



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



VIOLETA BASTOS DE MATTOS AREOSA

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE COPAÍBA (*Copaifera multijuga* HAYNE)
SOBRE A MORFOLOGIA HEPÁTICA E CARDÍACA EM UM MODELO DE
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR ZYMOZAN: UM ESTUDO ESTEREOLÓGICO**

MANAUS
2019

VIOLETA BASTOS DE MATTOS AREOSA

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE COPAÍBA (*Copaifera multijuga* HAYNE)
SOBRE A MORFOLOGIA HEPÁTICA E CARDÍACA EM UM MODELO DE
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR ZYMOSAN: UM ESTUDO ESTEREOLÓGICO**

Trabalho de Dissertação apresentado à
Universidade Federal do Amazonas – UFAM,
para obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-graduação em Imunologia
Básica e Aplicada. Área de concentração:
Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa

Coorientador: Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes

MANAUS
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A681e Areosa, Violeta Bastos de Mattos
Efeito do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) sobre a morfologia hepática e cardíaca em um modelo de inflamação induzida por zymosan: um estudo estereológico / Violeta Bastos de Mattos Areosa. 2019
73 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Coorientador: Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Produto natural. 2. Hepatoprotetor. 3. Histopatologia. 4. BALB/c. I. Costa, Oscar Tadeu Ferreira da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



Ata de Defesa de Mestrado do
aluno **VIOLETA BASTOS DE
MATTOS AREOSA**, em 17 de
junho de 2019.

Aos dezessete dias de junho de dois mil e dezanove, às quatorze horas, no Auditório do PPGIBA, a aluna deste Programa **VIOLETA BASTOS DE MATTOS AREOSA** apresentou à banca examinadora a sua dissertação de Mestrado intitulada "Efeito do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) sobre a morfologia hepática e cardíaca em um modelo de inflamação induzida por Zymosan: um estudo estereológico". A banca examinadora, composta pelos seguintes membros: Professor Doutor Oscar Tadeu Ferreira da Costa (Presidente), Professor Doutor José Fernando Marques Barcellos (Membro) e Professora Doutora Maria Cristina dos Santos (Membro), após a apresentação e a arguição, decidiu: pela (X) aprovação ou pela reprovação () de seu plano de trabalho.

Professor Doutor **Oscar Tadeu Ferreira da Costa** (Presidente)

Professor Doutor **José Fernando Marques Barcellos** (Membro)

Professora Doutora **Maria Cristina dos Santos** (Membro)

Dedico este trabalho aos meus queridos mestres do Instituto de Ciências Biológicas da UFAM, pois sem seus ensinamentos não teria me tornado a profissional que sou hoje. Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, que nunca mediram esforços pra me dar a melhor educação possível. Em especial à minha mãe **Aidila Maria de Carvalho Bastos** pelas palavras de ânimo, a paciência e o sangue e suor dado para que eu pudesse me dedicar exclusivamente aos meus estudos. Ao meu pai **Luis Carlos Mattos Areosa** que apesar de não estar mais fisicamente conosco, sei que ainda olha e preza por mim. A ambos minha mais eterna gratidão.

Ao meu orientador prof. Dr. **Oscar Tadeu Ferreira da Costa** que nesses oito anos de jornada se tornou mais que um mestre e passou a ser meu pai científico. Obrigada pelo acolhimento, ensinamentos e por mostrar que a estereologia é o padrão ouro para obtenção de dados quantitativos.

Ao meu coorientador prof. Dr. **Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes** pelo apoio científico, instrução e parceria na elaboração desse projeto.

À doutoranda **Vanda Santana Queiroz Dini** que além de grande amiga, se tornou uma segunda coorientadora. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e pelo apoio emocional e braçal durante essa jornada.

À técnica **Erilene do Carmo**, vulgo Lene Maria, por sempre se dispor a ajudar e por me ensinar um pouco do seu conhecimento técnico.

Ao **Laboratório de Morfologia Quantitativa**, minha primeira casa nesses dois anos de mestrado e que se tornou um espaço de desenvolvimento profissional e pessoal. Vou lembrar com muito carinho de todos os momentos compartilhados nele.

Ao **Laboratório Temático de Microscopia Ótica e Eletrônica** do Inpa pelo espaço cedido para o processamento das amostras, especialmente ao meu eterno calouro e grande amigo **Lucas Castanhola** por toda assistência dada no decorrer deste projeto.

Aos PIBICs **Gustavo e Pedro** pelo auxílio dado em parte deste projeto.

A todo o corpo docente, discente e administrativo do **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA**. Sem vocês essa jornada teria sido muito mais árdua.

Às amigas **Luana Yamille e Tarcila Alves** pelos momentos de descontração e por acreditarem em mim mais do que eu mesma.

A toda **família Areosa**, em especial meu tio **Antônio José** cujo apoio nesses últimos anos foi essencial para minhas conquistas pessoais.

A toda **família Bastos**, em especial à minha prima **Adelaide Bastos** e minha tia **Adileide Bastos**, mulheres guerreiras que eu admiro muito e nas quais me espelho

A **CAPES** pela bolsa de estudos, que foi importante para dedicação exclusiva à pesquisa.

Aos **animais do biotério**, o meu respeito porque deram suas vidas a pesquisa.

Por fim, agradeço a **todos** que de alguma forma ajudaram para realização deste trabalho. **Agradecida!**

Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los.

(Isaac Asimov)

RESUMO

A estereologia é o padrão ouro dos métodos quantitativos, cuja eficácia é justificada por sua rigorosa amostragem sistemática uniforme e ao acaso em todos os níveis da análise quantitativa. Por possibilitar a obtenção de informações 3-D a partir de seções 2-D, a estereologia permite a identificação quantitativa de um órgão ou estrutura, mostrando-se uma ferramenta fundamental em estudos histopatológicos. A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune que afeta uma parcela da população mundial, associadas a um risco elevado de morbidade e morte prematura devido a manifestações extra-articulares, com destaque para as doenças cardiovasculares. Apesar dos tratamentos disponíveis atualmente terem bons resultados no controle local da doença (articulações), apresentam um alto custo e efeitos colaterais, o que leva a um aumento na procura por tratamentos alternativos. O óleo de copaíba é um produto natural bastante utilizado na medicina popular amazônica não somente pelos seus diversos efeitos terapêuticos, mas também pelo seu baixo custo e fácil acesso. Portanto, a presente dissertação teve como objetivo avaliar, por meio da estereologia, a ação sistêmica do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) num modelo animal de AR induzida por zymosan (Zy). Para tal, o Zy foi injetado na região do coxim plantar e na articulação do joelho da pata esquerda (fêmeas BALB/c, n= 36). Trinta minutos antes da indução, os animais foram tratados oralmente com solução veículo ou óleo de copaíba (300 ou 600 mg/kg) ou diclofenaco, conforme grupo experimental. Após 96 horas de experimentação, os animais foram anestesiados e eutanasiados. O sangue, o coração e o fígado foram coletados para análises bioquímicas e estereológicas, respectivamente. Não houve alteração no volume dos órgãos. O Zy causou alterações histológicas no fígado, mas não no coração. A copaíba levou a um aumento da vacuolização no citoplasma dos cardiomiócitos e reverteu o dano hepático causado pelo Zy. Em conclusão: (i) a estereologia é capaz de detectar mínimas alterações morfológicas nos alvos investigados; (ii) o Zy apresenta um efeito sistêmico no modelo de indução experimental de AR; (iii) a copaíba teve um efeito hepatoprotetor; (iv) estudos adicionais são necessários para estabelecer o real papel da copaíba no coração.

Palavras-chave: produto natural, hepatoprotetor, histopatologia, BALB/c

ABSTRACT

Stereology is the gold standard of quantitative methods, whose efficacy is justified by its rigorous uniform systematic sampling at random at all levels of quantitative analysis. By making it possible to obtain 3-D information from 2-D sections, stereology allows the quantitative identification of an organ or structure, proving to be a fundamental tool in histopathological studies. Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease that affects a portion of the world population, associated with a high risk of morbidity and premature death due to extra-articular manifestations, especially cardiovascular diseases. Although currently available treatments have good results in local disease control (articulation), they present a high cost and side effects, which leads to an increase in the demand for alternative treatments. Copaiba oil is a natural product widely used in amazonian folk medicine not only for its various therapeutic effects but also for its low cost and easy access. Therefore, the present thesis aimed to evaluate, through stereology, the systemic action of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) in an animal model of RA induced by zymosan (Zy). For such, Zy was injected in the region of the plantar cushion and in the knee joint of the left paw (BALB/c females, n= 36). Thirty minutes before induction, the mice were orally treated with vehicle solution or copaiba oil (300 or 600 mg/kg) or diclofenac, according to the experimental group. After 96 hours of experimentation, the animals were anesthetized and euthanized. Blood, heart and liver were collected for biochemical and stereological analyzes, respectively. There was no change in organs volume. Zy caused histological changes in the liver, but not in the heart. Copaiba led to increased vacuolization in the cytoplasm of cardiomyocytes and reversed the liver damage caused by Zy. In conclusion: (i) stereology is able to detect minimal morphological changes in the targets investigated; (ii) Zy has a systemic effect on the experimental induction model of Rheumatoid Arthritis; (iii) copaiba had a hepatoprotective effect; (iv) additional studies are needed to establish the true role of copaiba in the heart.

Keywords: natural product, hepatoprotective, histopathology, BALB/c

LISTA DE ABREVIACOES

AIMR	Artrite imunomediada em roedores
AINE	Anti-inflamatorios no esteroides
ALT	Alanina aminotransferase
AR	Artrite Reumatoide
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
CK-TOTAL	Creatinoquinasas totais
CXCL1	Ligante 1 de quimiocina CXC
DMARD	Drogas antirreumaticas modificadoras de doença
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IUR	Amostragem isotrópica uniforme ao acaso
MAP	Proteína ativada por mitógenos
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
MEA	Manifestações extra- articulares
MODS	Síndrome da disfuno de múltiplos rgos
MyD88	Proteína de diferenciao mieloide 88
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	xido nítrico
PCA	Análise dos componentes principais
RA	Rheumatoid Arthritis
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxignio
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistmica
SUR	Amostragem sistmica uniforme ao acaso
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
Zy	Zymosan

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** Diagrama resumido das manifestações clínicas (articulares e extra-articulares) da AR..... 16

Capítulo 2

- Figura 1** Fotografias da morfologia das fibras cardíacas em cortes histológicos longitudinais (A, B, C e E) e transversais (D e F) nos diferentes grupos..... 36
- Figura 2** Gráficos apresentando o volume médio do coração nos diferentes grupos experimentais ao final do experimento..... 37
- Figura 3** Gráficos dos níveis séricos de CK-TOTAL..... 38
- Figura 4** Gráficos dos valores absolutos dos componentes cardíacos em mm³/g.... 39

Capítulo 3

- Figura 1** Fotografias da morfologia do parênquima e estroma hepáticos nos diferentes grupos..... 54
- Figura 2** Gráficos dos volumes médios do fígado nos diferentes grupos experimentais ao final do experimento..... 55
- Figura 3** Gráficos dos parâmetros bioquímicos usados para avaliação de alterações hepáticas..... 56
- Figura 4** Gráficos com os valores absolutos (A, B, C e D) e número de células (E) dos componentes hepáticos..... 57
- Figura 5** Gráfico da análise dos componentes principais dos dados morfométricos e bioquímicos..... 58
- Figura 6** Gráfico da análise de agrupamento (Clustering) dos grupos deste estudo..... 59
- Figura 7** Gráfico 3D mostrando a relação entre os parâmetros volume do fígado, número de células de Kupffer e níveis séricos de ALT nos grupos analisados..... 60

Capítulo 4

- Figura 1** Representação esquemática das conclusões obtidas sobre a ação do zymosan e do óleo de copaíba no presente estudo..... 69
- Figura 2** Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos na ação inflamatória do zymosan e anti-inflamatória do óleo de copaíba no tecido hepático no presente estudo..... 70

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 Densidade de volume em porcentagem dos componentes cardíacos..... 38

Capítulo 3

Tabela 1 Densidade de volume em porcentagem dos componentes hepáticos..... 56

SUMÁRIO

Capítulo 1	INTRODUÇÃO GERAL.....	14
Capítulo 2	Ação do óleo de copaíba no coração de camundongos num modelo de indução de Artrite Reumatoide por zymosan.....	28
Capítulo 3	Ação do óleo de copaíba no fígado de camundongos num modelo de indução de Artrite Reumatoide por zymosan.....	46
Capítulo 4	CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
ANEXOS	71

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO

Artrite Reumatoide: manifestações clínicas e imunopatogênese

Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória que afeta cerca de 1% da população mundial (UHLIG; MOE; KVIEN, 2014) e entre 0,2% a 1% da população brasileira (MARQUES NETO et al., 1993). Pode ocorrer em qualquer faixa etária, mas sua prevalência tende a progredir com o aumento da idade, manifestando-se predominante no sexo feminino (SPECTOR; HART; POWELL, 1993; TURESSON; MATTESON, 2004).

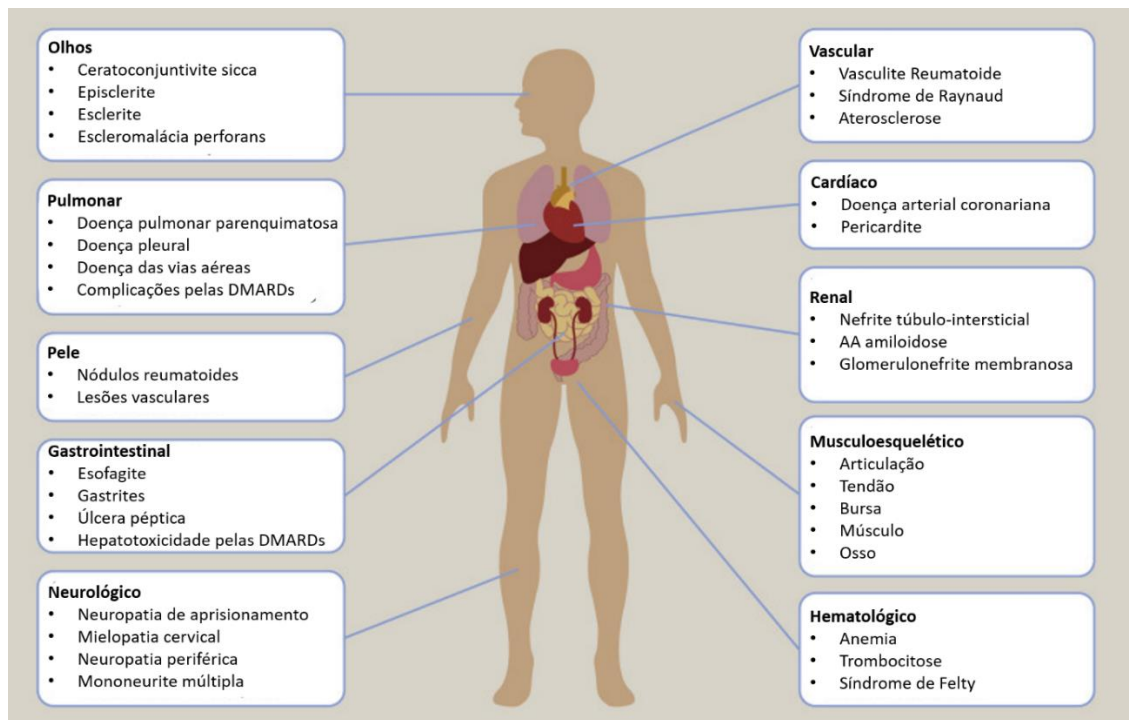
Caracterizada por inflamação sinovial e erosão óssea, essa doença apresenta um curso variável, desde acometimento leve e intermitente até uma forma mais grave e progressiva de pequenas e grandes articulações, apresentando sintomas como dores e inchaços, rigidez matinal, fadiga e perda de peso, além de possíveis manifestações extra-articulares (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Estudos demonstram que aproximadamente 40% dos pacientes com AR desenvolvem manifestações extra-articulares (MEA) (Figura 1) no início ou durante o curso de sua doença (CIMMINO et al., 2000), sendo as mesmas responsáveis pela redução de cinco a dez anos na expectativa de vida dos mesmos (KVIEN, 2004). Isso ocorre principalmente devido ao desenvolvimento precoce de doenças cardiovasculares, responsável pelo aumento de 50-60% do risco de mortalidade dos pacientes com AR quando comparados com indivíduos sem artrite (AVIÑA-ZUBIETA et al., 2008; MEUNE et al., 2009).

Dependendo da progressão da doença e comprometimento de outros órgãos, as realizações de atividades diárias ficam implicadas, gerando um impacto na saúde individual em termos do bem-estar físico, mental e social dos pacientes e aumento tanto da morbidade quanto da mortalidade (GABRIEL et al., 2003; TURESSON et al., 2002), além de um impacto econômico significativo devido aos gastos com medicação e procedimentos clínicos (KMILIAUSKIS et al., 2017; MARAVIC, 2010; PINCUS, 1995).

Apesar de não possuir etiologia esclarecida, a doença apresenta um processo inflamatório crônico característico. Acredita-se que o evento inicial da AR ocorra por fatores genéticos e ambientais (SILMAN; PEARSON, 2002) que desencadeiam um quadro de sinovite (inflamação da membrana sinovial) por meio da ativação e proliferação do revestimento sinovial que penetra tanto na cavidade articular quanto no tecido ósseo, levando à formação de uma estrutura patognomônica conhecida como *pannus* (VOGELPOEL et al., 2015). Tanto a hiperplasia dos sinoviócitos quanto a infiltração de células efetoras imunes,

como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos T e B, ocorre em consequência da desregulação de vias de sinalização e produção de citocinas inflamatórias, além da inibição da morte celular programada (SWEENEY; FIRESTEIN, 2004).

Figura 1 - Diagrama resumido das manifestações clínicas (articulares e extra-articulares) da AR. DMARDs: drogas antirreumáticas modificadoras de doença.



A liberação de enzimas como elastase e proteases pelos neutrófilos presentes na cavidade articular resulta na degradação da cartilagem, facilitando a deposição de imunocomplexos formados pela liberação de anticorpos pelos linfócitos B ativados no local, com conseguinte ativação do Sistema Complemento, agravando assim o quadro inflamatório da doença (EPSTEIN; CHOY; PANAYI, 2001).

