



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS DA FRIEDELINA SOBRE TIMÓCITOS E LINFÓCITOS E SUA
INFLUÊNCIA SOBRE AS CÉLULAS T REGULADORAS NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR OVALBUMINA NA ASMA ALÉRGICA
EXPERIMENTAL**

JULIANDERSON DE OLIVEIRA DOS SANTOS CARMO

MACEIÓ – AL,
2023

JULIANDERSON DE OLIVEIRA DOS SANTOS CARMO

**EFEITOS DA FRIEDELINA SOBRE TIMÓCITOS E LINFÓCITOS E SUA
INFLUÊNCIA SOBRE AS CÉLULAS T REGULADORAS NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR OVALBUMINA NA ASMA ALÉRGICA
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano Barreto

MACEIÓ – AL,
2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

C287e Carmo, Julianderson de Oliveira dos Santos.

Efeitos da friedelina sobre timócitos e linfócitos e sua influência sobre as células T reguladoras na resposta inflamatória induzida por ovalbumina na asma alérgica experimental / Julianderson de Oliveira dos Santos Carmo. – 2023.

112 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Emiliano Barreto.

Tese (doutorado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 95-112.

1. Friedelina. 2. Asma. 3. Linfócitos. 4. Timócitos. 5. Linfócitos T reguladores. 6. Inflamação. I. Título.

CDU: 612.112

Folha de Aprovação

JULIANDERSON DE OLIVEIRA DOS SANTOS CARMO

Efeitos da friedelina sobre tímócitos e linfócitos e sua influência sobre as células T reguladoras na resposta inflamatória induzida por ovalbumina na asma alérgica experimental

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 24 de agosto de 2023.

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO**
Data: 24/08/2023 16:34:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO (ORIENTADOR)

Documento assinado digitalmente
 **CAMILA BRAGA DORNELAS**
Data: 25/08/2023 14:18:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. CAMILA BRAGA DORNELAS – UFAL

Documento assinado digitalmente
 **ENIO JOSE BASSI**
Data: 30/08/2023 23:02:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ENIO JOSE BASSI – UFAL

Documento assinado digitalmente
 **MARCELO DUZZIONI**
Data: 30/08/2023 23:50:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MARCELO DUZZIONI – UFAL

Documento assinado digitalmente
 **RENATO SANTOS RODARTE**
Data: 25/08/2023 20:35:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. RENATO SANTOS RODARTE – UFAL

Documento assinado digitalmente
 **AXEL HELMUT RULF COFRE**
Data: 24/08/2023 16:41:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. AXEL HELMUT RULF COFRE – CESMAC

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (LBC/ICBS/UFAL), sob orientação do Professor Dr. Emiliano Barreto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Dedico este trabalho à minha querida amiga Návylla Candeia, cuja alegria e vitalidade foram prematuramente interrompidas devido ao COVID-19.

Návylla, sua amizade trouxe brilho e alegria à minha vida, deixando lembranças preciosas que permanecerão vivas em meu coração para sempre. Que este trabalho seja um reflexo do seu espírito resiliente e da sua busca incansável pelo conhecimento. Sua ausência é profundamente sentida, mas sua inspiração continuará presente no coração de todos que tiveram a oportunidade de conviver com você.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar toda sabedoria, inspiração e resiliência necessária para vivenciar quase uma década de trajetória acadêmica. Agradeço especialmente pelos últimos quatro anos, nos quais experienciei um período de profundo crescimento pessoal e profissional, enriquecido por aprendizados significativos. Espero que esse trabalho represente não somente a minha trajetória, mas também se configure como uma sincera expressão de gratidão por todas as bênçãos de Deus que foram derramadas sobre mim. Muito obrigado, senhor: “O agir de Deus é lindo/ Na vida de quem é fiel/ No começo tem provas amargas/ Mas no fim tem o sabor do mel”.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Elian Teles, cuja dedicação incansável em prol da minha felicidade é uma luz constante em minha vida. Muito obrigado por todo o amor, carinho e ensinamentos que compartilharam comigo. Agradeço por serem os pilares que sustentaram – e sustentam – meus sonhos, por sempre me apoiarem e acreditarem em cada passo que decidi tomar. Tudo que faço, todas as minhas ações são direcionadas a um dia retribuir, de alguma forma, a imensidão do que fizeram por mim. Meu amor por vocês é incondicional e eterno.

Os meus sinceros agradecimentos às minhas irmãs, Julielle e Juliete, e aos meus sobrinhos, Pedro e Lulu, por todo o amor e união. Muito obrigado por todos os momentos especiais que passamos juntos, por sempre estarem prontos a me ajudar. A presença de vocês traz alegria e nutre meu coração de felicidade. Amo muito vocês.

A minha linda esposa Ketlenn Lima. A mulher da minha vida, a pessoa que escolhi passar o resto da minha existência. Muito obrigado, minha companheira, por tudo que você representa para mim. Obrigado por sempre me apoiar, me motivar e sempre estar disposta a me escutar. Você é minha sustentação e meu direcionamento. Vossa alteza, eu te amo de uma forma tão profunda, tão inexplicável. Sou muito grato pela nossa família e pela oportunidade de ter você em minha vida. Que Deus nos abençoe a cada dia mais. Você faz parte dessa conquista. Essa tese é nossa!

Também não poderia deixar de agradecer a minha gatinha friedelina (sim, o nome dela é friedelina, o triterpeno pentacíclico que tanto falaremos nessa tese). Mesmo sob seu olhar de desprezo, julgamento e indiferença, foi muito bom tê-la por perto enquanto escrevia a tese.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e sei que posso contar em toda e qualquer situação, em especial: Neilson, William, Alanderson, Ítalo, Wesley. Muito obrigado, amo muito vocês.

À Universidade Federal de Alagoas, expresso minha gratidão pelo apoio institucional, que foi fundamental para a concretização deste trabalho. Também estendo meus agradecimentos às agências de fomento: Capes, CNPq e Fapeal. Gostaria ainda de agradecer à coordenação e a todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, que direta ou indiretamente participaram de minha formação.

Em especial, gostaria de agradecer ao INCT em neuroimunomodulação (INCT-NIM), coordenado pelo professor Dr. Wilson Savino, ao qual minha bolsa de doutorado esteve vinculada. Não posso deixar de agradecer ao Projeto CAPES-COFECUB, que viabilizou meu doutorado-sanduíche na França. Essa experiência enriquecedora não apenas ampliou meus horizontes acadêmicos, mas também contribuiu de maneira significativa para o meu desenvolvimento pessoal.

Ao meu orientador, conselheiro e fonte de inspiração: professor Emiliano Barreto. Muito obrigado por todo o suporte, ensinamentos e oportunidades. Cada conquista alcançada em minha vida acadêmica é um reflexo direto da sua dedicação e orientação. Professor, o senhor é um modelo a ser seguido, um pesquisador de excelência. Tive muita sorte em tê-lo como orientador durante toda minha trajetória acadêmica. Sem sombra de dúvidas, ao lado da minha família, o senhor ocupa um espaço singular em minha vida. Muitas das minhas experiências pessoais e profissionais não seriam possíveis sem o seu suporte. Agradeço por todas as orientações, desde a sugestão do sabor do “Crepe” (o caramelo da França é realmente incrível, saudades do “Crêpes au caramel”) até os direcionamentos acadêmicos. Enfim, muito obrigado por tudo, sou verdadeiramente grato por todas as oportunidades que o senhor me proporcionou.

Ao professor Vincent Lagente, meu supervisor/orientador no doutorado-sanduíche. Agradeço pela calorosa recepção, pelo suporte científico e pelo ambiente extremamente leve e acolhedor que me proporcionou. Agradeço à universidade de Rennes, ao Instituto Numecan e a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram no processo de adaptação e na rotina do laboratório. Em especial, agradeço aos pesquisadores Brendan Le Daré, Bernard Fromenty, Aude Bodin e Pierre-Jean Ferron pelo apoio científico e metodológico.

Ao laboratório de biologia celular (LBC) por proporcionar infraestrutura e recursos humanos de qualidade. Sou muito grato pela oportunidade de ter acesso a um laboratório com todos os meios necessários para a realização de uma pesquisa de qualidade.

A todos os professores do LBC que tanto me ajudaram durante a minha formação: Dr. Emiliano Barreto, Dr. Alexandre Borbely, Dr. Danielma Reis, Dr. Jamilyle Ferro, e a saudosa Dr. Salete Smaniotto. Muito obrigado por mostrar diariamente que o meio acadêmico PODE SIM ser um ambiente leve, acolhedor e empático.

Agradeço em especial a nossa técnica maravilhosa, Juliane Barreto, por todo apoio, por ser uma líder incrível e ser um elo importantíssimo que une todo o laboratório. Além do agradecimento profissional, agradeço pela pessoa incrível, sorridente e alegre, que sempre esteve disposta a ajudar em tudo que fosse possível. Em especial, agradeço muito pelo suporte no modelo de asma, eram tantos animais para tratar e desafiar, mas parecia que o tempo passava correndo em sua companhia. Sem dúvidas, essa tese tem muito das suas digitais. Muito obrigado, Juh! E sim, a defesa chegou e com isso, nossa costela ao Barbecue – melhor que a do Outback – vai sair!

Não posso deixar de agradecer a professora Jamilyle Ferro. Muito obrigado por todo apoio pessoal e profissional. Você foi – e continua sendo – essencial na minha formação: foi com você que aprendi a pegar em uma pipeta, a imobilizar um animal, a fazer os cálculos de concentração (vou nem comentar, hehe). Enfim, meu conhecimento científico e metodológico tem base em sua valiosa orientação. Além disso, agradeço por sempre acreditar e torcer por mim, por sempre estar presente em minhas conquistas e descobertas. Obrigado por acreditar em meu potencial, mesmo quando eu não confiava em mim mesmo. Muito obrigado por sempre segurar minha mão, me orientar e me fortalecer. A você, professora, madrinha de casamento e amiga, que permanecerá para sempre em minha vida, meu mais profundo agradecimento.

Agradeço imensamente à Professora Danielma Reis pelos meses de parceria na França e por todos os preciosos ensinamentos compartilhados. Ter a sua constante presença e apoio durante o cotidiano em um país estrangeiro foi de extrema importância para mim. Sou grato, ainda, por todas as suas contribuições científicas valiosas que proporcionaram um impacto significativo na minha formação.

Ao meu querido amigo e compadre Marvin Paulo. Muito obrigado por toda parceria e amizade, por sempre me apoiar e ajudar. Agradeço por todo apoio

metodológico (lembro você me ensinando a “tirar” o timo do animal e a saga de coletar os linfonodos), por todas as discussões científicas e por todas as “resenhas” que sempre estão presentes quando estamos juntos. Ao mestre da citometria e dos timócitos, o meu muito obrigado.

A todos os integrantes da família do Laboratório de Biologia Celular (LBC). Obrigado por todo o carinho, ensinamentos, e pelo ótimo ambiente de trabalho, em especial agradeço: Alef Batista (muito obrigado por ter contado os timócitos naquele experimento, hehe), Ana Lúcia, Camilla Mendes, Cecília, Cleidiane, Erick Alves, Everlaine Leite (a pessoa mais premiada que conheço, sou muito seu fã!), Fernanda, James Henrique, Keyla Nobre (cientista fitness), Liliane Tenório, Marvin Paulo, Porto (Felipe) – parceiro de friedelina, Rayane Botelho, Jordana Rodrigues, Thamyres. Agradeço também aos ex-integrantes do LBC que foram importantes na minha vida e formação: Monaly Lima, Anderson Marcos, Lilian Mariane, Flávio Martins, Tácio, Samário, Fagner (querido), João Paulo Noé, Fernanda Aquino, Polliane Araújo. Agradeço em especial a professora Ana Carolina Correia, pela orientação e por todos os direcionamentos: você tem um papel essencial em minha formação. Sou muito grato a todos!

Em especial, agradeço a Rayane Botelho (minha dupla de experimentos e de estudo de inglês), Ana Lúcia e Keyla Nobre, pessoas que sempre estiveram por perto, me apoiando em tudo e comemorando minhas conquistas. Levarei vocês para sempre em meu coração.

A Návylla Candeia (*in memoriam*) – que infelizmente perdemos para a COVID19 – por toda amizade e amor. Obrigado por todos os momentos de felicidade e alegria que passamos juntos. Sentimos muito a sua falta. Não tem como escutar sertanejo e não lembrar de você. Dedico essa tese a você, sua força, alegria e sorriso sempre estará marcado na história de quem te conheceu. Te amo, minha amiga.

Aos professores que fizeram parte da banca de qualificação: Dra. Carolinne Marques, Dr. Axel Helmut Cofre, Dr. Olagide Castro e Dr. Ênio Bassi. Muito obrigado pela disponibilidade e por todos os apontamentos. Todas as sugestões foram valiosas para melhorar o presente trabalho.

A banca de defesa. Muito obrigado pela disponibilidade e por contribuir nesta importante etapa de minha formação.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, participaram da realização desse sonho. Muito obrigado!

A educação   a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.

(Nelson Mandela).

NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com os requisitos das normas em vigor no momento desta publicação, segundo o Manual para normalização de trabalhos acadêmicos da UFAL: Helena Cristina Pimentel do Vale, Lívia Aparecida Ferreira Lenzi; Rafael Giardini Lenzi. Maceió: UFAL, 2022.

