



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA  
BÁSICA E APLICADA**



**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO BAÇO  
EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR  
ZYMOSAN E O EFEITO DO ÓLEO DESTILADO DE COPAÍBA  
(*Copaifera* spp. - LEGUMINOSAE-CAESALPINOIDEAE)**

**Manaus – AM  
2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
DOUTORADO EM IMUNOLOGIA**

**NADIELLE CASTRO PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO BAÇO  
EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR  
ZYMOSAN E O EFEITO DO ÓLEO DESTILADO DE COPAÍBA  
(*Copaifera* spp. - LEGUMINOSAE-CAESALPINOIDEAE)**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA) da Universidade Federal do Amazonas – UFAM – como requisito para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa  
Coorientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes

**Manaus – AM  
2022**

# FICHA CATALOGRÁFICA

## Ficha Catalográfica

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

P436a Pereira, Nadielle Castro  
Avaliação das características morfológicas do baço em um modelo murino de inflamação induzida por zymosan e o efeito do óleo destilado de copaíba (*Copaifera* spp. - Leguminosae-Caesalpinoideae) / Nadielle Castro Pereira . 2022  
78 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Baço. 2. Inflamação. 3. Artrite. 4. Óleo de copaíba. 5. Estereologia. I. Costa, Oscar Tadeu Ferreira da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

NADIELLE CASTRO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO BAÇO  
EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR  
ZYMOSAN E O EFEITO DO ÓLEO DESTILADO DE COPAÍBA  
(*Copaifera* spp. - LEGUMINOSAE-CAESALPINOIDEAE)**

APROVADO EM: **05/12/2022**

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa – Presidente  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

---

Profa. Dra. Grazyelle Sebreński da Silva  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

---

Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos Sobreira de Sampaio  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

---

Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Passos  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

---

Profa. Dra. Ilia Gilmara Carvalho dos Santos  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

**Manaus – AM  
2022**

## AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças, sabedoria, discernimento e capacidade para concluir este projeto.
- ❖ Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, pelo apoio estrutural e pela organização durante o meu Doutorado.
- ❖ Ao meu orientador, Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa, por ter aceitado orientar-me e por compartilhar comigo o seu conhecimento.
- ❖ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas FAPEAM pelo apoio financeiro durante meu Doutorado.
- ❖ Aos meus camundongos black-C57/6, que foram obrigados a dar a sua vida em prol do nosso conhecimento.
- ❖ Aos meus familiares e amigos, que sempre me ajudaram incentivando-me durante essa caminhada.

## EPÍGRAFE

*Mas graças a Deus, que sempre nos conduz  
vitoriosamente em Cristo e por nosso intermédio exala em  
todo lugar a fragrância do seu conhecimento;*

2 Coríntios 2:14

## RESUMO

O baço é o maior órgão linfoide secundário e tem papel relevante na filtração do sangue e a regulação das respostas imunes. Pouco se sabe sobre a microestrutura esplênica em animais induzidos a desenvolver um quadro de artrite. Essas informações são importantes quando se pensa em associar um tratamento oral fitoterápico a base de óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). Essa substância apresenta compostos anti-inflamatórios em sua constituição com efeitos anti-edematogênicos, contudo não há estudos avaliando a ação da copaíba no baço. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar por estereologia a estrutura do baço de camundongos da linhagem Black-C57BL/6 (n=15) induzidos a desenvolver inflamação pelo zymosan e tratados oralmente com o óleo de copaíba. Os animais foram distribuídos em três grupos: Salina, Zy e Zy/Cop; todos receberam inoculações intra-articular (tíbio tarsal) das respectivas soluções. A copaíba foi fornecida por gavagem. Os animais foram acompanhados por 23 dias. Ao final, os baços foram removidos e processados histologicamente e orientados seguindo as normas da moderna estereologia. O volume do baço foi determinado por contagem de pontos e por deslocamento de fluido, o volume dos componentes internos por contagem de pontos em relação ao espaço de referência, as células imunes (plasmócitos, linfócitos e macrófagos) foram estimados pelo Disector ótico. Zy causa um efeito sistêmico afetando principalmente a polpa branca e o perfil das células imunes. Zy/Cop resultou em aumento da polpa vermelha, redução da polpa branca, aumento de plasmócitos e macrófagos. Em conclusão, a indução da inflamação por zymosan afeta a organização esplênica e o perfil de células imunes. O uso oral de copaíba não preveniu essas alterações e, em certa extensão, pode ter tido um comprometimento na filtração do sangue e nas respostas imunes a antígenos.

**Palavras-chave:** baço; inflamação; artrite; óleo de copaíba; estereologia.

## ABSTRACT

The spleen is the largest secondary lymphoid organ and plays an important role in blood filtration and the regulation of immune responses. Little is known about the splenic microstructure in animals induced to develop arthritis. This information is important when thinking about associating an oral herbal treatment based on copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). This substance has anti-inflammatory compounds in its constitution with anti-edematogenic effects, however there are no studies evaluating the action of copaiba in the spleen. Thus, the objective of this study was to evaluate by stereology the structure of the spleen of mice of the Black-C57BL/6 lineage (n=15) induced to develop inflammation by zymosan and orally treated with copaiba oil. The animals were divided into three groups: Salina, Zy and Zy/Cop; all received intra-articular inoculations (tarsal tibia) of the respective solutions. Copaiba was supplied by gavage. The animals were followed for 23 days. At the end, the spleens were removed and histologically processed and oriented according to the norms of modern stereology. The volume of the spleen was determined by point counting and by fluid displacement, the volume of internal components by point counting in relation to the reference space, the immune cells (plasma cells, lymphocytes and macrophages) were estimated by the Optical Disector. Zy causes a systemic effect primarily affecting the white pulp and immune cell profile. Zy/Cop resulted in increased red pulp, reduced white pulp, increased plasma cells and macrophages. In conclusion, zymosan induction of inflammation affects splenic organization and immune cell profile. Oral use of copaiba did not prevent these changes and, to some extent, may have impaired blood filtration and immune responses to antigens.

**Keywords:** spleen, inflammation, arthritis, copaiba oil, stereology.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

**ACPA** – Anticorpos antiproteínas citrulinadas.

**AR** – Artrite Reumatoide.

**CFA** – Adjuvante completo de Freund.

**CG** – Centro germinativo.

**DMARDs** – Disease modifying anti-rheumatic drugs.

**DPI-AR** – Doença pulmonar intersticial associada à Artrite Reumatoide.

**eNOS** – Síntese de óxido nítrico endotelial.

**FR** – Fator reumatoide.

**i.a.** – Intra-articular.

**IL -1 $\beta$**  – Interleucina 1 beta.

**iNOS** – Síntese de óxido nítrico induzível.

**NF-kB** – Factor nuclear kappa B.

**NO** – Óxido nítrico.

**ODC** – Óleo destilado de copaíba.

**PALS** – Bainha linfóide periarteriolar.

**PB** – Polpa branca.

**PPARs** – Proliferadores de peroxissoma.

**PV** – Polpa vermelha.

**RCB** – Receptor canabinoide.

**RNS** - Espécies reativas de nitrogênio.

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio.

**TLR** – Receptor do tipo Toll.

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa.

**UFAM** – Universidade Federal do Amazonas

**VCAM-1** – Molécula de adesão de células vasculares.

**ZM** – Zona marginal.

**Zy** – Zymosan.

**ZyCop** – Zymosan tratado com copaíba 600mg.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características inflamatórias da membrana sinovial articular. ....	18
Figura 2. Organização estrutural do baço de camundongo Black-C57BL/6.....	24
Figura 3. Extração do óleo-resina de copaíba (Copaifera spp.).....	34
Figura 4. Desenho experimental. ....	35
Figura 5. Esquema de avaliação do volume por deslocamento de fluido. ....	38
Figura 6. Processamento histológico do baço.....	39
Figura 7. Imagem representativa da pata posterior esquerda. ....	41
Figura 8. Volume da pata esquerda em função do tempo. ....	42
Figura 9. Seções histológicas do baço coradas com toluidina e fucsina. ....	44
Figura 10. A. Massa corporal. B. Determinação do volume do baço por contagem de pontos (Princípio de Cavalieri) e por deslocamento de fluido. Notar a proximidade dos valores. C. Volume do baço em função da massa.....	46
Figura 11. A. Componente conjuntivo (cápsula + trabécula). B. Cápsula. C. Trabécula.....	47
Figura 12. Volume da polpa vermelha (A). Cordões esplênicos (B). Sinusoides esplênicos (C).....	48
Figura 13. Volume da polpa branca (A). PALS (B). Folículos (C). Arteriola central (D). Zona marginal (E). Centro germinativo (F). ....	49
Figura 14. Número de células. Plasmócitos (A). Macrófagos (B). Linfócitos (C).....	50
Figura 15. A. PCA utilizando os 13 parâmetros deste estudo. B. Análise de agrupamento (clustering) separando os grupos deste estudo. ....	52

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Compilação de dados volumétricos do baço de humanos e camundongos submetidos a condições patológicas. ....	28
Tabela 2. Avaliação detalhada do volume da pata esquerda. ....	43

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1. Epidemiologia da Artrite Reumatoide .....	16
2.2. Patogenia da Artrite Reumatoide .....	16
2.3. Artrite experimental .....	18
<b>3. A IMPORTÂNCIA DO BAÇO E SUAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS</b> ...	19
3.1. Morfologia do baço .....	21
3.2. Baço e a Artrite Reumatoide .....	24
3.3. Quantificação esplênica .....	26
<b>4. ÓLEO DE COPAÍBA</b> .....	29
<b>5. ESTEREOLOGIA</b> .....	30
<b>6. OBJETIVO</b> .....	32
6.1.    Objetivos gerais .....	32
6.2.    Objetivos específicos .....	32
<b>7. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
7.1.    Tipo de estudo, local e período .....	33
7.2.    Aspectos éticos .....	33
7.3.    Animais de estudo .....	33
7.4.    Obtenção do óleo destilado de copaíba ( <i>Copaifera</i> spp.) .....	34
7.5.    Característica físico-química do ODC .....	34
7.6.    Delineamento experimental .....	35
7.7.    Indução da artrite experimental .....	35
7.8.    Tratamento com copaíba .....	36
7.9.    Espessura da pata (edema) .....	36
7.10.    Peso corpóreo .....	37
7.11.    Remoção e fixação do baço .....	37
7.12.    Determinação do volume esplênico .....	37
7.13.    Volume por Deslocamento de fluido .....	37
7.14.    Processamento histológico .....	38
7.15.    Volume por contagem de pontos (Princípio de Cavalieri) .....	39
7.16.    Volume dos componentes esplênicos .....	40
7.17.    Contagem do número de células .....	40
<b>8. ESTATÍSTICA</b> .....	41
<b>9. RESULTADOS</b> .....	41
9.1 Espessura da pata .....	41

9.2. Histologia.....	43
9.3. Estereologia do baço .....	45
<b>10. DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>12. EQUIPE DO PROJETO DE PESQUISA .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 1. Documento da Comissão de Ética na utilização de animais – CEUA/UFAM</b> 69	
<b>ANEXO 2. Documento do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético –</b> SisGen.....	70
<b>ANEXO 3. Destilação do óleo-resina de copaíba (<i>Copaifera</i> spp.).....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO 4. Característica físico-química do óleo destilado de copaíba .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO 5. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas – CG-EM do</b> óleo destilado de copaíba. ....	73
<b>ANEXO 6. Preparo da solução zymosan A.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO 7. Preparo das doses de copaíba .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO 8. Protocolo de coloração .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 9. Protocolo utilizado para o Disector óptico (Estereologia) .....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica das articulações que acomete aproximadamente 2% da população mundial e afeta até três vezes mais as mulheres do que os homens (GOELDNER *et al.*, 2011). Essa enfermidade é progressiva, de caráter sistêmico, e sua causa não é bem definida; é caracterizada por proliferação sinovial e uma artrite simétrica e erosiva das articulações periféricas e conseqüente incapacidade motora (ALARCON; ANDRADE, 2007).

A doença está associada a manifestações extra-articulares, incluindo a pele, os olhos, o pulmão, o intestino, o fígado, o coração, os rins e o baço (COJOCARU *et al.*, 2010; PADHAN, 2017). Estudo epidemiológico mostrou que as manifestações extra-articulares, as quais acometem aproximadamente 40% dos pacientes no estágio inicial ou no curso da doença, são as principais causas de morte (BONGARTZ *et al.*, 2007). Fishman (1997) relatou que a esplenomegalia é comum em pacientes com AR e que as doenças reumáticas, incluindo o lúpus eritematoso sistêmico e a poliarterite nodosa, podem causar complicações graves e fatais para o paciente. Apesar disso, não há pesquisas que caracterizam quantitativamente as alterações estruturais desse órgão associadas à AR.

O baço é o maior órgão linfóide secundário e exerce várias funções importantes no organismo, incluindo a filtração do sangue e a regulação da resposta imune atuando na captura e na eliminação de vírus, bactérias e antígenos causadores de doenças (SAFERDING, 2019). Em camundongo sua estrutura é revestida por uma cápsula de tecido fibroso denso que o adentra formando trabéculas que se ramificam no parênquima esplênico conduzindo vasos sanguíneos (KUROTAKI; UEDE; TAMURA, 2015). O parênquima esplênico é dividido em dois principais compartimentos, denominados de polpa vermelha (PV) e polpa branca (PB), e cada um deles é constituído por células imunológicas que exercem funções distintas (ALEXANDRE *et al.*, 2022).

O principal foco deste estudo, foi avaliar as possíveis alterações esplênicas decorrentes de manifestações extra-articulares resultantes da AR e, com isso, contribuir para um maior entendimento da morfologia esplênica. Nesse contexto, a AR é uma doença de caráter autoimune e o tratamento utilizado consiste na

administração de medicamentos modificadores do curso da enfermidade (DMARDs, *disease modifying anti-rheumatic drugs*), que às vezes são acompanhados de glicocorticoides; e, em casos de artrite sintomática, são usados anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), comumente utilizados para aliviar as dores e os inchaços articulares (BURMESTER; POPE, 2017). Em caso de artrite refratária, o tratamento utilizado consiste em terapia dirigida contra citocina pró-inflamatória incluindo TNF- $\alpha$ . Agentes biológicos que inibem o TNF- $\alpha$  são considerados eficazes na redução da atividade e no retardamento do dano articular; atualmente, estão disponíveis três agentes anti-TNF- $\alpha$ : infliximabe, etanercepte e adalimumabe (ŠTEŇOVÁ *et al.*, 2021).

O óleo de copaíba da espécie *Copaifera multijuga* Hayne, do gênero *Copaifera* sp., é encontrado comumente na Amazônia e é retirado do tronco da árvore copaibeira, pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae. Normalmente, é utilizado pelas indústrias de cosméticos, de medicamentos e de tintas, popularmente conhecido por suas funções cicatrizantes, bactericidas e anti-inflamatórias (MARTINS; PEREIRA; LIMA, 2008).

Os modelos artríticos experimentais usados para avaliar novas abordagens terapêuticas são normalmente utilizados para proporcionar a compreensão sobre os mecanismos da sinovite e para contribuir com estudos de novas terapias (FRASNELLI *et al.*, 2005). A artrite pode ser induzida em animais por vários tipos de indutores (KEYSTONE *et al.*, 1977). Neste estudo optamos por utilizar o zymosan por ser um agente de fácil indução, com parâmetros imunológicos bem estabelecidos e com fácil reprodutibilidade (KOBAYASHI *et al.*, 2006).

Para avaliação do baço, serão utilizados os métodos *design-based* da moderna estereologia (LEWIS *et al.*, 2019). Por se tratar de uma doença autoimune sistêmica, buscou-se reunir dados e informações com o propósito de responder às seguintes questões: a artrite induzida por zymosan pode causar alterações esplênicas? Se sim, quais são essas alterações específicas? O modelo artrítico induzido por zymosan foi estabelecido como mais adequado para responder aos objetivos desta pesquisa. O óleo de copaíba tem efeito sobre os componentes estruturais do baço? Este estudo propõe a avaliação da ação fitoterápica do óleo de copaíba no baço. Por suas peculiaridades, buscou-se avaliar se a ação desse óleo destilado é eficaz na

preservação dos compartimentos esplênicos PV e PB após um processo inflamatório induzido por Zy em camundongos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Epidemiologia da Artrite Reumatoide

A AR é uma doença autoimune sistêmica, caracterizada por uma inflamação de evolução crônica e de origem ainda não bem definida. Essa enfermidade causa inflamação e proliferação da membrana sinovial articular provocando destruição da cartilagem e dos ossos e, conseqüentemente, incapacidade funcional nos indivíduos (SCOTT *et al.*, 2010).

A doença reumática acomete até três vezes mais mulheres do que homens, e sua prevalência na Europa e na América do Norte são de 0,5 a 1,0% (WOUDE; HELM-VAN MIL.,2018). No Brasil, a prevalência da AR é de 0,2% (SENNA *et al.*, 2004). De acordo com um estudo de corte envolvendo pacientes atendidos em centros de saúde pública de várias regiões do Brasil, um total de 1.115 pacientes foi diagnosticado com AR; desses, 89% eram mulheres (CASTELAR-PINHEIRO *et al.*, 2018). A prevalência da AR varia entre 0,4 e 1,9% em todo o mundo; e entre 0,2% e 1,0% em brasileiros (TOBÓN *et al.*, 2010). Na Amazônia brasileira foram estudados 132 pacientes com AR; destes, 34 apresentavam acometimentos extra-articulares (BOECHAT *et al.*, 2012).

### 2.2. Patogenia da Artrite Reumatoide

A AR é uma doença cuja iniciação e progressão estão associadas a vários fatores de risco – quer genéticos, quer ambientais representados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (SCOTT *et al.*, 2010). Por exemplo, fatores de risco genéticos (HLA-DRB1 e modificações epigenéticas) podem estar relacionados a um estágio de alto risco ou suscetibilidade. Outros fatores são ambientais, os quais incluem tabagismo, microbiota, sexo feminino, dieta, obesidade e características étnicas, que contribuem para que a doença atinja um nível no qual a AR é desencadeada (CHEN *et al.*, 2018; DEANE *et al.*, 2017; GOELDNER *et al.*, 2011).