Opções terapêuticas: a dualidade dos tratamentos disponíveis

Mesmo tendo como finalidade a remissão completa da doença (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010), os tratamentos atualmente disponíveis para a AR raramente alcançam esse objetivo e até mesmo trazem outras consequências, como no caso da utilização de drogas imunossupressoras que acabam aumentando o risco de contrair infecções graves (DORAN et al., 2002).

As intervenções terapêuticas para AR variam entre os reumatologistas, podendo incluir tanto medidas não farmacológicas, que incluem terapias físicas, ocupacionais e psicológicas, como medidas farmacológicas, que por sua vez emprega a administração de analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), corticosteroides, drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARDs) e terapia alvo com agentes biológicos (SMOLEN et al., 2010).

O tipo de terapia escolhido depende do estágio, da atividade e da gravidade da doença. De modo geral, a primeira linha de tratamento inclui AINEs, corticosteroides e DMARDs (DEVINE; ALFONSO-CRISTANCHO; SULLIVAN, 2011) Em pacientes que apresentam um quadro mais grave e que não respondem à terapia inicial, emprega-se a imunoterapia alvo com agentes biológicos, considerada a segunda linha de tratamento (MALOTTKI et al., 2011). Apesar de estudos demonstrarem uma maior eficácia dos tratamentos com agentes biológicos na fase inicial da doença (BREEDVELD et al., 2006; GOEKOOP-RUITERMAN et al., 2005), estes apresentam algumas desvantagens como: seu alto custo, que segundo Finckh et al. (2009) chega a ser dez vezes maior que os DMARDs convencionais; a possibilidade de efeitos potencialmente tóxicos (IKEDA; COX; EMERY, 2007) e um risco aumentado de infecções e malignidades por atuarem diretamente em moléculas e tipos celulares importantes do sistema imune. (BONGARTZ et al., 2006; DASS; VITAL; EMERY, 2006; JONES; DING, 2010; TANAKA, 2015).

Pelos motivos expostos acima, vêm-se aumentando a procura por tratamentos alternativos aos farmacêuticos, com destaque para a utilização de produtos naturais, que vêm oferecendo uma importante perspectiva na identificação de compostos bioativos (HEITZMAN et al., 2005; SHU, 1998).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades remota os primórdios da humanidade, sendo ainda bastante procurados nos tempos atuais como alternativas aos medicamentos sintéticos comerciais (SOUSA et al., 2008). Estudos afirmam que cerca de 25% a 50% de todos os fármacos avaliados como agentes terapêuticos em uso clínico mundial são derivados de compostos naturais (CALIXTO, 2005; GURIB-FAKIM, 2006).

Na região Amazônica, um dos produtos naturais de maior destaque é o óleo resina da copaíba, sendo amplamente utilizado na medicina popular regional. O mesmo é extraído do tronco de diversas espécies de plantas do gênero *Copaifera* sp., pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), distribuídas principalmente pela América Latina e África Ocidental (GARCIA, ROSÂNGELA FERNANDES; YAMAGUCHI, 2012). Das 72 espécies

identificadas, 16 são endêmicas do Brasil, incluindo a *Copaifera multijuga* Hayne (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

De modo geral, o óleo resina da copaíba apresenta em sua composição uma mistura de sesquiterpenos, com destaque para a presença de β -cariofilenos e diterpenos (CASCON; GILBERT, 2000; VEIGA JUNIOR et al., 2007) que conferem as suas propriedades anti-inflamatória (LUCCA et al., 2018), analgésica (KATSUYAMA et al., 2013), antiartrítica (VIJAYALAXMI; BAKSHI; BEGUM, 2015) entre outras.

Apesar da eficácia comprovada de algumas propriedades, estudos com o óleo de copaíba verificaram alterações citológicas em diversos órgãos como rins, pulmão, fígado e outros (BOTELHO et al., 2011; BRITO et al., 2000a; VINICIUS HENRIQUES BRITO et al., 2006; WESTPHAL; DE LIMA; GUIMARÃES, 2007), sugerindo uma dualidade na atuação do óleo.

Dentre os diversos efeitos colaterais de fármacos padrões e alternativos, a hepatotoxicidade vêm se tornando o foco da preocupação de órgãos reguladores na atualidade, sendo citado como uma das principais razões para retirada de medicamentos do mercado (XU; DIAZ; O'BRIEN, 2004). Esse panorama torna fundamental que para o desenvolvimento, comercialização e administração de medicamentos sejam realizados testes pré-clínicos e clínicos rigorosos no intuito de se estabelecer a segurança e eficácia dos mesmos (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Zymosan como modelo para indução de artrite experimental em animais

Levando-se em consideração que a AR não é uma doença contagiosa e que não ocorre em animais de laboratório, há uma busca por métodos que visem mimetizar a patogênese humana em modelos animais de forma a permitir seu estudo experimental.

Um dos modelos que mais vem sendo utilizado no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a AR é o de artrite imunomediada em roedores (AIMR), podendo haver variações quanto a espécie empregada, tipo da doença e agente indutor. Dentre os vários artritogênicos utilizados para a indução da AR, um dos destaques é o Zymosan (Zy) devido ao seu baixo custo operacional, além de ter um início do processo inflamatório definido, caracterizado por edema e infiltrado celular, atingido a resposta inflamatória da fase aguda máxima às seis horas após indução, permitindo assim sua utilização em protocolos experimentais rápidos (DE MENEZES, 2016).

Zy é um polissacarídeo proveniente da parede de fungos leveduriformes, como o fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Seu principal componente estrutural é a β -glucana, que apresenta propriedades imunoestimulatórias (CARDOSO, 2007), como a ativação de macrófagos e conseguinte liberação de mediadores inflamatórios, motivo pelo qual é amplamente empregado em estudos farmacológicos (ALVES et al., 2017; TARAYRE et al., 1989).

Estudos demonstram que esse processo inflamatório é iniciado pela ativação dos receptores Toll-like 2 (TLR2) presentes nos tecidos sinoviais com recrutamento da proteína adaptadora MyD88, promovendo a resposta inflamatória a partir dos genes responsivos ao NF- κ B num mecanismo dependente de MAP quinases (TAKEDA; AKIRA, 2005), com destaque para as citocinas TNF- α , IL-1 β e quimiocina CXCL1 (GUERRERO et al., 2012). Além do seu papel agonista ao TLR2, o Zy pode atuar na estimulação de agonistas endógenos do TLR4, exacerbando assim a resposta inflamatória (ROELOFS et al., 2005).

Estereologia como ferramenta indispensável para a obtenção de dados quantitativos

A estereologia é uma ciência que possibilita a inferência estatística de parâmetros geométricos (3D) a partir de informações amostradas espacialmente (2D) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003), apresentando grande acurácia e precisão devido à sua forte base matemática e estatística (MARCOS; MONTEIRO; ROCHA, 2012). Essa eficácia é baseada em três pilares principais: tamanho de amostra adequado, randomização e isotropia do órgão/tecido a ser estudado (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

A análise estereológica apresenta vantagens científicas sobre estudos qualitativos por: 1) apresentar resultados numéricos obtidos de forma não subjetiva que são facilmente reprodutíveis e verificáveis por diferentes laboratórios; 2) diminuição do trabalho fastidioso comumente associados aos estudos quantitativos devido à sua menor necessidade de número amostral e utilização de softwares próprios para a estereologia; 3) sua fundamentação teórica estabelecida tornou o método amplamente aceitável e difundido na experimentação científica; 4) necessitar de um curto treinamento para novos usuários e de equipamentos de baixo custo quando comparados à outras metodologias (BJARKAM; PEDERSEN; SØRENSEN, 2001; BOLENDER, 1981; DAVEY et al., 2006; KUBÍNOVÁ et al., 2001).

Por ser uma ferramenta robusta para a geração de dados quantitativos em diversas áreas de pesquisa (APFEL et al., 2002; LACERDA, 2000; LOPES-PAULO, 2004), a estereologia tem se mostrado uma das maiores realizações nos últimos anos envolvendo a

biologia experimental (BOLENDER, 1992) por detectar mínimas alterações morfológicas e funcionais (ANDERSEN; PAKKENBERG, 2003; ROBERTS; PUDDEPHAT; MCNULTY, 2000), sendo empregada na avaliação de alterações histológicas decorrentes de doenças ou exposição a agentes tóxicos. (ASLAN et al., 2006; GOODARZI; DOORGARD; POURNAGHI, 2017).

Os procedimentos técnicos para a quantificação das alterações no coração (RODRIGUES et al., 2004) e no fígado (JUNATAS et al., 2017; MARCOS; CORREIA-GOMES, 2016) já estão bem estabelecidos.

Objetivo deste estudo

Levando-se em consideração o grande impacto econômico e social da AR devido a questões como o seu alto índice de mortalidade em razão de complicações causadas por suas manifestações extra-articulares, com destaque para as doenças cardiovasculares, além do alto custo e efeitos colaterais dos tratamentos disponíveis, incluindo hepatotoxicidade, vê-se uma necessidade pela busca de novos tratamentos que evitem ou diminuam os problemas citados acima. Sendo assim, do presente estudo apresenta as seguintes hipóteses a serem testadas:

- (i) H₁: a copaíba possui um efeito protetor cardíaco frente à ação do Zy;
- (ii) H₁: a copaíba possui um efeito protetor hepático frente à ação do Zy.

Logo, este trabalho tem como objetivo geral avaliar, por meio da análise estereológica, o efeito do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) na morfologia do coração e do fígado num modelo animal de indução de artrite por Zy. Para tal, determinou-se o volume dos órgãos estudados, estimou-se parâmetros estereológicos como volume absoluto e relativo dos componentes do coração e do fígado, o número de macrófagos residentes no fígado (células de Kupffer), além da avaliação de indicadores de dano (CK-TOTAL, AST e ALT).

Extensão desta Dissertação

A presente dissertação é dividida em quatro capítulos, onde o primeiro trata de uma apresentação geral deste estudo, abordando tópicos como a problemática da AR, as opções terapêuticas convencionais e alternativas, com destaque ao uso do óleo resina de copaíba. O segundo e o terceiro capítulos compreendem a parte experimental sobre o efeito do Zy e do óleo de copaíba sobre o coração e o fígado, respectivamente, onde se avalia a ação do óleo

nos tecidos de interesse. O último capítulo engloba as conclusões finais do trabalho e as perspectivas para estudos futuros.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. M. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of strontium ranelate on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats depend on TNF- α inhibition. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 4, p. 764–772, 2017.

ANDERSEN, B. B.; PAKKENBERG, B. Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia. **British Journal of Psychiatry**, v. 182, n. 04, p. 354–361, 2003.

APFEL, M. I. R. et al. Estudo estereológico das células de purkinje cerebelares submetidas à intoxicação alcoólica em ratos wistar. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n. 2, p. 258–263, 2002.

ASLAN, H. et al. Effects of formaldehyde exposure on granule cell number and volume of dentate gyrus: A histopathological and stereological study. **Brain Research**, v. 1122, n. 1, p. 191–200, 2006.

AVIÑA-ZUBIETA, J. A. et al. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. **Arthritis & Rheumatism**, v. 59, n. 12, p. 1690–1697, 2008.

BJARKAM, C. R.; PEDERSEN, M.; SØRENSEN, J. C. New strategies for embedding, orientation and sectioning of small brain specimens enable direct correlation to MR-images, brain atlases, or use of unbiased stereology. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 108, p. 153–159, 2001.

BOLENDER, R. P. Stereology: Applications to Pharmacology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 549–573, 1981.

BOLENDER, R. P. Biological stereology: History, present state, future directions. **Microscopy Research and Technique**, v. 21, n. 4, p. 255–261, 1992.

BONGARTZ, T. et al. Anti-TNF Antibody Therapy in Rheumatoid Arthritis and the Risk of Serious Infections and Malignancies. **JAMA**, v. 295, n. 19, p. 2275–2285, 2006.

BOTELHO, N. M. et al. Estudo morfológico do efeito subagudo de altas doses do óleo de copaíba em ratos. **Rev. para. med**, 2011.

BREEDVELD, F. C. et al. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previo. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 1, p. 26–37, 2006.

BRITO, M. V. H. et al. Aspectos microscópicos do fígado de ratos após administração do óleo de copaíba. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 102–106, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CARDOSO, M. L. Efeito de frações obtidas da fucoídiana de *Fucus vesiculosus* em modelo experimental de artrite induzida por Zymosan. 2007. 85 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) - Curso Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773–778, 2000.

CIMMINO, M. A. et al. Extra-articular manifestations in 587 Italian patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology international**, v. 19, n. 6, p. 213–217, 2000.

DASS, S.; VITAL, E. M.; EMERY, P. Rituximab: novel B-cell depletion therapy for the treatment of rheumatoid arthritis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 7, n. 18, p. 2559–2570, 2006.

DAVEY, M. G. et al. Computer-assisted stereology: Point fraction of lung parenchyma and alveolar surface density in fetal and newborn sheep. **Scanning**, v. 25, n. 1, p. 37–44, 2006.

DE MENEZES, M. S. S. Efeito da olmesartana na inflamação intra-articular induzida por zymosan. 2016. 68 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Sociedade, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2016.

DEVINE, E. B.; ALFONSO-CRISTANCHO, R.; SULLIVAN, S. D. Effectiveness of biologic therapies for rheumatoid arthritis: An indirect comparisons approach. **Pharmacotherapy**, v. 31, n. 1, p. 39–51, 2011.

DORAN, M. F. et al. Predictors of infection in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 9, p. 2294–2300, 2002.

EPSTEIN, F. H.; CHOY, E. H. S.; PANAYI, G. S. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 12, p. 907–916, 2001.

FIGUEREDO, C. A. DE; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.

FINCKH, A. et al. Treatment of Very Early Rheumatoid Arthritis With Symptomatic Therapy, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, or Biologic Agents. **Annals of Internal Medicine**, v. 151, n. 9, p. 612, 2009.

GABRIEL, S. E. et al. Survival in rheumatoid arthritis: A population-based analysis of trends

over 40 years. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 1, p. 54–58, 2003.

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

GOEKOOP-RUITERMAN, Y. P. M. et al. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): A randomized, controlled trial. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 11, p. 3381–3390, 2005.

GOODARZI, N.; DOORGARD, E.; POURNAGHI, P. The Ameliorative Potential of Sophora alopecuroides Essential Oil on CCl₄ - Induced Hepatotoxicity in Mice; a Stereological Study. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 5, n. 2018, p. 47–54, 2017.

GUERRERO, A. T. G. et al. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: Participation of TNF- α , IL-1 β and CXCL1/KC. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 1, p. 51–57, 2012.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1–93, 2006.

HEITZMAN, M. E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 5–29, 2005.

IKEDA, K.; COX, S.; EMERY, P. Aspects of early arthritis. Biological therapy in early arthritis – overtreatment or the way to go? **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 3, p. 211, 2007.

JONES, G.; DING, C. Tocilizumab: A Review of Its Safety and Efficacy in Rheumatoid Arthritis. **Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders**, v. 3, p. 81–893, 2010.

JUNATAS, K. L. et al. Stereological analysis of size and density of hepatocytes in the porcine liver. **Journal of Anatomy**, v. 230, n. 4, p. 575–588, 2017.

KATSUYAMA, S. et al. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 5, p. 664–675, 2013.

KMILIAUSKIS, R. et al. Impact of rheumatoid arthritis in the public health system in Santa Catarina, Brazil: a descriptive and temporal trend analysis from 1996 to 2009. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 57, p. 204–209, 2017.

KUBÍNOVÁ, L. et al. Three-dimensional study of the capillary supply of skeletal muscle fibres using confocal microscopy. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 22, n. 3, p. 217–227, 2001.

KVIEN, T. K. Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis. **PharmacoEconomics**, v. 22, n. S1, p. 1–12, 2004.

LACERDA, C. A. Fisiologia e Fisiopatologia: Estereologia do rim: determinação do Vv, Nv e volume médio do glomérulo*. **J Bras Nefrol**, v. 22, n. 2, p. 103–109, 2000.

LOPES-PAULO, F. Efeitos da irradiação com raios-X em anastomoses colônicas: estudo estereológico experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 5, p. 504–510, 2004.

LUCCA, L. G. et al. Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 522–530, 2018.

MALOTTKI, K. et al. Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment**, v. 15, n. 14, 2011.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469–486, 2003.

MARAVIC, M. Economic impact of rheumatoid arthritis (RA) biotherapies in France. **Joint Bone Spine**, v. 77, p. 319–324, 2010.

MARCOS, R.; CORREIA-GOMES, C. Long live the liver: immunohistochemical and stereological study of hepatocytes, liver sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells and hepatic stellate cells of male and female rats throughout ageing. **Cell and tissue research**, v. 366, n. 3, p. 639–649, 2016.

MARCOS, R.; MONTEIRO, R. A. F.; ROCHA, E. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. **Journal of Anatomy**, v. 220, n. 4, p. 303–317, 2012.

MARQUES NETO, J. F. et al. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. **Rev. bras. reumatol**, p. 169–73, 1993.

MEUNE, C. et al. Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Rheumatology**, v. 48, n. 10, p. 1309–1313, 2009.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PINCUS, T. The Underestimated Long Term Medical and Economic Consequences of Rheumatoid Arthritis. **Drugs**, v. 50, n. Supplement 1, p. 1–14, 1995.

ROBERTS, N.; PUDDEPHAT, M. J.; MCNULTY, V. The benefit of stereology for quantitative radiology. **The British journal of radiology**, v. 73, n. 871, p. 679–97, 2000.

RODRIGUES, M. R. ' et al. Cirurgia de Pequenos Animais Estereologia de corações cirurgicamente denervados de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal**

Science, v. 41, p. 132–134, 2004.

ROELOFS, M. F. et al. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 8, p. 2313–2322, 2005.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. **Lancet (London, England)**, v. 376, n. 9746, p. 1094–108, 2010.

SHU, Y.-Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Journal of natural products**, v. 61, n. 8, p. 1053–1071, 1998.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 4, n. 3, p. 265–272, 2002.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 6, p. 964–975, 2010.

SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 642–654, 2008.

SPECTOR, T. D.; HART, D. J.; POWELL, R. J. Prevalence of rheumatoid arthritis and rheumatoid factor in women: evidence for a secular decline. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 52, p. 254–257, 1993.

SWEENEY, S. E.; FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 3, p. 372–378, 2004.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005.