RESUMO

A asma alérgica é uma doença crônica caracterizada pela hiper-reatividade brônquica, inflamação e remodelamento anormal das vias aéreas. Nesta patologia, a intensa resposta imune do tipo 2 e o reduzido número de linfócitos T reguladores (Treg) tem papel chave na patogênese da doença. Atualmente, os glicocorticoides inalatórios constituem a terapia de primeira linha no tratamento da asma. Porém, o uso prolongado destes fármacos em altas doses causam efeitos indesejáveis e aumentam o risco de outras patologias. Assim, a busca de alternativas para o tratamento da asma torna-se importante. A friedelina, um triterpeno pentacíclico natural, tem atraído interesse devido a sua ampla gama de ações farmacológicas, que incluem efeitos antitumorais, anti-inflamatórios, analgésicos, antipiréticos e antioxidantes. Apesar de todos estes efeitos, as ações da friedelina sobre timócitos e linfócitos T, bem como seu provável mecanismo de ação anti-inflamatório na asma alérgica experimental ainda não foram explorados. Neste estudo, objetivamos avaliar os efeitos da friedelina sobre timócitos e linfócitos *in vitro* e *in vivo*, bem como investigar o possível mecanismo anti-inflamatório desse triterpeno no modelo de asma alérgica experimental induzida por ovalbumina (OVA). Inicialmente, confirmamos que a friedelina não foi capaz de alterar a viabilidade de timócitos nas concentrações estudadas (0,1 -100 μ M). Em seguida, observamos *in vitro* que a friedelina aumentou a resposta migratória induzida por CXCL12 em timócitos imaturos (CD4⁻CD8⁻ e CD4⁺CD8⁺), ao mesmo tempo em que inibiu a migração de timócitos CD4⁺. Além disso, a friedelina também reduziu a produção da citocina IL-2 em timócitos estimulados com concanavalina-A (Con-A). Na população de linfócitos obtidos de linfonodos axilares, a friedelina não interferiu com a resposta migratória induzida por CXCL12, mas suprimiu a geração de IL-2 induzida por ConA. A injeção intraperitoneal em camundongos C57BL6 com friedelina por 4 dias consecutivos não alterou os aspectos macro- e microscópicos do timo, nem afetou seu peso relativo. Além disso, o perfil das diferentes subpopulações de timócitos permaneceram inalterados após o tratamento com a friedelina. Ao contrário, o tratamento com dexametasona, fármaco referência, induziu atrofia tímica com marcada redução tanto no número de timócitos quanto no peso do timo. Com base nos efeitos diretos da friedelina em células imunes, bem como a ausência de efeitos deletérios sobre o timo, avançamos para avaliar os efeitos do tratamento tópico com friedelina na asma. Nossos resultados revelaram que a friedelina reduziu de forma significativa o acúmulo de leucócitos totais nas vias aéreas dos animais asmáticos estimulados com OVA. Além disso, o tratamento com friedelina aumentou a porcentagem de linfócitos T reguladores nas vias aéreas dos animais asmáticos, o que pode justificar os efeitos anti-inflamatórios da friedelina. Em conjunto, estes resultados sugerem que a friedelina mostra-se como um candidato promissor para o tratamento da asma alérgica.

Palavras-chave: Friedelina. Asma. Linfócitos. Timócitos. Células Treg. Inflamação

ABSTRACT

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease characterized by bronchial hyperresponsiveness and abnormal airway remodeling. In this disease, the pathogenesis is driven by an intense type 2 immune response and a diminished population of regulatory T cells (Tregs). Currently, inhaled glucocorticoids are the first-line therapy for asthma. However, the prolonged use of these drugs at high doses can cause side effects and increase the risk of other pathologies. Thus, the search for alternatives for asthma treatment is very important. Friedelin, a natural pentacyclic triterpene, has garnered considerable attention due to its wide range of pharmacological actions, including antitumor, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, and antioxidant effects. Despite all these effects, the actions of friedelin on thymocytes and T lymphocytes, as well as its possible anti-inflammatory mechanism of action in experimental allergic asthma have not been explored yet. In this study, we aim to evaluate the effects of friedelin on thymocytes and lymphocytes *in vitro* and *in vivo*, as well as to investigate the possible anti-inflammatory mechanism of this triterpene in an experimental model of ovalbumin-induced allergic asthma. Firstly, we confirmed that friedelin did not alter the cell viability of thymocytes at all tested concentrations (0.1 - 100 μ M). Then, we observed *in vitro* that friedelin increased the CXCL12-induced migration in immature thymocytes (CD4⁻CD8⁻ and CD4⁺CD8⁺), while inhibiting the migration of CD4⁺ thymocytes. Additionally, friedelin also reduced the production of the cytokine IL-2 in thymocytes stimulated with concanavalin-A (Con-A). In the population of lymphocytes obtained from axillary lymph nodes, friedelin did not interfere with the migratory response induced by CXCL12 but suppressed the ConA-stimulated IL-2 production. The intraperitoneal injection of friedelin in C57BL6 mice for 4 consecutive days did not induce any noticeable changes in the macroscopic aspects of the thymus, nor did it affect its relative weight. Furthermore, the different thymocyte subsets remained unchanged after treatment with friedelin. On the other hand, treatment with dexamethasone, a reference drug, caused thymic atrophy with marked reduction in the number of thymocytes and thymus weight. Based on the direct effects of friedelin on immune cells, as well as the absence of detrimental effects on the thymus, we decided to evaluate the effects of topical treatment with friedelin in asthma. Our results revealed that friedelin significantly reduced the accumulation of total leukocytes in the airways of OVA-stimulated asthmatic animals. Moreover, friedelin treatment increased the percentage of regulatory T cells in the airways of asthmatic animals, which may justify the anti-inflammatory effects of friedelin. Taken together, these findings indicate that friedelin may be a promising candidate for the treatment of allergic asthma.

Keywords: Friedelin. Asthma. Lymphocytes. Thymocytes. Treg Cells. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Interação das células dendríticas com linfócitos T no ambiente asmático favorece a diferenciação dos linfócitos para o perfil de resposta Th2.....	28
Figura 2	Modificações histopatológicas das vias aéreas no contexto da asma.....	30
Figura 3	Eventos imunológicos envolvidos na fisiopatologia da asma....	31
Figura 4	Diferentes subpopulações de linfócitos T estão envolvidas na patogênese da asma alérgica.....	33
Figura 5	As células Treg residem em diferentes órgãos e tecidos.....	35
Figura 6	Mecanismos imunomoduladores mediados por células T reguladoras.....	36
Figura 7	As células Treg podem ser originadas no timo ou na periferia.....	37
Figura 8	Funções das células T reguladoras no contexto da asma.....	38
Figura 9	Exemplos de corticoides e suas respectivas estruturas moleculares.....	40
Figura 10	Mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios dos corticoides.....	41
Figura 11	Classes dos terpenos e seus respectivos exemplos.....	46
Figura 12	Estrutura molecular do triterpeno pentacíclico friedelina.....	49
Figura 13	Estratégia de <i>gate</i> utilizada para determinar as diferentes subpopulações de timócitos.....	55
Figura 14	Esquema da abordagem <i>in vivo</i> utilizada para avaliar o efeito do tratamento sistêmico com friedelina sobre o timo de camundongos.....	56
Figura 15	Modelo de asma alérgica experimental induzido por ovalbumina.....	59

Figura 16	Estratégia de <i>gate</i> utilizada para a análise das células CD4+CD25+FOXP3+ por citometria de fluxo.....	60
Figura 17	Friedelina não apresenta citotoxicidade em timócitos <i>in vitro</i>	61
Figura 18	A friedelina não altera o perfil das subpopulações de timócitos.....	63
Figura 19	Friedelina aumenta a migração de timócitos estimulados por CXCL12.....	64
Figura 20	Friedelina modula de maneira diferencial a migração das diferentes subpopulações de timócitos estimulados por CXCL12.....	65
Figura 21	Friedelina não altera os níveis de expressão de CXCR4 em timócitos estimulados por CXCL12.....	67
Figura 22	Friedelina diminui a produção de IL-2 em timócitos estimulados por conA.....	68
Figura 23	Friedelina não altera os a migração de linfócitos estimulados por CXCL12.....	69
Figura 24	O tratamento com friedelina reduz a produção de IL-2 em linfócitos estimulados por conA.....	70
Figura 25	O tratamento sistêmico com friedelina não altera o padrão macroscópico e o peso relativo do timo de camundongos.....	72
Figura 26	O tratamento sistêmico com friedelina não altera o número de timócitos totais e as diferentes subpopulações dessas células no timo de camundongos.....	73
Figura 27	O tratamento sistêmico com friedelina não altera a porcentagem de timócitos em apoptose no timo de camundongos.....	75
Figura 28	O tratamento intranasal com friedelina não causa efeitos deletérios no timo de animais asmáticos.....	77
Figura 29	O tratamento intranasal com friedelina diminui o recrutamento de leucócitos nas vias aéreas de animais asmáticos.....	78
Figura 30	O tratamento com friedelina diminui o número de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos nas vias aéreas de animais asmáticos...	79

Figura 31	O tratamento intranasal com friedelina diminui a porcentagem de linfócitos T CD4+ nas vias aéreas de animais asmáticos.....	80
Figura 32	O tratamento intranasal com friedelina restaura a porcentagem de linfócitos T reguladores nas vias aéreas de animais asmáticos.....	82
Figura 33	Esquema representando os efeitos imunomoduladores da friedelina in vitro e in vivo.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classe de esqueleto-bases de triterpenos pentacíclicos e sua estrutura	48
Tabela 2	Anticorpos utilizados para citometria de fluxo.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Soro de albumina bovina.
BUD	Budesonida
ConA	Concanavalina A
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DCs	Células dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
FD	Friedelina
FDA	Food Drug Administration
FOXP3	Fator de transcrição Forkhead Box Protein P3
GC	Glicocorticoide
GINA	Global Initiative of Asthma
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon- γ
LTs	Leucotrienos
MBP	Proteína básica principal
Mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mM.	Milimolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
SBF	Soro Bovino Fetal
SUS	Sistema Único de Saúde
TCR	Receptor de células T

TGF- β	Fator de crescimento transformador β do tipo 1
Th1	T <i>helper</i> 1
Th17	T <i>helper</i> 17
Th2	T <i>helper</i> 2
Treg	T regulador
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
β	Beta
%	Porcentagem
US\$	Dólar
°C	Grau Celsius
<	Menor
±	Mais ou menos
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Asma: aspectos gerais e epidemiológicos	25
2.1.1	Fisiopatologia da asma: Células e eventos envolvidos.....	24
2.1.2	Resposta celular na asma.....	32
2.1.3	Linfócitos T reguladores.....	34
2.2	Tratamento da asma	39
2.2.1	Estudos clínicos no contexto da asma alérgica.....	42
2.3	Produtos naturais	43
2.3.1	Terpenos e triterpenos: Estrutura e Funções.....	44
2.4	Friedelina	49
3	OBJETIVOS	51
3.1	Objetivo geral	51
3.2	Objetivos específicos	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	Animais	52
4.2	Coleta de timócitos e linfócitos	52
4.3	Ensaio de viabilidade celular por MTT	52
4.4	Ensaio de migração celular	53
4.5	Imunomarcagem das células por citometria de fluxo	54
4.6	Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	55
4.7	Protocolo de tratamento in vivo	56
4.8	Análise macroscópica do timo e avaliação do peso relativo	57
4.9	4.9 Contagem de timócitos totais e análise das subpopulações	57
4.10	Quantificação da apoptose por Anexina/PI	57
4.11	Modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina	58
4.12	Lavado broncoalveolar	59
4.13	Marcação de células T reguladoras (Tregs)	59

4.14	Análise estatística.....	60
5	RESULTADOS.....	61
5.1	Efeito da friedelina sobre a viabilidade de timócitos <i>in vitro</i>	61
5.2	Efeito da friedelina sobre o perfil das subpopulações de timócitos....	62
5.3	Efeito da friedelina sobre a migração de timócitos <i>in vitro</i>	64
5.4	Efeito da friedelina sobre a expressão do receptor CXCR4 em timócitos.....	66
5.5	Efeito da friedelina sobre a produção de IL-2 em timócitos.....	68
5.6	Efeito da friedelina sobre a migração de linfócitos.....	68
5.7	Efeito da friedelina sobre a produção de IL-2 por linfócitos.....	70
5.8	Efeito do tratamento com friedelina sobre aspectos macroscópico e peso relativo do timo de camundongos.....	71
5.9	Efeito do tratamento com friedelina sobre o número de timócitos e suas subpopulações no timo de camundongos.....	71
5.10	Efeito do tratamento sistêmico com friedelina sobre a morte de timócitos em camundongos.....	74
5.11	Efeito da friedelina sobre o peso relativo e a celularidade do timo de animais asmáticos.....	76
5.12	Efeito da friedelina sobre a porcentagem de células em apoptose no timo de animais asmáticos.....	76
5.13	Efeito da friedelina sobre o recrutamento de leucócitos totais para as vias aéreas de animais asmáticos estimulados com OVA.....	78
5.14	Efeito da friedelina sobre a porcentagem de células T CD4+ nas vias aéreas de animais asmáticos estimulados com OVA.....	79
5.15	Efeito da friedelina sobre a porcentagem de células T reguladoras nas vias aéreas de animais asmáticos estimulados com OVA.....	81
6	DISCUSSÃO.....	84
7	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

A asma alérgica é uma condição inflamatória crônica caracterizada pela hiper-reatividade brônquica e remodelamento anormal do tecido pulmonar, o que resulta no comprometimento da mecânica respiratória (HOLGATE et al., 2015; KAMARAJ et al., 2021; LUO et al., 2022). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019 a asma afetou aproximadamente 300 milhões de pessoas em todo mundo e causou 455.000 mortes. Nesse cenário, estima-se que diariamente mais de 1000 pessoas morrem devido a essa patologia. Ainda segundo a entidade, grande parte das mortes relacionadas à asma ocorre em países em desenvolvimento, onde há sérios problemas no diagnóstico e dificuldades no acesso ao tratamento da doença (OMS, 2019).