São necessários muitos fatores de risco antes de atingir um limiar acima do qual a AR é desencadeada. Inicialmente, a progressão da doença envolve o surgimento de autoanticorpos que irão atuar contra autoproteínas modificadas, o que



pode ocorrer anos antes do surgimento da sinovite subclínica – inflamação da membrana sinovial – e sintomas clínicos. A doença é caracterizada pela presença de autoanticorpos, que irão atuar contra os anticorpos IgG; e os principais autoanticorpos são os fatores reumatóides (FR) e os anticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPAs), os quais podem ser detectados até dez anos antes do surgimento da sinovite e dos sintomas clínicos (SMOLEN *et al.*, 2018). O avanço da enfermidade pode culminar com uma série de complicações extra-articulares, incluindo o pulmão, o coração, o fígado e o baço (GIANNINI *et al.*, 2020).

A doença pulmonar intersticial associada à AR é uma enfermidade de caráter complexo e similar à pneumonia. A prevalência no mundo pode variar entre 1 e 58%, e os sintomas podem manifestar-se por meio de problemas respiratórios seguidos de bronquiectasia e dispneia. O mecanismo do envolvimento articular com o pulmão ainda é pouco claro, mas se acredita que fatores genéticos e ambientais possam estar envolvidos com a predisposição à doença pulmonar associada à Artrite Reumatóide – DPI-AR (SPAGNOLO *et al.*, 2018).

Estudos indicam que indivíduos com AR têm duas vezes mais chance de desenvolverem doença cardiovascular, além de apresentarem o dobro de risco de insuficiência cardíaca. Essas doenças podem estar relacionadas ao compartilhamento de mediadores inflamatórios, modificação pós-translacional da proteína argenina que culmina em respostas imunes, alterações das lipoproteínas, aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial (ENGLAND *et al.*, 2018).

A lesão hepática é comum em 44% dos indivíduos com AR; e cerca de 94% dos casos são assintomáticos, podem ser representados pelo aumento dos níveis da enzima gama glutamil transferase. É uma doença de causa pouco compreendida, pois na maioria das vezes é difícil diagnosticar se a lesão hepática surgiu da AR, da toxicidade medicamentosa desenvolvida durante o tratamento da artrite ou se está associada a uma doença primária (SELLAMI *et al.*, 2019).

A presença de uma variedade de autoanticorpos no plasma e na membrana sinovial articular de pacientes com AR está relacionada não só com a inflamação crônica das articulações, mas também com o surgimento de outras doenças (BRONTE; PITTET, 2013; SAFERDING; BLÜML, 2019). Recentemente, um estudo evidenciou que uma alteração fisiológica no baço pode resultar no surgimento de

doenças autoimunes, incluindo a AR (ANANG *et al.*, 2021). No entanto não há estudos que demonstram se a AR pode afetar o funcionamento ou a morfologia do baço, que é um importante órgão, intimamente relacionado com a manutenção e com a regulação da resposta imunológica.

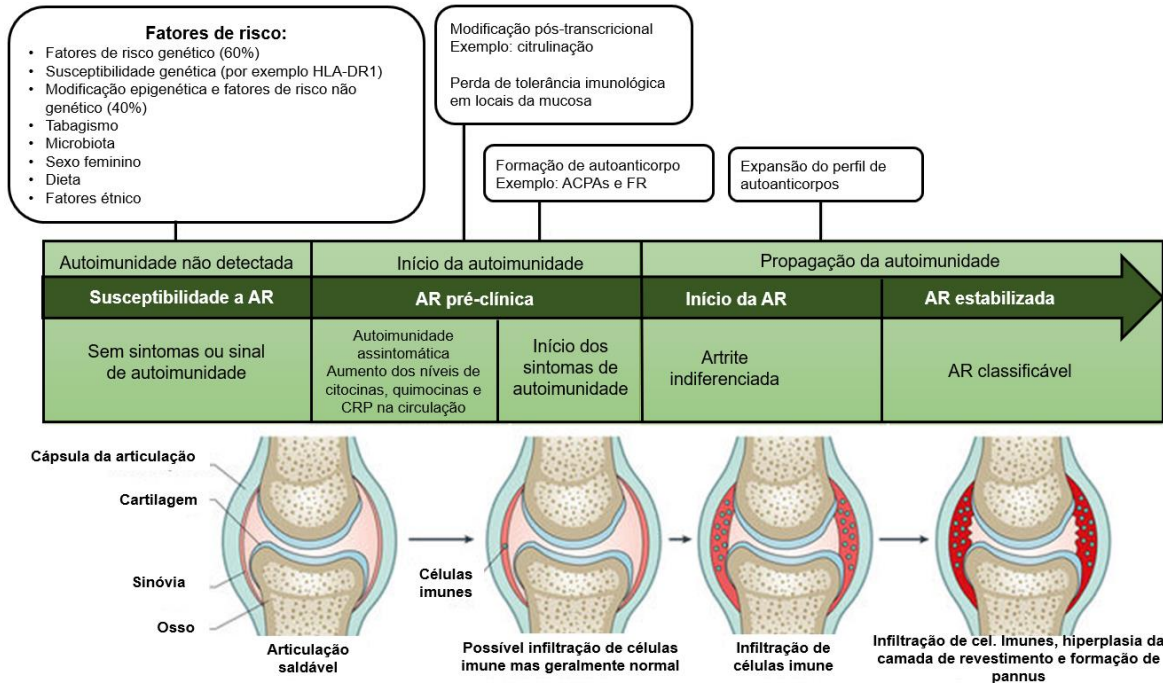


Figura 1. Características inflamatórias da membrana sinovial articular. A AR é uma doença complexa e envolve fatores ambientais que desencadeiam a doença em indivíduos geneticamente suscetíveis. Fonte: SMOLEN *et al.*, 2018 (modificado: traduzido do inglês - português).

### 2.3. Artrite experimental

O modelo experimental artrítico induzido em animais dispõe de vários indutores da doença, incluindo adjuvante (WAUBEN, 2001), colágeno, anticorpos (CAPLAZI *et al.*, 2015; TRENTAM; TOWNES; KANG, 1977), antígenos de várias espécies (CHOUDHARY; BHATT; PRABHAVALKAR, 2018) e zymosan (KEYSTONE *et al.*, 1977), além de modelos artríticos geneticamente modificados (KAWANE *et al.*, 2006; KEFFER *et al.*, 1991; KOUSKOFF *et al.*, 1996; SAKAGUCHI *et al.*, 2003). A artrite experimental é largamente empregada em pesquisas com a finalidade de entender a patogênese da AR, assim como na busca de novas descobertas de tratamento (ASQUITH *et al.*, 2009; CASTAÑEDA-LOPEZ *et al.*, 2018).

O zymosan – indutor de uma inflamação e utilizado neste estudo – é um polissacarídeo encontrado na parede celular de levedura do gênero *Saccharomyces*,

da espécie *Saccharomyces cerevisiae* formado por unidades repetidas de glicose interligadas por ligações  $\beta$ -13 glicosídicas (ASQUITH *et al.*, 2009). Após inoculação intra-articular (i.a) por zymosan, uma inflamação similar à AR é estabelecida, apresentando um pico de inflamação em três dias, diminuindo aos sete dias e reaparecendo aos 25 dias, o que reproduz uma inflamatória crônica em camundongo (KEYSTONE *et al.*, 1977).

O zymosan causa uma inflamação da membrana sinovial com a presença de infiltração por células mononucleares, secreção de citocinas que resulta em tecido hiper celular denominado de *pannus*, que posteriormente invade as regiões articulares e pode causar erosão óssea e cartilaginosa (ROUDIER, 2018). A inflamação é modulada pelos receptores do tipo Toll 2 (TLR2, *Toll-like receptors*), encontrados em várias células, inclusive as fagocitárias, que induzem a produção de citocinas e estimulam enzimas responsáveis pela produção de leucotrienos (araquidonatos), fosforilação de proteínas e ativação do complemento pela via alternativa (FRASNELLI *et al.*, 2005).

A utilização do zymosan como opção para induzir a inflamação experimental nos camundongos segue alguns princípios estabelecidos de acordo com a resposta inflamatória edematogênica monoartrítica. Isso porque os demais indutores causam poliartralgia e apresentam um perfil de inflamação que pode variar dependendo da espécie utilizada (HASHIMOTO *et al.*, 2018).

### **3. A IMPORTÂNCIA DO BAÇO E SUAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS**

Por muitos anos o baço foi considerado desnecessário pelo fato de podermos viver sem este órgão, entretanto, com os avanços dos estudos imunológicos, esse órgão foi ganhando espaço e grande atenção no meio científico. Atualmente, sabemos que é extremamente importante para o funcionamento do organismo, pois exerce vários papéis fundamentais na homeostasia (BRONTE; PITTET, 2013).

De acordo com um estudo realizado no baço de camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, por via intraperitoneal, mostrou que a parasitemia foi gradual entre os grupos inoculados e os camundongos esplenectomizados apresentaram uma parasitemia superior comparado aos camundongos não esplenectomizados. Esse resultado mostrou que a ausência desse órgão pode prejudicar o funcionamento do organismo (NEGREIROS *et al.*, 2009).

Em mamíferos, o baço é o maior órgão linfóide secundário e exerce várias funções importantes no organismo, incluindo a filtração e o armazenamento do sangue, além da defesa do organismo contra antígenos invasores do sangue e na regulação da resposta imunológica por meio de diferentes células e seus subtipos (SAFERDING; BLÜML, 2019).

O baço pode desenvolver tolerância a antígenos tumorais devido a estímulos enviados pelo tumor. De acordo com estudos realizados em camundongos, a esplenectomia (remoção do baço), realizada antes ou após a instalação de cânceres como carcinoma do cólon, mamário e melanoma, pode retardar o crescimento do tumor (Tabela 1) (FOTIADIS *et al.*, 1999; SCHWARZ; HISERODT, 1990). Esse efeito paradoxal e benéfico da esplenectomia foi visto em outro estudo que mostrou células mielóides produzidas pelo baço e recrutadas para o estroma tumoral, o que deixa claro que esse órgão orquestra a indução de tolerância aos antígenos tumorais (CORTEZ-RETAMOZO *et al.*, 2013).

O sangue entra no baço inicialmente pelo hilo por meio da artéria esplênica, que se divide em artérias trabeculares. As artérias trabeculares se ramificam pelo parênquima esplênico e dão origem a pequenas arteríolas que, por sua vez, se ramificam por meio da polpa vermelha (PV) e se tornam arteríolas centrais. As arteríolas centrais se estendem até a polpa branca (PB) e são circundadas por linfócitos T, que dão origem à bainha linfóide periarteriolar (PALS); arteríolas menores se ramificam das arteríolas centrais e entram na zona marginal (ZM). O sangue é conduzido até ZM em direção à PB e em seguida à PV por meio das artérias penicilares (PELLAS; WEISS, 1990). Na PV o sangue pode seguir por dois percursos ainda não bem definidos de acordo com a literatura, ou seja, o sangue segue por uma circulação fechada por meio de sinusóides e cordões esplênicos ou por uma circulação aberta por meio de vasos de terminações abertas. O sangue que é drenado pelos sinusóides retorna pela veia esplênica, e então sai pela veia trabecular localizada no hilo e segue para a circulação em outros órgãos (BRENDOLAN *et al.*, 2007).

A PV é onde ocorre a primeira linha de defesa contra patógenos sanguíneos, pois é onde se encontram presentes as células efectoras, incluindo as células dendríticas residentes, os macrófagos, as células naturais *killers* (NK) e bastante eritrócitos (QIU *et al.*, 2009). A PB, incluindo a ZM, é onde ocorre a segunda linha de defesa; a PB é composta por células dendríticas circulares, linfócitos B foliculares,

plasmócitos e linfócitos T auxiliares, enquanto a ZM, que é localizada entre a PV e a PB, é composta por macrófagos e seus subtipos, células dendríticas, células NK, linfócitos B residentes e T circulares que atuam mediando a resposta imune inata e a adaptativa (BRENDOLAN *et al.*, 2007; NOLTE *et al.*, 2000).

### 3.1. Morfologia do baço

O baço apresenta uma estrutura organizada e um funcionamento complexo. Devido às dificuldades na realização de estudos no baço de humanos, a maioria das pesquisas são experimentais com a intenção de simular o funcionamento do organismo humano no laboratório com a utilização de camundongos ou de ratos (ALTUNKAYNAK; ÖZBEK; ALTUNKAYNAK, 2007; SILVA *et al.*, 2012; ROMPPANEN, 1981).

Nos camundongos a PV é responsável pela remoção tanto de partículas estranhas do sangue quanto de imunocomplexos. Esse processo pode ocorrer quando o sangue arterial chega aos cordões esplênicos, localizados na PV, onde a remoção ocorre por meio da fagocitose realizada por macrófagos que se encontram associados às células e às fibras reticulares dos cordões esplênicos (FUJIYAMA *et al.*, 2019).

As hemácias senescentes apresentam uma membrana rígida; e os seios venosos são formados por fibras características conectadas às células endoteliais. Essa característica faz que ocorra um atraso da passagem de hemácias para os seios venosos, retendo-as entre os cordões esplênicos e conseqüentemente sendo removidas por macrófagos presentes nesse local. Esse processo de retenção delas também pode auxiliar no sequestro parcial de hemácias viáveis no baço, dando origem a um reservatório de sangue localizado dentro dos seios venosos da PV (MEBIUS; KRAAL, 2005).

Além disso, os macrófagos presentes no baço exercem um papel fundamental na renovação das hemácias e na reciclagem de ferro. Esse processo ocorre quando as hemácias são hidrolisadas pelo fagolisossomo presente nos macrófagos fazendo que a hemoglobina presente dentro das hemácias sofra degradação proteolítica, liberando o grupo heme da hemoglobina, que posteriormente é catabolizado em biliverdina, monóxido de carbono e ferro ferroso; este, por sua vez, pode ser

reaproveitado pelas células ou armazenado na forma de ferritina (KUROTAKI; UEDE; TAMURA, 2015).

Nos camundongos, a PB interage com a ZM; é nessa região que os linfócitos adentram em direção aos seus locais específicos, e essa entrada é mediada por quimiocinas. Os linfócitos B são atraídos para os folículos de células B por meio dos ligantes de quimiocinas CXCL13, ao passo que os linfócitos T são recrutados para a zona de células T por meio dos ligantes de quimiocinas CCL19 e CCL21 (ANSEL *et al.*, 2000).

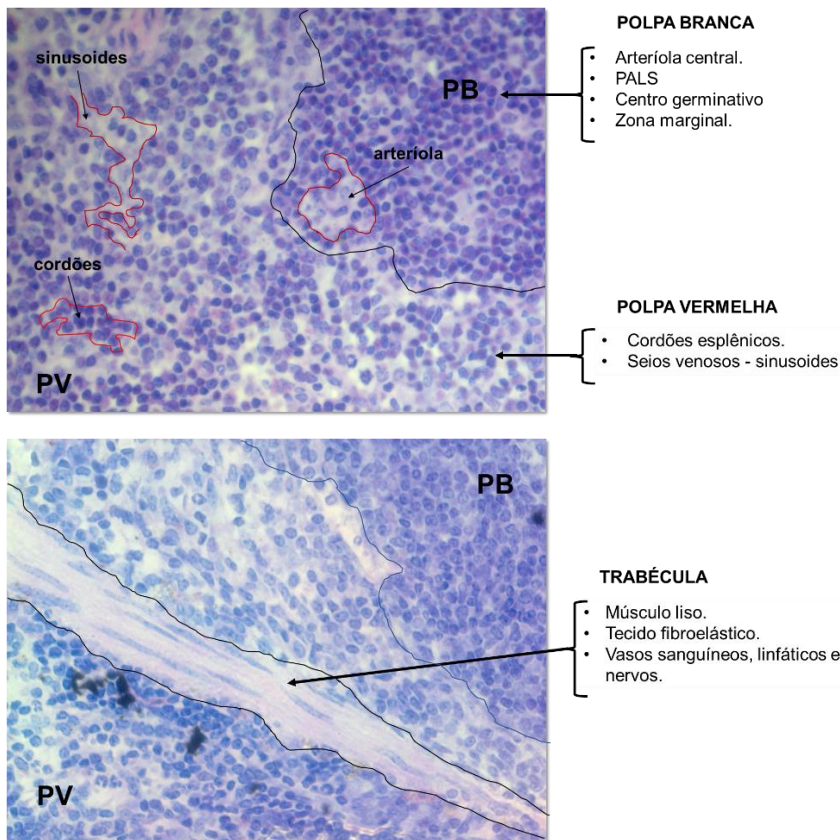
A resposta imunológica inicia-se a partir da entrada do antígeno invasor pela circulação sanguínea chegando até a polpa branca; em seguida, ele passa pela artéria central até chegar ao seio marginal, onde há interligação com as arteríolas radicais. As células apresentadoras de antígenos presentes na região da ZM captam o antígeno selecionado pela bainha linfóide periarteriolar (PALS) e o apresentam para os linfócitos T, que, por sua vez, interagem com os linfócitos B. Essa interação permite que os linfócitos B se proliferem e se diferenciem em plasmócitos dando início à produção de anticorpos e liberando-os para o sangue, o que gera uma resposta imunológica específica (STEINIGER, 2015).

A ZM é o principal local de ativação da resposta imunológica, de sorte que os linfócitos B presentes na ZM são importantes na resposta a antígenos T-independentes. Os antígenos polissacarídeos são capturados pelos macrófagos presentes na ZM, e essa ligação facilita a interação direta que ocorre entre os receptores BCR dos linfócitos B da ZM com os polissacarídeos poliméricos presentes na cápsula dos antígenos. A partir dessa ligação os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos e começam produzir anticorpos do tipo IgM que são importantes para a ativação da via clássica do sistema complemento. A ativação da via clássica é importante para a produção de opsoninas como C3b que atuam na lise desses antígenos. Esse tipo de resposta T-independente é extremamente importante para a defesa do organismo, porque existem diversos antígenos encapsulados que tem cápsula polissacarídica, e por isso, não são facilmente processados e apresentados via receptores MHC pelos macrófagos (HIJAZI *et al.*, 2022).

A localização e a estrutura que o baço apresenta contribuem para que o fluxo sanguíneo passe obrigatoriamente por ele; e por meio da ZM migram imediatamente para a PB e posteriormente para a PV; e, assim, há um monitoramento mais efetivo do sangue pelo sistema imunológico. Ao passo que a PB se limita à imunidade

adaptativa, a ZM envolve tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, por meio de células específicas, tornando o baço um órgão importante para a regulação do sistema imunológico e para a hemostasia do organismo (BRONTE; PITTET, 2013).