TANAKA, Y. JB Review Recent progress and perspective in JAK inhibitors for rheumatoid arthritis: from bench to bedside. **The Journal of Biochemistry**, v. 158, n. 3, p. 173–179, 2015.

TARAYRE, J. P. et al. Pharmacological studies on zymosan inflammation in rats and mice. 1: Zymosan-induced paw oedema in rats and mice. **Pharmacological Research**, v. 21, n. 4, p. 375–384, 1989.

TURESSON, C. et al. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 29, n. 1, p. 62–7, 2002.

TURESSON, C.; MATTESON, E. L. Management of extra-articular disease manifestations in rheu... : Current Opinion in Rheumatology. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 16, n. 3,

p. 206–211, 2004.

UHLIG, T.; MOE, R. H.; KVIEN, T. K. The Burden of Disease in Rheumatoid Arthritis. **PharmacoEconomics**, v. 32, n. 9, p. 841–851, 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. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248–254, 2007.

VIJAYALAXMI, A.; BAKSHI, V.; BEGUM, N. Anti-Arthritic And Anti Inflammatory Activity Of Beta Caryophyllene Against Freund's Complete Adjuvant Induced Arthritis In Wistar Rats. **Journal of Bone Reports & Recommendations**, v. 1, n. 2, p. 9, 2015.

VINICIUS HENRIQUES BRITO, M. et al. Efeito dos óleos de andiroba e copaíba na miosite induzida em ratos andiroba and copaiba oils effect in induced miositis in rats. **Revista Paraense de Medicina V**, v. 20, n. 2, 2006.

VOGELPOEL, L. T. C. et al. Control of Cytokine Production by Human Fc Gamma Receptors: Implications for Pathogen Defense and Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 79, 2015.

WESTPHAL, F. L.; DE LIMA, L. C.; GUIMARÃES, R. A. Avaliação das alterações pleuropulmonares após a injeção de óleo de resina de copaíba, extrato aquoso de cajú e polivinilpirrolidona iodado (pvpi) na pleura e parênquima pulmonar de ratos. **Col. Bras. Cir.**, v. 34, n. 3, p. 170–176, 2007.

XU, J. J.; DIAZ, D.; O'BRIEN, P. J. Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, n. 1, p. 115–128, 2004.

Capítulo 2

CORAÇÃO

Ação do óleo de copaíba no coração de camundongos num modelo de indução de Artrite Reumatoide por zymosan

Violeta Bastos de Mattos Areosa ¹, Vanda Santana Queiroz Dini ¹, Lucas Castanhola Dias ², Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes ³; Jarbas Pereira de Paula ⁴, Cacilda Satomy Yano Malmann ⁵ e Oscar Tadeu Ferreira da Costa ⁶

¹ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

² Laboratório Temático de Microscopia Ótica e Eletrônica, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, AM, Brasil.

³ Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

⁴ Laboratório de Anatomia, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

⁵ Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Universitário Getúlio Vargas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

⁶ Laboratório de Microscopia Quantitativa, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

RESUMO

Manifestações extra-articulares afetam cerca de 40% dos pacientes com Artrite Reumatoide, sendo o desenvolvimento precoce de doenças cardiovasculares responsável por um aumento de 50-60% do risco de mortalidade. Os tratamentos convencionais intervêm no curso local da Artrite, porém possuem diversos efeitos colaterais. Produtos naturais têm se destacado como tratamentos alternativos pelo seu fácil acesso e baixo custo, com o óleo resina de copaíba ganhando relevância devido à sua ampla utilização na medicina popular amazônica. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) no tecido cardíaco num modelo animal de indução da artrite pelo zymosan (Zy). Para tal, Zy foi injetado na região do coxim plantar e na articulação do joelho da pata esquerda. Trinta minutos antes da indução, os camundongos (fêmeas BALB/c, n= 36) foram tratados oralmente com solução veículo ou óleo de copaíba (300 ou 600 mg/kg) ou diclofenaco (100 mg/kg), conforme grupo experimental. Após 96 horas de experimentação, os animais foram anestesiados e eutanasiados. O sangue e coração foram coletados para análises bioquímicas e estereológicas, respectivamente. Não houve alteração do volume do coração. A copaíba levou a um aumento da vacuolização nos cardiomiócitos. Embora os níveis séricos de CK-TOTAL tenham se elevado às 24 horas, exceto no grupo controle negativo, o Zy não causou alterações substanciais no coração no tempo de experimentação. Conclui-se que o Zy, no atual modelo de indução de artrite, não afetou a morfologia dos cardiomiócitos, impossibilitando a avaliação do efeito da copaíba no órgão.

Palavras-chave: Estereologia, vacuolização, cardiomiócitos, CK-TOTAL.

ABSTRACT

Extra-articular manifestations affect approximately 40% of patients with Rheumatoid Arthritis, with the early development of cardiovascular diseases responsible for a 50-60% increase in their risk of death. Conventional treatments intervene in the local course of arthritis, but they have several side effects. Natural products have stood out as alternative treatments because of their easy access and low cost, with copaiba resin oil gaining relevance due to its wide use in Amazonian folk medicine. The objective of the present study was to evaluate the effect of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) on cardiac tissue in an animal model of arthritis induction by zymosan (Zy). For such, Zy was injected in the region of the plantar coxim and in the knee joint of the left paw. Thirty minutes before induction, mice (female BALB/c, n= 36) were orally treated with vehicle solution or copaiba oil (300 or 600 mg/kg) or diclofenac (100 mg/kg), according to the experimental group. After 96 hours of experimentation, the animals were anesthetized and euthanized. Blood and heart were collected for biochemical and stereological analyzes, respectively. There was no change in heart volume. Copaiba led to increased vacuolization in cardiomyocytes. Although serum levels of CK-TOTAL increased at 24 hours, except in the negative control group, Zy did not cause substantial changes in the heart at the time of experimentation. It was concluded that Zy, in the current model of induction of Arthritis, did not affect the morphology of cardiomyocytes, making impossible the evaluation of the effect of copaiba in the organ.

Keywords: Stereology, vacuolization, cardiomyocytes, CK-TOTAL.

INTRODUÇÃO

Estudos demonstram que aproximadamente 40% dos pacientes com Artrite Reumatoide (AR) apresentam manifestações extra-articulares (MEA) no início ou durante o curso de sua doença (CIMMINO et al., 2000), sendo responsáveis pela redução de cinco a dez anos na expectativa de vida dos mesmos (KVIEN, 2004). Essas manifestações são divididas em não severas e severas (TURESSON; JACOBSSON; BERGSTRÖM, 1999), e estão associadas a um risco elevado de morbidade e morte prematura de pacientes com AR (BONGARTZ et al., 2006; MINAUR et al., 2004; TURESSON et al., 2006). As MEA incluem nódulos e vasculite reumatoide, complicações pleuropulmonares, neurológicas, digestivas, cutâneas, hematológicas, oculares e o desenvolvimento precoce de doenças cardiovasculares (DEMARIA, 2002; GABRIEL et al., 2003; HOCHBERG; JOHNSTON; JOHN, 2008), sendo a última responsável pelo aumento de 50-60% do risco de mortalidade dos pacientes com AR quando comparados com indivíduos sem artrite (AVIÑA-ZUBIETA et al., 2008; MEUNE et al., 2009).

Diferentes tipos de manifestações cardiovasculares foram relatados em pacientes com AR, entre elas: doença do miocárdio, vasculite coronária, disfunção diastólica, aterosclerose acelerada e lesões valvulares (COSKUN et al., 2005). Apesar da pericardite ser a mais comum (COSKUN et al., 2005), a mortalidade precoce está associada principalmente à isquemia cardíaca (SOLOMON et al., 2006), insuficiência cardíaca congestiva (NICOLA et al., 2006) e acidentes cerebrovasculares (AVIÑA-ZUBIETA et al., 2008). Adicionalmente, estudos indicam que pacientes com artrite portadores de problemas cardíacos tem maior probabilidade de doença assintomática por não apresentarem manifestações clínicas como a angina, tornando difícil a detecção precoce de infarto do miocárdio e favorecendo a morte cardíaca súbita (MARADIT-KREMERS et al., 2005).

Os métodos diagnósticos usados para determinar moléstias cardíacas variam de acordo com o tipo e grau da lesão. Além da análise histológica, a dosagem sérica de enzimas cardíacas é amplamente empregada de forma complementar aos demais exames. Entre estas destacam-se as creatinoquinasas, enzimas em sua maioria citoplasmáticas que apresentam três isoformas: CK-MM, CK-MB e CK BB encontradas predominantemente no músculo esquelético, músculo cardíaco e músculo liso/cérebro, respectivamente. Após uma lesão, estas são liberadas na corrente sanguínea onde seus níveis plasmáticos elevam-se, atingem um pico

e voltam a normalidade de forma característica, possibilitando diagnosticar o local e a extensão da lesão cardíaca.

Os tratamentos convencionais intervêm no curso local da AR (articulação), porém têm diversos efeitos colaterais (SINGH et al., 2011), incluindo dislipidemia por glicocorticoides (BOERS et al., 2003), hipertensão por uso de anti-inflamatórios (BATLOUNI, 2010) e diabetes devido aos corticoides (SUISSA; KEZOUH; ERNST, 2010).

Por estes motivos, há uma necessidade por tratamentos alternativos que não causem ou diminuam os efeitos colaterais causados pelos tratamentos convencionais. Na região Norte do Brasil, um dos destaques é o óleo resina de copaíba extraído do tronco da árvore copaíba, um produto natural amplamente utilizado na medicina popular amazônica devido à sua já bem estabelecida propriedade medicinal (GARCIA; YAMAGUCHI, 2012). Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a ação do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) no tecido cardíaco num modelo animal de indução da AR pelo zymosan (Zy).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Camundongos BALB/c fêmeas, pesando entre 17-22 g, foram fornecidos pelo Biotério Central do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e mantidos em ambiente com temperatura controlada a 20-22 °C, ciclo de claro-escuro a cada 12 horas e livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (CEUA-INPA), sob o protocolo 048/2016 (ANEXO I).

Obtenção do óleo de copaíba

O óleo destilado de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) foi fornecido pelo Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM coordenado pelo Prof. Dr. Emerson Lima.

Delineamento experimental

Os camundongos (n= 36) foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais: C- (controle negativo; sem indução da AR/veículo), Ccop300 (controle copaíba; sem indução da AR/copaíba 300 mg/kg), Zy (indução da AR/veículo), Zy/Diclo (indução da AR/diclofenaco 100 mg/kg), Zy/Cop300 (indução da AR/copaíba 300 mg/kg) e Zy/Cop600 (indução da AR/copaíba 600 mg/kg).

Pré-tratamento e indução da artrite

A indução da artrite foi feita por meio de injeção de solução contendo 500 µg de Zy (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em 25 µL de solução salina estéril na região do coxim plantar da pata posterior e na região intra-articular do joelho esquerdo. Trinta minutos antes da injeção de Zy, os camundongos foram tratados oralmente com solução veículo (Tween 20 e salina), óleo de copaíba (300 ou 600 mg/kg) ou diclofenaco (100 mg/kg), conforme grupo experimental.

Coleta, fixação e processamento das amostras

O sangue foi coletado em dois momentos do experimento (24 horas e 96 horas após indução da AR) via plexo venoso oftálmico. Em seguida, o mesmo foi centrifugado e o plasma foi mantido a baixa temperatura em microtubos heparinizados para posterior análise bioquímica. Ao final do experimento (96 horas), os animais foram anestesiados com cetamina (82 mg/kg) e xilazina (5,75 mg/kg) e então eutanasiados. O coração foi imediatamente fixado em solução formaldeído tamponado.

Para o processamento histológico, as amostras foram sistemática e aleatoriamente orientadas (*orientator* - IUR) para a geração de isotropia. Em seguida, as mesmas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70 e 96%), infiltradas e incluídas em moldes individuais preenchidos com resina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Kúlzer-Heraues, Alemanha). Seções histológicas (9-12 seções, 3µm) foram obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2345, Alemanha) e posteriormente coradas com tricrômico de Mallory.

Estereologia

O volume do coração foi determinado de acordo com o princípio de Cavalieri (CAVALIERI, 1635). Para tal, um sistema teste de contagem foi sobreposto às seções histológicas e visualizadas com a ajuda de um estereomicroscópio (Zeiss Stemi SV 11, Alemanha), sendo calculado como:

$V_{\text{coração}} = \sum_{i=1}^m Pi \times T \times \frac{a}{p}$, onde, $\sum Pi$ é o número total de pontos no grid que tocavam o coração, a/p é área ocupada por cada ponto central (1,21 mm²) e T (aproximadamente 0,4 mm) é a distância entre cada seção.

A porcentagem dos componentes do coração foi obtida pelo princípio de Delesse (DELESSE, 1862). Um aumento de 1000 foi empregado nos campos de vista selecionados aleatoriamente e fotografados em um microscópio (Leica DM4B, Alemanha). A densidade de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (coração) foi

calculado como: $Vv = \frac{\sum_{i=1}^m P_{\text{comp}}}{\sum_{i=1}^m P_{\text{ref}}}$, onde Vv é a densidade de volume de determinado

componente (cardiomiócitos: núcleo, citoplasma normal, citoplasma vacuolizado; vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e mastócitos) e P_{ref} é a somatória de pontos que tocam o espaço de referência (coração) (HOWARD; REED, 1998). Os dados percentuais obtidos para cada componente foram transformados em absolutos ao serem multiplicados pelo volume de Cavalieri:

$$\text{Volume absoluto (mm}^3\text{)} = Vv \times \text{Volume Cavalieri (mm}^3\text{)}$$

Análise bioquímica

A concentração plasmática de creatinoquinases totais (CK-TOTAL) foi determinada por espectrofotometria utilizando o analisador bioquímico Bio-Plus-2000 (São Paulo, Brasil). Os resultados obtidos foram analisados e interpretados de acordo com o significado clínico da sua órgão-especificidade e níveis plasmáticos.

Estatística

O programa Prisma (GraphPad Software, Inc., CA, USA) foi usado para a análise estatística e gráfica deste estudo. Os dados foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e analisados por meio de ANOVA (one-way e two-way). Nos casos

em que a diferença entre os grupos seja indicada, o teste paramétrico de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios entre os grupos experimentais. O limite de confiança estabelecido para os testes foi de 5%.

Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz foram avaliados para cada animal e o estimador da variância foi determinado usando o coeficiente de erro (C.E.) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri foi determinada de acordo com (CRUZ-ORIVE, 1999):

$$CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right) = \left[0,0724 \times \frac{B}{\sqrt{A}} \times \frac{\sqrt{n}}{\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)^{3/2}} \right]^{1/2}$$

Onde: $CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)$ indica o coeficiente de erro para a determinação do volume; $\frac{B}{\sqrt{A}}$ indica a variância das áreas transversais (*shape coefficient*) e depende da complexidade das formas da estrutura; n representa o número de seções avaliadas e $\sum_{i=1}^n Pi$ é o número de pontos contados sobre as seções.

O CE da densidade de volume foi estimado de acordo com Orive (1980), usando a equação:

$$CE(Rv) = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\sum u^2}{\sum u \sum u} + \frac{\sum v^2}{\sum v \sum v} - 2 \frac{\sum uv}{\sum u \sum v} \right\} \right]^{1/2}$$

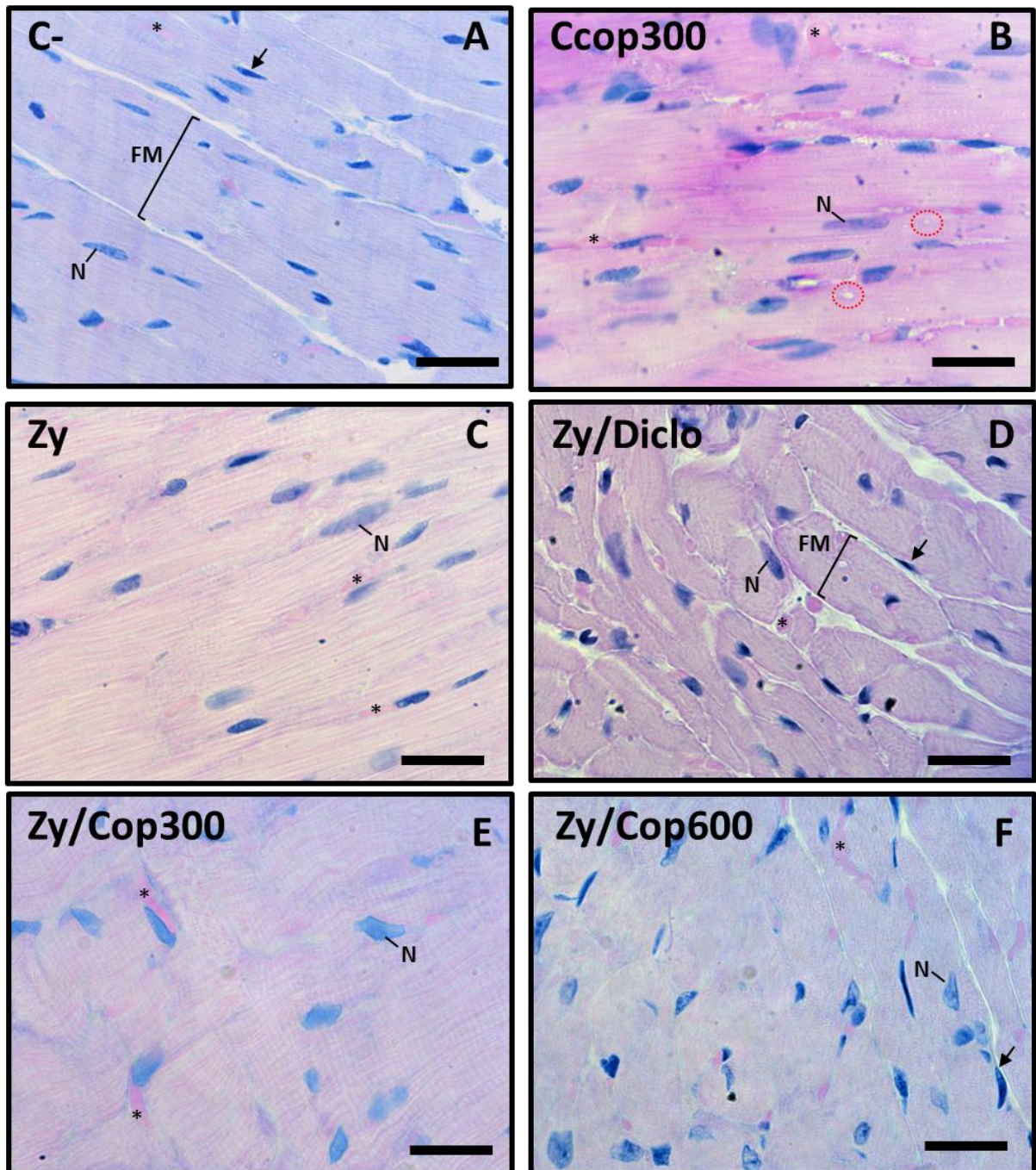
Onde: $CE(Rv)$ indica o coeficiente de erro para a determinação da relação superfície-volume ou densidade-volume; k representa o número de imagens analisadas e u e v são as contagens de interseções ou pontos efetuadas. Um $CE \leq 5\%$ será considerado satisfatório.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra os achados histológicos no coração. O tecido cardíaco apresentou estrutura normal com fibras musculares individualizadas (FM), estriações normais, núcleo central (N), fibroblastos periféricos (setas) e distribuição homogênea de capilares (*). De modo geral, não foram observadas alterações histológicas significativas nos grupos, com