Inúmeros trabalhos têm revelado que o desequilíbrio entre a resposta imune adaptativa de perfil T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2) desempenha um papel crítico no estabelecimento e na progressão da asma (BAI et al., 2022; LUO et al., 2022). Nessa condição patológica, os linfócitos Th2, e as citocinas relacionadas a esse perfil imunológico, desempenham um papel fundamental no início, no desenvolvimento e no agravamento da doença (WIEST et al., 2018).

Células do sistema imune como linfócitos e seus precursores timócitos são componentes importantes na fisiopatologia da asma, visto que a migração dessas células e a produção de citocinas, tal como a interleucina-2 (IL-2), são padrões observados na resposta imune associada às alergias (HONDOWICZ et al., 2016). Logo, a avaliação desses eventos em células imunes revela-se crucial para a compreensão dos mecanismos imunomoduladores e para o desenvolvimento de fármacos antiasmáticos.

Os linfócitos T, em especial as células T reguladoras (Treg, CD4+CD25+Foxp3+) têm atraído grande atenção devido a sua capacidade de limitar o desenvolvimento e a progressão das doenças alérgicas (ZHANG et al., 2022; ZHU et al., 2020). De fato, já foi demonstrado que, em pacientes asmáticos (SUN et al., 2021) e em distintos modelos experimentais de asma (AZEVEDO et al., 2021) há uma redução no número e na funcionalidade dessas células, o que destaca a sua importância no contexto da doença.

Mesmo com todo conhecimento acerca dos diferentes aspectos da doença, incluindo a disponibilidade de fármacos para o tratamento, os indicadores

epidemiológicos para a asma, tais como o número de mortes e de internações, permanecem elevados na população (JIN et al., 2016), o que sugere a necessidade de buscar candidatos a fármacos para o tratamento da asma. Atualmente, os fármacos disponíveis para tratar essa patologia, como os corticoides e broncodilatadores, são capazes de manter sob controle as manifestações clínicas deletérias da doença. Porém, um contingente relevante de paciente, cerca de 5 a 10%, são refratários ao tratamento com corticoides (HENDERSON et al., 2020). Além disso, para grande maioria dos pacientes, o uso prolongado desses fármacos ocasiona uma variedade de efeitos adversos.

De fato, prévios estudos já reportaram o potencial lesivo dos corticoides sobre o timo de animais e de humanos (AHMED; SRIRANGANATHAN, 1994; CANNIZZO et al., 2010; FUKUYAMA et al., 2011). Deste modo, a busca por novos fármacos para o tratamento da asma que sejam efetivos e com menos efeitos deletérios sobre os órgãos linfoides torna-se importante. Logo, os produtos naturais se mostram como fonte para a obtenção de fármacos relevantes, seja pela sua diversidade química, ou mesmo pela sua disponibilidade. Dentre os produtos naturais, os triterpenos são moléculas amplamente encontradas no reino vegetal, em especial nos frutos, folhas e cascas de plantas medicinais (HILL e CONNOLLY, 2013).

Na última década, diversos trabalhos evidenciaram as múltiplas propriedades farmacológicas dos triterpenos, em especial da friedelina. Esse triterpeno pentacíclico natural já teve descrito seus efeitos antitumorais (SUBASH-BABU; LI; ALSHATWI, 2017), anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos (ANTONISAMY; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011), além de suas atividades vasodilatadoras e antioxidantes (SUNIL et al., 2013). No entanto, apesar dessa diversidade de efeitos farmacológicos, até o momento, não há estudos que reportam os efeitos da friedelina sobre timócitos e linfócitos, ou mesmo o seu impacto em doenças imunoinflamatórias, tal como a asma.

Portanto, no presente trabalho, avaliou-se os efeitos diretos da friedelina sobre a timócitos e linfócitos *in vitro*. Além disso, investigou-se também o potencial anti-inflamatório desse triterpeno no modelo de asma alérgica experimental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Asma: aspectos gerais e epidemiológicos

A organização *Global Initiative of Asthma* (GINA) define a asma como uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, que acarreta sintomas respiratórios, como chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse, que variam no tempo e na intensidade, juntamente com limitações variáveis do fluxo respiratório (GINA, 2023). O perfil complexo da doença decorre da interação entre fatores ambientais e genéticos, levando a uma variedade de formas clínicas, que engloba hiper-reatividade brônquica, comprometimento da função respiratória e remodelamento anormal das estruturas pulmonares (PAVÓN-ROMERO et al., 2021).

De acordo com estudos divulgados pela OMS, projeta-se que no ano de 2025 o número de pessoas acometidas por asma em todo o mundo possa chegar a 400 milhões. Além disso, a asma é responsável por causar cerca de 455.000 óbitos por ano, com estimativas de mais de 1000 mortes diárias devido às complicações decorrentes dessa patologia. Vale registrar que a maior parte dessas mortes ocorre em países em desenvolvimento, onde o acesso ao diagnóstico e ao tratamento da asma é limitado (OMS, 2019).

No Brasil, a asma afeta cerca de 20 milhões de pessoas, resultando em uma prevalência estimada de 4,5% a 8,5%, e de forma específica, entre adolescentes, esse índice alcança cerca de 18,5% (ATHANAZIO et al., 2022; PITCHON et al., 2020; SOLÉ et al., 2015). Diante desse cenário, o Brasil figura como o quinto país com maior prevalência dessa enfermidade no mundo (TO et al., 2012). Adicionalmente, a asma constitui uma das principais razões para internações no âmbito do SUS, resultando em aproximadamente 2,3% do total de internações. Especificamente entre crianças e adultos jovens, a asma assume a posição de terceira causa mais frequente de internações, abrangendo aproximadamente 5,7% dos casos (NAKAMUTA et al., 2023). Em Alagoas, segundo dados do DATASUS e de estudo recentes, cerca de 3 mil casos de internações foram notificados no período de 5 anos (2017-2021), o que resultou em 26 óbitos (PACHECO et al., 2022).

Em conjunto, esses indicadores epidemiológicos indicam que a asma figura como uma das patologias mais comuns no Brasil e no mundo e um importante problema de saúde pública em nível global (OMS, 2019; MASOLI et al., 2004).

Estes registros mostram a abrangência global da asma, principalmente por afetar indivíduos de todas as faixas etárias e independente de gênero. Por conta disso, a asma causa uma série de problemas financeiros e sociais. Embora esses números possam variar significativamente de país para país, estima-se que o custo médio anual por paciente, englobando toda a população asmática na Europa, seja de aproximadamente US\$ 1.900. Esse valor aparenta ser menor se comparado à média estimada nos Estados Unidos, que é de cerca de US\$ 3.100 (NUNES; PEREIRA; MORAIS-ALMEIDA, 2017). Modelos matemáticos permitem projetar que a asma não controlada custará à economia dos EUA cerca de US\$ 300 bilhões até 2038 apenas em custos médicos diretos. Esse valor pode aumentar de forma substancial para cerca de US\$ 963 bilhões se for considerado os custos indiretos, como a perda de produtividade no trabalho, por exemplo (YAGHOUBI et al., 2019). No Brasil, a maior parte dos recursos financiados pelo sistema único de saúde (SUS) e pelos pacientes e seus familiares são destinados para internações e medicamentos (STIRBULOV et al., 2016).

Além dos danos financeiros, há diversos problemas sociais associados à asma. A hospitalização devido a complicações da asma acarreta um considerável número de ausências escolares e laborais, o que pode ter um impacto negativo no desempenho acadêmico, profissional e nas interações sociais dos pacientes (BOUSQUET et al., 2005; NUNES; PEREIRA; MORAIS-ALMEIDA, 2017). Em conjunto, esses fatores indicam a importância de estudos que visem buscar alternativas terapêuticas para asma, bem como para melhor entender a fisiopatologia dessa doença.

2.1.1 Fisiopatologia da asma: células e eventos envolvidos

O processo de sensibilização é o primeiro evento no desenvolvimento da asma, e ocorre quando células do sistema imunológico reconhecem um alérgeno e desencadeia uma resposta imune específica.

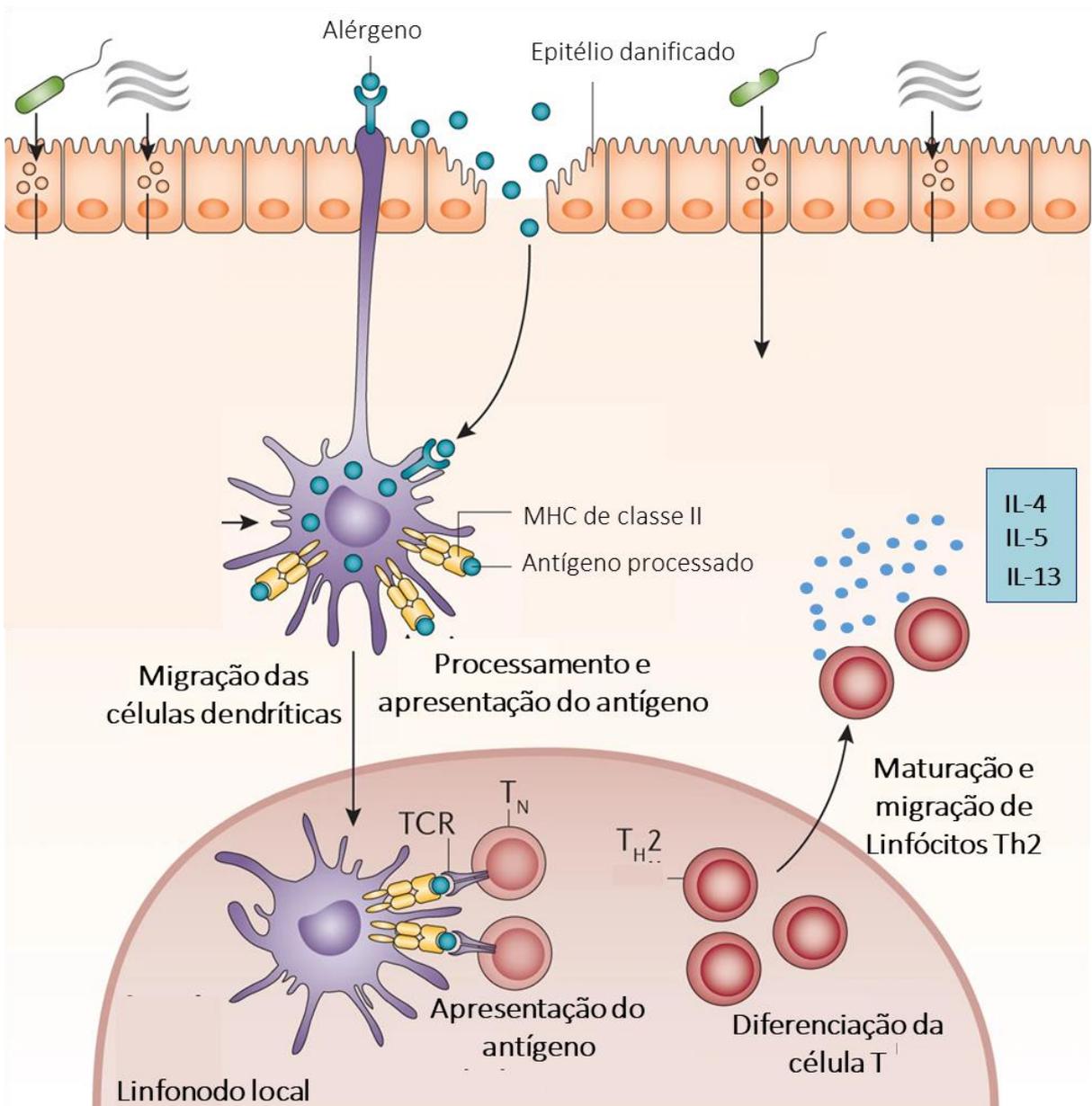
Diversos fatores podem induzir a resposta alérgica, sendo os alérgenos mais comuns o ácaro, pólen, pelos de animais, fungos, poluentes ambientais e alguns alimentos. Esses fatores ativam as células epiteliais alveolares, que por sua vez secretam citocinas e quimiocinas capazes de mediar o recrutamento de células imunes para o local afetado, especialmente as células dendríticas (DCs, do inglês,

Dendritic Cells). Vale ressaltar que muitos alérgenos relacionados à asma exibem propriedades enzimáticas que os permitem ultrapassar a barreira epitelial para interagir diretamente com as DCs da mucosa (MORIANOS; SEMITEKOLOU, 2020).

As DCs desempenham um papel crucial na iniciação e propagação da resposta alérgica na asma. Essas células possuem receptores específicos em suas membranas celulares capazes de reconhecer e capturar antígenos/alérgenos estranhos e agentes infecciosos presentes nas mucosas. Após o reconhecimento dos alérgenos, as células dendríticas realizam a fagocitose, o processamento e a apresentação dos antígenos na membrana por meio das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (MHC II, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) (MORIANOS; SEMITEKOLOU, 2020).