A principal diferença do baço de camundongo comparado com o do humano está na estrutura da PB. Em camundongos, a PB é contornada pela ZM, e a região interna da PB nutrida por arteríola central é formada por três zonas, que incluem a zona de linfócitos B maduros, a zona clara e a zona escura, todas constituídas de linfócitos B de vários tamanhos. Já nos humanos a ZM encontra-se ausente, e a região folicular compreende o centro germinativo (CG) constituído por três zonas, denominadas de zona escura, zona clara e zona de manto (STEINIGER, 2015). Estudos mostraram que há uma ligação direta entre o funcionamento do baço e a resposta imunológica, mas não está claro se a AR pode causar alteração morfológica no baço. Sob o ponto de vista imunológico, é possível entender que o baço é importante para uma resposta imune eficaz (SAFERDING; BLÜML, 2019).



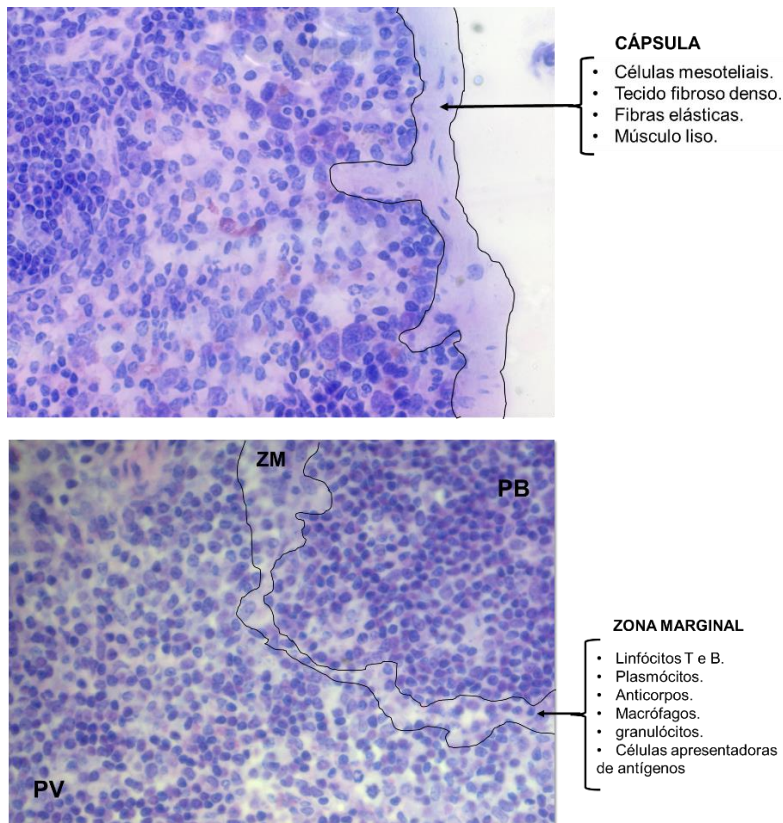


Figura 2. Organização estrutural do baço de camundongo Black-C57BL/6. Seções do baço coradas com azul de toluidina e fucsina.

### 3.2. Baço e a Artrite Reumatoide

O baço é o local de regulação do sistema imunológico, é nesse local que os linfócitos B completam a sua maturação. Os linfócitos imaturos são ativados quando encontram um antígeno invasor e se diferenciam em células efectoras. Os plasmócitos presentes no linfonodo e no baço secretam anticorpos, que migram por meio da corrente sanguínea até o local de infecção (BRONTE; PITTET, 2013).

As formas como os fatores de riscos ambientais contribuem para o surgimento da AR ainda não é bem definida. Entretanto parece que fatores, como *stress* emocional, tabagismos, incluindo infecções virais, podem estimular células em mucosas e promover modificação pós-translacional do aminoácido arginina para uma citrulina dando origem a uma variedade de proteínas como histonas, fibronectina, colágeno e fibrinogênio por meio de um processo denominado de *citrulinação* (ALARCON; ANDRADE, 2007).



Após a citrulinização, os peptídeos que sofreram alterações são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos e são apresentados, via MHC, aos linfócitos T, que, posteriormente ativa os linfócitos B que começam a produzir vários autoanticorpos que reconhecem autoproteínas, incluindo o FR, que são anticorpos direcionados a se ligarem à porção Fc das imunoglobulinas-G (IgG) e dos ACPA, direcionados a reconhecerem proteínas citrulinadas (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

Os resultados dos exames laboratoriais mostram que o paciente com AR apresenta uma anemia normocítica e normocrômica. Além da elevação de provas de atividade inflamatória como: PCR e VHS; cerca de 30 – 50% dos casos apresentam FAN positivo. Há a ocorrência do FR presente no sangue em 70 – 80% dos pacientes, no entanto, somente sua existência não é suficiente para um diagnóstico de AR; já a detecção do anti-CCP (anticorpo anti-peptídeos citrulinados) no sangue indica um marcador mais específico para o fechamento do diagnóstico de AR (MATSUMOTO, 2017).

Estudos mostraram que o surgimento da AR está associado a um gatilho adicional como formação de complexos imunes, ativação do sistema complemento ou alteração microvascular para iniciar a sinovite clínica (KUROWSKA *et al.*, 2017). A resposta autoimune gerada pela presença de autoproteínas pode ser vista nos subcompartimentos da medula óssea, no timo e nos linfonodos (MCINNES; SCHETT, 2011).

Os CGs são estruturas especializadas que são formadas no interior dos órgãos linfoides secundários incluindo o baço, onde ocorre seleção de afinidade, expansão clonal e hipermutação somática de linfócito B que são atraídos para o CG por meio de citocinas secretadas nesse local (ALLEN; CYSTER, 2008). Na presença de antígenos estranhos, os linfócitos B imaturos migram para os locais de células B e T dos órgãos linfoides. Em resposta ao estímulo, as células B se movem para o centro do folículo dando origem ao CG nascente (CHAN *et al.*, 2009) e posteriormente ao CG maduro, caracterizados por zona escura e zona clara, que são importantes para as reações de CG. Na zona escura os linfócitos B sofrem expansão clonal e hipermutação somática do gene do receptor para alterar e aumentar a diversidade. A proliferação acompanhada da hipermutação somática, que ocorre exclusivamente no CG, pode

induzir mutações nocivas no gene do receptor de alguns linfócitos B e consequentemente induzir a apoptose (ARULRAJ *et al.*, 2021).

Na saída para a zona clara, os linfócitos B passam por um processo de seleção positiva e negativa com base em sua afinidade para o antígeno mediado pelas células dendríticas foliculares bem como de acordo com sua interação com os linfócitos T auxiliares foliculares (VICTORA *et al.*, 2010). Os linfócitos B selecionados positivamente são reciclados na zona escura, onde passam por várias rodadas de expansão clonal e hipermutação e dão origem a células B de memória ou plasmócitos, que posteriormente saem do CG e migram para a periferia (MEYER-HERMANN *et al.*, 2012).

### 3.3. Quantificação esplênica

Em humanos, estudos mostraram que o câncer gástrico em fase inicial aumentou o volume da PV em 71% e diminuiu a PB em 8%; a PALS em 8%; e a ZM em 5%. Esses resultados indicaram que houve uma alteração celular dentro desses compartimentos e que possivelmente isso foi a causa da alteração no volume de suas estruturas, além de uma provável ativação de respostas imunológicas contra o tumor, representadas na Tabela 1 (MILICEVIC *et al.*, 1996).

Outro estudo envolvendo vários pacientes com diferentes doenças autoimunes, como anemia hemolítica hereditária, talassemia e esferocitose, mostrou um aumento substancial no volume esplênico, demonstrado por meio do aumento, principalmente, da PV e da diminuição da PB, sobretudo em pacientes com talassemia (BOSMAN; CAVALIERE, 1967). O mesmo cenário foi demonstrado em outras doenças como hepatite crônica, cirrose hepática, hipertensão portal idiopática e trombose venosa esplênica, representado na Tabela 1 (CAVALLI *et al.*, 1982). Tais resultados apontam um aumento significativo do volume total esplênico: a esplenomegalia.

Em camundongos, o crescimento progressivo de tumores induzidos por células tumorais H238 em experimento laboratorial mostrou um aumento no volume esplênico total de 200µl. Houve também aumento da PB em 40% e diminuição do volume da PV em 30%, seguido da diminuição de trabéculas em 1% e da ZM em 15%, representado na Tabela 1 (NUTTER *et al.*, 1980). Resultado semelhante a estudo em humano.

A alimentação prolongada com dietas ricas em gordura pode causar vários distúrbios, como dislipidemia, aumento do volume hepático e consequentemente

acúmulo de gordura nas células do fígado e do baço. Camundongos que foram alimentados com dieta padrão e depois infectados por *Schistosoma mansoni* apresentaram aumento do volume esplênico de 400 mm<sup>3</sup>, demonstrado também pela diminuição da PV em 18% e da PB em 20%. Por sua vez, quando tratados com dieta de alto teor de gordura e infectados por esse mesmo parasita, apresentaram diminuição do volume esplênico de 350 mm<sup>3</sup>, seguida da diminuição significativa da PV em 16% e da PB em 18% em comparação ao grupo de camundongos tratados com dieta de alto teor de gordura, mas não infectados, conforme representado na Tabela 1 (SILVA *et al.*, 2012).

Estudos mostraram que o uso de morfina como analgésico narcótico pode modular a resposta imunológica do organismo. Isso foi demonstrado por meio de experimento em camundongos. Os animais foram expostos ao tratamento prolongado com morfina, e os resultados mostraram diminuição no volume esplênico em 44%, seguida da diminuição dos compartimentos PV em 39% e PB em 43%, o que sugere que o uso prolongado desse fármaco pode modular a resposta imune sanguínea, modificando não só o volume total esplênico, mas também o de seus compartimentos (VOJDANI *et al.*, 2010b).

Tabela 1. Compilação de dados volumétricos do baço de humanos e camundongos submetidos a condições patológicas.

	N	Volume Baço (mm <sup>3</sup> )	PV (%)	T (%)	PB (%)	PALS (%)	ZM (%)	REFERÊNCIAS
<b>HUMANOS</b>								
Saudáveis.		134,40	70,28	4,63	24,90			
Talassemia maior.		337,40	86,83	4,98	8,09			
Esferocitose hereditária.	23	384,90	8,62	4,22	15,01			(BOSMAN <i>et al.</i> , 1966)
Eliptocitose hereditária.		407,50	84,60	4,32	18,84			
Hepatite crônica ativa.		947,00	80,00	4,70	7,70			
Cirrose hepática.		642,50	74,20	7,40	8,10			
Hipertensão portal idiopática.	20	1,398	80,80	4,80	5,10			(CAVALLI <i>et al.</i> , 1982)
Trombose venosa esplênica.		980,00	79,50	7,80	12,70			
Lesão traumática.			65,33		10,74	6,77	6,76	
Câncer gástrico.	18		71,11		8,64	5,39	5,72	(MILICEVIC <i>et al.</i> , 1996)
<b>CAMUNDONGOS</b>								
Tratados com células não tumorais.	18	94,70	42,20	3,20	21,10		23,20	(NUTTER <i>et al.</i> , 1980)
Tratados com células tumorais.		200,00	30,00	1,00	40,00		15,50	
Alimentados com dieta padrão.		160,00	42,00		53,00			
Alimentados com dieta padrão e infectados por <i>S. mansoni</i> .		400,00	18,00		20,00			
Alimentados com dieta de elevado teor de gordura.	20	260,00	36,00		63,00			(SILVA <i>et al.</i> , 2012)
Alimentados com dieta de elevado teor de gordura e infectados por <i>S. mansoni</i> .		350,00	16,00		18,00			
Não tratados.		58,81	67,80	2,80	28,70			
Tratados com morfina.	19	34,87	69,10	3,40	27,40			(VOJDANI <i>et al.</i> , 2010)

**Legenda:** Os dados foram obtidos por estereologia para quantificação de volume esplênico em diferentes doenças em humanos ou camundongos; polpa vermelha (PV), trabéculas (T), polpa branca (PB), bainha linfóide periarteriolar (PALS), zona marginal (ZM).

#### 4. ÓLEO DE COPAÍBA

O óleo de copaíba, dependendo da região no Brasil, é conhecido popularmente como copaíba-angelim, copaíba-preta, copaíba-rosca, copaíba-rósea, copaíba-roxa, copaíba-vermelha, copaibeira, marimari, óleo-pardo, óleo de copaíba, pau d'óleo (FEITOSA *et al.*, 2018). Pertence à família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae, gênero *Copaifera* L., que possui mais de 28 espécies catalogadas, das quais 16 são endêmicas no Brasil, e nove destas estão presentes na Amazônia brasileira, incluindo a *Copaifera multijuga* Hayne, espécie utilizada no presente estudo (PAIVA *et al.*, 2002).

A árvore de copaíba pode alcançar 60 metros de altura; sua casca é lisa, de coloração cinza-avermelhada; sendo a extração do óleo realizada a partir do tronco da árvore. Por ser constituída por ácidos resinosos e compostos voláteis, denomina-se óleo-resina (BRUM, CAMARGO, FERRAZ, 2009), o qual apresenta uma coloração amarelo-clara e é bastante utilizado pelas empresas como combustível, vernizes, tinturas e cosméticos, além de fixador de essências (ALENCAR, 1982).

Na medicina tradicional, o óleo é utilizado com diferentes funções, incluindo curativo e anti-inflamatório (AMES-SIBIN *et al.*, 2018a; FRANCISCO, 2005), antisséptico (DIEFENBACH *et al.*, 2018), antineoplásico (LIMA *et al.*, 2003), antimicrobiano Gram-positivo (MASSON *et al.*, 2013), bronquite, úlcera, dermatite, sífilis (BRANDÃO *et al.*, 2008), além de atividades antinociceptivas periféricas e centrais (GOMES *et al.*, 2007), cicatrização (PAIVA *et al.*, 2002), antiperiodontite (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009) e na atividade de antileishmania (SANTOS *et al.*, 2008).

O óleo de copaíba é comumente utilizado por meio da ingestão do composto bruto, que apresenta em sua propriedade vários componentes como os sesquiterpenos que apresentam o  $\beta$ -cariofileno como componente majoritário; este exerce atividade antioxidante e anti-inflamatória e reduz o edema da pata em ratos com artrite induzida com adjuvantes (AMES-SIBIN *et al.*, 2018a; DINI, 2019; LUCCA *et al.*, 2015; TAPPIN *et al.*, 2004). Além de exercer atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica, o  $\beta$ -cariofileno diminui a apoptose e apresenta propriedades antineoplásicas do colorretal (CALLEJA *et al.*, 2013; DAHHAM *et al.*, 2015).

Em modelo experimental, reduziu a mortalidade e apresentou efeito protetor sobre convulsões em camundongos induzidos pelo ácido caínico (LIU *et al.*, 2015). Os efeitos anti-inflamatórios do  $\beta$ -cariofileno podem ser vistos também na diminuição da fibrose hepática em modelo experimental de camundongo (CALLEJA *et al.*, 2013), além de atividades antialérgicas *in vitro* e *in vivo* (JIN *et al.*, 2011).

O efeito fitoterápico do óleo de copaíba e a toxicidade podem variar de acordo com a dose administrada. Um estudo mostrou que a administração oral de doses de 580mg/kg e 1.150mg/kg uma vez por dia, durante 18 dias, apresentou ações sistêmicas anti-inflamatórias, antioxidantes e antiedematogênicas, contudo a dose maior foi tóxica ao fígado, pois apresentou danos na morfologia das células hepáticas de ratos (CASTRO GHIZONI *et al.*, 2017). Outro estudo mostrou que a utilização de dose superior a 2.000mg/kg é tóxica sugerindo que doses inferiores a essa concentração são mais seguras (SACHETTI *et al.*, 2009).

A avaliação antiedematogênica já está bem consolidada, e um estudo provou, por meio da comparação de tratamento via oral com nanoemulsão a 15% de copaíba, óleo-resina de copaíba (puro) e óleo destilado de copaíba, que a nanoemulsão a 15% de copaíba foi mais eficiente na diminuição do edema de pata em camundongo induzido por zymosan (SILVA, 2019a). Contudo são poucas as investigações sobre os efeitos da *Copaifera multijuga* Hayne sobre o baço, especialmente acerca do processo anti-inflamatório na estruturação celular esplênica, na doença e no tratamento (AMES-SIBIN *et al.*, 2018a; CASTRO GHIZONI *et al.*, 2017).

## 5. ESTEREOLOGIA

A estereologia é um conjunto de métodos matemáticos estratégicos utilizados para garantir uma análise quantitativa acurada de determinados parâmetros (volume, área superficial e número de células) de qualquer tipo de estrutura independentemente de sua forma. Quando aplicada corretamente, exerce uma função importante na investigação de hipóteses experimentais gerando resultados precisos, eficientes e confiáveis. De forma geral, a estereologia busca proporcionar métodos quantitativos que irão contribuir para o avanço da pesquisa, de modo que se dê credibilidade aos resultados obtidos (WANG *et al.*, 2018).

A maioria dos estudos realizados com o baço tem concentrado suas pesquisas em análises semiquantitativas, repletas de viés sistemático (HOWARD; REED, 2005).

Essas avaliações introduzem erros de amostragem que conduzem a conclusões duvidosas. A estereologia se utiliza de informações 2-D (seções histológicas) para produzir dados 3-D precisos e acurados (URANCHIMEG., 2010; ENGLER *et al.*; 2010; APARECIDA *et al.*, 2018).

O método estereológico é de grande relevância, pois constitui um sistema simples e eficaz, considerado padrão ouro quantitativo. Desde seu surgimento na década de 60, a estereologia vem sendo utilizada em vários campos do conhecimento embora na área clínica normalmente se utilizem métodos com projeções de imagens para análise do baço, como a ultrassonografia, a ressonância magnética, a tomografia computadorizada e a cintilografia (SILVERMAN *et al.*, 1999, YETTER *et al.*, 2003).

A escolha desse método foi devido a outros estudos promissores realizados no âmbito da pesquisa científica, os quais mostraram o uso da estereologia como um método quantitativo simples, que não requer ferramentas sofisticadas, de fácil execução e de baixo custo (BOLENDER, 1992; CAGLAR *et al.*, 2014; FARIA; SEYFERT, 2008).

## 6. OBJETIVO

### 6.1. Objetivos gerais

Avaliar por estereologia a estrutura do baço de camundongos da linhagem Black-C57BL/6 induzidos a desenvolver inflamação pelo composto Zymosan e tratados oralmente com o óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne).

### 6.2. Objetivos específicos

1. Determinar o volume absoluto do baço por estereologia.
2. Estimar o volume da polpa vermelha e da polpa branca.
3. Estimar o volume da cápsula e das trabéculas.
4. Estimar o volume dos componentes presentes na polpa vermelha e na polpa branca.
5. Estimar o número total de plasmócitos, macrófagos e linfócitos no baço.
6. Avaliar a capacidade do óleo de copaíba em preservar a morfologia do baço.