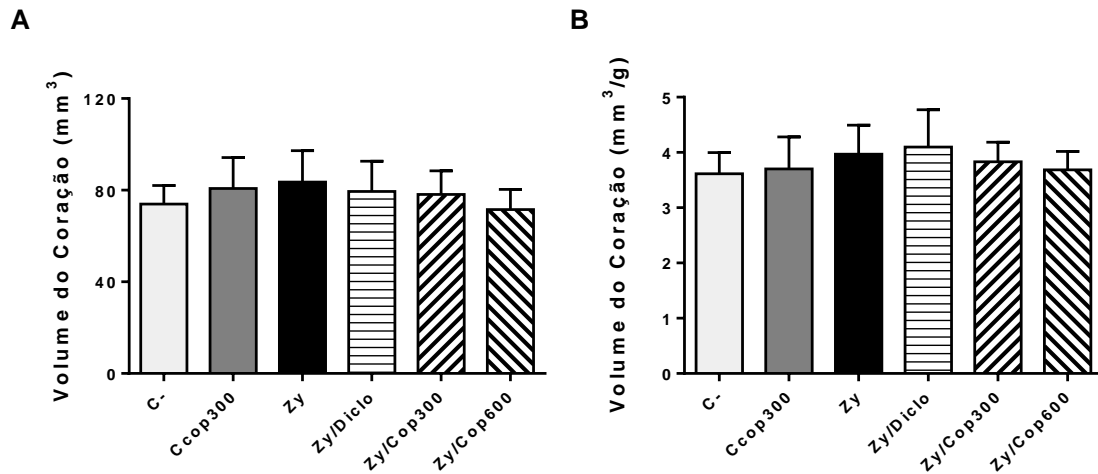
exceção do grupo Ccop300, que apresentou visível vacuolização citoplasmática (círculos pontilhados em vermelho).

Figura 1 – Fotografias da morfologia das fibras cardíacas em cortes histológicos longitudinais (A, B, C e E) e transversais (D e F) nos diferentes grupos. Barra = 20 µm. Tricrômico de Mallory. Aumento de 1000. FM: fibras musculares. N: núcleo dos cardiomiócitos. *:vasos sanguíneos. Seta: fibroblastos. Círculos pontilhados em vermelho: vacuolização.



Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao volume do coração (Figura 2A), resultado mantido quando o valor foi normalizado em função da massa corpórea do animal. (Figura 2B).

Figura 2 – Gráficos apresentando o volume médio do coração nos diferentes grupos experimentais ao final do experimento. **A.** Volume do coração em milímetros cúbicos. **B.** Volume do coração normalizado pela massa corpórea do animal. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão.



Os níveis séricos de CK-TOTAL apresentaram-se aumentados às 24 horas em relação às 96 horas, sendo o grupo experimental Zy/Diclo o único a não mostrar diferença significativa quando comparado ao grupo C- (Figura 3A). Ao se comparar os valores plasmáticos obtidos nos dois momentos de coleta em cada grupo experimental, o grupo Ccop300 e todos os grupos induzidos à artrite apresentaram aumento de CK-TOTAL às 24 horas (Figura 3B).

Em relação à densidade de volume (Vv %), o componente cardíaco com maior representatividade foi o cardiomiócito, seguido pelos vasos sanguíneos, tecido conjuntivo, outros tecidos e células do sistema imune, respectivamente (Tabela 1). Quando esses valores foram multiplicados pelo volume do órgão para a obtenção do seu valor absoluto e divididos pela massa corpórea do animal, apenas as subcategorias citoplasma normal e citoplasma vacuolizado, do componente cardiomiócito, no grupo Ccop300 apresentou diferença significativa (diminuição e aumento, respectivamente) em relação ao grupo Zy/Diclo (Figura 4).

Figura 3- Gráficos dos níveis séricos de CK-TOTAL. **A.** Comparação entre os grupos experimentais nos tempos de coleta. **B.** Comparação por grupo experimental. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. Análise estatística two-way ANOVA. * indica diferença significativa entre os grupos no mesmo tempo (A) e quando comparado ao tempo 24 horas (B). Diferença significativa quando $p < 0,05$.

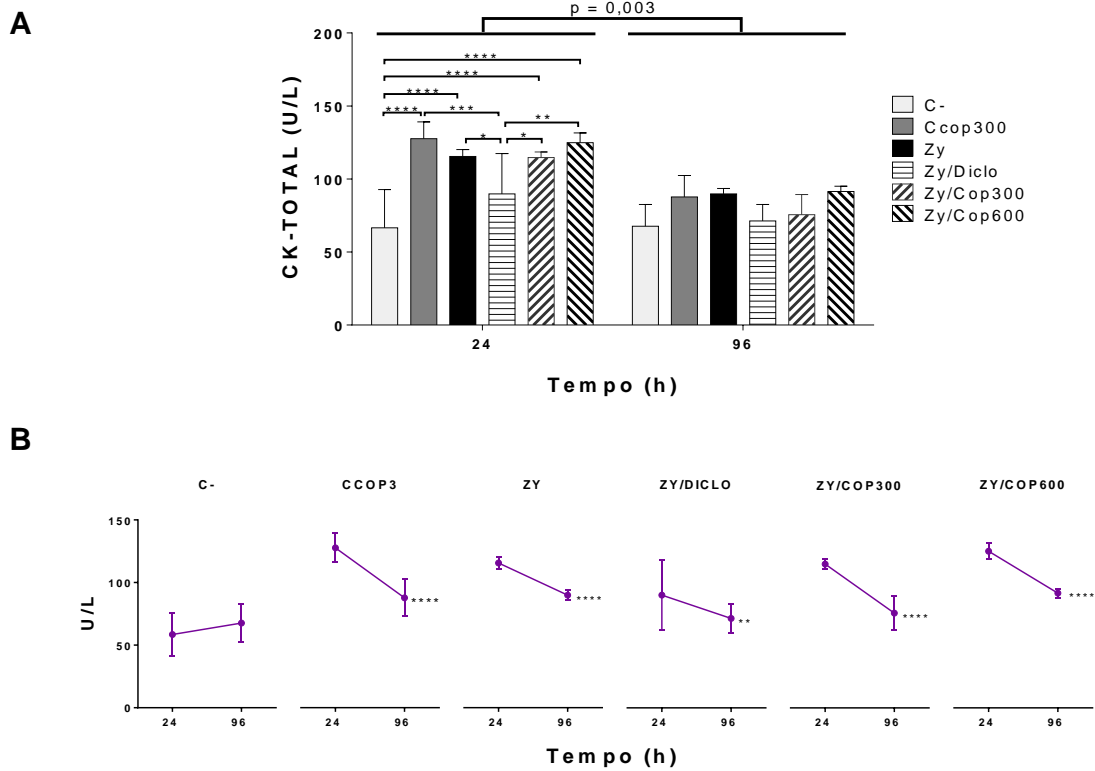
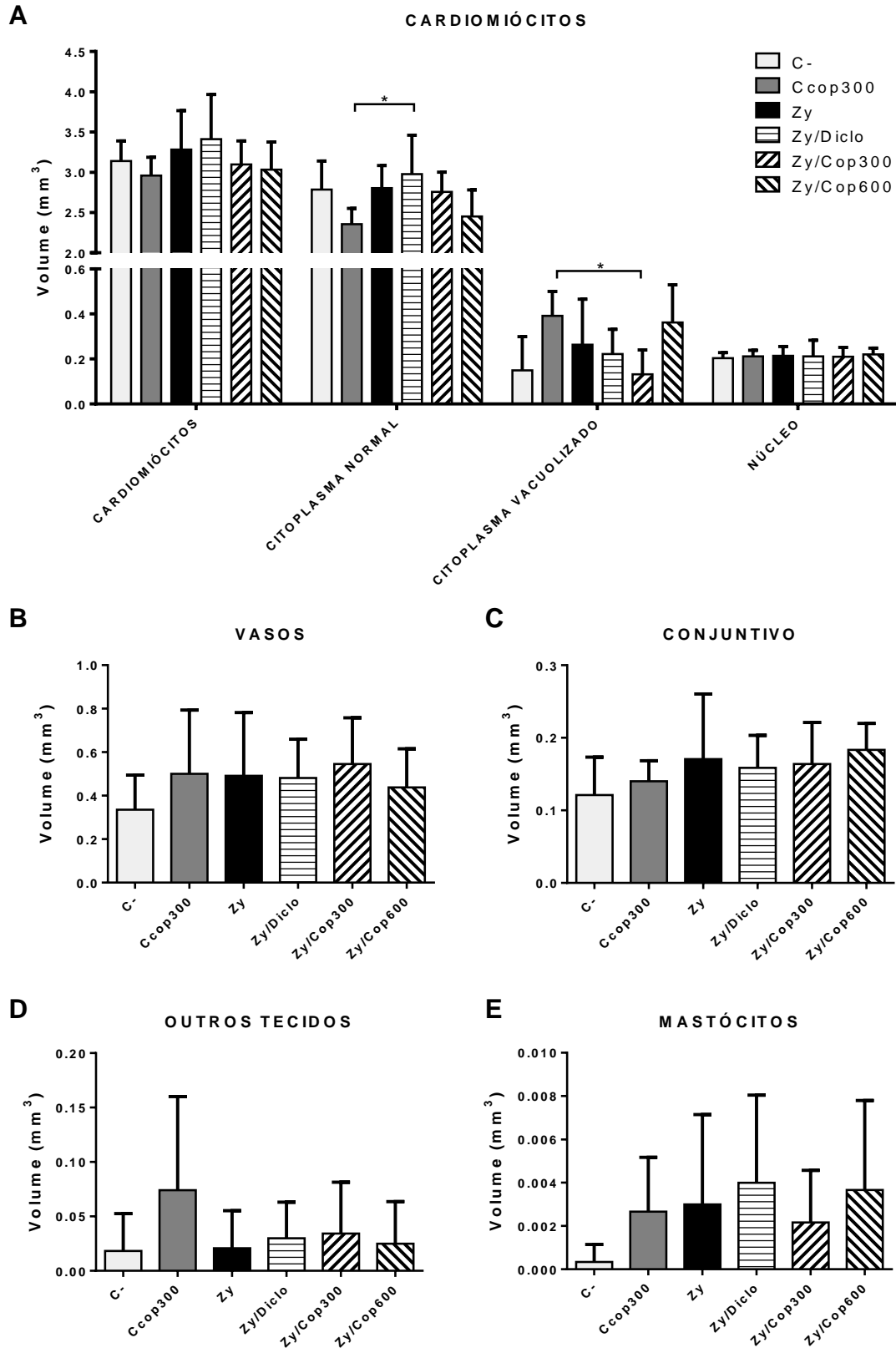


Tabela 1. Densidade de volume em porcentagem dos componentes cardíacos. **CN:** citoplasma normal; **CV:** citoplasma vacuolizado; **N:** núcleo; **C:** cardiomiócitos; **V:** vasos; **TC:** tecido conjuntivo; **OT:** outros tecidos; **M:** mastócitos. * representam subcategorias do componente cardiomiócitos.

Grupos	Vv (%)							
	CN*	CV*	N*	C	V	TC	OT	M
C-	77,00	4,46	5,64	87,00	9,04	3,39	0,46	0,01
Ccop300	64,96	10,71	5,82	81,48	12,81	3,85	1,76	0,10
Zy	71,17	6,2	5,42	82,79	12,49	4,14	0,52	0,07
Zy/Diclo	73,38	5,37	5,16	83,90	11,63	4,01	0,40	0,06
Zy/Cop300	71,85	3,44	5,45	80,74	13,90	4,24	0,97	0,05
Zy/Cop600	66,54	9,68	6,00	82,22	11,87	4,99	0,82	0,10

Figura 4 - Gráficos dos valores absolutos dos componentes cardíacos em mm^3/g . **A.** Cardiomiócitos e suas subcategorias: citoplasma normal, citoplasma vacuolizado e núcleo **B.** Vasos sanguíneos. **C.** Tecido conjuntivo **D.** Outros tecidos **E.** Mastócitos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa entre os grupos da mesma categoria. Diferença significativa quando $p < 0,05$.



DISCUSSÃO

Pacientes com AR apresentam maior risco de comprometimento cardiovascular do que pessoas sem a doença. Vários estudos tem mostrado danos cardíacos em modelo murino após inoculação de Zy (MONROE et al., 2016). No presente estudo, não detectamos alterações morfológicas substanciais no tecido cardíaco, exceto o aumento da vacuolização citoplasmática em Ccop300. A elevação de CK-TOTAL é sugestiva de dano provavelmente relacionados a outros sítios de ação do Zy e da copaíba.

O Zy é um componente da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* que, devido à característica não degradável de suas partículas, resulta num processo inflamatório prolongado em razão de sua fagocitose e consequente ativação de macrófagos (DI PAOLA et al., 2006). Isso inicia uma cascata inflamatória caracterizada por um aumento da produção de espécies reativas (ROS e RNS), que leva à ativação de vias como MAPK e NF- κ B com consequente expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias (ALLEN; TRESINI, 2000). Adicionalmente, a alta expressão de molécula de adesão ICAM-1 e VCAM-1 na parede de vasos resulta no influxo de células do sistema imune, principalmente neutrófilos (AHMAD et al., 2018). Somadas, essas características são alguns dos motivos pelos quais o Zy é amplamente empregado em estudos farmacológicos (ALVES et al., 2017; TARAYRE et al., 1989).

Apesar de ser comumente usado como modelo de indução para o estudo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e da síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS), pouco se sabe do efeito do Zy na função cardíaca. Monroe et al. (2016) demonstrou que a aplicação do Zy na região peritoneal leva a uma diminuição da condução (efeito dromotrópico negativo) e da contração ventricular (efeito inotrópico negativo) no coração, onde o primeiro pode estar relacionado com uma mediação por parte do receptor de dectina-1 e o segundo com uma mediação de citocinas como TNF- α e NO, substâncias envolvidas na inflamação causada pelo Zy (CUZZOCREA et al., 1997; MONDELLO et al., 2011) e já conhecidas por sua ação na supressão cardíaca (KAKIHANA et al., 2016). Adicionalmente, já foi reportado que o estresse oxidativo está relacionado ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e sua possível progressão a uma falência cardíaca (MADAMANCHI; RUNGE, 2013).

Entretanto, no presente estudo, o Zy não causou alterações histológicas substanciais. Isso pode ter ocorrido devido ao modelo de indução escolhido e tempo de experimentação (96 horas). Contudo sabe-se que o Zy, como indutor de AR, apresenta dois picos de edema: um

agudo (6 horas) e um crônico (> 25 dias) (FRASNELLI et al., 2005), motivo pelo qual não se pode descartar completamente a possibilidade do atual modelo inflamatório causar danos cardíacos.

Apesar de diversos estudos já terem comprovado a ação terapêutica do óleo de copaíba em diferentes enfermidades, há uma escassez na literatura sobre seu efeito no tecido cardíaco, onde a maioria apresenta um maior enfoque fisiológico e bioquímico que histológico. Um exemplo é o estudo de Campos-Carraro et al. (2018), que demonstrou um efeito cardioprotetor do óleo de copaíba ao atenuar tanto a remodelação do ventrículo esquerdo, quanto a ativação de vias de sinalização envolvidas na morte (apoptose) e sobrevivência celular. Isso pode estar relacionado à ação antioxidante do óleo, em especial dos componentes terpenos (PAPADA et al., 2018) que atenuam na sinalização apoptótica e contribuem na preservação da função cardíaca (CAMPOS-CARRARO et al., 2018).

Neste trabalho, o grupo Ccop300 levou a um aumento da vacuolização no citoplasma dos cardiomiócitos. Ainda que a vacuolização citoplasmática seja relacionada a uma resposta negativa da célula a algum estímulo externo, Shubin et al. (2016) afirma que não há dados suficientes que relacionem o processo de vacuolização à morte ou sobrevivência celular. Em contra partida, o estudo de Nayak et al. (1996) demonstrou que uma vacuolização não lipídica em hepatócitos está mais relacionada com uma tolerância a futuros danos, sendo mais uma resposta adaptativa de curta duração a lesões leves de fase aguda.

Em relação ao aumento dos níveis séricos de CK-TOTAL, estudos relatam que a caquexia é uma condição comum em pacientes com AR, sendo caracterizada por perda de massa e força muscular e considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e o excesso de mortalidade relacionados à doença (ROUBENOFF, 2009). Como o parâmetro bioquímico utilizado foi a CK-TOTAL, todas as três isomorfias foram medidas (CK-MM, CK-MB, CK-BB). Sendo assim, a elevação de seus níveis séricos pode ser referente à perda de tecido muscular, principalmente do músculo esquelético, característico da caquexia reumatoide. Em relação ao óleo de copaíba, o estudo de Medeiros et al. (2014) mostrou que esta levou a um aumento do nível sérico de CK-TOTAL, que segundo o autor pode estar relacionado a uma possível superprodução de megacariócitos pelo baço e envolvimento de plaquetas imaturas.