Em seguida, as DCs migram para os linfonodos locais, onde ocorre a interação com os linfócitos T CD4⁺ virgens por meio do receptor de células T (TCR, do inglês, *T-cell receptor*), do MHC classe II e de moléculas coestimuladoras. No contexto alérgico, essa interação ocorre na presença das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, que favorecem a diferenciação dos linfócitos T para o perfil de resposta Th2, que, por sua vez, migram para o local da inflamação, onde, após o desafio com o alérgeno, produzem citocinas pró-alérgicas, como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (HOLGATE et al., 2015b) (figura 1). Em especial, a citocina IL-2 desempenha um papel importante na asma, por estar envolvida na diferenciação e na função dos linfócitos T do perfil Th2 (COTE-SIERRA et al., 2004). Além disso, estudos indicam que essa citocina interfere com a translocação nuclear do receptor de glicocorticoide, diminuindo a ação anti-inflamatória desses fármacos (KANAGALINGAM et al., 2019).

Figura 1 – Interação das células dendríticas com linfócitos T no ambiente asmático favorece a diferenciação dos linfócitos para o perfil de resposta Th2



Resumidamente, as células dendríticas reconhecem os alérgenos, realizam a fagocitose e apresentam os antígenos na membrana. Em seguida, migram para os linfonodos locais e interagem com os linfócitos T CD4+ virgens, levando à diferenciação desses linfócitos T para o perfil de resposta Th2. Os linfócitos T Th2, por sua vez, migram para o local inflamado e produzem citocinas pró-alérgicas, como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. FONTE: Adaptado de HOLGATE et al., 2015.

Recentemente, as células linfoides inatas do tipo 2 (ILCs, do inglês *Innate lymphoid cells*) têm emergido como importantes células no contexto asmático. Um conjunto de evidências científicas vêm indicando que essas células são capazes de produzir uma variedade de citocinas e mediadores inflamatórios capazes de modular a resposta imune na asma alérgica (MASPERO et al., 2022).

Dentre as moléculas liberadas pelos linfócitos T e pelas ILCs, as citocinas IL-5 e IL-9 são essenciais para promover eosinofilia tecidual e hiperplasia de mastócitos, enquanto a IL-13 estimula a hiperprodução de muco. Além disso, as citocinas do tipo Th2 também agem diretamente sobre os linfócitos B, promovendo a produção de anticorpos do tipo IgE. Essas imunoglobulinas se ligam nos receptores de alta (FcεRI) e baixa (FcεRII ou CD23) afinidade em mastócitos, basófilos e eosinófilos, preparando essas células para uma resposta imediata e intensificada nas próximas exposições ao alérgeno (MORIANOS; SEMITEKOLOU, 2020; PAVÓN-ROMERO et al., 2021).

De fato, após a fase de sensibilização, os principais sintomas clínicos da asma alérgica ocorrem devido a exposições subsequentes do indivíduo aos mesmos alérgenos. Isso resulta em uma resposta broncoconstritora precoce, que dura de 5 a 90 minutos, causada pela ação da histamina, prostaglandina D2 e leucotrieno C4 (LTC4) produzidos por mastócitos e eosinófilos que foram desgranulados de forma dependente de IgE. Após essa resposta aguda, ocorre uma resposta de fase tardia que evolui ao longo de 3 a 12 horas, e está ligada ao recrutamento e a ativação de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares, que produzem mediadores responsáveis por exacerbar a resposta inflamatória e a responsividade das vias aéreas (HOLGATE et al., 2015).

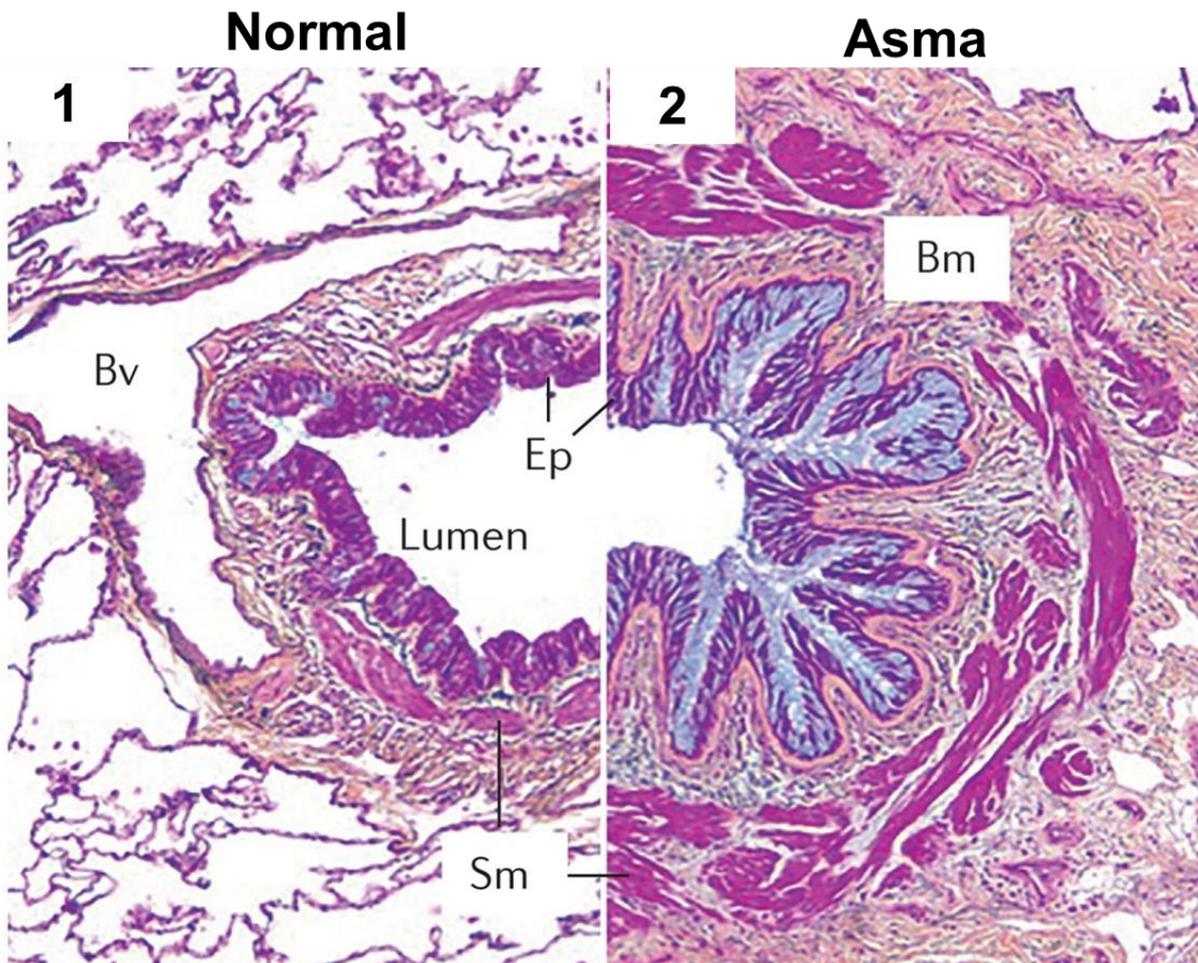
Sabe-se que mediadores como histamina, leucotrienos, proteína básica principal (MBP, do inglês *Major Basic Protein*), IL-4 e IL-13 estão diretamente envolvidas na hiper-reatividade das vias aéreas. Em especial, já foi evidenciado na literatura que os leucotrienos têm a capacidade de aumentar a responsividade pulmonar e causar hipertrofia da musculatura lisa tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes asmáticos (GUNDEL; LETTS; GLEICH, 1991).

A cronicidade desses eventos inflamatórios leva ao remodelamento das vias aéreas, com hiperplasia das células caliciformes e a consequente maior produção de muco, além do aumento da deposição de colágeno e da angiogênese subjacente ao epitélio. Adicionalmente, já foi evidenciado, em pacientes asmáticos, um aumento da massa muscular lisa das vias aéreas. Em conjunto, essas alterações no

microambiente pulmonar acarreta um comprometimento da mecânica respiratória e o aparecimento dos principais sintomas intermitentes da asma, incluindo, dispneia, tosse e aperto no peito, em combinação com obstrução respiratória variável das vias aéreas (HOLGATE et al., 2015).

A figura a seguir evidencia as diferenças estruturais do tecido pulmonar de um paciente asmático comparado com um indivíduo não acometido com a doença.

Figura 2 – Modificações histopatológicas das vias aéreas no contexto da asma

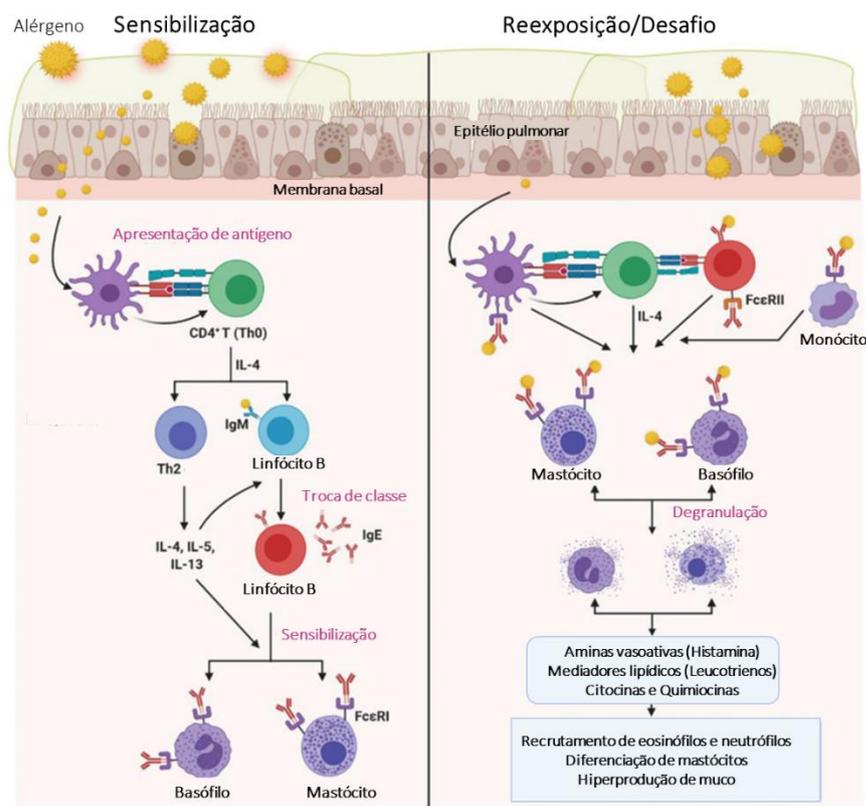


Corte transversal de uma via aérea asmática (1) comparada com uma via aérea normal (2). (1) Vias aéreas normais, com todas as estruturas preservadas e sem infiltrado inflamatório (2) No pulmão asmático é possível evidenciar um maciço infiltrado inflamatório, que mais frequentemente consiste em eosinófilos ativados, mastócitos e linfócitos T. Além disso, pode-se observar um remodelamento tecidual com metaplasia da mucosa, aumento do músculo liso (Sm), fibrose e angiogênese subepitelial. Ep: Epitélio; Bm:membrana basal. FONTE: HOLGATE et al., 2015.

Ao longo do tempo, uma série de estudos tem contribuído para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da asma, sendo os modelos animais uma ferramenta essencial nesse processo. Dentre esses modelos, o modelo de asma alérgica induzida

por ovalbumina (OVA) tem desempenhado um papel crucial na compreensão da fisiopatologia da doença e na busca por novos fármacos antiasmáticos. O uso de modelos animais em pesquisa tem a capacidade de reproduzir características-chave da asma observadas em seres humanos, permitindo uma investigação aprofundada dos seus mecanismos subjacentes (AZMAN et al., 2021). A figura a seguir ilustra os mecanismos patofisiológicos que ocorrem no modelo experimental, os quais são semelhantes aos observados na asma humana.

Figura 3– Eventos imunológicos envolvidos na fisiopatologia da asma



(1) Sensibilização: inicialmente, as células dendríticas processam e apresentam o antígeno às células T CD4+, que subsequentemente polarizam em linfócitos Th2 por meio de citocinas de perfil Th2 (principalmente IL-4). As células Th2 secretam grandes quantidades de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), que por sua vez, ativam as células B a secretarem anticorpos do tipo IgE, que é reconhecida pelos receptores FcεRI nos mastócitos, basófilos e eosinófilos. (2) Reexposição/desafio: mastócitos e basófilos sensibilizados (dotados de anticorpos IgE contra o alérgeno) reconhecem diretamente os antígenos e sofrem degranulação, que libera aminas vasoativas (histamina), mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos), quimiocinas e outras citocinas. Esses mediadores, por sua vez, recrutam os eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares, induzem a diferenciação de mastócitos, a hipersecreção de muco e apoptose de células epiteliais pulmonares. FONTE: Adaptado de AZMAN et al., 2021

2.1.2 Resposta celular na asma

Diversos tipos celulares estão envolvidos na patogênese e progressão da asma, incluindo mastócitos, basófilos, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais alveolares, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos. As interações entre essas células e os distintos mediadores por elas produzidas perpetuam a resposta inflamatória (HAMID et al., 2003).