## **7. MATERIAL E MÉTODOS**

### **7.1. Tipo de estudo, local e período**

Trata-se de um estudo experimental realizado no Laboratório de Morfologia Quantitativa/ICB da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, em Manaus-AM. O experimento foi realizado no período de janeiro de 2020 a dezembro de 2021.

### **7.2. Aspectos éticos**

Todos os procedimentos seguiram as diretrizes do Conselho Brasileiro para o Controle da Experimentação Animal – CONCEA – e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas – CEUA-UFAM, sob o protocolo 035/2019 (ANEXO 1).

### **7.3. Animais de estudo**

No experimento foram utilizados quinze (n=15) camundongos fêmeas da linhagem Black-C57BL/6, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Como dois terços da população que desenvolvem AR são mulheres e como vários estudos apontam o sexo feminino como fator de risco para o desenvolvimento da doença, optamos por utilizar em nosso estudo camundongos fêmeas (DEANE *et al.*, 2017). Os animais pesavam entre 18 – 38g, com idade de 60 dias.

#### 7.4. Obtenção do óleo destilado de copaíba (*Copaifera* spp.)

O óleo destilado de copaíba (ODC) utilizado no experimento foi fornecido pelo Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, localizado na Universidade Federal do Amazonas, coordenado pelo Prof. Dr. Emerson Lima. O óleo-resina de copaíba foi extraído da copaibeira por meio da perfuração realizada no caule da árvore por indígenas da comunidade Dessano, Oka Diakuru, na comunidade do Tupé de Rio Negro (3°03'10,3'' S 60°18'23,4'' W), em Manaus – AM. A coleta foi realizada em 15 de abril de 2018. Como foram os indígenas da comunidade que coletaram o óleo-resina, não foi feita a exsicata.

O acesso foi cadastrado na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), do Ministério do Meio Ambiente (ANEXO 2). O óleo-resina de copaíba foi submetido ao processo de destilação por arraste a vapor, de acordo com (SILVA *et al.*, 2022). A descrição do procedimento encontra-se no ANEXO 3. O ODC foi armazenado em frasco de plástico, protegido da luz, à temperatura ambiente, até a sua utilização.



Figura 3. Extração do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.). Perfuração e extração do óleo-resina de copaíba direto do tronco da árvore copaibeira. Fonte: (ASSIS, 2019).

#### 7.5. Característica físico-química do ODC

O ODC utilizado nesta pesquisa apresentou como característica físico-química aspecto líquido, límpido, transparente, fino e oleoso; cor amarelo-clara; odor característico do próprio óleo; densidade de 0,8942g/mL; viscosidade 10,7cP; e pH entre 6,0-7,0.

A cromatografia do ODC identificou 14 componentes envolvendo 100,00% das substâncias presentes, entre as quais as principais identificadas foram os

sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno (40,7%), o óxido cariofileno (13,6%), o  $\alpha$ -copaeno (10,8%) e o (*E*)- $\alpha$ -bergamoteno (8,02%). Realizados de acordo com (SILVA *et al.*, 2022), os procedimentos para a caracterização físico-química e a cromatografia do ODC encontram-se nos ANEXOS 4 e 5.

## 7.6. Delineamento experimental

Os camundongos foram randomizados por meio do *site* randomizer.org e separados em três grupos experimentais: **salina** (controle negativo: sem indução da AR), **Zy** (indução da artrite experimental sem tratamento) e **Zy/Cop** (indução da artrite + tratamento com copaíba). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno abertas (*open cage*), em ambiente com temperatura controlada a 20 - 22°C, com ciclo de claro/escuro de 12/12 horas e com acesso *ad libitum* à ração e à água. O monitoramento dos animais foi acompanhado diariamente até o término do experimento durante 23 dias (552 horas) (Figura 4

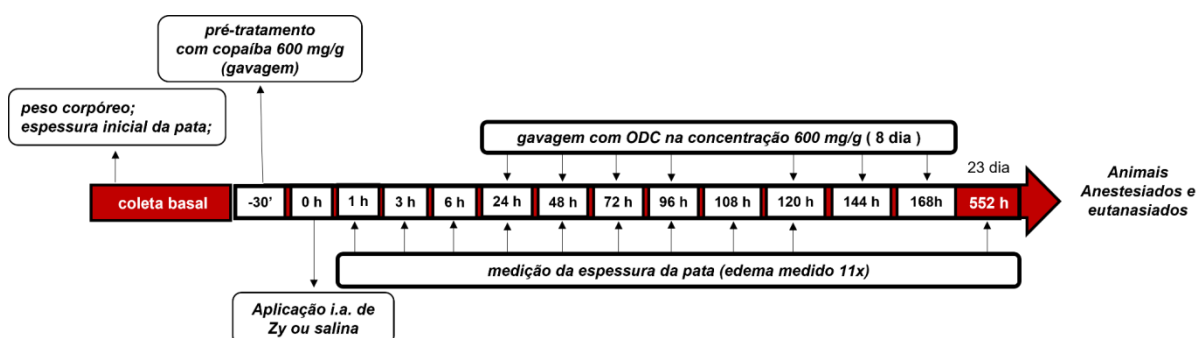


Figura 4. Desenho experimental. Etapas que antecedem o experimento (coleta basal), seguidas do início da experimentação animal (-30') antes do tempo 0, i.a. (intra-articular), Zy (zymosan).

## 7.7. Indução da artrite experimental

A experimentação animal começou no primeiro dia, intitulado “tempo zero”, quando foi realizada a aplicação intra-articular (i.a.) de zymosan no grupo **Zy** e de solução salina no grupo **Salina**, ambos na articulação tíbio tarsal da pata posterior esquerda. O grupo **Zy** foi injetado com 500  $\mu$ g de zymosan (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em 25  $\mu$ L de solução salina estéril; o preparo da solução de zymosan encontra-se no ANEXO 6. No grupo **Salina**, foi injetado uma única dose contendo 25  $\mu$ L de solução salina estéril a 1% de acordo com (AMES-SIBIN *et al.*, 2018b). Os camundongos foram acompanhados por 552 horas. Este estudo optou pela utilização

do zymosan devido ao seu baixo custo operacional; também pelo fato de o início do processo inflamatório estar bem estabelecido (MENEZES, 2016).

#### 7.8. Tratamento com copaíba

O grupo **Zy/Cop** foi tratado com 600 mg de ODC diluído em uma solução de veículo (solução salina, 1% + Tween, 20x). Esta dose foi administrada por gavagem de acordo com o peso de cada animal, com a média de 108  $\mu\text{L/g}$ ; o protocolo para o preparo e a distribuição das doses de ODC encontra-se no ANEXO 7. Os animais foram tratados uma vez por dia pela manhã durante oito dias antes da indução da artrite (30 minutos antes) e por mais sete dias. A utilização da copaíba se fez necessário devido ser amplamente utilizada na medicina popular, seu fácil acesso, baixo custo e a facilidade do tratamento via oral usado popularmente. A concentração de ODC neste estudo foi definida com base na revisão sistemática realizada por (DINI, 2019).

#### 7.9. Espessura da pata (edema)

O edema das patas foi medido duas semanas antes e nos tempos de 1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 108h, 120h e 552 horas. Para a aferição, foi utilizado um paquímetro digital (Mitutoyo Absolute, Japão) e as medidas respeitaram sempre a mesma posição em relação ao coxim plantar. Com o intuito de reduzir a margem de erro, as medidas foram realizadas três vezes e obtida a média aritmética. Os resultados foram aplicados na seguinte equação:

$$\text{Espessura da pata} = \text{espessura final} - \text{espessura inicial}$$

Esse dado teve a finalidade de demonstrar se a escolha do modelo artrítico induzido por zymosan foi efetivo no edema demonstrado por outros estudos (FRASNELLI *et al.*, 2005; SILVA, 2019a). A espessura da pata do grupo **Zy/Cop** não foi aferida. Estudos prévios mostraram que a copaíba reduz o edema de pata (SILVA *et al.*, 2022; AMES-SIBIN *et al.*, 2018b; DINI, 2019).

### 7.10. Peso corpóreo

O peso corpóreo foi monitorado antes do pré-tratamento com copaíba (30 minutos antes). Para tal, foi utilizada uma balança analítica. O peso médio inicial dos animais foi de 23 – 33 g. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a dose de copaíba a ser fornecida para cada animal (ANEXO 7).

### 7.11. Remoção e fixação do baço

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com cetamina (82 mg/kg) e xilazina (5,75 mg/kg) e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical. O baço foi removido e imediatamente fixado em solução de formaldeído tamponado por 48h.

### 7.12. Determinação do volume esplênico

Para obtenção de uma determinação não enviesada do volume total do baço, foram utilizados dois métodos para a comparação: deslocamento de fluido (SCHERLE, 1970) e contagem de pontos (CAVALIERI, 1653).

### 7.13. Volume por Deslocamento de fluido

A determinação do volume absoluto do baço foi feita por deslocamento de fluido segundo Scherle (1970). Para o procedimento, foi utilizada uma balança analítica (Shimadzu AY220, Japão) e um fluido de densidade conhecida. O órgão foi totalmente submerso em um béquer contendo solução fixadora, elevado por um fio de cobre para que não encostasse no fundo e nas laterais do recipiente conforme demonstrado na Figura 6. O volume final do órgão foi obtido após a correção da densidade do líquido utilizando a seguinte equação:  $V = PS/DF$ , onde V é o volume absoluto do órgão; PS é o peso do órgão submerso (g); e DF é a densidade do fluido (formol tamponado = 1,2704 g/mL.cm<sup>3</sup>).



Figura 5. Esquema de avaliação do volume por deslocamento de fluido. O baço é totalmente submerso em um béquer contendo formol tamponado, elevado por um fio de cobre, o que evita que encoste no fundo e nas laterais do recipiente.

#### 7.14. Processamento histológico

Após a fixação, os baços foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70 e 96%) e cortados ao meio em relação ao seu maior eixo; em seguida, foram organizados em moldes improvisados preenchidos com resina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraeus, Alemanha). Os moldes em resina foram conservados em estufa aquecida a 40° C por 24h para a polimerização da resina.

Para garantir imparcialidade na amostragem, os órgãos foram rotacionados de forma aleatória e sistemática para produzir seções isotrópicas uniformes (IUR sections) (MATTFELDT *et al.*, 1990) antes da polimerização da resina. A microtomia foi realizada com um micrótomo (Leica RM 2345, Alemanha), gerando 8 - 10 seções a 1 mm de distância entre as seções que foram coradas com azul de toluidina a 0,5% por 5 segundos e fucsina por 4 segundos (ANEXO 8 e Figura 5). Os procedimentos foram realizados de acordo com Kiernan (1999).

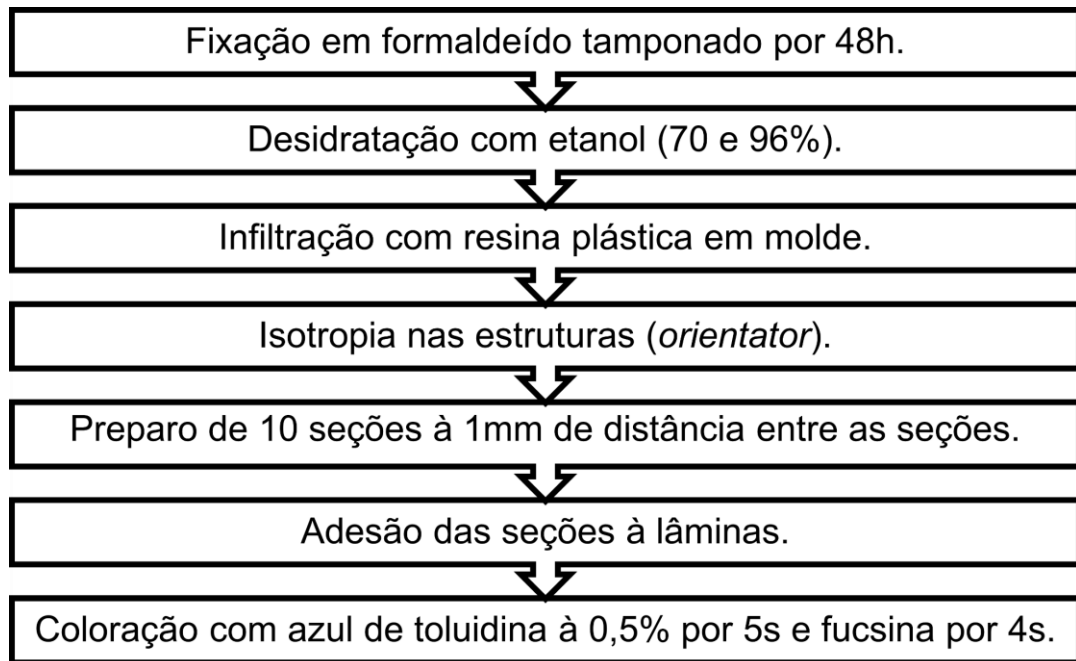


Figura 6. Processamento histológico do baço. Fixação, desidratação, infiltração, isotropia, confecção das seções (micrótomo), preparo das lâminas e coloração.

#### 7.15. Volume por contagem de pontos (Princípio de Cavalieri)

A determinação do volume esplênico foi obtida por meio das seções seriais e em conformidade com o princípio de Cavalieri (1635). As seções foram visualizadas em um baixo aumento (40 x). Para tal, um sistema teste de contagem foi sobreposto às seções histológicas e visualizadas com a ajuda de um microscópio (Olympus, BX-54, Alemanha) no aumento de 4. Para a realização das análises, utilizou-se um *software* Imod versão 4.7/módulo *stereology*, que sobrepõe às imagens um sistema de contagem contendo pontos distribuídos de forma sistemática, uniforme e ao acaso (KREMER; MASTRONARDE; MCINTOSH, 1996). O coeficiente de erro satisfatório determinado foi de 5% (GUNDERSEN *et al.*, 1988). O volume do baço foi calculado como:

$$V_{baço} = \sum_{i=1}^m Pi \times T \times \frac{a}{p}$$
 onde,  $\sum Pi$  é o número total de pontos no sistema que tocava o baço,  $a/p$  é área ocupada por cada ponto central ( $0,04 \text{ mm}^2$ ) e  $T$  (1 mm) é a distância entre cada seção.

### 7.16. Volume dos componentes esplênicos

O percentual dos componentes do baço foi obtido pelo princípio de Delesse (DELESSE, 1848) que consiste em aplicar um sistema de contagem de pontos em campos de vista microscópicos selecionados e, a partir daí, determinar a porcentagem dos seguintes componentes: cápsula, trabécula, sinusoides, cordão esplênico, folículo, PALS, arteríola central, CG e ZM.  $PV$  = sinusoides, cordão esplênico.  $PB$  = folículo, PALS, arteríola central, CG e ZM. Um aumento de 400 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 (baço) foi calculado como:  $Vv = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m Pref}$ , onde  $Vv$  é a densidade de volume de determinado componente (cápsula, trabécula, sinusoides, cordão esplênico, folículo, PALS, arteríola central, CG e ZM);  $P_{comp}$  é a soma de pontos no componente específico; e  $Pref$  é a somatória de pontos que tocarão o espaço de referência (baço) (HOWARD; REED, 1998). Os dados percentuais foram obtidos para cada componente e foram transformados em absolutos ao serem multiplicados pelo volume de Cavalieri:

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

### 7.17. Contagem do número de células

Uma quantificação 3-D foi empregada para a determinação do número de plasmócitos, macrófagos e linfócitos por meio do *Disector*; o protocolo se encontra no ANEXO 9 e foi feito de acordo com (HOWARD; REED, 1998; STERIO, 1984). Com o auxílio de um microscópio de luz (Olympus BX41, Japão) de aumento 1000, “foram mergulhados” 6  $\mu\text{m}$  nas seções histológicas. Um negatoscópio refletiu e projetou sobre cada seção a imagem do sistema teste de contagem, seis por campo de vista, o que serviu de referência para a contagem do número de células. A densidade numérica foi calculada segundo a equação:

$$Nv = \frac{1}{\frac{a}{f} \times h} \times \frac{\sum_{i=1}^m Q-}{\sum_{i=1}^m Pi}$$

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 tocarão o espaço de referência (órgão). Os resultados obtidos foram multiplicados pelo volume do órgão para a obtenção do número total de células.

## 8. ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  DP. Os dados foram analisados pelo programa estatístico Prisma (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Os dados foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e foram analisados por meio de ANOVA (análise de variância one-way). Em caso de diferença entre os grupos, o teste paramétrico de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para comparar os valores médios entre os grupos. O limite de confiança determinado para os testes foi de 5%. Para as análises multivariadas utilizou-se o programa PAST-PAleontological STatistics, version 3.14 (Hammer et al. 2001).

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Espessura da pata

O grupo Zy foi efetivo em evidenciar edema na pata, conforme demonstrado na Figura 7 B, após 1 hora de injeção i.a., houve um pico do edema 6h e permanecendo edemaciado ao longo das 552 horas (23.º dia) de experimentação.

Os valores obtidos de pata no Zy corresponderam aos obtidos por Keystone *et al.*, (1977), que mostrou uma inflamação proliferativa com infiltração de células mononucleares, hipertrofia sinovial e formação de pannus com o pico da doença no 2.º dia e com diminuição da inflamação após o 14.º dia, com recidiva após o 25.º dia, caracterizado como um modelo artrítico bifásico por desenvolver uma resposta de fase aguda (<7 dias) e outra de fase crônica (>25 dias) (FRASNELLI *et al.*, 2005).

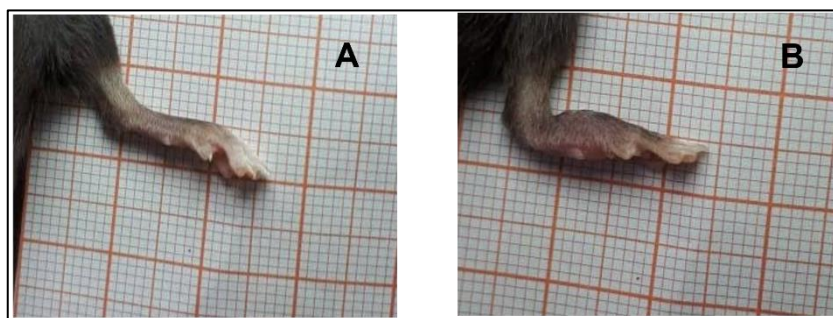


Figura 7. Imagem representativa da pata posterior esquerda. Camundongo da linhagem Black-C57BL/6 antes da inoculação, sem edema (A); E após a inoculação intra-articular (i.a.) de Zy, com edema (B).