Levando em consideração o exposto acima, pode-se concluir que o atual modelo de indução de AR por Zy não foi capaz de causar danos histológicos significativos no coração em 96 horas de experimento, impossibilitando assim uma avaliação do efeito do óleo de

copaíba no órgão. Ainda assim, a copaíba na dose 300 mg/kg causou um aumento da vacuolização no citoplasma dos cardiomiócitos, que devido às limitações histológicas e bioquímicas deste estudo, não se pode relacionar a uma atuação benéfica ou maléfica, havendo necessidade de estudos à longo prazo para ser definir com precisão o efeito da copaíba no tecido cardíaco. Adicionalmente, a elevação dos níveis séricos de CK-TOTAL nos grupos induzidos à artrite pode estar relacionada a um dano no músculo esquelético causada pelo Zy.

REFERÊNCIAS

AHMAD, S. et al. Modulation of Chemokine- and Adhesion-Molecule Gene Expression and Recruitment of Neutrophil Granulocytes in Rat and Mouse Liver after a Single Gadolinium Chloride or Zymosan Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3891, 2018.

ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 3, p. 463–499, 2000.

ALVES, S. M. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of strontium ranelate on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats depend on TNF- α inhibition. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 4, p. 764–772, 2017.

AVIÑA-ZUBIETA, J. A. et al. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. **Arthritis & Rheumatism**, v. 59, n. 12, p. 1690–1697, 2008.

BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 4, p. 556–563, 2010.

BOERS, M. et al. Influence of glucocorticoids and disease activity on total and high density lipoprotein cholesterol in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 62, n. 9, p. 842–5, 2003.

CAMPOS-CARRARO, C. et al. Copaiba Oil Attenuates Right Ventricular Remodeling by Decreasing Myocardial Apoptotic Signaling in Monocrotaline-Induced Rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 72, n. 5, p. 214–221, 2018.

CAVALIERI, B. **Geometria indivisibilibus continuorum**.1635.

COSKUN, S. et al. Cardiac involvement in patients with rheumatoid arthritis. **APLAR Journal of Rheumatology**, v. 8, n. 1, p. 23–31, 2005.

CRUZ-ORIVE, L. M. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. **Journal of Microscopy**, v. 193, n. 3, p. 182–198, 1999.

CUZZOCREA, S. et al. Role of nitric oxide in a nonseptic shock model induced by zymosan in the rat. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 7, n. 5, p. 351–7, 1997.

DELESSE, A. **Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches - A. Delesse**. Savy, 1862.

DEMARIA, A. N. Relative risk of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. **The American Journal of Cardiology**, v. 89, n. 6, p. 33–38, 2002.

DI PAOLA, R. et al. GREEN TEA POLYPHENOL EXTRACT ATTENUATES ZYMOSAN-INDUCED NON-SEPTIC SHOCK IN MICE. **Shock**, v. 26, n. 4, p. 402–409, 2006.

FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther** 2005 7:2, v. 7, n. 2, p. R370, 2005.

GABRIEL, S. E. et al. Survival in rheumatoid arthritis: A population-based analysis of trends over 40 years. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 1, p. 54–58, 2003.

GARCIA, R.; YAMAGUCHI, M. Óleo de Copaíba e Suas Propriedades Medicinais: Revisão Bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137–146, 2012.

HOCHBERG, M. C.; JOHNSTON, S. S.; JOHN, A. K. The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n. 2, p. 469–480, 2008.

HOWARD, C. V; REED, M. G. Unbiased Stereology Three-dimensional Measurement in Microscopy Second Edition. 1998.

KAKIHANA, Y. et al. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. **Journal of Intensive Care**, v. 4, n. 1, p. 22, 2016.

MADAMANCHI, N. R.; RUNGE, M. S. Redox signaling in cardiovascular health and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, p. 473–501, 2013.

MARADIT-KREMERS, H. et al. Increased Unrecognized Coronary Heart Disease and Sudden Deaths in Rheumatoid Arthritis A Population-Based Cohort Study. **ARTHRITIS & RHEUMATISM**, v. 52, n. 2, p. 402–411, 2005.

MEDEIROS, D. et al. Study of copaiba oil on behavioral testing in rodent models by inducing neuropathic and inflammatory pain. **Journal of Experimental and Integrative Medicine**, v. 4, n. 3, p. 194, 2014.

MEUNE, C. et al. Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Rheumatology**, v. 48, n. 10, p. 1309–1313, 2009.

- MONDELLO, S. et al. Glutamine treatment attenuates the development of organ injury induced by zymosan administration in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, n. 1, p. 28–40, 2011.
- MONROE, L. L. et al. Zymosan-induced peritonitis: Effects on cardiac function, temperature regulation, translocation of bacteria and role of dectin-1. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 46, n. 6, p. 723, 2016.
- NAYAK, N. C. et al. The nature and significance of liver cell vacuolation following hepatocellular injury ? an analysis based on observations on rats rendered tolerant to hepatotoxic damage. **Virchows Archiv**, v. 428, n. 6, p. 353–365, 1996.
- NICOLA, P. J. et al. Contribution of congestive heart failure and ischemic heart disease to excess mortality in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 1, p. 60–67, 2006.
- ORIVE, L.-M. C. On the estimation of particle number. **Journal of Microscopy**, v. 120, n. 1, p. 15–27, 1980.
- PAPADA, E. et al. Bioavailability of Terpenes and Postprandial Effect on Human Antioxidant Potential. An Open-Label Study in Healthy Subjects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 3, p. 1700751, 2018.
- ROUBENOFF, R. Rheumatoid cachexia: a complication of rheumatoid arthritis moves into the 21st century. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 2, p. 108, 2009.
- SHUBIN, A. V et al. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55863–55889, 2016.
- SINGH, J. A. et al. Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2011.
- SOLOMON, D. H. et al. Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 65, p. 1608–1612, 2006.
- SUISSA, S.; KEZOUH, A.; ERNST, P. Inhaled Corticosteroids and the Risks of Diabetes Onset and Progression. **The American Journal of Medicine**, v. 123, n. 11, p. 1001–1006, 2010.
- TARAYRE, J. P. et al. Pharmacological studies on zymosan inflammation in rats and mice. 1: Zymosan-induced paw oedema in rats and mice. **Pharmacological Research**, v. 21, n. 4, p. 375–384, 1989.

FÍGADO

Ação do óleo de copaíba no fígado de camundongos num modelo de indução de Artrite Reumatoide por zymosan

Violeta Bastos de Mattos Areosa ¹, Vanda Santana Queiroz Dini ¹, Lucas Castanhola Dias ², Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes ³; Jarbas Pereira de Paula ⁴, Cacilda Satomy Yano Malmann ⁵ e Oscar Tadeu Ferreira da Costa ⁶

¹ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

² Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, AM, Brasil.

³ Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

⁴ Laboratório de Anatomia, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

⁵ Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Universitário Getúlio Vargas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

⁶ Laboratório de Microscopia Quantitativa, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

RESUMO

Devido ao seu papel central na destoxificação do organismo, o fígado possui risco aumentado a danos gerados por fármacos ou outras substâncias tóxicas, sendo a hepatotoxicidade associada ao uso de medicamentos o principal motivo para a não aprovação e retirada destes do mercado. Apesar de intervir no curso local da Artrite Reumatoide (AR), os tratamentos convencionais apresentam diversos efeitos colaterais, o que aumenta a procura por tratamentos alternativos. Na Região Amazônica o óleo de copaíba é amplamente utilizado na medicina popular devido ao seu fácil acesso e baixo custo. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) no tecido hepático num modelo animal de indução da AR pelo zymosan (Zy). Para tal, Zy foi injetado na região do coxim plantar e na articulação do joelho da pata esquerda. Trinta minutos antes da indução, os camundongos (fêmeas BALB/c, n= 36) foram tratados oralmente com solução de veículo ou óleo de copaíba (300 ou 600 mg/kg) ou diclofenaco (100 mg/kg), conforme grupo experimental. Após 96 horas de experimentação, os animais foram anestesiados e eutanasiados. O sangue e o fígado foram coletados para análises bioquímicas e estereológicas, respectivamente. Não houve alteração do volume do fígado. Houve um aumento do número de células de Kupffer nos grupos induzidos à artrite. O Zy foi o grupo a apresentar maior volume de alterações morfológicas no órgão. Conclui-se que, neste modelo de indução de artrite, o Zy causou alterações hepáticas que foram revertidas pela ação do óleo de copaíba.

Palavras-chave:Disector, células de Kupffer, hepatócitos, ALT, AST

ABSTRACT

Because of its central role in detoxification of the body, the liver is at increased risk of damage from drugs or other toxic substances, and drug-associated hepatotoxicity is the main reason for non-approval and withdrawal from the market. Despite intervening in the local course of Rheumatoid Arthritis (RA), conventional treatments have several side effects, which increases the demand for alternative treatments. In the Amazon Region, copaiba oil is widely used in folk medicine for its easy access and low cost. The objective of this study was to evaluate the effect of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) on hepatic tissue in an animal model of RA induction by zymosan (Zy). For such, Zy was injected in the region of the plantar coxim and in the knee joint of the left paw. Thirty minutes before induction, mice (females BALB/c, n = 36) were orally treated with vehicle solution or, copaiba oil (300 or 600 mg/kg) or diclofenac (100 mg/kg), according to the experimental group. After 96 hours of experimentation, the animals were anesthetized and euthanized. Blood and liver were collected for biochemical and stereological analyzes, respectively. There was no change in liver volume. There was an increase in the number of Kupffer cells in the arthritis-induced groups. The Zy group had the highest volume of morphological changes in the liver. It was concluded that in this model of arthritis induction, Zy caused hepatic changes that were reversed by the action of copaiba oil.

Keywords: Disector, Kupffer cells, hepatocytes, ALT, AST

INTRODUÇÃO

O relato de efeitos colaterais graves associados ao uso de fármacos em circulação no mercado vêm aumentando, se tornando assim um importante problema de saúde pública (MOORE; COHEN; FURBERG, 2007) e principal motivo para a sua não aprovação (JAESCHKE et al., 2002; SENIOR, 2007).

Devido à lesão hepática ser um dos efeitos colaterais mais comuns relacionados ao uso de medicamentos (SUZUKI et al., 2010), o fígado vem ganhando bastante enfoque nos estudos toxicológicos com fármacos e fitoterápicos (ACETI et al., 2002; CHITTURI; GEORGE, 2002; GARCÍA-CORTÉS et al., 2008; POLSON, 2007), principalmente por sua relação com o aumento dos casos de insuficiência hepática aguda (LAZEROW; ABDI; LEWIS, 2005; YUAN; KAPLOWITZ, 2013).

O fígado possui um risco aumentado a danos gerados por fármacos ou outras substâncias químicas devido ao seu papel central no metabolismo e destoxificação de drogas e toxinas (BLEIBEL et al., 2007) Apesar de sua habilidade regenerativa, qualquer disfunção celular ou fisiológica que impossibilite sua homeostasia irá acarretar no comprometimento de suas funções e conseqüente desenvolvimento de doenças hepáticas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

O diagnóstico de lesões hepáticas causadas por drogas é um desafio para os clínicos pois tende a ser baseado em evidências circunstanciais (KAPLOWITZ, 2001). Isso ocorre porque os eventos hepáticos adversos devido a drogas podem imitar todas as formas de doenças hepatobiliares agudas e crônicas (ZIMMERMAN, 2000), além do que muitos dos metabólitos intermediários responsáveis pelo efeito tóxico possuem uma curta meia-vida, o que dificulta sua detecção nos exames clínicos comuns (PARK et al., 2005). Ademais, biópsias têm se mostrado ineficazes como ferramentas de diagnóstico de hepatotoxicidade de drogas por indicarem apenas o tipo e grau de lesão hepática em vez da etiologia (VERMA; KAPLOWITZ, 2009).

A hepatotoxicidade de fármacos padrões ou alternativos é de grande preocupação de órgãos reguladores, sendo citado como uma das principais razões para retirada de medicamentos do mercado (XU; DIAZ; O'BRIEN, 2004). Esse panorama torna fundamental que para o desenvolvimento, a comercialização e administração de medicamentos sejam

realizados testes pré-clínicos e clínicos que se estabeleçam a segurança e eficácia dos mesmos (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Levando-se em consideração o alto custo, os efeitos colaterais e o potencial tóxico dos tratamentos convencionais para Artrite Reumatoide (AR) atualmente disponíveis no mercado, têm-se uma necessidade por tratamentos terapêuticos que sejam eficazes e seguros. Na Região Amazônica, o óleo de copaíba é um produto natural de destaque devido a sua ampla utilização na medicina popular. Apesar de diversos estudos voltados para a ação terapêutica do óleo de copaíba (GARCIA; YAMAGUCHI, 2012), há uma escassez na literatura sobre sua toxicidade (SACHETTI et al., 2009). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) no tecido hepático num modelo animal de indução da AR pelo zymosan (Zy).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Camundongos BALB/c fêmeas, pesando entre 17-22 g, foram fornecidos pelo Biotério Central do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e mantidos em ambiente com temperatura controlada a 20-22 °C, ciclo de claro-escuro a cada 12 horas e livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (CEUA-INPA), sob o protocolo 048/2016 (ANEXO I).

Obtenção do óleo de copaíba

O óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) destilado foi fornecido pelo Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM coordenado pelo Prof. Dr. Emerson Lima.

Delineamento experimental

Os camundongos (n= 36) foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais: C- (controle negativo; sem indução da AR/veículo), Ccop300 (controle

copaíba; sem indução da AR/copaíba 300 mg/kg), Zy (indução da AR/veículo), Zy/Diclo (indução da AR/diclofenaco 100 mg/kg), Zy/Cop300 (indução da AR/copaíba 300 mg/kg) e Zy/Cop600 (indução da AR/copaíba 600 mg/kg).

Pré-tratamento e indução da artrite

A indução da artrite foi feita por meio de injeção de solução contendo 500 µg de Zy (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em 25 µL de solução salina estéril na região do coxim plantar da pata posterior e na região intra-articular do joelho esquerdo. Trinta minutos antes da injeção de Zy, os camundongos foram tratados oralmente com solução veículo (Tween 20 e salina), óleo de copaíba (300 ou 600 mg/kg) ou diclofenaco (100 mg/kg), conforme grupo experimental.

Coleta, fixação e processamento das amostras

O sangue foi coletado em dois momentos do experimento (24 horas e 96 horas após indução da AR) via plexo venoso oftálmico. Em seguida, o mesmo foi centrifugado e o plasma foi mantido a baixa temperatura em microtubos heparinizados para posterior análise bioquímica. Ao final do experimento (96 horas), os animais foram anestesiados com cetamina (82 mg/kg) e xilazina (5,75 mg/kg) e então eutanasiados. O fígado foi imediatamente fixado em solução de formaldeído tamponado. Para o processamento histológico, as amostras foram sistemática e aleatoriamente orientadas (*smooth fractionator* - SUR) para a geração de isotropia. Em seguida, as mesmas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70 e 96%), infiltradas e incluídas em moldes individuais preenchidos com resina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraues, Alemanha). Seções histológicas (6 seções, 3µm) foram obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2345, Alemanha) e posteriormente coradas com azul de toluidina e fucsina.

Volumetria por deslocamento de fluido (Scherle)

A determinação do volume absoluto do fígado foi feita por deslocamento de fluido segundo Scherle, (1970) utilizando uma balança analítica (Shimadzu AY220, Japão). O volume final do órgão foi obtido após a correção da densidade do fluido utilizado segundo a equação: $V = \frac{W}{\rho}$, onde V , volume do órgão; W , peso do órgão imerso e ρ é a densidade do fluido (formol tamponado = 1,007 g. cm³).

Estereologia

A porcentagem dos componentes do fígado foi obtida pelo princípio de Delesse (DELESSE, 1862). Um aumento de 1000 foi empregado nos campos de vista selecionados aleatoriamente e fotografados em um microscópio (Leica DM4B, Alemanha). A densidade de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (fígado) foi

calculado como: $Vv = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$, onde Vv é a densidade de volume de determinado

componente (hepatócitos totais: anucleados, mononucleados e polinucleados; estroma: vasos, ductos e sinusoide; alterações morfológicas e células de Kupffer) e P_{ref} é a somatória de pontos que tocam o espaço de referência (fígado) (HOWARD; REED, 1998). Os dados percentuais obtidos para cada componente foram transformados em absolutos ao serem multiplicados pelo volume de Cavalieri:

$$\text{Volume absoluto (mm}^3\text{)} = Vv \times \text{Volume Cavalieri (mm}^3\text{)}$$

Uma quantificação 3-D foi empregada para a determinação do número de células de Kupffer por meio do *Disector* (ANEXO II) (HOWARD; REED, 1998; STERIO, 1984). Com o auxílio de um microscópio de luz (Olympus BX41, Japão) no aumento 1000, “mergulhou-se” 15µm nas sessões histológicas grossas (25µm). Um negatoscópio refletiu e projetou sobre a seção a imagem do sistema teste de contagem (seis por campo de vista) que serviram de referencial para a contagem do número de células de Kupffer. A densidade numérica foi calculada segundo a equação: $Nv = \frac{1}{a \times h} \times \frac{\sum_{i=1}^m Q-}{\sum_{i=1}^m Pi}$ Onde: a/f é a área do sistema teste

de contagem; h é a altura do disector (altura de mergulho na seção); $\sum Q-$ é a contagem de núcleos das células de interesse; $\sum P$ é a contagem de pontos que tocam o espaço de referência (órgão). Os resultados foram multiplicados pelo volume de do órgão (Scherle) respectivo para a obtenção do número total de células.

Análise bioquímica

A concentração plasmática de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foi determinada por espectrofotometria utilizando o analisador bioquímico Bio-Plus-2000 (São Paulo, Brasil). Os resultados obtidos foram analisados e interpretados de acordo com o significado clínico da sua órgão-especificidade e níveis plasmáticos.

Estatística

O programa Prisma (GraphPad Software, Inc., CA, USA) foi usado para a análise estatística e gráfica deste estudo. Os dados foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e analisados por meio de ANOVA (ONE-WAY e TWO-WAY). Nos casos em que a diferença entre os grupos seja indicada, o teste paramétrico de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios entre os grupos experimentais. O limite de confiança estabelecido para os testes foi de 5%.

Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz foram avaliados para cada animal e o estimador da variância foi determinado usando o coeficiente de erro (C.E.) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri foi determinada de acordo com (CRUZ-ORIVE, 1999):

$$CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right) = \left[0,0724 \times \frac{B}{\sqrt{A}} \times \frac{\sqrt{n}}{\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)^{3/2}} \right]^{1/2}$$

Onde: $CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)$ indica o coeficiente de erro para a determinação do volume; $\frac{B}{\sqrt{A}}$ indica a variância das áreas transversais (*shape coefficient*) e depende da complexidade das formas da estrutura; n representa o número de seções avaliadas e $\sum_{i=1}^n Pi$ é o número de pontos contados sobre as seções.

O CE da densidade de volume foi estimado de acordo com Orive, (1980) usando a equação:

$$CE(Rv) = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\sum u^2}{\sum u \sum u} + \frac{\sum v^2}{\sum v \sum v} - 2 \frac{\sum uv}{\sum u \sum v} \right\} \right]^{1/2}$$

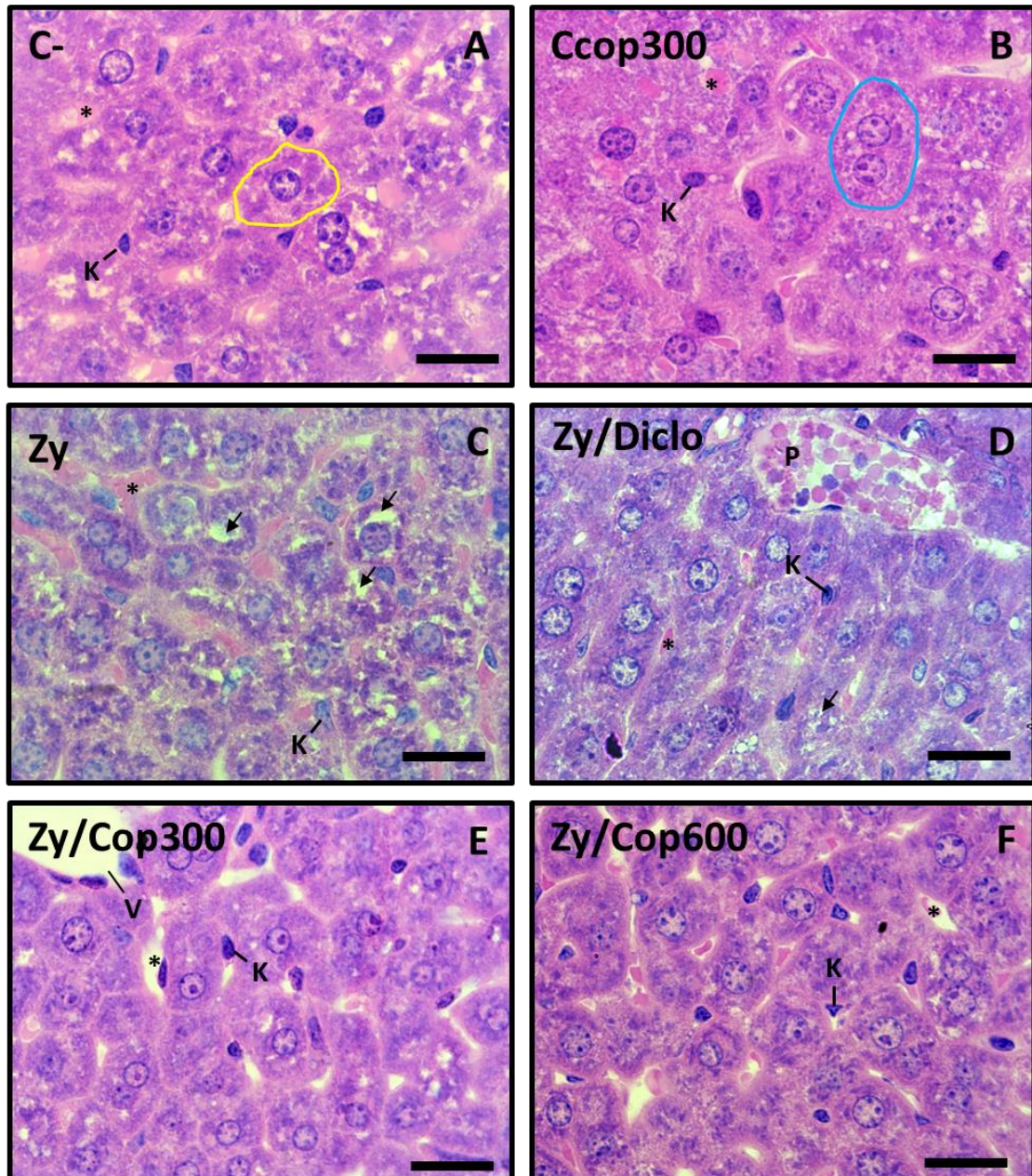
Onde: $CE(Rv)$ indica o coeficiente de erro para a determinação da relação superfície-volume ou densidade-volume; k representa o número de imagens analisadas e u e v são as contagens de interseções ou pontos efetuadas. Um $CE \leq 5\%$ será considerado satisfatório.

Para as análises multivariadas utilizou-se o programa PAST-Paleontological Statistics, versão 3.14 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001)

RESULTADOS

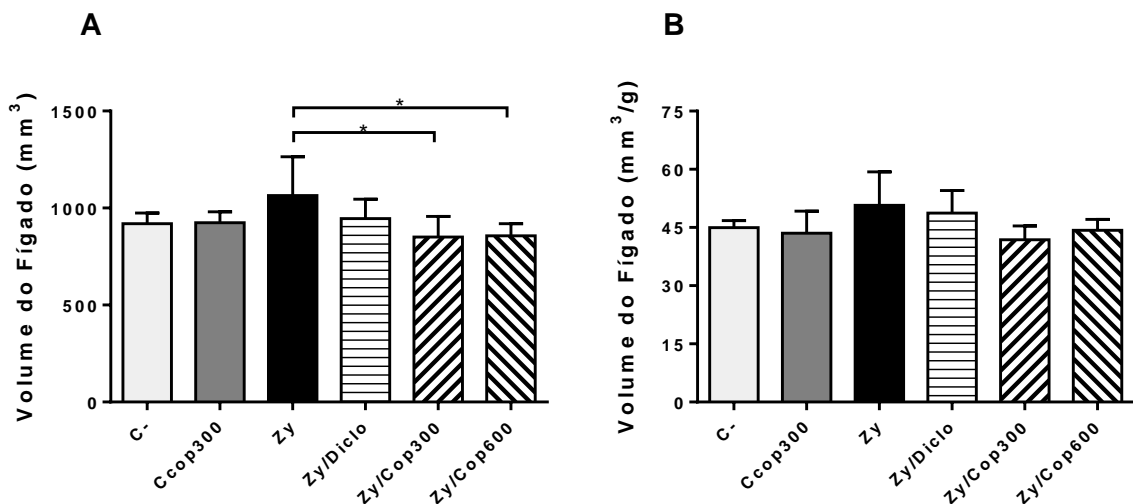
A Figura 1 apresenta os achados histológicos no fígado. No grupo C-, o parênquima hepático apresentou hepatócitos de distribuição homogênea, mono (contorno amarelo) e polinucleados (contorno azul), citoplasma apresentando granulações, ausência de vacuolização e espacia células de Kupffer (K) ao longo dos sinusoides (*). Os grupos Zy e Zy/Diclo apresentaram um aumento de alterações morfológicas (setas) em comparação aos outros grupos experimentais.

Figura 1 - Fotografias da morfologia do parênquima e estroma hepáticos nos diferentes grupos. Barra = 20 μ m. Azul de toluidina e fucsina. Aumento de 1000. K: células de Kupffer; P: espaço porta; V: vênula; *: sinusoide; seta: alterações morfológicas; Contorno amarelo: hepatócito mononucleado; Contorno azul: hepatócito binucleado.



O volume do fígado (mm^3) esteve aumentado no grupo Zy em relação aos grupos Zy/Cop300 e Zy/Cop600 (Figura 2A). Após normalização do volume em função da massa corpórea do animal, os grupos não mostraram diferença significativa (Figura 2B).

Figura 2 - Gráficos dos volumes médios do fígado nos diferentes grupos experimentais ao final do experimento. **A.** Volume do fígado em milímetros cúbicos. **B.** Volume do fígado normalizado pela massa corpórea do animal. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa entre os grupos no mesmo tempo. Diferença significativa quando $p < 0,05$.



Os níveis séricos de ALT mostraram-se elevados às 96 horas em relação às 24 horas de experimentação. Neste último, os grupos Ccop300 e Zy/Cop300 tiveram níveis menores ao do grupo C-, enquanto que 96 horas, o grupo Zy/Diclo exibiu níveis séricos menores aos dos grupos C-, Zy/Cop300 e Zy/Cop600 (Figura 3A). Em relação à AST, não houve diferença significativa entre os tempos 24 e 96 horas, nem entre os grupos nos respectivos tempos (Figura 3B).

Ao se comparar os valores plasmáticos obtidos nos dois momentos de coleta em cada grupo experimental, o AST não mostrou diferença significativa em nenhum dos grupos, enquanto que o ALT dos grupos Zy/Cop300 e Zy/Cop600 apresentaram um aumento às 96 horas (Figura 3C).

Em relação à densidade de volume ($V_v \%$), o componente hepático com maior representatividade foi o hepatócito, seguido pelo estroma, alterações morfológicas e células de Kupffer (Tabela 1). Quando esses valores foram multiplicados pelo volume do órgão para a obtenção do seu valor absoluto, todas as categorias apresentaram diferença significativa entre os grupos, com exceção dos hepatócitos e suas subcategorias (Figura 4A).

Figura 3 – Gráficos dos parâmetros bioquímicos usados para avaliação de alterações hepáticas. **A.** Níveis séricos de ALT **B.** Níveis séricos de AST. **C.** Comparação entre os níveis séricos de ALT e AST em cada grupo experimental. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa entre os grupos no mesmo tempo (A e B) e quando comparado ao tempo 24 h (C). Diferença significativa quando $p < 0,05$.

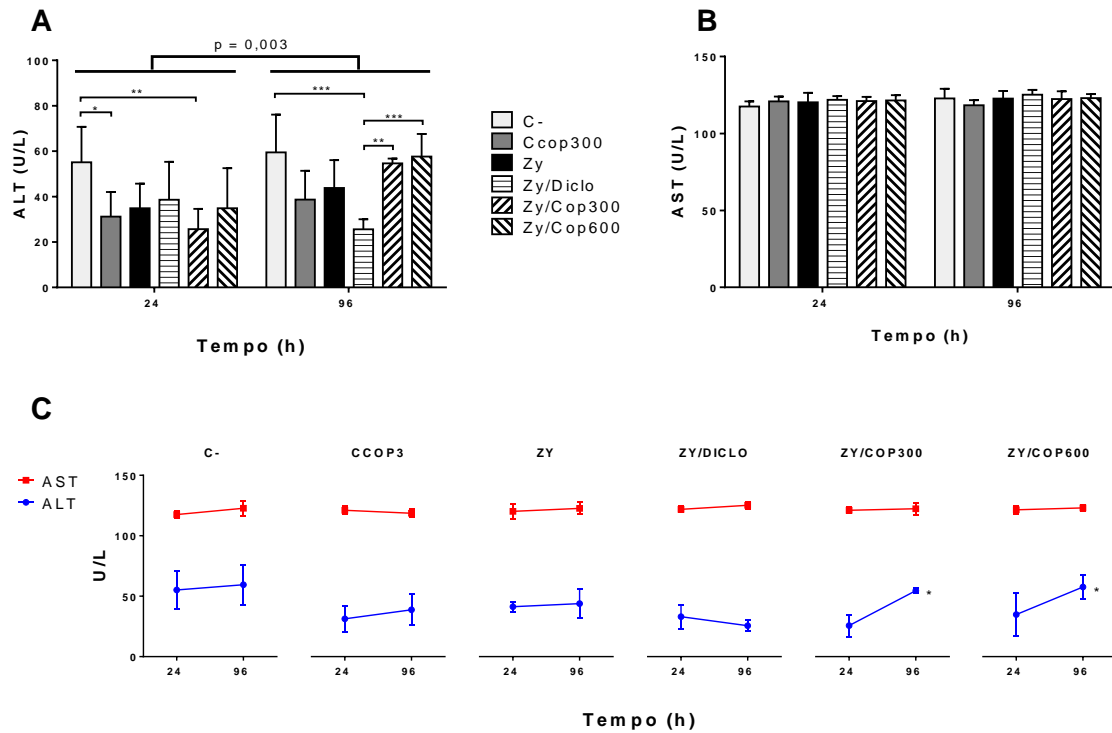
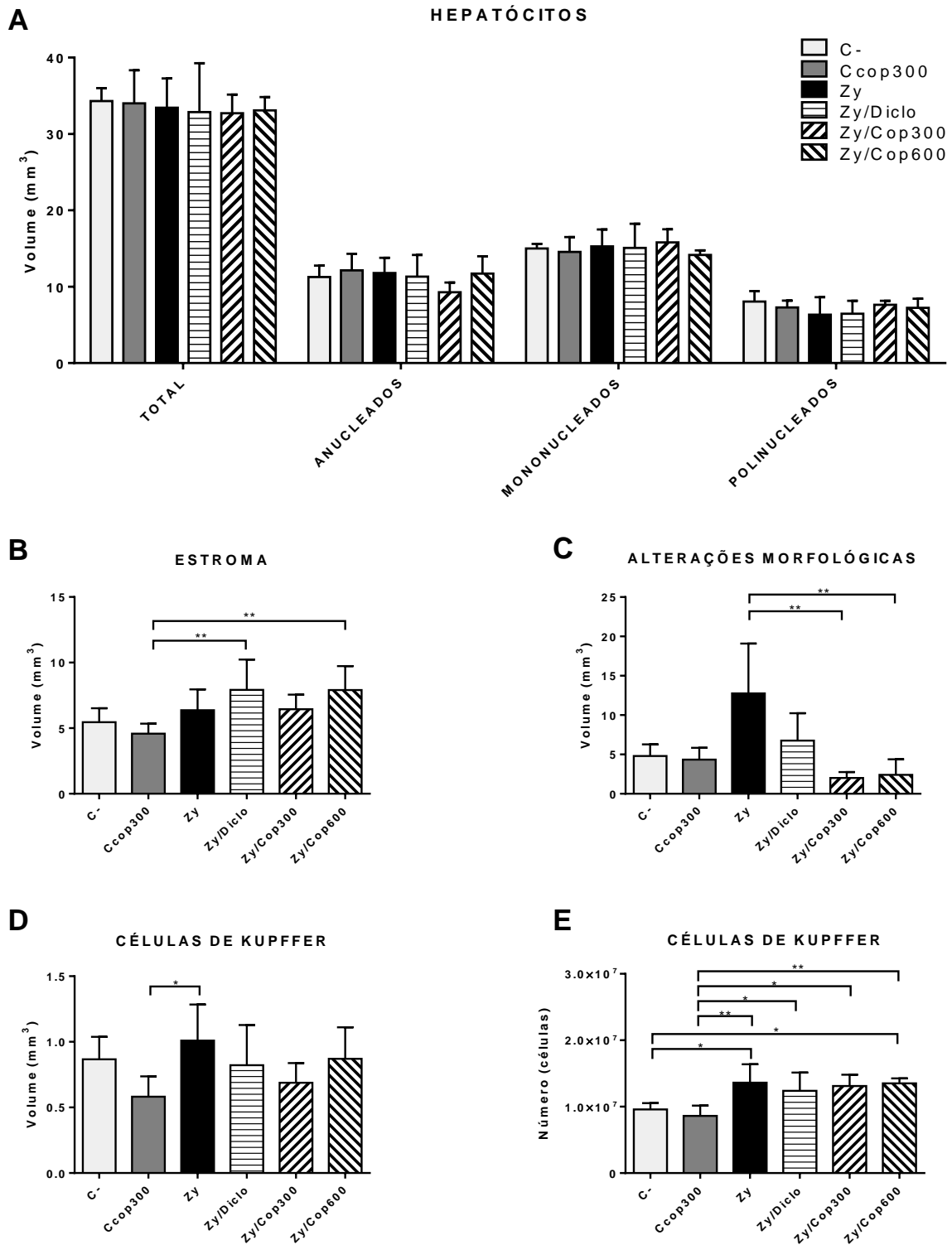


Tabela 1. Densidade de volume em porcentagem dos componentes hepáticos. **HA:** hepatócitos anucleados; **HM:** hepatócitos mononucleados; **HP** hepatócitos polinucleados; **HT:** hepatócitos totais; **E:** estroma; **AM:** alterações morfológicas; **CK:** células de Kupffer. * representam subcategorias do componente hepatócitos totais

Grupos	Vv (%)						
	HA*	HM*	HP*	HT	E	AM	CK
C	77,00	4,46	5,64	87,00	9,04	3,39	0,46
Ccop300	64,96	10,71	5,82	81,48	12,81	3,85	1,76
Zy	71,17	6,2	5,42	82,79	12,49	4,14	0,52
Zy/Diclo	73,38	5,37	5,16	83,90	11,63	4,01	0,40
Zy/Cop300	71,85	3,44	5,45	80,74	13,90	4,24	0,97
Zy/Cop600	66,54	9,68	6,00	82,22	11,87	4,99	0,82

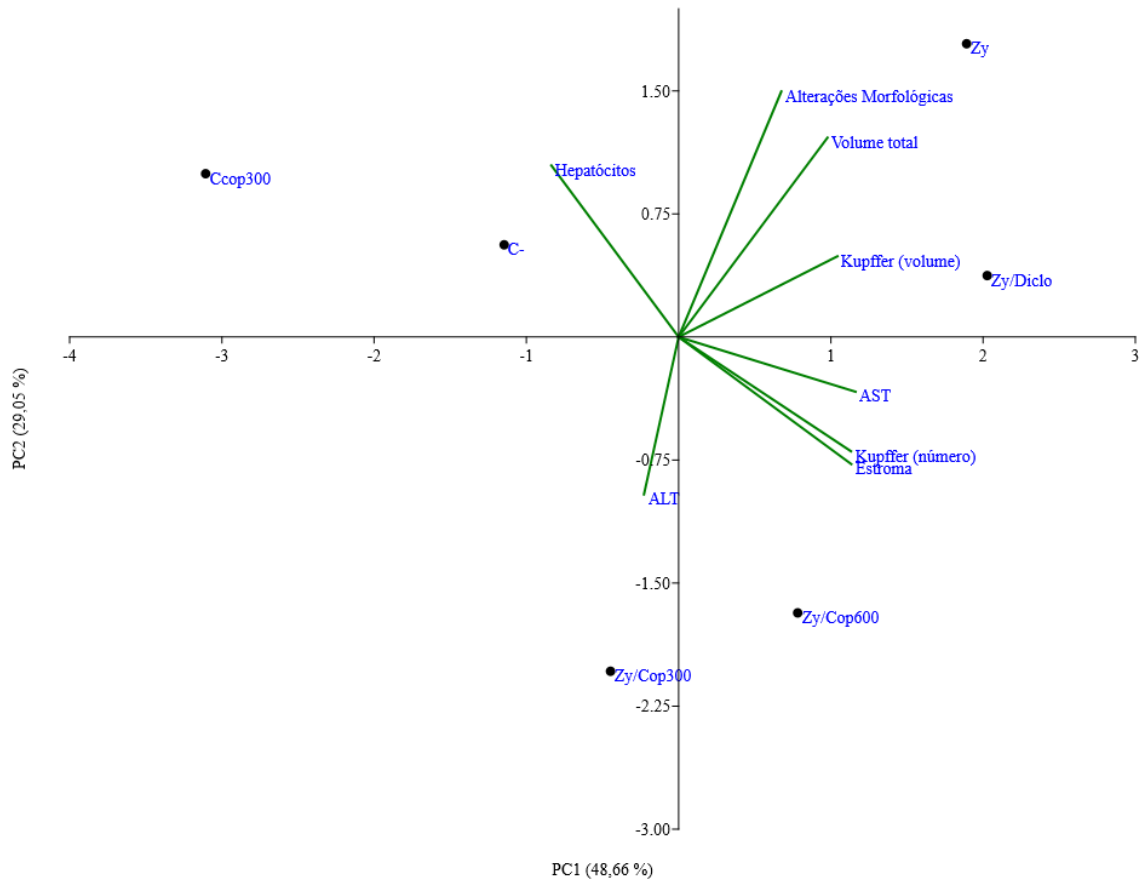
Figura 4 – Gráficos com os valores absolutos (A, B, C e D) e número de células (E) dos componentes hepáticos. **A.** Hepatócitos e suas subcategorias: hepatócitos anucleados, mononucleados e polinucleados. **B.** Estroma. **C.** Alterações morfológicas. **D.** Células de Kupffer (volume). **E.** Células de Kupffer (número). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa entre os grupos da mesma categoria. Diferença significativa quando $p < 0,05$.