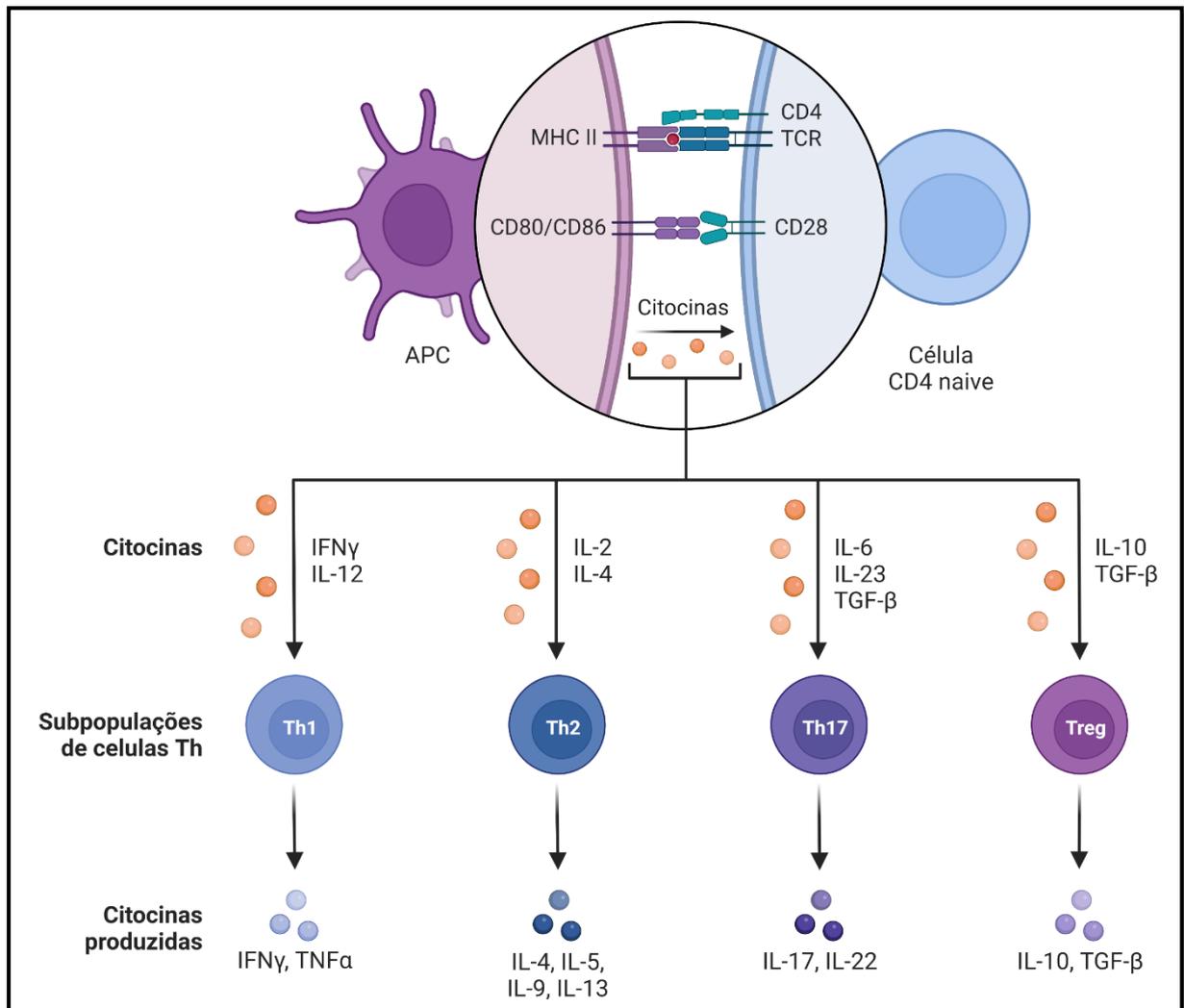
Dentre essas células, os linfócitos T desempenham um papel crucial na resposta imune alérgica e no desenvolvimento da asma. Dependendo das citocinas que produzem e das funções imunológicas que desempenham, as células T podem ser categorizadas em quatro subtipos: (1) Células Th1, que secretam interferon gama (IFN- γ); (2) Células Th2, produtoras de IL-4; (3) Células Th17, que produzem IL-17; e (4) Células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ (Tregs), produtoras de interleucina 10 (IL-10) e fator transformador de crescimento beta (TGF- β , do inglês, *Transforming Growth Factor beta*). Cada subtipo de linfócito T exerce um papel distinto na regulação da resposta imune e na progressão da asma (ZAROBKIEWICZ et al., 2021).

Os linfócitos T do perfil Th2 têm um papel significativo, pois produzem citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que favorecem a troca de classe de anticorpos para IgE nas células B, além de mediar o recrutamento de eosinófilos, neutrófilos e a produção de muco. Por outro lado, os linfócitos T do perfil Th1 estão envolvidos na produção de IFN- γ , que estimula a ativação de macrófagos e promove respostas imunológicas mediadas por células (LUO et al., 2022).

Outro perfil celular importante no contexto da asma são os linfócitos Th17. O aumento do número dessas células está associado ao aumento de IL-17 no microambiente pulmonar, o que parece estar relacionado com a resistência ao tratamento com corticoides. Além disso, os linfócitos Th17 promovem neutrofilia e uma redução no número de células T reguladoras no sítio inflamatório (LUO et al., 2022c).

Os linfócitos T reguladores, por sua vez, desempenham funções relacionadas à supressão da resposta imune. As células desse perfil produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , que regulam negativamente as funções das células imunes inatas e adaptativas (DURRANT; METZGER, 2010). Esses diferentes perfis de células são evidenciados na figura 4.

Figura 4 – Diferentes subpopulações de linfócitos T estão envolvidas na patogênese da asma alérgica



Os linfócitos T podem apresentar diferentes perfis de tipos de respostas imunológicas, dependendo do padrão de citocinas presentes no microambiente no momento de sua ativação.

De fato, a interação entre os perfis de linfócitos T e seu papel na etiologia e severidade da asma revelaram que o desequilíbrio entre as respostas imunes do tipo Th1/Th2 é um fator significativo para a progressão da doença. No entanto, é importante ressaltar que a desregulação dos linfócitos T na asma não se limita apenas às respostas do tipo Th1/Th2 (JI et al., 2014; LLOYD; HESSEL, 2010).

Estudos têm revelado a importância do desequilíbrio entre as respostas dos linfócitos T do perfil Th17 e dos linfócitos T reguladores (Tregs). Tanto em pacientes asmáticos quanto em modelos experimentais da doença foi observado um aumento no número de células Th17 e uma diminuição no número de células Tregs (LIN et al., 2020). Portanto, a busca por estratégias capazes de modular essas células torna-se

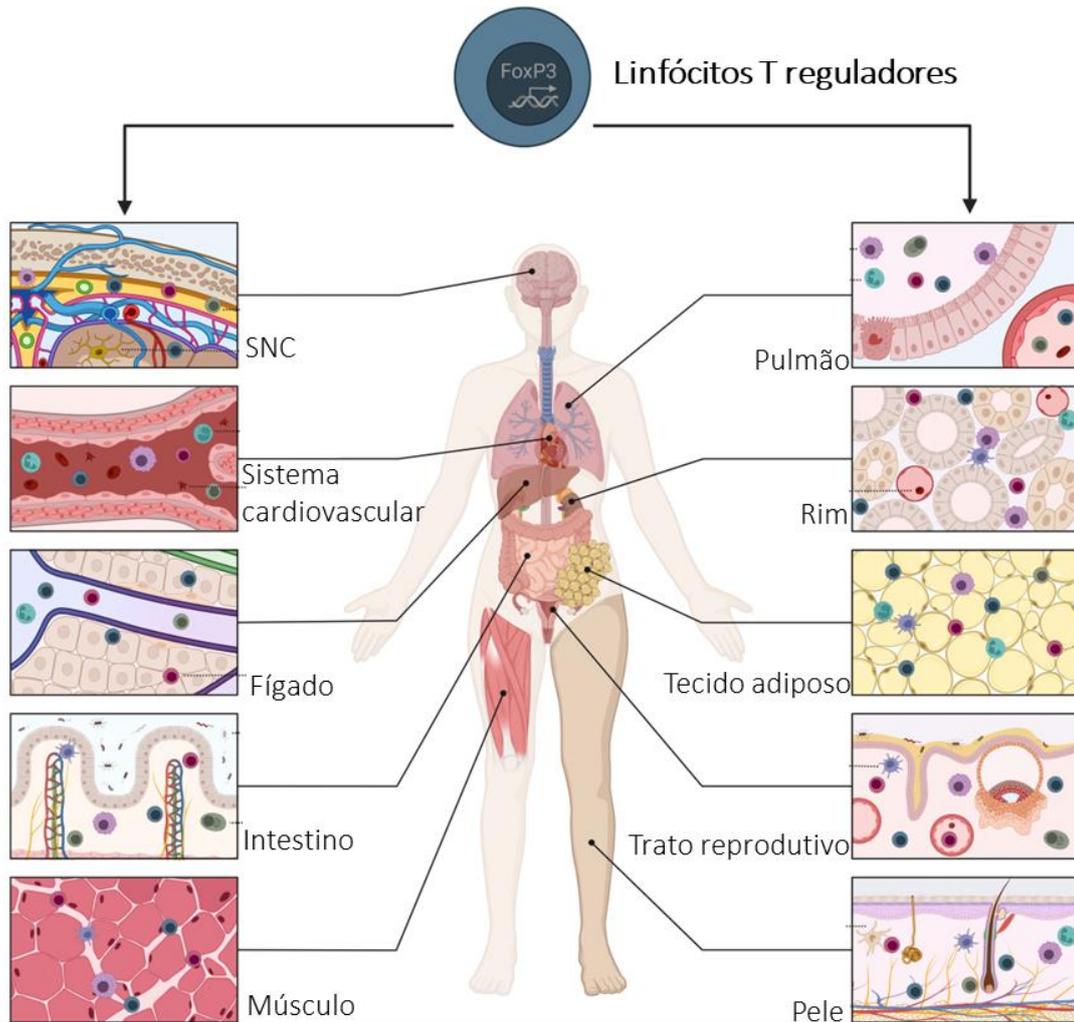
importante no tratamento da asma, especialmente em pacientes não responsivos aos corticoides convencionais.

2.1.3 Linfócitos T reguladores

As células T reguladoras (Tregs) desempenham um papel importante na regulação da resposta imunológica. Essas células são caracterizadas por expressar os receptores de membrana CD4 e CD25, além do fator de transcrição FOXP3 (FOXP3, do inglês, *Forkhead Box Protein P3*) (CD4+CD25+Foxp3+). As Tregs suprimem a ativação de outras células do sistema imune, como células T efetoras, células B e células dendríticas, e, assim, desempenham uma função crucial na manutenção da tolerância imunológica e na regulação de respostas imunes exacerbadas (CHERU; HAFLER; SUMIDA, 2023; KEMPKES et al., 2019).

Essas células podem ser encontradas em diversos órgãos periféricos, tais como pele, intestino, tecido adiposo e pulmão. A presença dessas células no microambiente desses órgãos permite a regulação ativa de processos inflamatórios, o que promove a homeostasia tecidual (MALKO; ELMZZAHI; BEYER, 2022; PANDURO; BENOIST; MATHIS, 2016).

Figura 5 - As células Treg residem em diferentes órgãos e tecidos



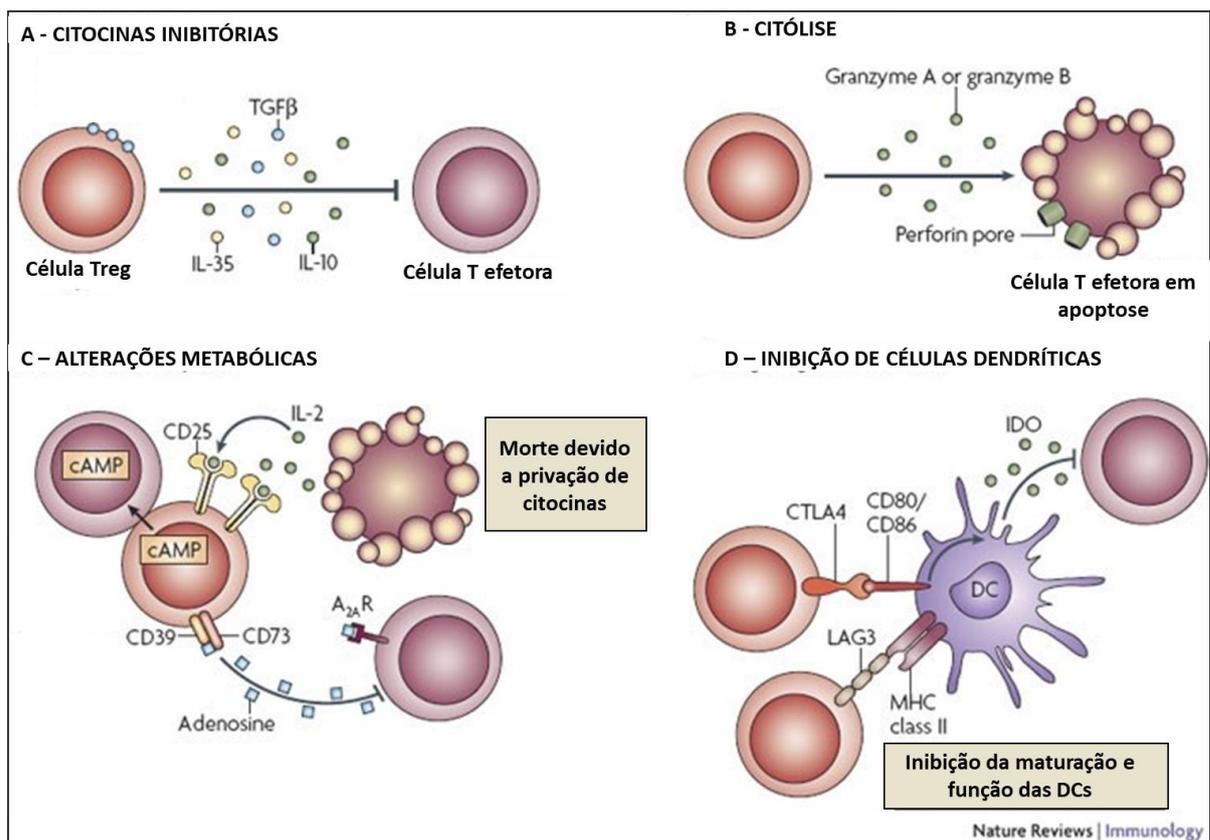
Os linfócitos T reguladores podem ser encontrados em diversos órgãos, onde desempenham papéis importante na modulação da resposta imune. FONTE: adaptado de MALKO; ELMZZAHI; BEYER, 2022.