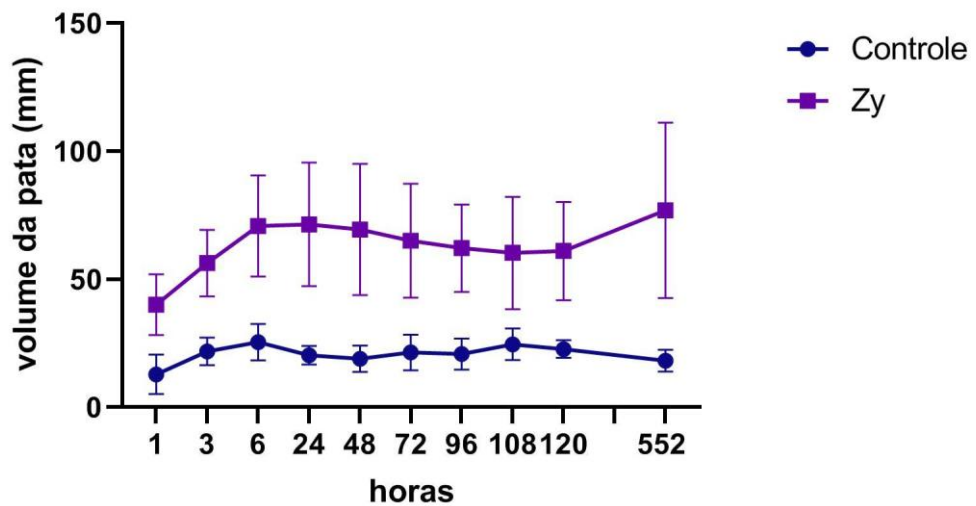


Figura 8. Volume da pata esquerda em função do tempo. Volume da pata medido em diferentes tempos (1h, 3h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 108h, 120h e 552 (23.º dia) após a inoculação de Zy; e salina no grupo salina. A espessura da pata esquerda foi obtida em (mm). Os resultados são expressos pela média  $\pm$  erro-padrão da média. Houve um aumento significativo de volume da pata do grupo Zy após 3 h [ $p=0.0097$ ], 6 h [ $p=0.0002$ ], 24 h [ $p<0.0001$ ], 48 h [ $p<0.0001$ ], 72 h [ $p=0.0004$ ], 96 h [ $p=0.0010$ ], 108 h [ $p=0.0067$ ], 120 h [ $p=0.0028$ ] e 552 h [ $p<0.0001$ ] comparado ao grupo salina.

A Tabela 2 mostra o percentual do volume da pata esquerda de acordo com o tempo, o que sugere que o modelo artrítico induzido por zymosan foi efetivo no aumento do volume da pata de acordo com o tempo e apresentando um pico após 6h (119,42%) e após 552h (130,09%) no grupo Zy comparado ao salina.

A indução i.a. do zymosan em joelhos comumente promove uma infiltração de células polimorfonucleares, e há uma hipertrofia da membrana sinovial e a formação de *pannus*, que podem gerar danos à cartilagem (KEYSTONE *et al.*, 1977b). O edema na articulação é um sinal que é desenvolvido nas primeiras 6 horas da indução; e após 7 dias há uma diminuição significativa da sua espessura (FEARON; AUSTEN, 1977), contudo um estudo mostrou que a inflamação pode permanecer até 25 dias da indução (FRASNELLI *et al.*, 2005).

Tabela 2. Avaliação detalhada do volume da pata esquerda.

$\Delta$ volume da (pata injetada)	salina	Zy
+ 1 hora	12,67 $\pm$ 7,74 (22,03%)	37,93 $\pm$ 11,93 (65,26%)
+ 3 horas	21,60 $\pm$ 5,42 (37,57%)	54,20 $\pm$ 13,01 (94,26%)
<b>+ 6 horas</b>	<b>25,27 <math>\pm</math> 7,12</b> <b>(43,94%)</b>	<b>68,67 <math>\pm</math> 19,74</b> <b>(119,42%)</b>
+ 24 horas	20,07 $\pm$ 3,64 (34,90%)	69,33 $\pm$ 24,12 (120,58%)
+ 48 horas	18,73 $\pm$ 5,09 (32,58%)	67,33 $\pm$ 25,64 (117,10%)
+ 72 horas	21,20 $\pm$ 6,97 (36,87%)	62,93 $\pm$ 22,28 (109,45%)
+ 96 horas	20,60 $\pm$ 6,07 (35,83%)	60,00 $\pm$ 17,04 (104,35%)
+ 108 horas	24,40 $\pm$ 6,22 (42,43%)	58,13 $\pm$ 21,93 (101,10%)
+ 120 horas	22,53 $\pm$ 3,45 (39,19%)	58,87 $\pm$ 19,21 (102,38%)
<b>+ 552 horas</b> <b>(23 dias)</b>	<b>18,00 <math>\pm</math> 4,26</b> <b>(31,30%)</b>	<b>74,80 <math>\pm</math> 34,23</b> <b>(130,09%)</b>

Legenda. O volume da pata no tempo inicial (-30') foi de 57,50 mm; os resultados foram obtidos por meio do cálculo ( $\Delta$ volume das patas = volume final representado a cada horário – volume inicial (-30')), expresso em (mm) e utilizado para a obtenção da média  $\pm$  desvio padrão (DP).

## 9.2. Histologia

A Figura 9A mostra o baço do grupo salina contornado por uma cápsula fina, formada por fibras musculares lisas, fibras colágenas e tecido fibroso denso. Na Figura 9B, mostra-se um parênquima esplênico evidenciando a PV e a PB. A PB é formada por agregações de linfócitos em torno das arteríolas centrais; e, na parte mais interna da PV, é possível visualizar sinusoides e cordões esplênicos, formados por plasmócitos, macrófagos e eritrócitos sustentados por um estroma de células reticulares e fibras. A Figura 9C mostra trabéculas derivadas da cápsula, que conduzem vasos sanguíneos até o parênquima esplênico.

A partir da Figura 9D, encontram-se as estruturas do grupo Zy, iniciando-se com uma cápsula fina dando origem a uma pequena trabécula. O parênquima esplênico na Figura 9E mostra a PV e a PB. Na PB é possível visualizar agregações linfocitárias; e a PV mostra sinusoides espessados, seguidos da presença de trabécula aparentemente espessada e alongada (Figura 9F). Por meio da análise histológica qualitativa não foi possível mensurar a presença de alterações morfológicas entre os grupos salina, Zy e Zy/Cop.

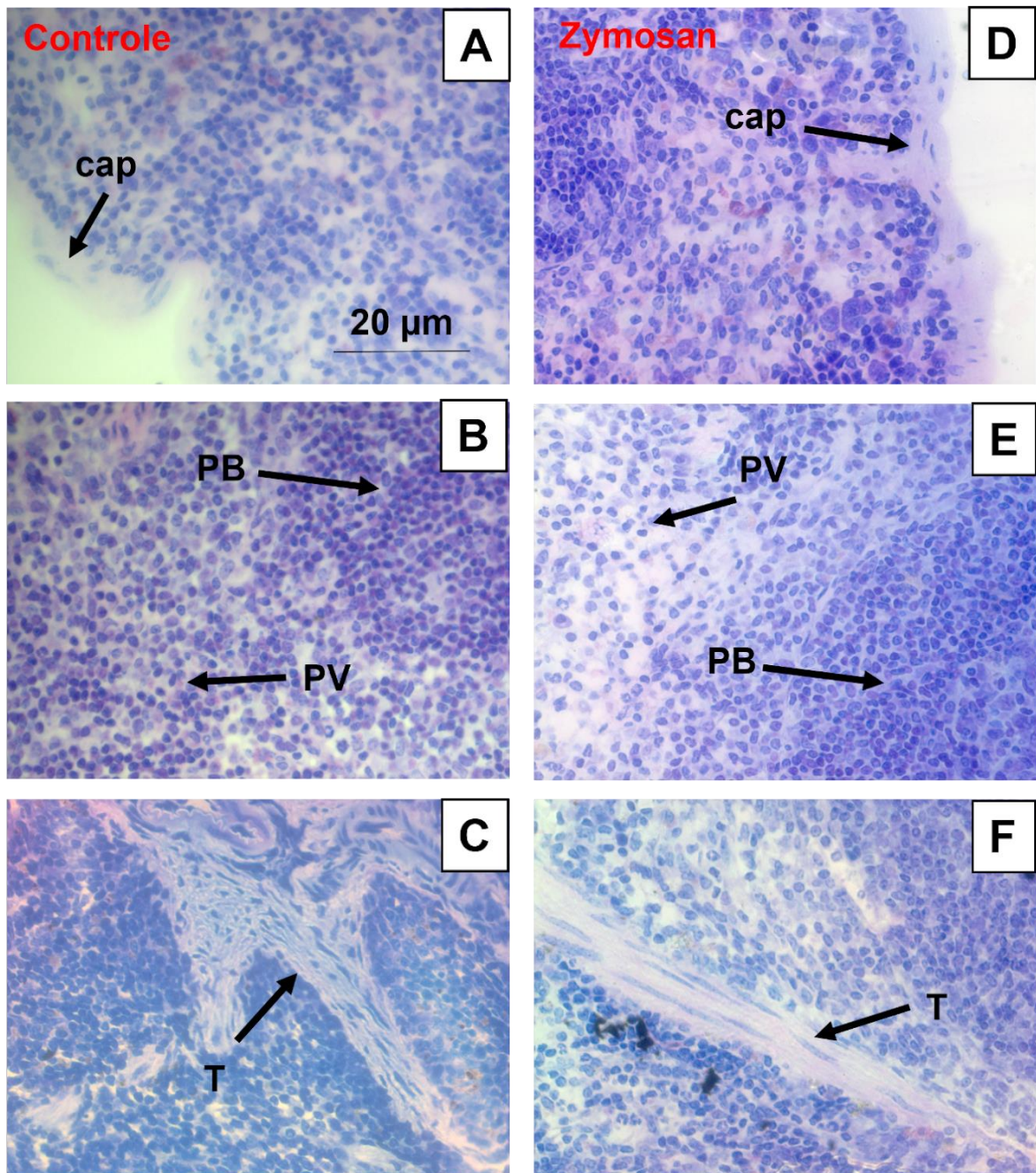


Figura 9. Seções histológicas do baço coradas com toluidina e fucsina. Grupo salina: A, B e C); o baço é visto revestido por uma cápsula (cap). B) O parênquima esplênico do baço é visto formado por polpa branca (PB) e por polpa vermelha (PV). C) A trabécula (T) com três projeções é vista no parênquima esplênico. Zy: D, E e F) O baço é visto revestido por uma (cap.) dando origem a uma trabécula curta. E) O parênquima esplênico do baço é visto formado por PB e PV. F) O baço é visto com T espessa e longa. Seções histológicas indicando as estruturas internas do baço; aumento 20x.

### 9.3. Estereologia do baço

Não houve alteração significativa na massa corporal (Fig. 10A). Não houve diferença significativa entre os métodos utilizados para a determinação do volume (Fig. 10B). Mesmo quando o volume é normalizado em função da massa não houve diferença entre os grupos (Fig. 10C).

Não houve alteração significativa no componente conjuntivo (Fig. 11A), contudo, o volume da cápsula foi reduzido significativamente em Zy (Fig. 11B) em relação à Salina. Em oposição, o volume da trabécula aumentou em Zy e Zy/Cop (Fig. 11C).

A polpa vermelha esteve aumentada em Zy/Cop quando comparada a Salina e ao Zy (Fig. 12A). As mesmas alterações significativas e nos mesmos grupos foram observadas para os cordões esplênicos (Fig. 12B). Não observamos alterações significativas nos sinusoides esplênicos (Fig. 12C).

A polpa branca diminuiu de volume em Zy/Cop em relação à Salina e em relação ao Zy (Fig. 13A). Apesar disso, uma pequena, mais significativa queda foi observada em PALS do grupo Zy (Fig. 13B). Os folículos também diminuíram de volume em Zy/Cop em relação à Salina e em relação ao Zy (Fig. 13C). As arteríolas centrais estiveram reduzidas em Zy e Zy/Cop (Fig. 13D). Não alteração no volume da zona marginal (Fig. 13E), contudo, o volume dos centros germinativos reduziu em Zy/Cop (Fig. 13F).

A população de células imunes apresentou variação no presente estudo. O número de plasmócitos esteve elevado em Zy/Cop em relação a Salina e Zy (Fig. 14A). Os macrófagos aumentaram em Zy/Cop em relação à Salina (Fig. 14B). Os linfócitos aumentaram significativamente em Zy em relação a Salina e a Zy/Cop (Fig. 14C).

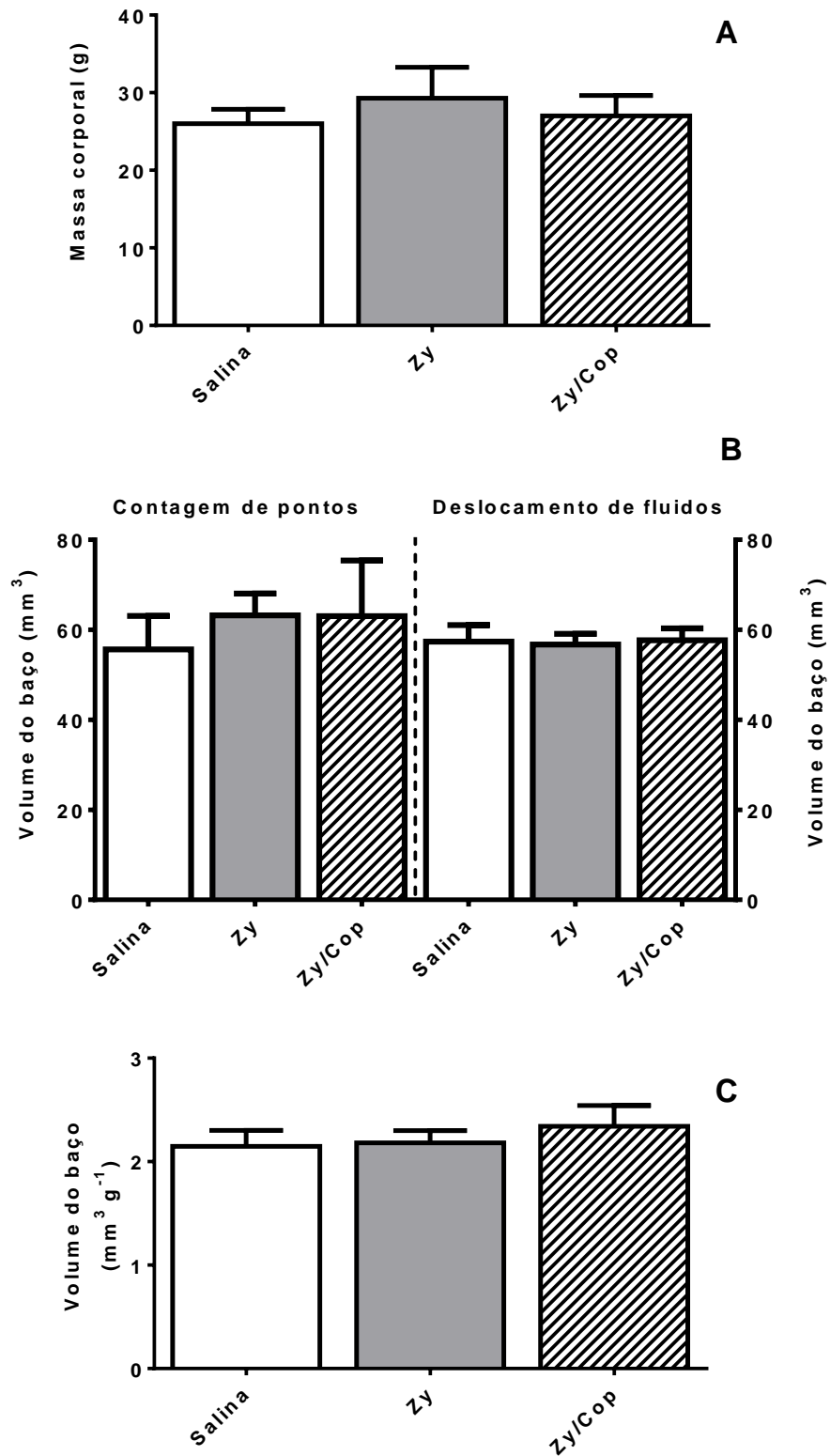


Figura 10. A. Massa corporal. B. Determinação do volume do baço por contagem de pontos (Princípio de Cavalieri) e por deslocamento de fluido. Notar a proximidade dos valores. C. Volume do baço em função da massa. p = diferença significativa entre os grupos.