Na categoria estroma, os grupos Zy/Diclo e Zy/Cop600 apresentaram um volume aumentado em relação ao do Cop300 (Figura 4B). Já o grupo Zy foi o que teve maior volume de alterações morfológicas, com diferença significativa quando comparado aos grupos Zy/Cop300 e Zy/Cop600 (Figura 4C), além de um volume aumentado de células de Kupffer quando comparado ao grupo Ccop300 (Figura 4D).

O número de células de Kupffer aumentou em todos os grupos onde houve a indução da artrite quando comparados ao grupo Ccop300, mas apenas os grupos Zy e Zy/Cop600 aumentaram em relação ao grupo C- (Figura 4E).

Figura 5 - Gráfico da análise dos componentes principais dos dados morfométricos e bioquímicos.

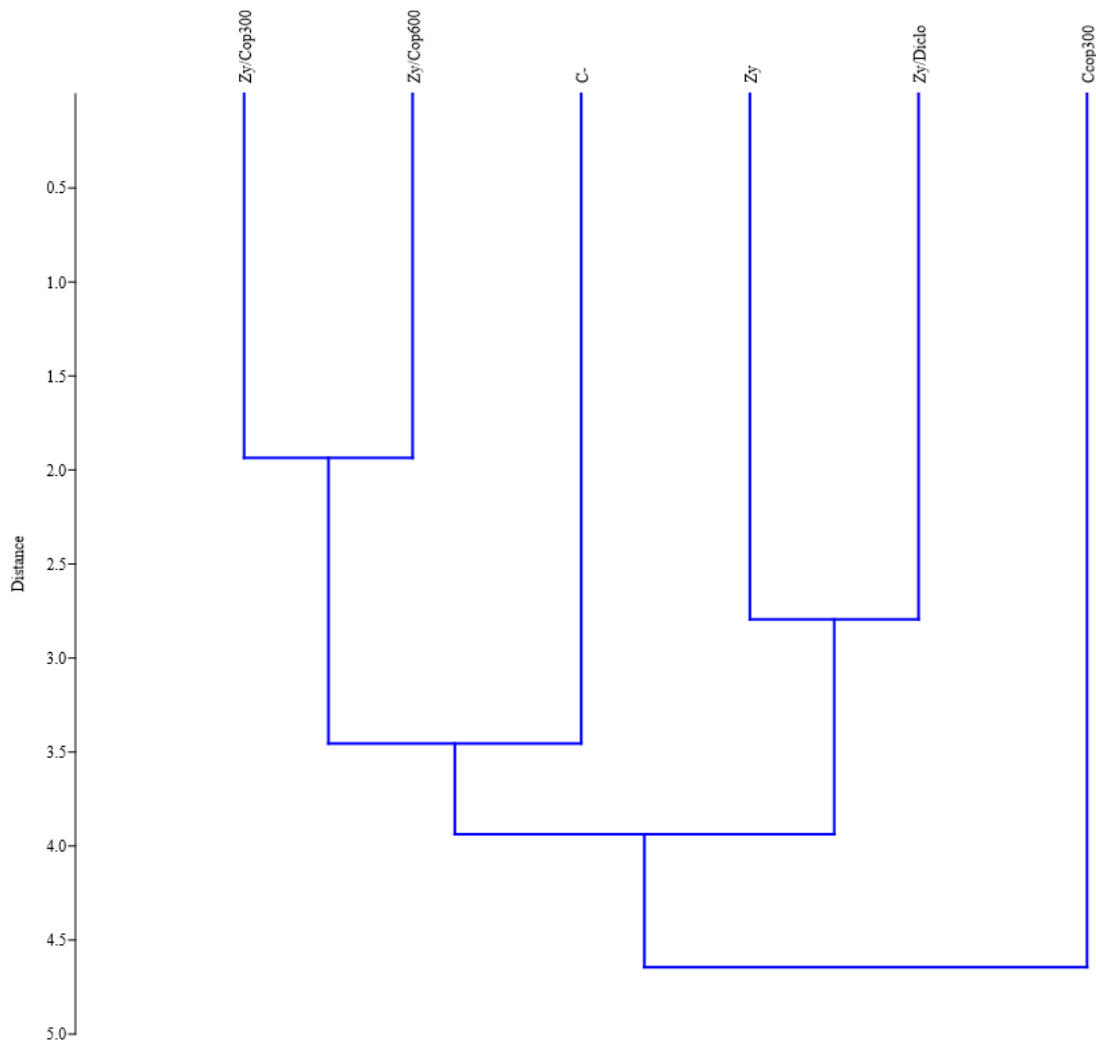


As variáveis morfológicas obtidas no presente estudo (8 no total) foram analisadas de forma multivariada (PCA, análise dos componentes principais). A Figura 5 apresenta as correlações obtidas. A análise reduziu a complexidade dos dados em 2 componentes (PC1 e PC2). No total, esses dois componentes explicaram mais de 77 % da variabilidade dos dados

(PC1 = 48,66 % e PC2 = 29,05 %). Os grupos Zy e Zy/Diclo mostraram proximidade sugerindo respostas similares e em comum apresentaram maiores valores para o número e volume de células de Kupffer, AST e estroma. Essas variáveis apresentaram alta correlação positiva e foram inversamente correlacionadas à variável hepatócitos.

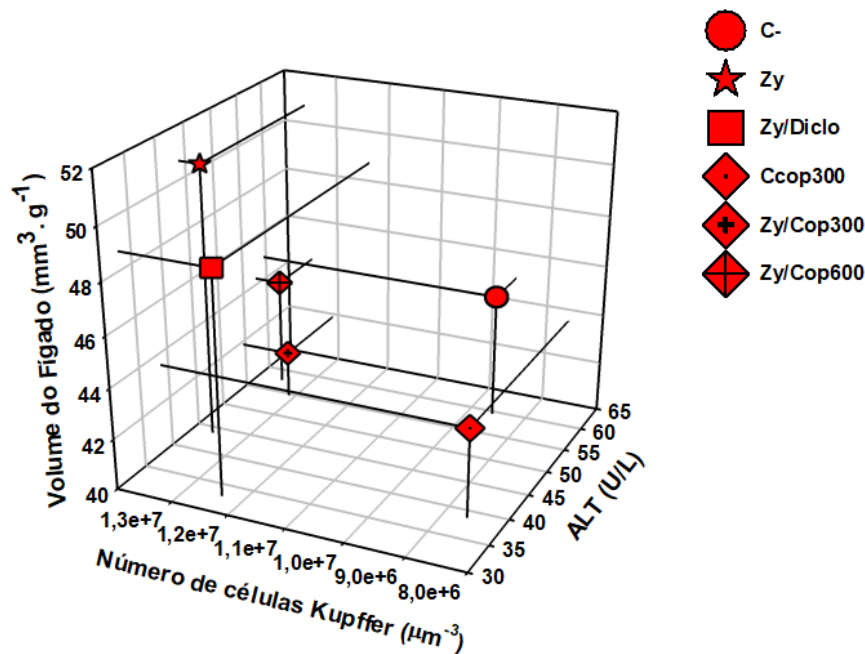
A análise de agrupamento (clustering) foi usada como uma técnica de reconhecimento de padrões para determinar as relações entre os grupos. Os grupos Zy/Cop300 e Zy/Cop600 apresentaram elevada similaridade e proximidade ao C- (Figura 6). Em oposição, Zy e Zy/Diclo foram mais similares entre si e distantes dos demais grupos, exceto do tratamento Ccop300.

Figura 6 – Gráfico da análise de agrupamento (Clustering) dos grupos deste estudo.



A Figura 7 apresenta um gráfico 3D com a relação da concentração sérica de ALT, o número de células de Kupffer e o volume do fígado. O tratamento C- caracteriza-se por maior ALT, menor número de células de Kupffer e um volume de fígado mediano. Todos os grupos com copaíba apresentam um volume do fígado relativamente menor que o do grupo C-, sendo o Ccop300 mais próximo ao último em relação ao número de células de Kupffer. Os demais apresentam um valor aumentado desses tipos celulares, sendo os grupos Zy e Zy/Diclo os que apresentam um maior volume do órgão.

Figura 7 – Gráfico 3D mostrando a relação entre os parâmetros volume do fígado, número de células de Kupffer e níveis séricos de ALT nos grupos analisados.



DISCUSSÃO

No presente estudo, o Zy causou alterações morfológicas e levou a um aumento do número de células de Kupffer no tecido hepático. Apesar do aumento no número desses macrófagos ter acontecido em todos os grupos induzidos à artrite pelo Zy, apenas o grupo sem tratamento (Zy) apresentou alterações morfológicas aumentadas, indicando um papel protetor dos grupos tratados com as diferentes doses de copaíba (300 e 600 mg/kg) já que estes foram os únicos a apresentar diferença significativa com o grupo Zy nessa categoria. Os níveis de

ALT se mostraram elevados apenas nos grupos Zy/Cop300 e Zy/Cop600, o último apresentando também um aumento de volume do estroma.

O fígado executa funções fundamentais para o organismo, como desintoxicação e filtragem de micro-organismos, motivo pelo qual apresenta a maior quantidade proporcional de macrófagos em relação a todos os órgãos sólidos do corpo humano (GUILLIAMS et al., 2016). Dentre os diferentes tipos celulares com capacidade fagocitária presentes no tecido hepático, o destaque vai para as células de Kupffer que, por residirem dentro do lúmen dos sinusoides hepáticos, possuem um papel chave na remoção de micro-organismos, toxinas e restos metabólicos que chegam ao fígado via veia porta (trato intestinal) e via artérias hepáticas (circulação sanguínea) (FOX; THOMAS; BROITMAN, 1987; YAN; LI; LI, 2014).

Além de sua atuação como fagócitos profissionais no “clearance” dos sinusoides hepáticos, as células de Kupffer também atuam na manutenção da tolerância imunológica, da integridade e da homeostase tecidual (JENNE; KUBES, 2013; OKABE; MEDZHITOV, 2016; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015). Essa gama de atuações só é possível devido a expressão de diversos receptores de membrana, incluindo receptores Toll-like (TRLs), receptores scavengers (SR), receptores do Complemento (C3aR e C5aR), entre outros.(DECKER, 1990; JENNE; KUBES, 2013; KRENKEL; TACKE, 2017; LOEGERING, 1986; SU, 2002).

No presente estudo, todos os grupos experimentais onde houve indução da AR pelo Zy apresentaram aumento do número de células de Kupffer. Vários trabalhos já demonstraram que o Zy leva a uma hiperplasia destes tipos celulares no fígado (BOUWENS; KNOOK; WISSE, 1986; C DIESELHOFF-DEN DULK; CROFTON; VAN FURTH, 1979), sendo esta uma característica proeminente de qualquer tipo de lesão hepática (KARLMARK et al., 2009).

Ademais, o grupo experimental Zy foi o que apresentou o maior volume de alterações morfológicas no fígado. Estudos mostram que esse dano é causado por um processo inflamatório iniciado pela ativação de macrófagos, incluindo as células de Kupffer, pelo Zy principalmente via receptor dectina-1 (BROWN et al., 2003), mas não exclusivamente (GANTNER et al., 2003). Isso gera um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, por sua vez, leva à ativação de vias de sinalização como a MAPK e NF-κB (ALLEN; TRESINI, 2000) e consequente aumento da expressão de quimiocinas e citocinas inflamatórias. Adicionalmente, o estudo de Ahmad et al. (2018) demonstrou que uma sobrecarga fagocitária nas mesmas causada pelo Zy resulta numa expressão gênica aumentada

de moléculas de adesão “positivas” como ICAM-1 e VCAM-1 no fígado, resultando no influxo aumento de neutrófilos na área porta do órgão.

De modo geral, os mecanismos comentados acima representam alguns dos fatores responsáveis pela ação inflamatória do Zy e seu conseqüente envolvimento na patogênese de diversos órgãos, incluindo fígado (GALUPPO et al., 2010; HONG et al., 2016; MONROE et al., 2016). Isso nos leva a crer que as alterações morfológicas vistas no grupo Zy se deu principalmente pelo aumento do número das células de Kupffer e pelo influxo de células imunes, como por exemplo neutrófilos, o que levou ao aumento da liberação espécies reativas (ROS e RNS) e de enzimas no fígado, resultando assim em dano tecidual causado tanto por um estresse oxidativo quanto pelo processo inflamatório, respectivamente.

Apesar de também apresentarem um aumento do número de macrófagos, os grupos Zy/Cop300 e Zy/Cop600 não mostraram diferença significativa com os grupos controles em relação ao volume de alterações morfológicas, o que nos leva a crer que, no presente estudo, o óleo de copaíba reverteu o dano hepático induzido pelo Zy.

Isso provavelmente se deu pela ação anti-inflamatória da copaíba, já bem documentada na literatura. Basile et al. (1988) demonstrou que esta ação está relacionada a uma diminuição da permeabilidade vascular, resultando na diminuição do influxo de células imunes. Já o trabalho de Castro Ghizoni et al. (2017) mostrou que o óleo de copaíba não somente levou a uma diminuição da glicólise, mas também do estresse oxidativo no tecido hepático.

Tendo em vista que as células de Kupffer são macrófagos, deve-se levar em consideração sua já conhecida polarização entre os perfis M1 (pró-inflamatório) e M2 (reparo tecidual e imunomodulação). Estudos demonstram que esta mudança está intimamente relacionada às alterações metabólicas, com um metabolismo glicolítico para o perfil M1 e um metabolismo oxidativo para o perfil M2 (GALVÁN-PEÑA; O'NEILL, 2014).

Com isso, pode-se supor que apesar do número aumentado das células de Kupffer no fígado, a copaíba está tendo uma ação anti-inflamatória ao atuar numa possível polarização deste tipo celular para um perfil M2, numa diminuição do estresse oxidativo e do influxo de células inflamatórias, os principais responsáveis pela inflamação causada pelo Zy, inibindo assim o dano tecidual causado pelo mesmo. Contudo, para confirmação desses dados são necessários alguns testes adicionais como a dosagem de citocinas, análise do estresse oxidativo (níveis de NO, ROS e RNS) e do perfil metabólico das células de Kupffer (glicólise e β -oxidação).

Em contra partida, o grupo Zy não apresentou aumento dos níveis séricos de ALT, sendo os grupos Zy/Cop300 e Zy/Cop600 os únicos com tal elevação. Apesar disso, é importante salientar que essa diferença significativa foi resultado da comparação dos níveis séricos nos tempos 24 e 96 horas dos respectivos grupos, e que a mesma se encontra dentro dos limites dos valores de referência para a enzima em BALB/c disponíveis na literatura (BARBOSA et al., 2017; SPINELLI et al., 2012). Somando-se ao fato de que não houve diferença dos níveis de ALT dos dois grupos com o grupo C- às 96 horas, período de elevação dos níveis séricos da enzima em lesões hepáticas agudas, estes devem ser desconsiderados como parâmetro para determinação de dano hepático, fato corroborado pela diminuição de alterações morfológicas em ambos os grupos, os únicos a apresentarem diferença significativa com o grupo Zy. Esse resultado está de acordo com trabalhos como o de Botelho et al. (2011) e Brito et al. (2000b), onde doses orais de copaíba não resultaram em alterações histopatológicas no fígado.

Além disso, o grupo Zy/Cop600 apresentou estroma aumentado. O trabalho de Estevão et al. (2009), demonstrou que a copaíba promoveu uma neoangiogênese em retalhos cutâneos, fato que pode explicar o aumento do volume da categoria já que esta é um somatório das estruturas ductos, vasos sanguíneos e sinusoides.

Sendo assim, pode-se concluir que o modelo de indução de AR por Zy teve um efeito sistêmico, devido ao aumento das alterações morfológicas no fígado, e que o uso oral de copaíba apresentou uma ação hepatoprotetora ao reverter os danos causado pelo Zy no tecido hepático.

REFERÊNCIAS

ACETI, A. et al. Hepatotoxicity development during antiretroviral therapy containing protease inhibitors in patients with HIV: the role of hepatitis B and C virus infection. **Journal of acquired immune deficiency syndromes** (1999), v. 29, n. 1, p. 41–8, 2002.