As células Tregs desempenham um papel crucial em diversos processos biológicos e suas funções anti-inflamatórias têm um impacto positivo em doenças autoimunes e alérgicas. Elas possuem a capacidade de regular a resposta imune de forma abrangente, modulando os diferentes tipos de respostas associadas a essas células. No entanto, é importante ressaltar que, em certas condições, as células Tregs podem ter efeitos prejudiciais, especialmente no contexto do câncer. Nessas situações, os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores das células Tregs podem suprimir a resposta imune contra o tumor, favorecendo a progressão tumoral e a formação de metástases (KOS et al., 2022; OH; HONG; YUN, 2019).

A modulação sobre o sistema imunológico realizada por esse tipo celular ocorre por meio da expressão de moléculas supressoras, como PD-1 (do inglês,

Programmed cell death protein 1), CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T-lymphocyte protein 4*) e CD39, que inibem diretamente a função e maturação das células dendríticas. Adicionalmente, essas células também produzem uma série de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10, TGF- β e IL-35, as quais podem agir em células da imunidade inata, diminuindo suas funções efetoras. Um outro mecanismo consiste na inibição direta sobre as células T efetoras é por meio da indução de citólise utilizando granzima (KOS et al., 2022; OHUE; NISHIKAWA, 2019).

Figura 6 – Mecanismos imunomoduladores mediados por células T reguladoras



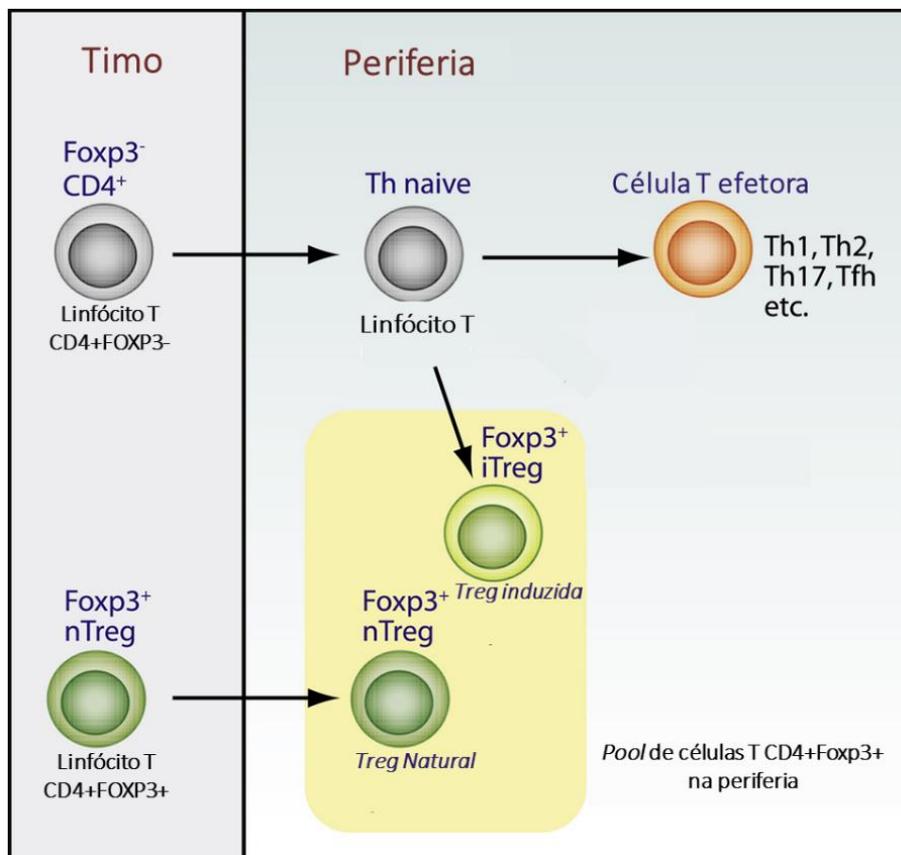
As Tregs apresentam diversos mecanismos imunomoduladores: (a) Produção de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, tais como IL-10 e TGF- β , respectivamente; (b) Produção de proteases (granzimas e perfurinas), que induzem a citólise de linfócitos T efetores.; (c) Indução de alterações metabólicas em células imunes; (d) Inibição direta da função e maturação das células dendríticas. FONTE: Adaptado de VIGNALI, COLLISON E WORKMAN, 2008.

As células T reguladoras podem ser categorizadas em células Treg naturais/tímicas (nTregs) e células Treg induzidas periféricas (iTregs). As células nTreg são originadas no timo como uma subpopulação de células T funcionalmente maduras, onde adquirem função imunossupressora mediante a expressão do marcador de superfície CD25 e do fator de transcrição FOXP3. Durante esse

processo, o fator de crescimento TGF- β e a citocina IL-2 no microambiente tímico são essenciais no desenvolvimento dessas células. Já foi evidenciado, por exemplo, que camundongos deficientes para os receptores de ambas as moléculas apresentaram uma depleção completa das células Treg (LI; ZHENG, 2015; LIU et al., 2008).

Por outro lado, na periferia, modificações epigenéticas nos linfócitos T, permitem que essas células se adaptem e modifiquem seus perfis efetores específicos. Nesse contexto, determinados estímulos, como TGF- β ou ácido retinóico podem determinar a diferenciação de células T *naïves* em células iTregs (OHUE; NISHIKAWA, 2019). Logo, seguindo estes achados, os linfócitos T reguladores que se encontram presentes nas vias aéreas e pulmão no contexto asmático podem ter origem tanto do timo quanto da diferenciação periférica de outros linfócitos T (CUROTTO DE LAFAILLE; JUAN LAFAILLE, 2009).

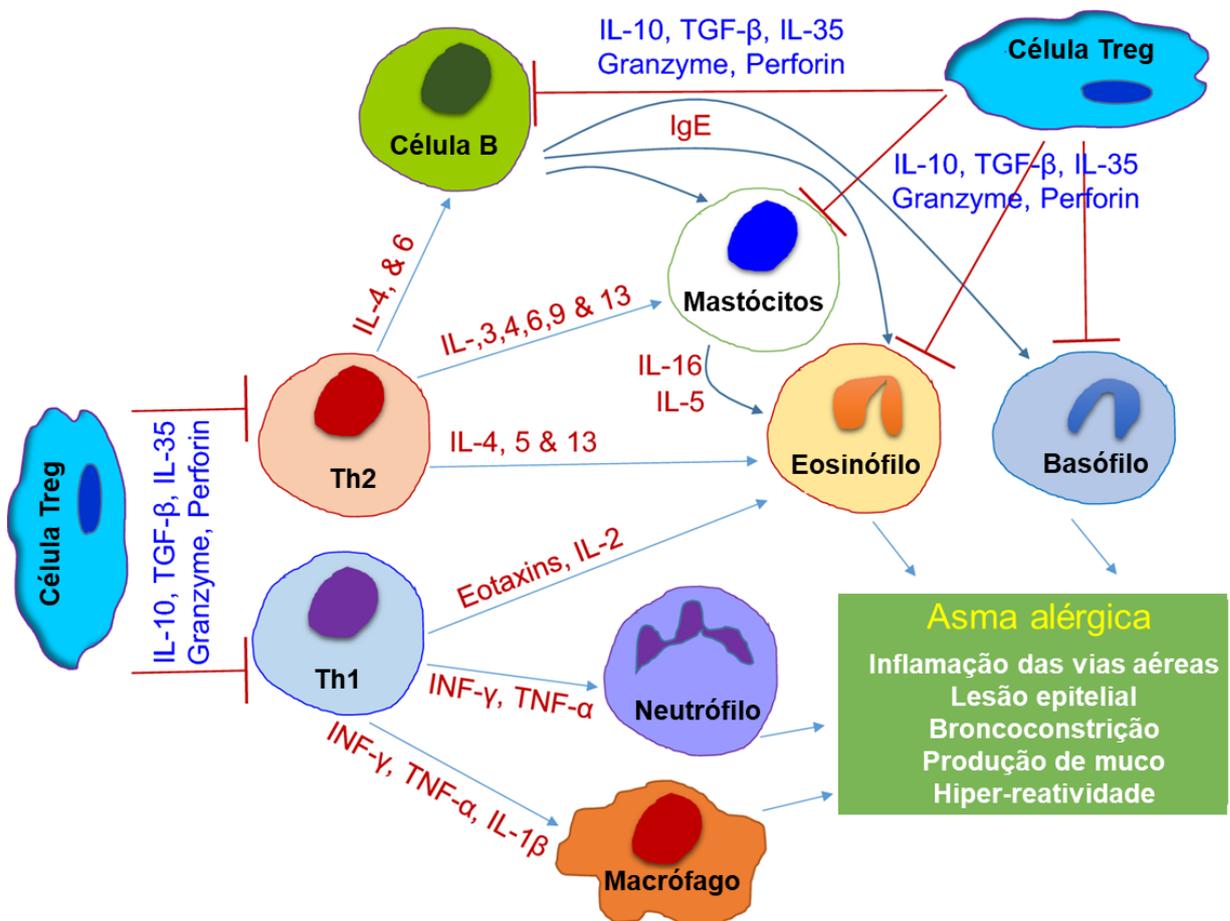
Figura 7 – As células Treg FOXP3⁺ podem ser originadas no timo ou na periferia



Origem das células T reguladoras. As nTregs são diferenciadas no microambiente tímico e migram para os tecidos periféricos. As iTregs, por sua vez, diferenciam-se a partir de células T CD4⁺ *naïve* em tecidos periféricos (órgãos linfoides secundários ou tecidos). Dessa forma, o *pool* de células T reguladoras presente nos tecidos compreende tanto as células nTregs quanto as células iTregs. FONTE: Adaptado de CUROTTO DE LAFAILLE; JUAN LAFAILLE, 2009

No contexto da asma, as Tregs produzem e liberam IL-10, TGF- β e IL-35, que em conjunto podem inibir as funções e a ativação de linfócitos T dos perfis th1 e th2, bem como dos linfócitos B, reduzindo a produção de anticorpos do tipo IgE. Além da produção de citocinas, as Tregs também são capazes de produzir enzimas, como granzimas e perforinas, que desencadeiam a morte de linfócitos. Conforme observado na figura abaixo (figura 8), é interessante apontar que esses eventos celulares não são específicos apenas em linfócitos, mas também são empregados em outras células efetoras, tais como mastócitos, eosinófilos e basófilos, inibindo essas células e, em última instância, reduzindo os sintomas clássicos dessa doença (KHAN, 2020).

Figura 8 – Funções das células T reguladoras no contexto da asma alérgica



Os linfócitos T podem agir modulando as funções de diversas células efetoras na asma. A produção de mediadores anti-inflamatórios e fatores de crescimento podem inibir as funções de linfócitos T e B, além de mastócitos, eosinófilos e basófilos. Em conjunto, essa imunomodulação promovida pelas células Treg reduzem o quadro inflamatório e os consequentes sintomas clássicos da asma. FONTE: Adaptado de (KHAN, 2020)

Um conjunto de evidências vem indicando que a modulação no número e na função das células Treg pode ter um impacto importante no tratamento da asma. Estudos em modelos pré-clínicos já evidenciaram que a depleção dessas células no modelo de asma está associada com a exacerbação do quadro asmático (KHAN, 2020). Por outro lado, ainda em modelos experimentais, a transferência ativa de células Treg em animais asmáticos atenua a asma alérgica induzido por OVA (KEARLEY; ROBINSON; LLOYD, 2008). Adicionalmente, pacientes asmáticos apresentam uma diminuição na expressão do fator de transcrição FOXP3 no tecido pulmonar (PROVOOST et al., 2009), além de uma considerável redução na porcentagem de células Tregs no lavado broncoalveolar. Outras abordagens já observaram que as células Treg coletadas de pacientes asmáticos possui uma capacidade reduzida em suprimir a proliferação e a produção de citocinas por linfócitos T em modelos experimentais *in vitro* (HARTL et al., 2007). Esses achados, além de evidenciar a importância dessas células no contexto da doença, indicam que a sua modulação pode ser um alvo terapêutico importante no controle da asma.