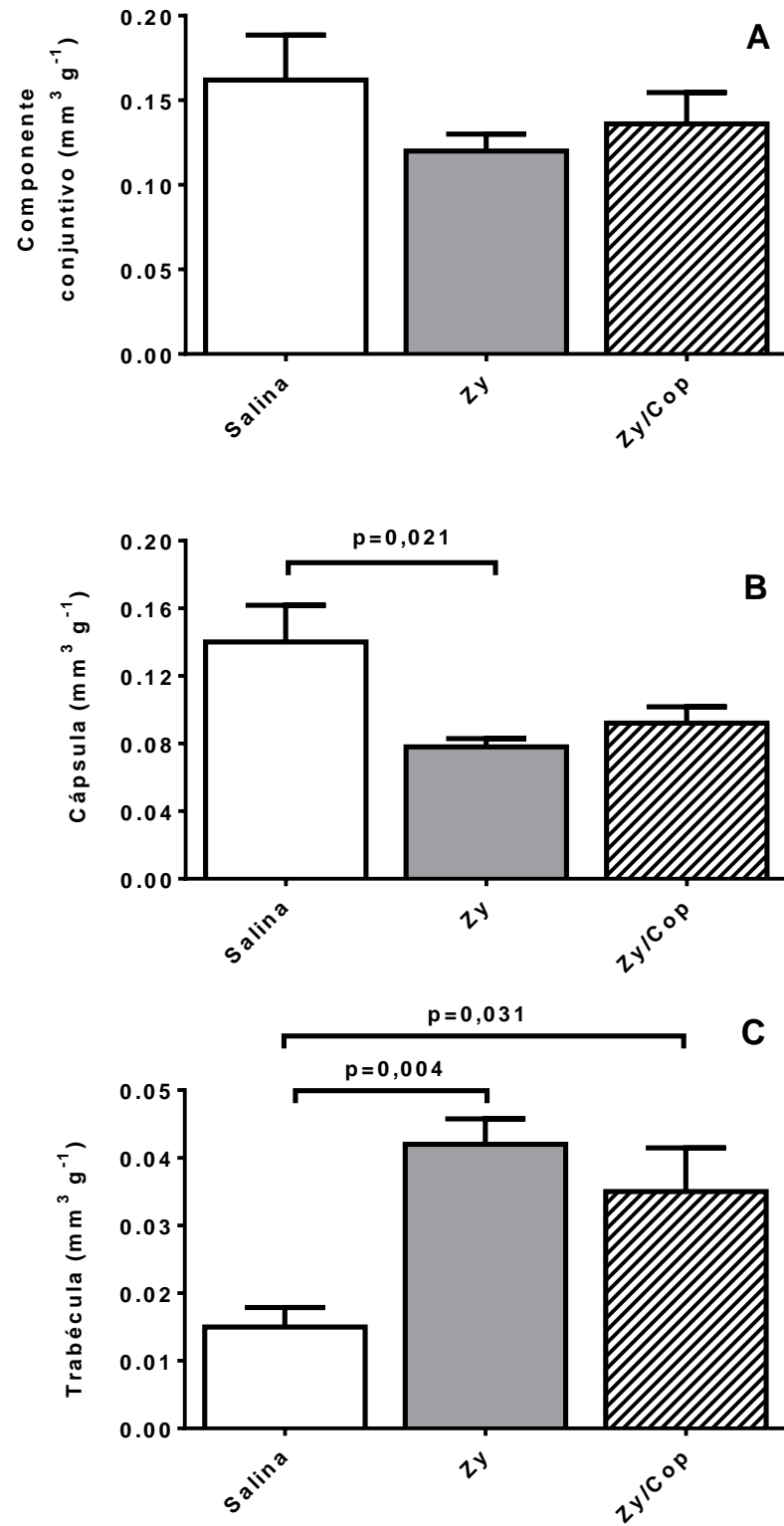


Figura 11. A. Componente conjuntivo (cápsula + trabécula). B. Cápsula. C. Trabécula.  $p$  = diferença significativa entre os grupos.

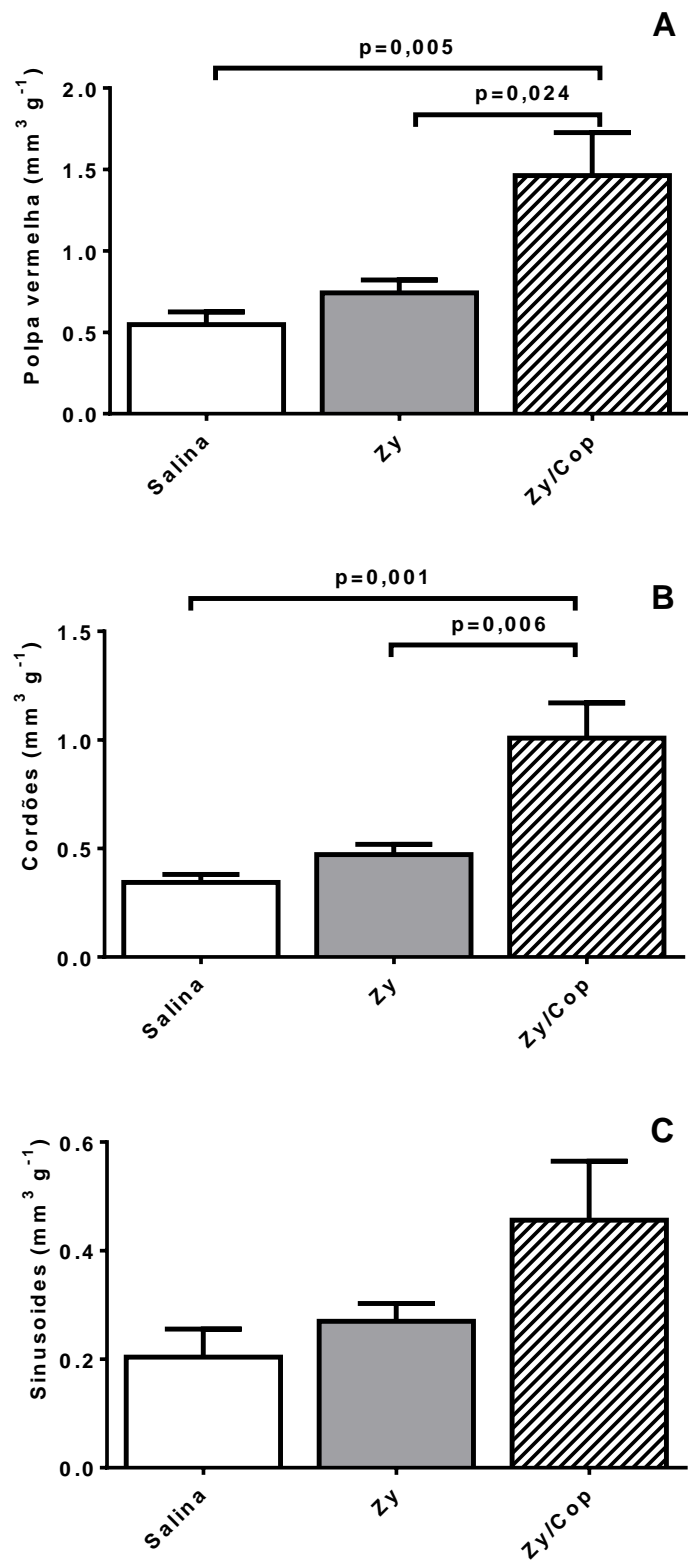


Figura 12. Volume da polpa vermelha (A). Cordões esplênicos (B). Sinusoides esplênicos (C). p = diferença significativa entre os grupos.



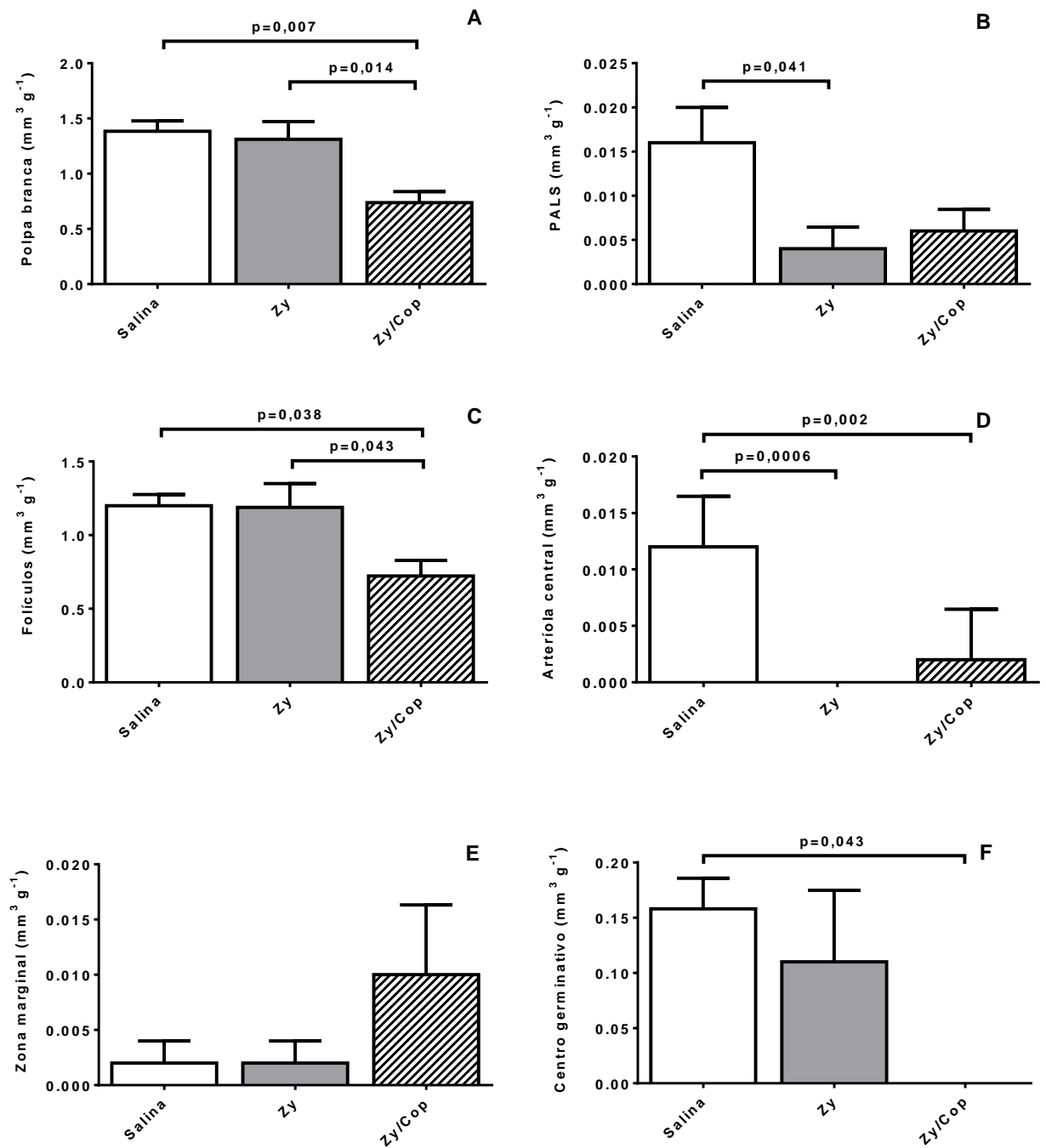


Figura 13. Volume da polpa branca (A). PALS (B). Folículos (C). Arteriola central (D). Zona marginal (E). Centro germinativo (F). p = diferença significativa entre os grupos.

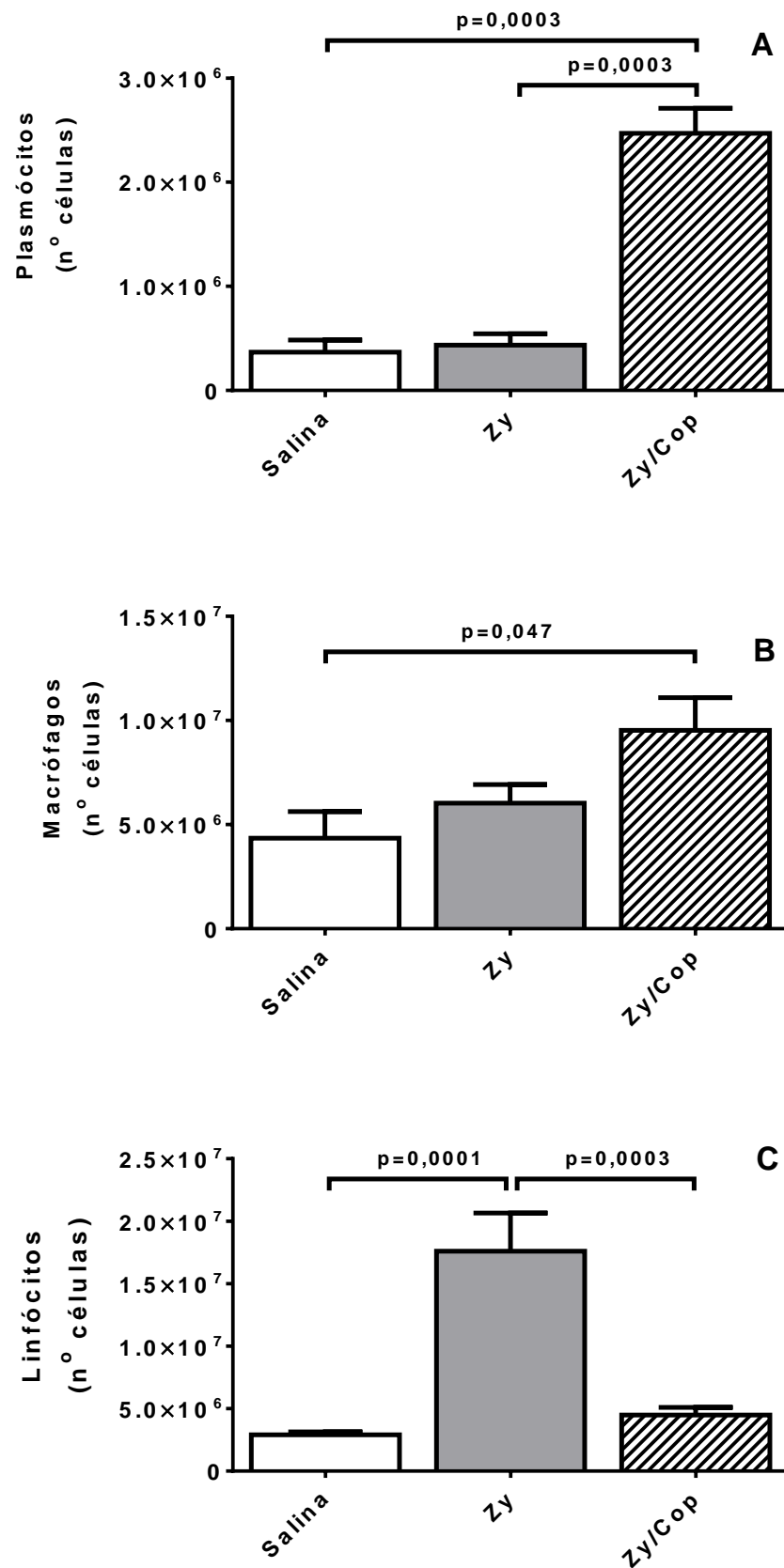


Figura 14. Número de células. Plasmócitos (A). Macrófagos (B). Linfócitos (C). p = diferença significativa entre os grupos.

As variáveis morfológicas obtidas neste estudo (13 no total) foram analisadas de forma multivariada (PCA, análise dos componentes principais). A Figura 15 mostra as correlações obtidas; a análise reduziu a complexidade dos dados em dois componentes (PC1 e PC2). No total esses dois componentes explicaram aproximadamente 62% da variabilidade dos dados (PC1 = 38,67% e PC2 = 23,32%). Os grupos mantiveram-se relativamente segregados e isso indica que afetaram de forma diferenciada a morfologia do baço. A distância entre Salina e Zy/Cop confirma que o tratamento oral com copaíba não foi efetivo para a manutenção da estrutura esplênica (Fig. 15A). Macrófagos, ZM, cordões, sinusoides, plasmócitos e o volume do baço apresentaram forte correlação positiva (proximidade dos vetores verdes em paralelo). Quando esses mesmos dados são plotados em um agrupamento fica evidente o isolamento do Salina e a similaridade entre Zy e Zy/Cop (Fig. 15B).

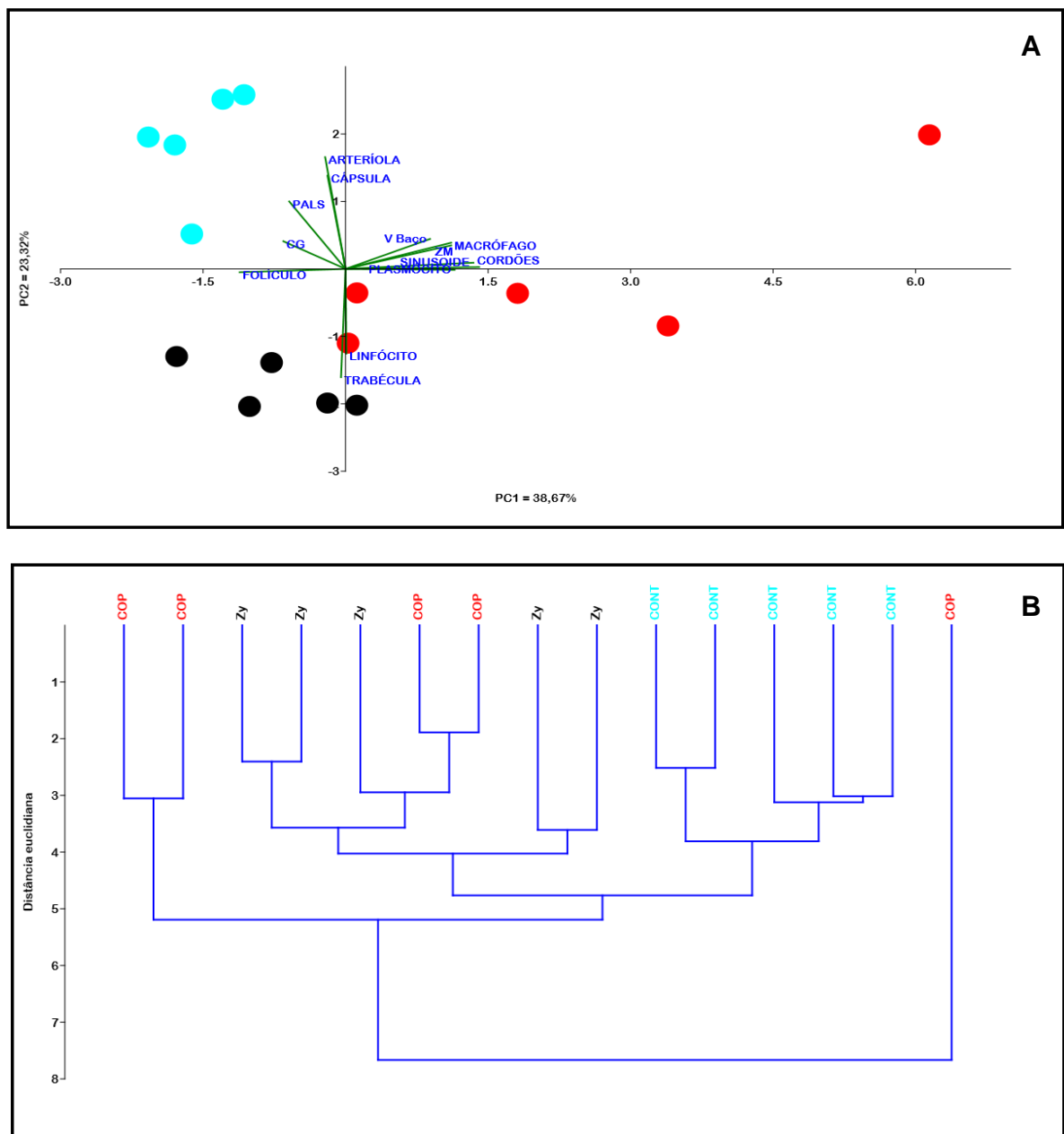


Figura 15. A. PCA utilizando os 13 parâmetros deste estudo. Observar que a complexidade dos dados foi reduzida para dois componentes (PC1 e PC2). Círculo azul = Salina; círculo preto = Zy; círculo vermelho = Zy/Cop. B. Análise de agrupamento (clustering) separando os grupos deste estudo. Os grupos estão indicados em cores correspondentes a PCA.