AHMAD, S. et al. Modulation of Chemokine- and Adhesion-Molecule Gene Expression and Recruitment of Neutrophil Granulocytes in Rat and Mouse Liver after a Single Gadolinium Chloride or Zymosan Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3891, 2018.

ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology**

and Medicine, v. 28, n. 3, p. 463–499, 2000.

BARBOSA, B. DE S. et al. Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1–5, 2017.

BASILE, A. C. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian copaifeira. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 101–109, 1988.

BLEIBEL, W. et al. Drug-Induced Liver Injury: Review Article. **Dig Dis Sci**, v. 52, p. 2463–2471, 2007.

BOTELHO, N. M. et al. Estudo morfológico do efeito subagudo de altas doses do óleo de copaíba em ratos. **Rev. para. med**, 2011.

BOUWENS, L.; KNOOK, D. L.; WISSE, E. Local Proliferation and Extrahepatic Recruitment of Liver Macrophages (Kupffer Cells) in Partial-Body Irradiated Rats. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 39, n. 6, p. 687–697, 1986.

BRITO, M. V. H. et al. Aspectos microscópicos do fígado de ratos após administração do óleo de copaíba. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 102–106, 2000.

BROWN, G. D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119–24, 2003.

C DIESELHOFF-DEN DULK, M. M.; CROFTON, R. W.; VAN FURTH, R. Origin and kinetics of Kupffer cells during an acute inflammatory response Stimulation by stilboestrol or zymosan of mice. **Immunology**, v. 37, n. 1, p. 7, 1979.

CASTRO GHIZONI, C. V. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions of Copaiba Oil Are Related to Liver Cell Modifications in Arthritic Rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 10, p. 3409–3423, 2017.

CHITTURI, S.; GEORGE, J. Hepatotoxicity of Commonly Used Drugs: Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Antihypertensives, Antidiabetic Agents, Anticonvulsants, Lipid-Lowering Agents, Psychotropic Drugs. **Seminars in Liver Disease**, v. 22, n. 02, p. 169–184, 2002.

CRUZ-ORIVE, L. M. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. **Journal of Microscopy**, v. 193, n. 3, p. 182–198, 1999.

DECKER, K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). **European Journal of Biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 245–261, 1990.

DELESSE, A. **Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches - A. Delesse**. Savy, 1862.

ESTEVÃO, L. R. DE M. et al. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesq. agropec. bras**, v. 44, n. 4, p. 406–412, 2009.

FIGUEREDO, C. A. DE; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional

de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.

FOX, E. S.; THOMAS, P.; BROITMAN, S. A. Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. **Infection and immunity**, v. 55, n. 12, p. 2962–6, 1987.

GALUPPO, M. et al. Role of PPAR- δ in the development of zymosan-induced multiple organ failure: an experiment mice study. **Journal of Inflammation**, v. 7, n. 1, p. 12, 2010.

GALVÁN-PEÑA, S.; O'NEILL, L. A. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 420, 2014.

GANTNER, B. N. et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 9, p. 1107–17, 2003.

GARCÍA-CORTÉS, M. et al. Liver injury induced by “natural remedies”: an analysis of cases submitted to the Spanish Liver Toxicity Registry. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, v. 100, n. 11, p. 688–695, 2008.

GARCIA, R.; YAMAGUCHI, M. Óleo de Copaíba e Suas Propriedades Mediciniais: Revisão Bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137–146, 2012.

GUILLIAMS, M. et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 669–684, 2016.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis Biotic recovery after the end Ordovician mass extinction View project Early Triassic geochemistry and invertebrate palaeontology in central Spitsbergen, Svalbard View projec. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HONG, Y. et al. Combination therapy of molecular hydrogen and hyperoxia improves survival rate and organ damage in a zymosan-induced generalized inflammation model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 6, p. 2590–2596, 2016.

HOWARD, C. V; REED, M. G. Unbiased Stereology Three-dimensional Measurement in Microscopy Second Edition. 1998.

JAESCHKE, H. et al. Mechanisms of Hepatotoxicity. **Toxicological sciences**, v. 65, n. 2, p. 166–176, 2002.

JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 996–1006, 2013.

KAPLOWITZ, N. Drug-Induced Liver Disorders. **Drug Safety**, v. 24, n. 7, p. 483–490, 2001.

KARLMARK, K. R. et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1 + monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. **Hepatology**, v. 50, n. 1, p. 261–274, 2009.

KRENKEL, O.; TACKE, F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. **Nature**

Reviews Immunology, v. 17, n. 5, p. 306–321, 2017.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia-bases patológicas das doenças**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2015.

LAZEROW, S. K.; ABDI, M. S.; LEWIS, J. H. Drug-induced liver disease 2004. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, n. 3, p. 283–292, 2005.

LOEGERING, D. J. Kupffer cell complement receptor clearance function and host defense. **Circulatory shock**, v. 20, n. 4, p. 321–33, 1986.

MONROE, L. L. et al. Zymosan-induced peritonitis: Effects on cardiac function, temperature regulation, translocation of bacteria and role of dectin-1. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 46, n. 6, p. 723, 2016.

MOORE, T. J.; COHEN, M. R.; FURBERG, C. D. Serious Adverse Drug Events Reported to the Food and Drug Administration, 1998-2005. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, n. 16, p. 1752, 2007.

OKABE, Y.; MEDZHITOV, R. Tissue biology perspective on macrophages. **Nature Immunology**, v. 17, n. 1, p. 9–17, 2016.

ORIVE, L.-M. C. On the estimation of particle number. **Journal of Microscopy**, v. 120, n. 1, p. 15–27, 1980.

PARK, B. K. et al. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 177–202, 2005.

POLSON, J. E. Hepatotoxicity Due to Antibiotics. **Clinics in liver disease**, v. 11, n. 3, p. 549–561, 2007.

SACHETTI, C. G. et al. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 937–941, 2009.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, n. 1, p. 57–60, 1970.

SENIOR, J. R. Drug Hepatotoxicity from a Regulatory Perspective. **Clinics in liver disease**, v. 11, n. 3, p. 507–524, 2007.

SPINELLI, M. O. et al. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. **cientia Plena**, v. 8, n. 2, 2012.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **Journal of Microscopy**, v. 134, n. 2, p. 127–136, 1984.

SU, G. L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 2, p. G256–G265, 2002.

SUZUKI, A. et al. Drugs Associated with Hepatotoxicity and their Reporting Frequency of Liver Adverse Events in Vigibase™. **Drug Safety**, v. 33, n. 6, p. 503–522, 2010.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 643–675, 2015.

VERMA, S.; KAPLOWITZ, N. Diagnosis, management and prevention of drug-induced liver injury. **Gut**, v. 58, n. 11, p. 1555–1564, 2009.

XU, J. J.; DIAZ, D.; O'BRIEN, P. J. Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, n. 1, p. 115–128, 2004.

YAN, J.; LI, S.; LI, S. The Role of the Liver in Sepsis. **International Reviews of Immunology**, v. 33, n. 6, p. 498–510, 2014.

YUAN, L.; KAPLOWITZ, N. Mechanisms of Drug-induced Liver Injury. **Clinics in Liver Disease**, v. 17, p. 507–518, 2013.

ZIMMERMAN, H. J. Drug-induced liver disease. **Clinics in liver disease**, v. 4, n. 1, p. 73–96, 2000.

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

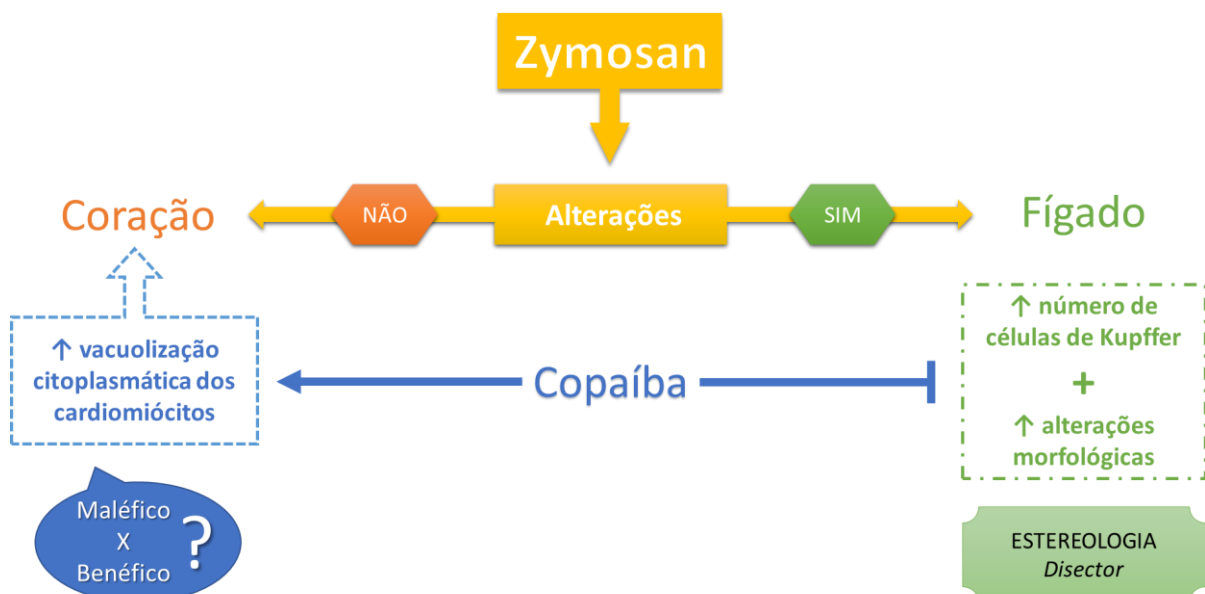
CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- A estereologia é capaz de detectar mínimas alterações morfológicas nos alvos investigados;
- O zymosan apresenta um efeito sistêmico no modelo de indução experimental de Artrite Reumatoide;
- O curto tempo de experimentação não foi suficiente para que houvesse algum dano substancial no tecido cardíaco pelo zymosan;
- Tanto o zymosan quanto o óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) levam a um aumento dos níveis séricos de CK-TOTAL;
- O óleo de copaíba causa um aumento de vacuolização no citoplasma dos cardiomiócitos;
- O zymosan causa dano hepático caracterizado pelo aumento de alterações morfológicas e no número de células de Kupffer;
- O óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), quando administrado via oral, é capaz de reverter os danos hepáticos causados pelo zymosan.

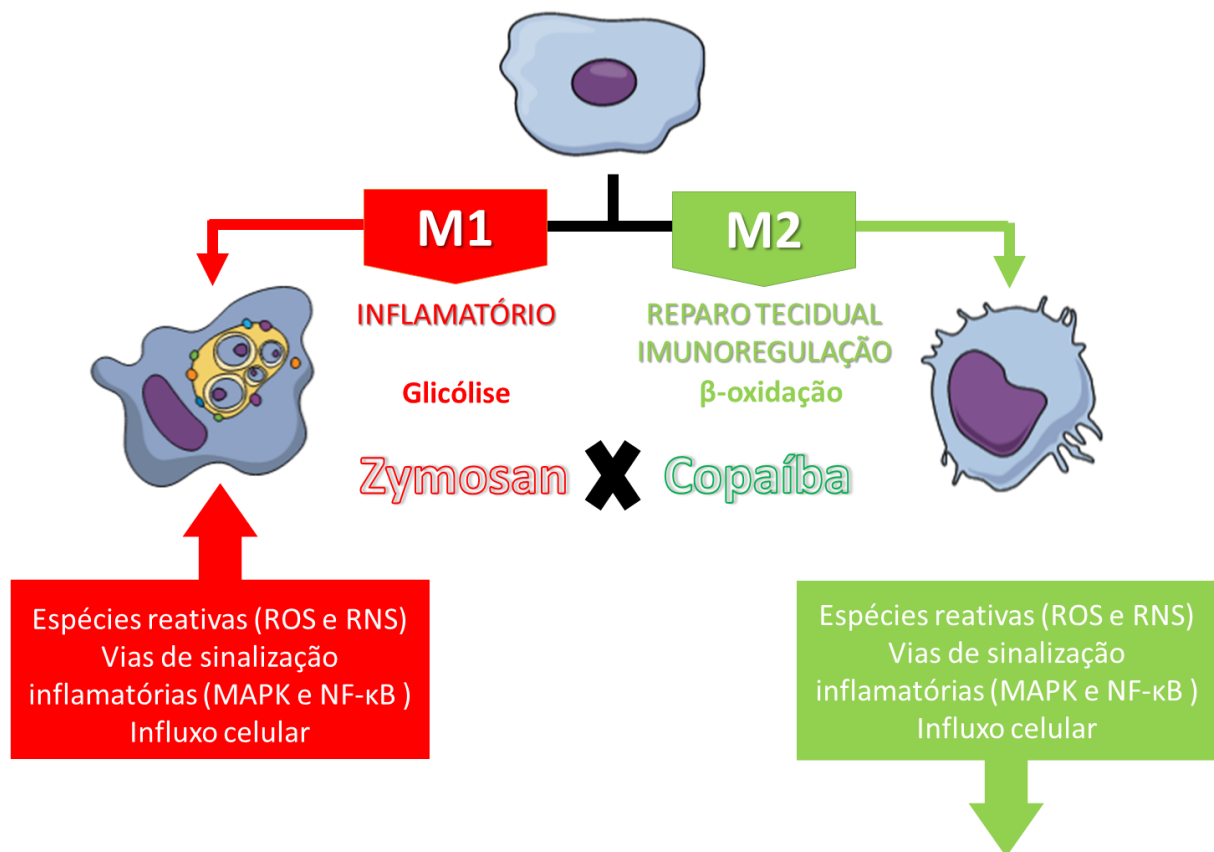
As conclusões descritas acima encontram resumidas na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática das conclusões obtidas sobre a ação do zymosan e do óleo de copaíba no presente estudo. Também apresenta uma indagação quanto ao papel do aumento da vacuolização causada pelo óleo de copaíba no tecido cardíaco e evidencia o papel fundamental da utilização do *Disector* na obtenção dos resultados referentes aos dados histológicos no fígado.



Apesar do foco histológico do presente estudo, a Figura 2 apresenta os possíveis mecanismos envolvidos na atuação protetora do óleo de copaíba no tecido hepático.

Figura 2 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos na ação inflamatória do zymosan e anti-inflamatória do óleo de copaíba no tecido hepático no presente estudo. Enfoque na polarização das células de Kupffer e sua atuação no processo inflamatório e no reparo tecidual.



PERSPECTIVAS

- 1) Futuros estudos devem avaliar o efeito do zymosan a longo prazo no tecido cardíaco;
- 2) Associação de mais variáveis bioquímicas poderiam ajudar a definir com mais precisão os danos aos tecidos tanto pelo zymosan quanto pela copaíba;
- 3) São necessários estudos que avaliem se a vacuolização no citoplasma dos cardiomiócitos causada pelo óleo de copaíba é um mecanismo protetor ou danoso.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer do CEUA/INPA


 PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
 ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Estereologia da Articulação Tibiotarsal de Camundongos induzidos à Artrite e tratados com óleo de Copaíba, Copaifera multijuga Hayne (Leguminosae)**", registrada com o nº **048/2016**, sob a responsabilidade de **PRITESH JAYCHAND LALWANI** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de 26/01/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/01/2017 a 09/01/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/C
Número de animais	36
Peso/Idade	18 – 22g / 8 semanas
Sexo	M / F
Origem	Biotério Central - INPA

Data de liberação do Parecer: 30.01.2017


George Henrique Rebelo
 Presidente CEUA-INPA
 PO n. 079/2015

ANEXO II – Protocolo utilizado para o Disector Óptico

1. Obtenção de seções grossas (25 μm) em resina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, K lzer-Heraues, Alemanha).
2. Armazenamento das seções em microtubos para posterior análise.
3. Montagem e colora o das seções.
 - a. Dispor a se o sobre uma gota de água em uma lâmina limpa e usar um pincel de ponta fina para estender a mesma.
 - b. Retirar o excesso de água com papel filtro.
 - c. Pingar uma gota de corante sobre a se o.
 - d. Repetir o passo (b).
 - e. Adicionar uma gota de água sobre a se o (remo o do excesso de corante)
 - f. Repetir o passo (b).
 - g. Sobrepor uma lamínula sobre a se o e levar   estufa entre 50-60  C até completa secagem (aproximadamente 30 minutos).
 - h. Remover a lâmina da estufa, retirar a lamínula com cuidado para não desgrudar a se o e proceder a montagem final com a resina adequada (bálsamo sint tico, entellan ).
 - i. Manter na estufa até completa secagem.
4. Aplica o do Disector óptico.
 - a. Proceder amostragem aleatória sistemática de campos de vista.
 - b. Localizar do primeiro campo a ser analisado (aumento 1000).
 - c. Projetar a imagem do sistema de contagem (grid) no campo de vista com o auxílio de um negastosc pio e um t do de desenho (câmara clara). O grid utilizado   composto por vários “frames” contendo linhas permitas e linhas proibidas (Figura a seguir).
 - d. Identificar o topo da se o (superfície da se o).
 - e. Desprezar os primeiros 5 μm da se o (topo da se o) e aprofundar o campo visual lentamente utilizando o parafuso micrométrico do microscópio, checando o avanço no microcator (instrumento acoplado   platina do microscópio para a detec o de movimentos no eixo z).
 - f. Proceder   contagem dos núcleos das células de Kupffer que entram ou saem de foco no interior do “frame” respeitando os limites do mesmo.

- g. Repetir o passo (f) até ser atingida a altura máxima do Disector (nesse estudo $15\ \mu\text{m}$). Desprezar os últimos $5\ \mu\text{m}$ da seção.
- h. Aplicar os valores obtidos na equação padrão do Disector.

Imagem ilustrativa do sistema de contagem empregado na estimativa do número total de células (Disector Óptico). O sistema é composto por 16 “frames”, cada qual contendo linhas permitas (verdes) e proibidas (vermelhas). Só são contabilizados os núcleos que entram ou saem de foco no interior do “frame” e que tocam as linhas verdes (círculos brancos pontilhados), enquanto que os núcleos que tocam as linhas vermelhas (X preto) são desconsiderados. Uma estimativa do número total de células pode ser obtido pela multiplicação da densidade numérica obtida (Disector) pelo volume do órgão.