Nesse sentido, terapias que atuem modulando o número e/ou as funções das células Tregs podem ser interessantes no controle da fisiopatologia da asma, especialmente nos casos de asma grave resistente ao tratamento com corticoides (KHAN, 2020). De fato, diversos estudos têm demonstrado que o aumento da quantidade dessas células nas vias aéreas, por meio do uso de moléculas de origem natural, pode proporcionar efeitos antiasmáticos significativos.

2.2 Tratamento da asma

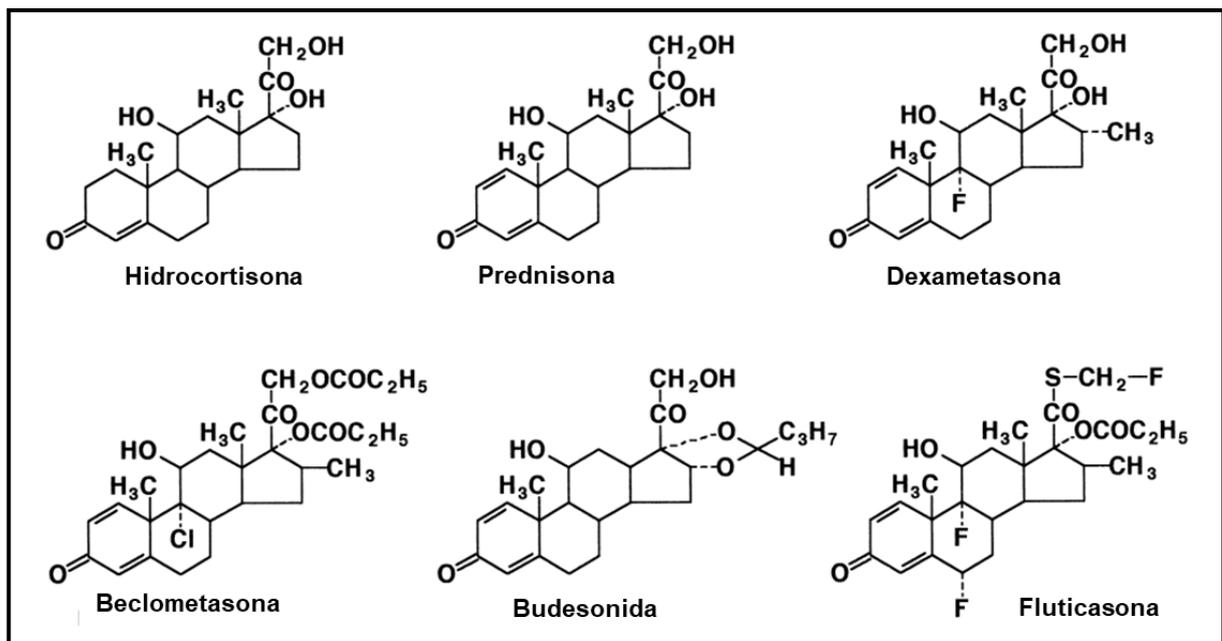
Atualmente, o tratamento da asma compreende principalmente o uso de fármacos anti-inflamatórios (GINA, 2023), por meio do uso de corticoides inalatórios ou sistêmicos, broncodilatadores β 2-agonistas de curta ou longa duração e antagonistas dos receptores de leucotrienos (WÓJCIK-PSZCZOŁA et al., 2023). Além desses fármacos, o uso de anticorpos específicos tem revelado resultados favoráveis para o controle da doença. Atualmente os anticorpos disponíveis no mercado para o tratamento da asma incluem o omalizumabe, um anticorpo monoclonal que se liga seletivamente à IgE de origem humana e é utilizado para tratar a asma alérgica grave em pacientes maiores de 6 anos de idade (BUHL, 2005; HENRIKSEN et al., 2020). Além desse, há anticorpos monoclonais anti-IL-5 (mepolizumab, reslizumab e

benralizumab) e anti-IL-4 (Dupilumab) que também são utilizados no controle dos sintomas da doença (RIDOLO et al., 2020; WALSH, 2020).

O tratamento da asma tem caráter progressivo dependendo da gravidade dos sintomas e da responsividade dos pacientes ao tratamento. Entretanto, mesmo em condições de sintomas leves, o uso de corticoides inalatórios sempre é levado em consideração (GINA, 2023). Já em pacientes com asma grave, recomenda-se a administração de corticosteroide inalatório com fármacos β -agonistas de longa duração em alta dose, associada a terapias adjuvantes, incluindo o uso de brometo de tiotrópio, anti-IgE, anti-IL-4 e anti-IL-5 (GINA, 2023; RIDOLO et al., 2020)).

Assim, os corticoides consistem na principal classe de fármacos utilizados em todas as fases do tratamento da asma. O primeiro uso de corticosteroide para tratar a exacerbação aguda da asma foi em 1956 (HUANG et al., 2023). A descoberta dos efeitos anti-inflamatórios dessas moléculas foi um marco importante, e foi seguido por significativos avanços na modificação química das moléculas, resultando em uma ampla variedade de formulações disponíveis (ALANGARI, 2014). A figura abaixo ilustra alguns exemplos de corticoides.

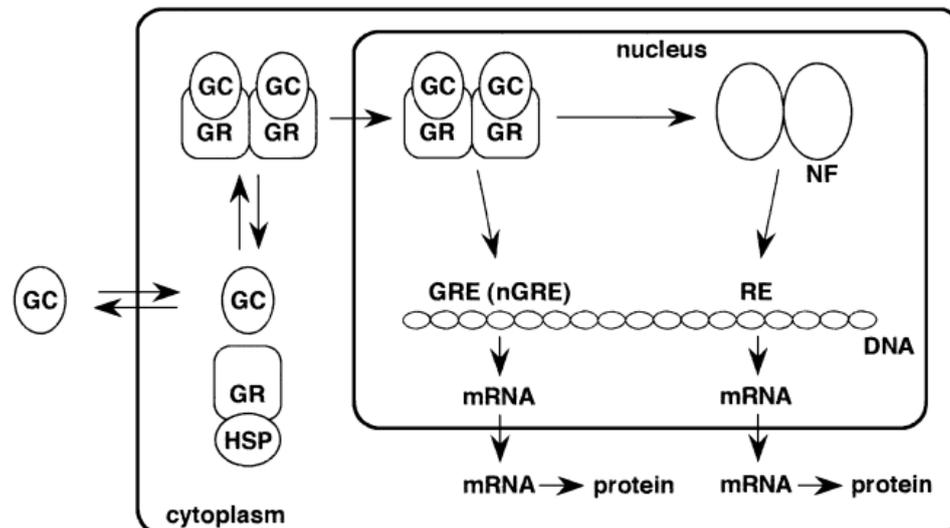
Figura 9 – Exemplos de corticoides e suas respectivas estruturas moleculares



Nota-se que a estrutura-base é constante nos diferentes tipos de corticoides, mas as modificações em regiões específicas causam alterações significativas na função, estabilidade e na degradação bioquímica dessas moléculas. A budesonida, por exemplo, é facilmente degradada após absorção venosa, enquanto a dexametasona é mais estável em níveis sistêmicos. FONTE: Adaptado de INAGAKI; NAGAI, 2001.

Mecanicamente, os corticosteroides agem suprimindo múltiplos genes inflamatórios a partir de sua ligação a receptores intracelulares específicos. O receptor de glicocorticoide (GR, do inglês *glucocorticoid receptor*) presente no citoplasma atua com um fator de transcrição. Assim, uma vez que essas moléculas se ligam a esses receptores, o complexo GR-corticoide sofre translocação do citoplasma para o núcleo e regula a expressão gênica de duas maneiras: (1) Medeia a transcrição gênica diretamente, por meio da ligação em suas regiões promotoras no DNA; (2) Inibe a transcrição de determinados genes, mediante interação com outros fatores de transcrição, tal como NF-κB. Nesse sentido, esse evento acarreta tanto a transcrição de genes anti-inflamatórios, quanto a supressão de genes pró-inflamatórios (INAGAKI; NAGAI, 2001).

Figura 10 – Mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios dos corticoides.



Os corticoides se ligam aos receptores GR, que por sua vez, transloca para o núcleo para mediar positivamente a expressão de genes anti-inflamatórios e inibir a expressão de genes pró-inflamatórios. FONTE: Adaptado de INAGAKI; NAGAI, 2001.

Com o resultado da ação dos GC, observa-se uma redução no recrutamento e ativação de células efetoras no sítio inflamatório, incluindo linfócitos T, eosinófilos, mastócitos, basófilos, células epiteliais alveolares, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Essa redução nos parâmetros celulares e moleculares da resposta inflamatória contribuem significativamente para a diminuição do quadro asmático (BARNES, 2006).

No entanto, apesar da importância e eficácia desses fármacos, o seu uso prolongado está associado com diversos efeitos colaterais, incluindo o surgimento de osteoporose, diabetes, obesidade, glaucoma, catarata, retardo de crescimento e hipertensão (HUANG et al., 2023; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2016). Além disso, pacientes submetidos ao uso de altas doses desses medicamentos podem desenvolver transtornos psiquiátricos, incluindo depressão, psicose, irritabilidade e ansiedade (PRETORIUS, 2004; THIBAUT, 2019). Outrossim, o uso desses fármacos pode causar sérios danos nos órgãos linfoides primários e secundários, em especial no timo. Um conjunto de evidências vem indicando que o tratamento com dexametasona, por exemplo, pode reduzir o peso e a celularidade do timo de camundongos e de bezerros (CANNIZZO et al., 2010; FUKUYAMA et al., 2011).

Além desses efeitos adversos associados aos corticoides, os pacientes em terapia prolongada podem desenvolver resistência tecidual específica a esses fármacos (YAGHOUBI et al., 2019). Estudos indicam que os efeitos das terapias disponíveis não são eficientes para 5 a 10% dos pacientes com asma grave, ou seja, uma grande quantidade de pessoas no mundo, cerca de 15 a 30 milhões, não são responsivos aos tratamentos com os estróides disponíveis, o que acarreta má qualidade de vida, além do aumento da morbidade e mortalidade desses pacientes (HENDERSON et al., 2020; YANG et al., 2022).

Em conjunto, esses fatos indicam a necessidade de buscar alternativas para ampliar as opções de fármacos disponíveis para o controle da asma.

2.2.1 Estudos clínicos no contexto da asma alérgica

Diversos estudos clínicos têm sido conduzidos com o objetivo de explorar terapias mais eficazes e seguras que possam complementar ou até mesmo servir com alternativas para o tratamento da asma (BEZERRA; PINHEIRO; BARRETO, 2022; BLEECKER et al., 2016). Especialmente, alguns desses estudos têm se concentrado em explorar o potencial dos produtos naturais para o manejo dessa condição respiratória.

Nesse cenário, em um trabalho realizado por Manarin e colaboradores (2019), foi evidenciado que o tratamento com raízes em pó de *Curcuma longa* L foi capaz de melhorar o quadro asmático em crianças e adolescentes com asma moderada e grave. Os resultados do estudo clínico indicaram que o uso desse produto natural está

associado a um melhor controle da doença após 3 e 6 meses, reduzindo a frequência de despertares noturnos dos pacientes e diminuindo a necessidade de uso de broncodilatadores (MANARIN et al., 2019).

Adicionalmente, em um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, Koshak e colaboradores (2017) demonstraram que a suplementação com o óleo de *Nigella sativa* L. – produto natural utilizado como suplemento alimentar ou fitoterápico para uma variedade de doenças inflamatórias – promoveu uma melhora significativa no controle da asma em pacientes adultos (homens e mulheres, 18 – 65 anos). Foi evidenciado uma normalização da eosinofilia sanguínea, acompanhada de uma melhora na função pulmonar dos participantes após o uso desse produto natural (KOSHAK et al., 2017). Outrossim, em outro estudo clínico, o monoterpeneo 1.8-cineol (eucaliptol), constituinte majoritário do óleo de eucalipto, foi caracterizado por possuir efeitos anti-inflamatórios em pacientes asmáticos (JUERGENS et al., 2003).

Em conjunto, esses estudos clínicos refletem o interesse de diversos grupos de pesquisas em diferentes partes do mundo em explorar alternativas promissoras para o tratamento da asma, e nesse cenário, os produtos naturais têm se mostrado como uma opção importante na busca por novos candidatos a fármacos.

2.3 Produtos naturais

Os produtos naturais têm sido amplamente utilizados no tratamento de várias doenças e condições médicas desde tempos imemoriais. Essas substâncias, obtidas a partir de fontes naturais como plantas, animais e micro-organismos, são caracterizadas como uma importante ferramenta científica para a descoberta de novos compostos bioativos (CALIXTO, 2019).

Atualmente, há uma estimativa que, em países industrializados, aproximadamente 60% dos fármacos disponíveis são de origem natural ou deles derivados (MATHUR; HOSKINS, 2017). Para se ter uma ideia, o estudo de Newman e Cragg (2019) demonstrou a quantidade de produtos naturais incluídos formalmente como medicamentos aprovados pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) entre 1981 e 2019. Eles demonstraram que, no período avaliado, o FDA aprovou 1.881 medicamentos. Desse total, 71 (3,8%) eram produtos naturais inalterados, 356 (18,9%) eram derivados de produtos naturais, 346 (18,4%) eram macromoléculas biológicas (usualmente proteínas, peptídeos), e 447 (22,5%) eram drogas sintéticas,

mas com estruturas que mimetizam moléculas de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2020). Isso indica a importância dos produtos naturais no desenvolvimento e na expansão de fármacos disponíveis.