## 10. DISCUSSÃO

As alterações no baço de murinos induzidos a AR por Zy e o possível efeito do tratamento oral com ODC são pouco descritas. Há necessidade de estudos que utilizem métodos quantitativos imparciais, como a estereologia, para a investigação da estrutura esplênica. A obtenção de informações sobre o volume dos componentes do baço e o perfil celular pode contribuir com a ampliação do conhecimento nesta área (SAĞIROĞLU *et al.*, 2014).

No presente estudo, o volume médio do baço foi de 55,65 mm<sup>3</sup>, resultado semelhante a estudos realizados em camundongos que mostraram o volume de 58,81 mm<sup>3</sup> (VOJDANI *et al.*, 2010a) e de 53,00 mm<sup>3</sup> (VÁSQUEZ *et al.*, 2015). Em nosso estudo, não observamos alteração do volume do baço, contudo, a quantificação de seus componentes internos foi alterada após a indução da inflamação. Além disso, o tratamento oral com copaíba não foi capaz de prevenir outras alterações esplênicas. Estudos prévios mostraram que o baço pode sofrer alterações por vários fatores, tais como, obesidade, isquemia cerebral, hipotireoidismo e AR (ALTUNKAYNAK; ÖZBEK; ALTUNKAYNAK, 2007; DRAGUTIN *et al.*, 2015; EL-WASEEF, 2020; URANCHIMEG *et al.*, 2010). No estudo estereológico de Areosa (2019) o fígado de camundongos Balb/c induzidos a AR mantiveram seus volumes inalterados, mas houve reorganização de seus componentes internos, indicando que há uma prioridade dos organismos em preservar o volume total de um órgão em detrimento de sua distribuição interna. Nosso estudo também evidenciou a capacidade do Zy em causar um efeito sistêmico, sobretudo por sua aplicação intra-articular; esse achado é corroborado por outros estudos (DAMASCENO DE LIMA *et al.*, 2022; SUGIMOTO; ENDO; ARATANI, 2021).

No presente estudo, os aspectos mais proeminentes da inflamação induzida por zymosan em relação ao baço normal (Salina) foram a diminuição da cápsula e aumento da trabécula, redução da PALS e arteríolas centrais e aumento de linfócitos. Esses resultados mostram como uma inflamação crônica afeta a organização esplênica, especificamente a polpa branca e o perfil das células imunes. No estudo de El-Baseei (2020), o baço artrítico induzido por adjuvante de Freund apresentou alterações mais evidentes como aumento de volume de trabéculas e sinusoides, sugerindo um possível aumento de fluxo sanguíneo na PV e espessamento da cápsula e da trabécula. Em nosso estudo, é possível que as poucas alterações em Zy

em relação à Salina estejam relacionadas à fase do processo inflamatório avaliado (fase de resolução). Contudo, essa fase, que aparece semanas após o início da inflamação, é caracterizada pelo aumento de macrófagos e isso não foi observado no presente estudo.

A comparação entre os grupos Zy e Zy/Cop mostrou que o grupo induzido à inflamação e sem tratamento por copaíba foi caracterizado por redução da PV promovido pelo decréscimo dos cordões, aumento da PB promovido pelo crescimento dos folículos, redução de plasmócitos e aumento de linfócitos. Essa comparação é interessante e necessária para entendermos como um fator adicional ao sistema (= copaíba) pode alterar a morfologia de um órgão. O grupo Zy/Cop mostrou efeitos opostos ao Zy. Isso não significa que a copaíba tenha tido um papel protetor esplênico (sistêmico), visto que sua ação não traz o animal às condições de homeostase do grupo Salina, mas sim o mantém em outro nível semelhante a uma “homeostase adaptativa” (NEWSON *et al.*, 2017). Em outras palavras, a copaíba não traz os animais à fase de resolução da inflamação com o fim das respostas inatas-mediadas. As implicações dessas observações morfológicas devem ser confrontadas com dados celulares e bioquímicos para se ter uma visão integral do exato papel da copaíba na inflamação.

O grupo Zy/Cop, quando comparado à Salina, foi caracterizado por aumento de trabéculas, aumento de PV, redução da PB (promovida pela queda nos folículos, arteríolas e CG), aumento de plasmócitos e macrófagos. Portanto, a organização esplênica foi afetada. Como as alterações no número de macrófagos poderiam ser interpretadas? O baço é um dos principais locais imunológicos responsáveis pela homeostase do sangue abrigando populações heterogêneas de macrófagos que atuam no controle de infecções transmitidas pelo sangue e induzem respostas imunes eficazes (SILVA *et al.*, 2015). Macrófagos metalofílicos marginais e macrófagos de zona marginal fagocitam com eficiência patógenos transmitidos pelo sangue e sua localização adjacente a áreas esplênicas ricas em linfócitos T e B favorece o rápido contato entre esses macrófagos e as células da imunidade adaptativa, tornando-os pontes importantes entre a imunidade inata e adaptativa (SILVA *et al.*, 2015). Neste sentido, o aumento de macrófagos promovido pela copaíba poderia ser uma indicação de um efeito positivo deste tratamento. Entretanto, a íntima proximidade do grupo Zy/Cop com o Zy (análises multivariadas) não favorece tal argumento. Embora vários estudos tenham mostrado o papel benéfico do uso da copaíba na saúde e, em

especial, seu papel anti-inflamatório (BARBOSA *et al.*, 2018; CAPUTO *et al.*, 2020; CASTRO GHIZONI *et al.*, 2017; TELLES *et al.*, 2022), evidenciamos que seu uso oral afeta o volume dos componentes esplênicos e o perfil das células imunes. Como tais alterações irão afetar a saúde deve ser o foco de futuros estudos.

As análises multivariadas executadas no presente estudo (PCA e análise de agrupamento) confirmaram nossas observações de que os três grupos deste estudo apresentaram comportamento independente entre si e que o tratamento com copaíba não foi capaz de preservar a microestrutura esplênica. Na verdade, a maior parte dos animais tratados com copaíba apresentaram alterações esplênicas mais similares aos animais que receberam zymosan (ver análise de agrupamento, Fig. 15B). Em conclusão, a indução da inflamação por zymosan afeta a organização esplênica e o perfil de células imunes. O uso oral de copaíba não preveniu essas alterações e, em certa extensão, pode ter tido um comprometimento na filtração do sangue e nas respostas imunes a antígenos.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCON, Renata Trigueirinho; ANDRADE, Luís Eduardo Coelho. Auto-antibodies to citrullinated proteins and rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 180–187, 2007.

ALENCAR, Jurandyr da Cruz. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central. 2 - Produção de óleo-resina. **Acta Amazonica**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 75–89, 1982.

ALLEN, Christopher D C; CYSTER, Jason G. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. **Seminars in immunology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 14–25, 2008.

ALTUNKAYNAK, Berrin Zuhai; ÖZBEK, Elvan; ALTUNKAYNAK, Muhammed Eyup. A stereological and histological analysis of spleen on obese female rats, fed with high fat diet. **Saudi medical journal**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 353–357, 2007.

AMES-SIBIN, Ana P. *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 119, n. 12, p. 10262–10277, 2018a.

AMES-SIBIN, Ana P. *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene, the major constituent of copaiba oil, reduces systemic inflammation and oxidative stress in arthritic rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 119, n. 12, p. 10262–10277, 2018b.

ANANG, Dornatien C. *et al.* The Germinal Center Milieu in Rheumatoid Arthritis: The Immunological Drummer or Dancer? **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 19, p. 10514, 2021.

ANSEL, K. Mark *et al.* A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6793, p. 309–314, 2000.

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**. 2019. 1–74 f. - Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2019.

ARULRAJ, Theinmozhi *et al.* Germinal Centre Shutdown. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021.

ASQUITH, Darren L. *et al.* Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 2040–2044, 2009.



BALANDRAUD, Nathalie; ROUDIER, Jean. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 165–170, 2018.

BANDONI, Arnaldo L. Bandoni (**Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica**). 2. ed. Buenos Aires: [s. n.], 2003. *E-book*.

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

BEREK, C.; BERGER, A.; APEL, M. Maturation of the immune response in germinal centers. **Cell**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 1121–1129, 1991.

BOECHAT, Narjara de Oliveira *et al.* Interaction between Smoking and HLA-DRB1\*04 Gene Is Associated with a High Cardiovascular Risk in Brazilian Amazon Patients with Rheumatoid Arthritis. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. e41588, 2012.

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

BONGARTZ, T *et al.* Citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, [s. l.], v. 46, p. 70–75, 2007.

BOSMAN, C.; CAVALIERE, P. Biometrically revealed splenic differences between thalassemia, hereditary spherocytosis and elliptocytosis. **Pathologia Et Microbiologia**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 35–58, 1967.

BRACHT, Livia *et al.* Effects of simvastatin, atorvastatin, ezetimibe, and ezetimibe+ simvastatin combination on the inflammatory process and on the liver metabolic changes of arthritic rats. **Fundamental & clinical pharmacology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 722–734, 2012.

BRANDÃO, Maria G. L. *et al.* Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 141–148, 2008.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos: uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa: [s. n.], 2007.

BRENDOLAN, Andrea *et al.* Development and function of the mammalian spleen. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 166–177, 2007.

BRONTE, Vincenzo; PITTET, Mikael J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. **Immunity**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 806–818, 2013.

BURMESTER, Gerd R.; POPE, Janet E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 389, n. 10086, p. 2338–2348, 2017.

CAGLAR, V. *et al.* Determination of normal splenic volume in relation to age, gender and body habitus: a stereological study on computed tomography. **Folia Morphologica**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 331–338, 2014.

CALLEJA, Miguel Angel *et al.* The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **The British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 394 – 401, 2013.

CAPLAZI, P. *et al.* Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 819–826, 2015.

CASTAÑEDA-LOPEZ, María Eugenia *et al.* Animal Models of Rheumatoid Arthritis. *Em: experimental animal models of human diseases - an effective therapeutic strategy*. [S. l.]: InTech, 2018.

CASTELAR-PINHEIRO *et al.* The REAL study: a nationwide prospective study of rheumatoid arthritis in Brazil. **Advances in Rheumatology (London, England)**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 9, 2018.

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

CAVALIERI, Bonaventura. **Geometria indivisibilibus continuorum nova quadam ratione promota**. [S. l.]: Ex typographia de Ducijs., 1653.

CAVALLI, G. *et al.* The microvascular architecture of spleen in congestive splenomegaly: A morphological-histometric study. **Pathology - Research and Practice**, [s. l.], v. 174, n. 1, p. 131–146, 1982.

CESTA, Mark F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 455–465, 2006.

CHAN, Tyani D. *et al.* Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 183, n. 5, p. 3139–3149, 2009.

CHEN, Yuqing *et al.* Antiarthritic Activity of Diallyl Disulfide against Freund's Adjuvant-Induced Arthritic Rat Model. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 291–303, 2018.

CHOUHARY, Narayan; BHATT, Lokesh K.; PRABHAVALKAR, Kedar S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 193–200, 2018.

COJOCARU, Manole *et al.* Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. **Maedica**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 286–291, 2010.

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

CUTOLO, Maurizio *et al.* The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, p. 867260, 2022.

DA SILVA, Adriana Matias *et al.* A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 132, n. 2, p. 193–199, 2012.

DAHAM, Saad S. *et al.* The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 2015.

DAS, Subham; PADHAN, Prasanta. An Overview of the Extraarticular Involvement in Rheumatoid Arthritis and its Management. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 81–86, 2017.

DEANE, Kevin D. *et al.* Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 3–18, 2017.

DELAND, Frank H. Normal Spleen Size. **Radiology**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 589–592, 1970.

DELESSE, Achille. **Procédé mécanique pour déterminer la composition chimique des roches**. [S. l.]: éditeur inconnu, 1848.

DIEFENBACH, Ana Lúcia *et al.* Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* ssp.) on oral pathogens: Systematic review. **Phytotherapy research: PTR**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 586–596, 2018.

DINI, Vanda Santana Queiroz. Ação anti-inflamatória do óleo de copaíba em artrite induzida em modelo animal: Uma Revisão Sistemática. **Scientia Amazonia**, [s. l.], v. 8, p. 12, 2019.

DRAGUTIN, Roksandić *et al.* Stereological and Immunohistochemical Study of the Spleen in Hypothyroid Juvenile Rats. [s. l.], v. 65, n. 2, p. 246–259, 2015.

EL-WASEEF, Dalia Alaa El-Din Aly. A highlight on CD4+ T-cells in the spleen in a rat model of rheumatoid arthritis and possible therapeutic effect of omega-3. Histological and Immunofluorescence study. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 81, p. 106283, 2020.

ENGLAND, Bryant R *et al.* Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications. **The BMJ**, [s. l.], v. 361, 2018.

FARIA, Marcelo Domingues de; SEYFERT, Carlos Eduardo. Dimensões, massa e volume do baço em tartarugas (*Trachemys scripta elegans*, Wied, 1839). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s. l.], v. 45, p. 94–97, 2008.

FEARON, D. T.; AUSTEN, K. F. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 1683–1687, 1977.

FEITOSA, Denilson José Silva *et al.* Effects of Copaiba oil in the healing process of urinary bladder in rats. **International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 384–389, 2018.

FIGUEIREDO, Josely F.; MATTIX, Marc E.; PAPENFUSS, Tracey L. Chapter 11 - Hematopoietic System. *Em*: PARKER, George A.; PICUT, Catherine A. (org.). **Atlas of Histology of the Juvenile Rat**. Boston: Academic Press, 2016. p. 349–371. *E-book*.

FISHMAN, Daniel. Splenic involvement in rheumatic diseases. - PubMed - NCBI. [s. l.], v. 27, n. 3, p. 141–155, 1997.

FOTIADIS, C. *et al.* The effect of various types of splenectomy on the development of B-16 melanoma in mice. **International Journal of Surgical Investigation**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 113–120, 1999.

FRANCISCO, Sebastião Geraldo. Uso do óleo de resina de Copaíba (*Copaifera officinalis* L) em inflamação ginecológica. **Femina**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 89–93, 2005. FRASNELLI, Matthias E. *et al.* TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. R370, 2005.

GOELDNER, Isabela *et al.* Artrite Reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 495–503, 2011.

GOMES, Niele Matos *et al.* Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 486–492, 2007.

GUNDERSEN, H. J. *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. 379–394, 1988.

HE, Jian *et al.* Hypoxia triggers the outbreak of infectious spleen and kidney necrosis virus disease through viral hypoxia response elements. **Virulence**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 714–726, 2022.

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

HUANG, Chuanxin. Germinal Center Reaction. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s. l.], v. 1254, p. 47–53, 2020.

IMAI, Y. *et al.* A morphological and immunohistochemical study of lymphoid germinal centers in synovial and lymph node tissues from rheumatoid arthritis patients with special reference to complement components and their receptors. **Acta Pathologica Japonica**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 127–134, 1989.

JIN, Jeong Ho *et al.* Anti-allergic activity of sesquiterpenes from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 223–228, 2011.

KAWANE, Kohki *et al.* Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. **Nature**, [s. l.], v. 443, n. 7114, p. 998–1002, 2006.

KEFFER, J. *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 10, n. 13, p. 4025–4031, 1991.

KEYSTONE, E. C. *et al.* Zymosan—Induced Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1396–1401, 1977a.

KEYSTONE, E. C. *et al.* Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1396–1401, 1977b.

KIERNAN, J. A. Histological and histochemical methods: theory and practice, 3rd EDITION. **Shock**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 479, 1999.

KOBAYASHI, K. *et al.* Cytokine production profile of splenocytes derived from zymosan A-treated SKG mice developing arthritis. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 335–341, 2006.

KONG, Deok-Hoon *et al.* Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 1057, 2018.

KOUSKOFF, V. *et al.* Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. **Cell**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 811–822, 1996.

KREMER, James R.; MASTRONARDE, David N.; MCINTOSH, J.Richard. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. **Journal of Structural Biology**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 71–76, 1996.

KUROTAKI, Daisuke; UEDE, Toshimitsu; TAMURA, Tomohiko. Functions and development of red pulp macrophages. **Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 55–62, 2015.

KUROWSKA, Weronika *et al.* The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Central-European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 390–398, 2017.

LEWIS, Steven M.; WILLIAMS, Adam; EISENBARTH, Stephanie C. Structure-function of the immune system in the spleen. **Science immunology**, [s. l.], v. 4, n. 33, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6495537/>. Acesso em: 11 set. 2020.

LIMA, Sylvia R. M. *et al.* In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. **Phytotherapy research: PTR**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 1048–1053, 2003.

LIU, Hao *et al.* Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 118–123, 2015.

LOUIS, Cynthia *et al.* Therapeutic Effects of a TANK-Binding Kinase 1 Inhibitor in Germinal Center-Driven Collagen-Induced Arthritis. **Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 50–62, 2019.

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

- MARTINS-DA-SILVA, Regina C. V.; PEREIRA, Jorge Fontella; LIMA, Haroldo Cavalcante de. O gênero *Copaifera* (Leguminosae - Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 455–476, 2008.
- MASSON, D. S. *et al.* Antimicrobial activity of copaíba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 664–669, 2013.
- MATTFELDT, Torsten *et al.* Estimation of surface area and length with the orientator. **Journal of Microscopy**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 301–317, 1990.
- MEBIUS, Reina E.; KRAAL, Georg. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews. Immunology**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 606–616, 2005.
- MELLORS, R. C. *et al.* CELLULAR ORIGIN OF RHEUMATOID FACTOR. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 875–886, 1959.
- MENEZES, Marília Stefani Souza de. **Efeito da olmesartana na Inflamação Intra-articular Induzida por Zymosan**. 2016. 68 f. Dissertação - Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, MOSSORÓ, 2016.
- MEYER-HERMANN, Michael *et al.* A Theory of Germinal Center B Cell Selection, Division, and Exit. **Cell Reports**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 162–174, 2012.
- MILICEVIC, Z. *et al.* Stereological study of tissue compartments of the human spleen. **Histology and histopathology**, [s. l.], 1996.
- NOLTE, M. A. *et al.* Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 626–634, 2000.
- NUTTER, Robert L. *et al.* Responses of mouse spleen morphology to the growth of subcutaneously injected virally transformed cells. **The Anatomical Record**, [s. l.], v. 197, n. 3, p. 363–368, 1980.
- ORIVE, Luis-M. Cruz. On the estimation of particle number. **Journal of Microscopy**, [s. l.], v. 120, n. 1, p. 15–27, 1980.
- PAIVA, L. a. F. *et al.* Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy research: PTR**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 737–739, 2002.

