** v. 49, n. 5, p. 1080-1085, 2011.

SIEGFRIED, E. C. et al. Systematic review of published trials: long-term safety of topical corticosteroids and topical calcineurin inhibitors in pediatric patients with atopic dermatitis. **BMC Pediatrics.** v. 16, n. 75, p. 1-15, 2016.

SIGURGEIRSSON, B. et al. Safety and efficacy of pimecrolimus in atopic dermatitis: a 5-year randomized trial. **Pediatrics.** v. 135, n. 4, p. 597-606, 2015.

SIMON, D. et al. Th17 cells and tissue remodeling in atopic and contact dermatitis. **Allergy.** v. 69, n. 1, p. 125-131, 2014.

SIMON, D.; BIEBER, T. Systemic therapy for atopic dermatites. **Allergy.** v. 69, p. 46- 55, 2014.

SOUSA, J. P. B. et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **J Pharm Biomed Anal,** v. 54, n. 4, p. 653-659, 2011.

SOUWER, Y. et al. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. **Current Opinion in Immunology.** v. 22, n. 6, p. 821-826, 2010.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ.** v. 299, n. 6710, p. 1259-1260, 1989.

TANG, T. S.; BIEBER, T.; WILLIAMS, H. C. Are the concepts of induction of remission and treatment of subclinical inflammation in atopic dermatitis clinically useful? **J Allergy Clin Immunol.** v. 133, p. 1615-1625, 2014.

TAWADA, C. et al. Interferon- γ decreases ceramides with long-chain fatty acids: possible involvement in atopic dermatitis and psoriasis. **J Invest Dermatol.** v. 134, n. 3, p. 712-718, 2014.

TODA, M. et al. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. **J Allergy Clin Immunol.** v. 111, n. 4, p. 875-881, 2003.

UCHIDA, Y. Ceramide signaling in mammalian epidermis. **Biochim Biophys Acta.** v. 1841, n. 3, p. 453-462, 2014.

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. **J Ethnopharmacol.** v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.

VELDHOEN, M. et al. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity.** v. 24, p. 179-189, 2006.

WEIDINGER, S. et al. Filaggrin mutations strongly predispose to earlyonset and extrinsic atopic dermatitis. **J Invest Dermatol.** v. 127, p. 724-726, 2007.

WILLIAMS, H. C. Epidemiology of human atopic dermatitis – seven areas of notable progress and seven areas of notable ignorance. **Vet Dermatol.** v. 24, n. 1, p. 3-9, e1-2, 2013.

WU, C. T. et al. Inhibitory effects of cultured *Dendrobium tosaense* on atopic dermatitis murine model. **Int J Pharm.** v. 463, n. 2, p. 193-200, 2014.

YAMAGUCHI, M. H.; E GARCIA, R. F. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa.** v. 5, n. 1, p. 137-146, 2012.

YANO, C. et al. Impact of disease severity on work productivity and activity impairment in Japanese patients with atopic dermatitis. **J Dermatol.** v. 40, n. 9, p. 736-739, 2013.

YOO, J. et al. Systemic sensitization with the protein allergen ovalbumin augments local sensitization in atopic dermatitis. **J Inflamm Res.** v. 7, p. 29-38, 2014.

ZAKI, I.; EMERSON, R.; ALLEN, B. R. Treatment of severe atopic dermatitis in childhood with cyclosporin. **The British journal of dermatology.** v. 135, suppl. 48, p. 21-24, 1996.

ZEPPA, L.; BELLINI, V.; LISI, P. Atopic dermatitis in adults. **Dermatitis.** v. 22, n. 1, p. 40-46, 2011.

ANEXO 1