PELLAS, T. C.; WEISS, L. Deep splenic lymphatic vessels in the mouse: a route of splenic exit for recirculating lymphocytes. **The American Journal of Anatomy**, [s. l.], v. 187, n. 4, p. 347–354, 1990.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. a. S. Copaiba oil (*Copaifera* sp.): history, extraction, industrial applications and medicinal properties. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009a.

QIU, Chun-Hong *et al.* Novel subset of CD8+ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 182, n. 7, p. 4127–4136, 2009.

ROMPPANEN, T. A morphometrical method for analyzing germinal centers in the chicken spleen. **Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section C, Immunology**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 263–268, 1981.

SACHETTI, Camile Giaretta *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 19, p. 937–941, 2009.

SAFERDING, Victoria; BLÜML, Stephan. Innate immunity as the trigger of systemic autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], p. 102382, 2019.

SAĞIROĞLU, A. *et al.* Estimation of spleen volume and surface area of the newborns' cadaveric spleen using stereological methods. **Folia Morphologica**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 183–192, 2014.

SAKAGUCHI, Noriko *et al.* Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. **Nature**, [s. l.], v. 426, n. 6965, p. 454–460, 2003.

SANTOS, Adriana *et al.* Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 120, p. 204–208, 2008.

SASAKI, K.; MATSUMURA, G.; ITO, T. Effects of pregnancy on erythropoiesis in the splenic red pulp of the mouse: a quantitative electron microscopic study. **Archivum Histologicum Japonicum = Nihon Soshikigaku Kiroku**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 429–438, 1981.

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

SCHWARZ, Roderich E.; HISERODT, John C. Effects of splenectomy on the development of tumor-specific immunity. **Journal of Surgical Research**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 448–453, 1990.



SCOTT, David L.; WOLFE, Frederick; HUIZINGA, Tom W. J. Rheumatoid arthritis. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 2010.

SELLAMI, Meriem *et al.* Etiological Features of Liver Involvement in Rheumatoid Arthritis. **Current Rheumatology Reviews**, [s. l.], 2019.

SENNA, Erika Rodrigues *et al.* Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal of Rheumatology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 594–597, 2004.

SILVA, Evandro de Araújo. **Avaliação química e farmacológica do óleo destilado de copaiba (Copaifera spp. - LeguminosaeCaesalpinoideae) e aplicações biotecnológicas**. 2019a. 132 f. tese - Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus-AM, 2019.

SILVA, Evandro de Araújo. **Avaliação química e farmacológica do óleo destilado de copaiba (Copaifera spp. - LeguminosaeCaesalpinoideae) e aplicações biotecnológicas**. 2019b. - Universidade Federal do Amazonas, [s. l.], 2019.

SILVA, Evandro de Araújo *et al.* Efectos antiinflamatorios y toxicidad oral aguda de nanoemulsión cargada de aceite esencial de *Copaifera* spp. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 323–342, 2022.

SIMKINS, Tyrell J. *et al.* Reduced Noradrenergic Signaling in the Spleen Capsule in the Absence of CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 669–679, 2016.

SMOLEN, Josef S. *et al.* Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–23, 2018.

SPAGNOLO, Paolo *et al.* The Lung in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 70, n. 10, p. 1544–1554, 2018.

STEINIGER, Birte S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. **Immunology**, [s. l.], v. 145, n. 3, p. 334–346, 2015.

ŠTEŇOVÁ, Emőke *et al.* Biological Anti-TNF- $\alpha$  Therapy and Markers of Oxidative and Carbonyl Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2021, p. 5575479, 2021.

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

TAPPIN, Marcelo R. R. *et al.* Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 236–240, 2004.

TOBÓN, Gabriel J.; YOUINOU, Pierre; SARAUX, Alain. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 10–14, 2010.

TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 146, n. 3, p. 857–868, 1977.

UMEDA, Naoto; MATSUMOTO, Isao; SUMIDA, Takayuki. [The pathogenic role of ACPA in rheumatoid arthritis]. **Nihon Rinsho Men'eki Gakkai Kaishi = Japanese Journal of Clinical Immunology**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 391–395, 2017.

URANCHIMEG, D. *et al.* Recovered changes in the spleen by agmatine treatment after transient cerebral ischemia. **Anatomy & Cell Biology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 44–53, 2010.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 11, p. 463–471, 1963.

VAN EDEN, W.; WAGENAAR-HILBERS, J. P.; WAUBEN, M. H. Adjuvant arthritis in the rat. **Current Protocols in Immunology**, [s. l.], v. Chapter 15, p. Unit 15.4, 2001.

VÁSQUEZ, Bélgica *et al.* Effects of early and late adverse experiences on morpho-quantitative characteristics of Sprague-Dawley rat spleen subjected to stress during adulthood. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 3624–3635, 2015.

VICTORA, Gabriel D. *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. **Cell**, [s. l.], v. 143, n. 4, p. 592–605, 2010.

VOJDANI, Zahra *et al.* Quantitative study of the effects of morphine on the mouse spleen and inguinal lymph node. **Archives of Iranian Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 294–300, 2010a.

WANG, Li *et al.* A history of the stereology in china. **Image Analysis & Stereology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 9–19, 2018.

WANG, Haijing *et al.* Exposure to hypoxia causes stress erythropoiesis and downregulates immune response genes in spleen of mice. **BMC genomics**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 413, 2021.

WOUDE, Diane van der; HELM-VAN MIL, Helm-van. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research. Clinical Rheumatology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 174–187, 2018.

YOUSSEF, Dareen A.; EL-FAYOUMI, Hassan M.; MAHMOUD, Mona F. Beta-caryophyllene protects against diet-induced dyslipidemia and vascular inflammation in rats: Involvement of CB2 and PPAR- $\gamma$  receptors. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 297, p. 16–24, 2019.

YU, Zhiqian *et al.* Dynamics of Platelet Behaviors as Defenders and Guardians: Accumulations in Liver, Lung, and Spleen in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 1253–1267, 2019.

YUNNA, Chen *et al.* Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 877, p. 173090, 2020.

## 12. EQUIPE DO PROJETO DE PESQUISA

<b>NOME</b>	<b>INSTITUIÇÃO</b>	<b>FORMAÇÃO</b>	<b>FUNÇÃO</b>
<b>Nadielle Castro Pereira</b>	ICB/UFAM	Doutoranda	Desenvolvimento, análise, conclusão e divulgação dos resultados.
<b>Oscar Tadeu Ferreira da Costa</b>	ICB/UFAM	Biólogo, Doutor em ecologia e recursos naturais	Orientação, estereologia, histopatologia
<b>Lucas Castanhola Dias</b>	INPA	Biólogo, gerente do laboratório temático de microscopia eletrônica	Microscopia
<b>Erilene Santos do Carmo</b>	UFAM	Assistência técnica	Colaboração no experimento
<b>Antonio Luiz Ribeiro Boechat Lopes</b>	UFAM	Médico reumatologista	Colaboração no desenvolvimento do projeto
<b>Juliana de Andrade Rebouças Guimarães</b>	UEA	Médica reumatologista	Colaboração no desenvolvimento teórico/análise

## ANEXO 1. Documento da Comissão de Ética na utilização de animais – CEUA/UFAM



Poder Executivo  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Comissão de Ética no Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta "Artrite induzida por zymosan em modelo murino associada a anemia e o potencial farmacológico do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne)", sob a responsabilidade do professor pesquisador **Oscar Tadeu Ferreira da Costa (Docente/ICB/UFAM)**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, foi aprovada sob o número 035/2019.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De março à abril/2019
Especie/linhagem/raça	Camundongo heterogêneo / CS7Bl/6
N. de animais	15
Peso/idade	60dias/18-38g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFAM

Manaus, 19 de setembro de 2019.

  
Profa. Dra. Cinthya Iamile Frithz Brandão de Oliveira  
Presidente do CEUA-UFAM

## ANEXO 2. Documento do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético – SisGen



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
 Cadastro nº A16D06E

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A16D06E
Usuário:	Universidade Federal do Amazonas
CPF/CNPJ:	04.378.626/0001-97
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

### Espécie

Copálfera multijuga  
 Óleo resina de copaliba

### Fonte do CTA

CTA de origem identificável diretamente com provedor

### Provedor

Comunidade Indígena Dessoano

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DO ÓLEO DE COPAIBA DESTILADO (Copálfera sp) E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

### Equipe

<b>EMERSON SILVA LIMA</b>	<b>Universidade Federal do Amazonas</b>
<b>EVANDRO DE ARAÚJO SILVA</b>	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS</b>
<b>JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO</b>	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS</b>

**ANEXO 3.** Destilação do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.)

O processo de destilação do óleo-resina de copaíba foi realizado por arraste a vapor, por meio de um equipamento específico para destilação. O óleo-resina de copaíba foi adicionado em um alambique (100kg) e, por meio deste, o vapor gerado passou por uma caldeira à temperatura de 180°C. A fração volátil do óleo de copaíba destilado foi arrastada pelo vapor e condensada por resfriamento utilizando água à temperatura ambiente. Em seguida, o óleo destilado de copaíba foi separado da água (hidrolato) pela diferença de densidade, resultando em uma quantidade de 75kg de produto. O hidrolato foi descartado; e todo o processo de destilação durou 4 horas (BANDONI, 2003; SILVA., 2019).

**ANEXO 4.** Característica físico-química do óleo destilado de copaíba

O aspecto, a cor e o odor do óleo destilado de copaíba foram obtidos por meio de características macroscópicas, de sorte que a amostra em estudo (óleo de copaíba destilado) foi comparada com uma amostra de referência padrão comprada no mercado. A observação serviu para a visualização de ocorrência de alterações como separação de fase, precipitação, turvação, mudança de cor e odor mediante o órgão olfatório (BRASIL, 2007).

A determinação da densidade relativa do óleo destilado foi realizada pelo método de picnômetro (SILVA., 2019). Inicialmente, utilizou-se uma balança analítica para pesar o picnômetro de vidro vazio (M0). Em seguida, foi adicionada dentro do picnômetro água bidestilada evitando formação de bolhas; esvaziou-se o recipiente com cuidado e foi feita a pesagem (M1). Com o picnômetro limpo e seco novamente, foi adicionado o óleo destilado de copaíba, e houve a mensuração do peso (M2). O método foi realizado à temperatura de 25±1°C. A densidade relativa foi calculada por meio da expressão:

$$D^{25} = (M2 - M0) / M1 - M0$$

Onde:  $D^{25}$  = densidade relativa a 25°C.

M0 = massa do picnômetro vazio, em gramas.

M1 = massa do picnômetro com água purificada, em gramas.

M2 = massa do picnômetro com a amostra, em gramas.

A determinação da viscosidade do óleo destilado de copaíba foi realizada por meio da utilização do equipamento viscosímetro rotativo, que consiste na medição do torque utilizado para girar um fuso imerso em um fluido específico. Esse equipamento foi ajustado de acordo com a faixa para o fuso (*spindle*) adequado. Em seguida, mergulhou-se o fuso na posição diagonal na amostra com temperatura estável, evitando formação de bolhas, até atingir o sulco (marca) da haste do fuso, e nivelou-se o aparelho. A seguir, procedeu-se à leitura da viscosidade, de acordo com o procedimento operacional do aparelho (SILVA, 2019).

A determinação do pH foi realizada por meio do pHmetro (TecnoPON, Brasil), previamente calibrado com solução tampão de pH 4,7 e 10. Por se tratar de um óleo, a determinação do pH foi realizada diretamente sobre o líquido, imergindo-se o eletrodo diretamente nele (BRASIL, 2007).



**ANEXO 5.** Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas – CG-EM do óleo destilado de copaíba.

A identificação e a quantificação de  $\beta$ -cariofileno no óleo destilado de copaíba foram realizadas por meio da CG-EM utilizando o equipamento GC2010/QP2010 Plus (Shimadzu, Japão). Para o fracionamento, utilizou-se uma coluna capilar Rtx-5 MS (30mm x 0,25mm x 0,25mm) com hélio servindo como gás carreador a um fluxo de 1,02mL/min. O preparo das soluções injetáveis para análise qualitativa foi feito diluindo 10mg de óleo em 1mL de diclorometano; e 1 $\mu$ L da solução foi injetado com uma razão de separação de 1:50. A coluna capilar foi ajustada à temperatura de 60 a 280°C, com aumento gradual de 3°C/min. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram 220°C e 260°C, respectivamente (SILVA, 2019).

Para obter os índices de retenção, uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C7-C30) foi analisada nas mesmas condições, e os cálculos foram feitos de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN; KRATZ, 1963). As identificações foram baseadas na comparação dos espectros adquiridos com aqueles armazenados na biblioteca da Wiley 8th edition e na comparação dos índices de retenção com os dados da literatura (DAMS, 2007).

A quantidade relativa em percentual (%) da fração destilada dos constituintes do óleo de copaíba foi acessada por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID) utilizando um equipamento QP2010 (Shimadzu). Para quantificar o  $\beta$ -cariofileno, construiu-se uma curva de calibração com oito pontos nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu$ g/mL. Construiu-se a curva de linearidade plotando a área do pico *versus* a concentração do padrão de  $\beta$ -cariofileno. A linha de regressão foi ajustada pelo método dos mínimos quadrados (área do pico = 102,18 x Concentração – 177,19) com o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup> = 0,997), utilizado para a quantificação do  $\beta$ -cariofileno (SILVA, 2019).

Em razão de o óleo de copaíba possuir somente sesquiterpenos e diterpenos, a análise quantitativa foi investigada usando padrão comercial de  $\beta$ -cariofileno, cuja seleção se deveu ao fato de ser o composto majoritário nas diferentes amostras descritas de óleo destilado de copaíba e, possivelmente, o componente responsável pela atividade farmacológica desse óleo (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

## ANEXO 6. Preparo da solução zymosan A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
LABORATÓRIO DE MICROSCOPIA QUANTITATIVA  
PROJETO ZYMOZAN x COPAÍBA



### CÁLCULO ZYMOZAN A

**Obs.:** Cálculo para 10 animais.

1. ESTERELIZAÇÃO	Quantidade (ug)
Cálculo NaCl 0,15 M	2,191g/250000 uL
1% NaCl (uL)/ zymosan	500
zymosan (ug)	50000

**PROCEDIMENTO:**

1. Homogeneizar (suspender).
2. Ferver por 1 hora.
3. Centrifugar 4000 rpm/30 min.
4. Descartar sobrenadante.
5. Suspender em salina.

### 2. DILUIÇÃO DO ZYMOZAN

**Obs.:** 500µg Zy/articulação

Volume de salina/articulação (uL)	25
Concentração Zymosan/articulação (ug)	500
Volume final da solução de inoculação (uL)	2500

**ANEXO 7. Preparo das doses de copaíba****➤ Preparo da solução veículo:**

➤ Preparar 1000 µL de veículo

1. 100 µL de Tween (20x).
2. 900 µL de solução salina (1%).

**➤ Preparo do óleo de copaíba 600**

1. Pesar 150mg de óleo de copaíba.
2. Diluir em 1000µL de veículo.

**Cálculo de distribuição do volume de acordo com o peso de cada animal**

<b>Animal</b>	<b>Peso do animal (g)</b>	<b>Concentração de Copaíba/animal (mg)</b>	<b>Volume de Copaíba+Veículo/animal (µL)</b>
Aco600 #1	26,70	16,02	106,80
Aco600 #2	30,70	18,42	122,80
Aco600 #3	26,10	15,66	104,40
Aco600 #4	23,50	14,10	94,00
Aco600 #5	28,00	16,80	112,00
	<b>TOTAL (mg)</b>	81	<b>540,00</b>
<b>CONCENTRAÇÃO ESTIMADA (mg)</b>		<b>150,00</b>	<b>Dose média 108 µL/kg</b>

**ANEXO 8.** Protocolo de coloração**Azul de toluidina 0,5%**

Azul de toluidina .....	0,12g
Borato de Na+.....	0,5g
H <sub>2</sub> O destilada.....	100mL

**Fucsina básica**

Fucsina básica.....	0,5g
Zinco em pó.....	10g
Ácido acético.....	2mL
H <sub>2</sub> O destilada.....	400mL

## **ANEXO 9.** Protocolo utilizado para o Disector óptico (Estereologia)

1. Obtenção de seções histológicas em resina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraues, Alemanha).
2. Armazenamento das seções em microtubos para posterior análise.
3. Montagem e coloração das seções.
  - I. Dispor a seção sobre uma gota de água em uma lâmina limpa e usar um pincel de ponta fina para estendê-la.
  - II. Retirar o excesso de água com papel filtro.
  - III. Pingar uma gota de corante sobre a seção.
  - IV. Repetir o passo (II).
  - V. Adicionar uma gota de água sobre a seção (remoção do excesso de corante).
  - VI. Repetir o passo (II).
  - VII. Sobrepor uma lamínula sobre a seção e levar à estufa entre 50-60° C até completa secagem (aproximadamente 30 minutos).
  - VIII. Remover a lâmina da estufa, retirar a lamínula com cuidado para não desgrudar a seção e proceder à montagem final com a resina adequada (bálsamo sintético, entellan®).
  - IX. Manter na estufa até completa secagem.
4. Aplicação do Disector Óptico.
  - I. Proceder à amostragem aleatória sistemática de campos de vista.
  - II. Localizar o primeiro campo a ser analisado (aumento 1000).
  - III. Projetar a imagem do sistema de contagem (grid) no campo de vista com o auxílio de um negastoscópio e um tubo de desenho (câmara clara). O grid utilizado é composto por vários “frames” contendo linhas permitidas e linhas proibidas (Figura a seguir).
  - IV. Identificar o topo da seção (superfície da seção).
  - V. Desprezar os primeiros 5µm da seção (topo da seção) e aprofundar o campo visual lentamente utilizando o parafuso micrométrico do microscópio, checando o avanço no microcator (instrumento acoplado à platina do microscópio para a detecção de movimentos no eixo z).

- VI. Proceder à contagem dos núcleos dos plasmócitos, macrófagos e linfócitos que entram ou saem de foco no interior do “frame” respeitando os limites deste.
- VII. Repetir o passo (f) até ser atingida a altura máxima do Disector (nesse estudo 6  $\mu\text{m}$ ).
- VIII. 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 6 “frames”, cada qual contendo linhas permitidas (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 os núcleos que tocam as linhas vermelhas (X preto) são desconsiderados. Uma estimativa do número total de células pode ser obtida pela multiplicação da densidade numérica obtida (Disector) pelo volume do órgão.