Como exemplos de medicamentos provenientes de produtos naturais que são globalmente comercializados podemos destacar: sinvastatina e atorvastatina (agentes anticolesterolêmicos), captopril e enalapril (agentes anti-hipertensivos), ciclosporina A e rapamicina (agentes imunossupressores), taxol e docetaxel (agentes antitumorais), penicilina, eritromicina, amoxicilina e estreptomicina (agentes antibióticos e antifúngicos) (BUTLER, 2004; CALIXTO, 2019; MATHUR; HOSKINS, 2017).

Os produtos naturais são dotados de características específicas que conferem vantagens importantes no processo de descoberta de fármacos. Em geral, essas substâncias apresentam massa molecular elevada, maior número de oxigênio em sua estrutura e maior quantidade de doadores e receptores de ligações de hidrogênio em comparação com as moléculas sintéticas (ATANASOV et al., 2021). Um outro aspecto importante relacionado aos produtos naturais é a sua diversidade química, o que proporciona uma ampla gama de possibilidades terapêuticas (MATHUR; HOSKINS, 2017). Em conjunto, essas propriedades permitem que essas moléculas atuem em diversos alvos no organismo, modulando processos metabólicos, eventos celulares e vias de sinalização celular.

Os produtos naturais podem ser agrupados em diversas classes, de acordo com as características das suas estruturas moleculares e vias metabólicas envolvidas em sua síntese. Dentre os grupos com ampla ação farmacológica pode ser destacado os terpenos, pois compõem a maior família de metabólitos secundários nas plantas (HUANG et al., 2022).

2.3.1 Terpenos e triterpenos: Estrutura e Funções

Os terpenos englobam mais de 40.000 moléculas quimicamente caracterizadas (HUANG et al., 2022). Essas moléculas são constituintes essenciais de todas as células vivas ou organismos multicelulares, incluindo bactérias, *archaea*, protistas e eucariotos. Em plantas, os terpenos atuam majoritariamente como metabólitos secundários e desempenham funções importantes na defesa contra predadores, na atração de polinizadores e na proteção contra patógenos. Estudos vêm evidenciando que essa classe de moléculas possui uma vasta gama de propriedades

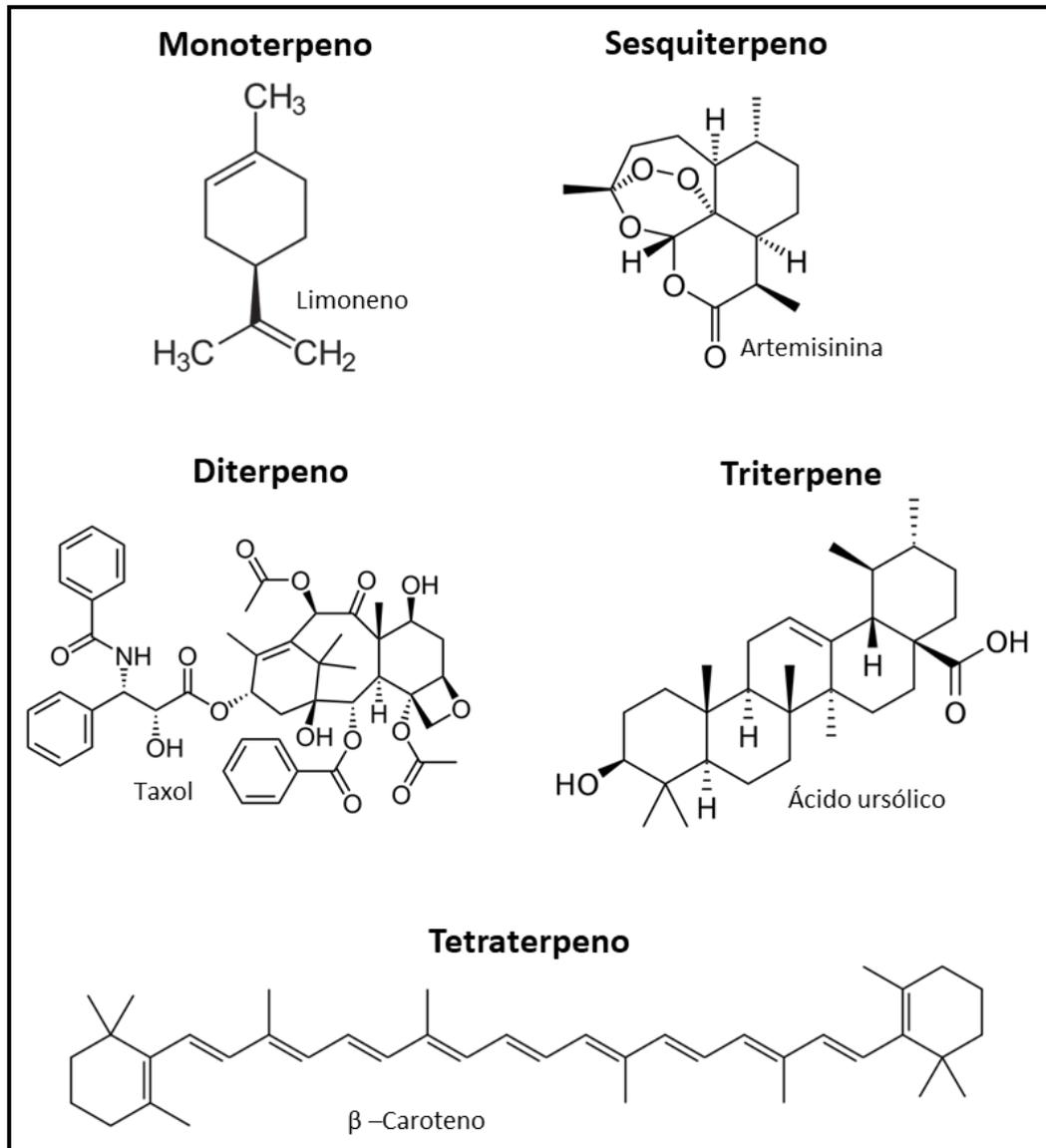
farmacológicas relevantes, representando uma fonte rica de compostos com potencial terapêutico e farmacológico (TETALI, 2019).

Em termos de estrutura química, os terpenos são moléculas compostas por unidades monoméricas de isopreno (C_5H_8), que podem se unir em diferentes arranjos para formar moléculas de várias classes e tamanhos. Os terpenos podem apresentar cadeias cíclicas ou acíclicas, sendo classificados com base na quantidade de unidades de isopreno presentes em sua estrutura, de forma s serem chamados de mono-, sesqui-, di-, tri-, e tetraterpenos (TETALI, 2019).

Os monoterpênos ($C_{10}H_{16}$) são compostos por duas unidades de isopreno e podem apresentar cadeias acíclicas, monocíclicas ou bicíclicas em sua estrutura química. Já os sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) são compostos por três unidades de isopreno e frequentemente são estruturados em anéis mono e policíclicos. Os diterpenos ($C_{20}H_{36}$), por sua vez, são formados por quatro unidades de isopreno e possuem uma variedade de arranjos estruturais. Adicionalmente, os triterpenos ($C_{30}H_{48}$), que consistem em seis unidades de isopreno, exibem uma ampla diversidade de estruturas com mais de 40 esqueletos de carbono distintos, enquanto os tetraterpenos ($C_{40}H_{64}$), compostos por oito unidades de isopreno, possuem uma estrutura maior e são conhecidos como carotenos. Por fim, há alguns terpenos com mais que oito unidades isoprênicas, e nesses casos, as moléculas são classificadas como politerpenos (DEL PRADO-AUDELO et al., 2021; HILLIER; LATHE, 2019).

O termo terpenoide refere-se aos derivados oxigenados dos terpenos (JOVANOVIC et al., 2010; MASYITA et al., 2022). No presente estudo, foi utilizada a friedelina que é denominada como um terpenoide por conter em sua estrutura um átomo de oxigênio (figura 12). A figura 11 mostra exemplos de terpenos das diversas classes existentes.

Figura 11 – Classes dos terpenos e seus respectivos exemplos



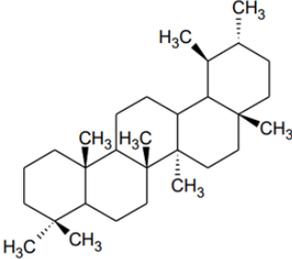
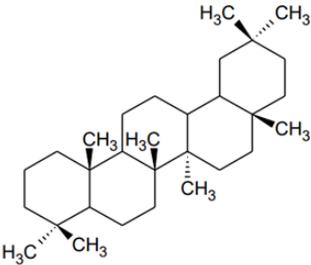
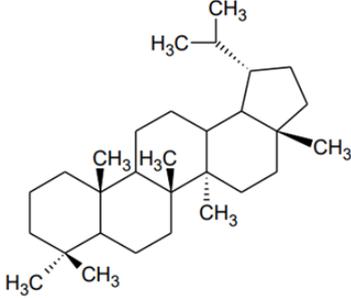
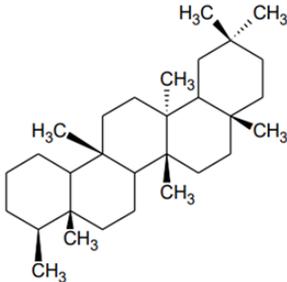
Os terpenos são moléculas compostas por unidades de isopreno (C_5H_8), que podem se unir em diferentes arranjos para formar terpenos de várias classes e tamanhos. FONTE: autoria própria, 2023

Devido à sua diversidade química, os terpenoides apresentam um amplo leque de atividades biológicas. Alguns terpenos possuem atividade antimicrobiana, antifúngica, antimalárica e anticancerígena, enquanto outros apresentam propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e analgésicas (HAN; CHEN; SUN, 2021; LU et al., 2018; SOMANTRI et al., 2021; WILLOUGHBY et al., 2009; ZHANG; LI; DU, 2022). Essas características fazem dos terpenoides candidatos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de distintas doenças.

De forma específica, os triterpenos são compostos por seis unidades de isopreno e possuem um total de 30 átomos de carbono. (KARTINI et al., 2021; LUO et al., 2022a; SOMANTRI et al., 2021; ZHAO et al., 2022). Os triterpenos podem ser divididos em dois grupos principais, a depender da estrutura e do número de anéis presentes em cada grupo: tetracíclicos e pentacíclicos. Os triterpenos tetracíclicos possuem quatro anéis de carbono em sua estrutura, conferindo-lhes uma configuração mais compacta. Já os triterpenos pentacíclicos apresentam cinco anéis de carbono, o que lhes confere uma estrutura mais complexa e diversificada em comparação com os tetracíclicos. Os triterpenos pentacíclicos são constituídos por um esqueleto principal que pode ser classificado como: ursano, oleanano, lupano ou friedelano (Tabela 1) (GHANTE; JAMKHANDE, 2019). Esses esqueletos carbônicos sofrem transformações químicas para gerar seus derivados por meio de enzimas específicas presente nos vegetais ou de forma artificial por métodos químicos.

Nesse cenário, a estrutura de ursano é utilizada como base para formação do ácido ursólico e α -amirina, enquanto a estrutura de oleanano, pode gerar ácido oleanólico e β -amirina. A estrutura-base lupano, por sua vez, pode gerar o terpeno ácido betulínico. Já a estrutura friedelano serve como base na formação da friedelina, molécula utilizada no presente trabalho.

Tabela 1 - Classe de esqueleto-bases de triterpenos pentacíclicos e sua estrutura

Esqueleto-base	Estrutura molecular	Exemplos
Ursano		Ácido ursólico α -Amirina
Oleanano		Ácido oleanólico Ácido Glicirretínico β -Amirina
Lupano		Ácido betulínico
Friedelano		Friedelina Celastrol

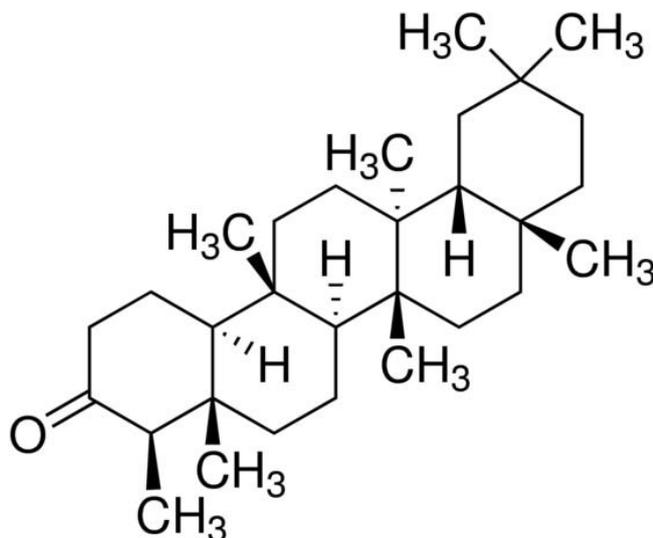
Os triterpenos pentacíclicos são derivados de um esqueleto principal, os quais servem como base para a formação de uma variedade de moléculas derivadas. Fonte: Adaptado de GHANTE; JAMKHANDE, 2019.

2.4 Friedelina

A friedelina é um triterpeno pentacíclico que pode ser encontrado em diversas fontes vegetais. Há registros na literatura que esse triterpeno foi encontrado em diferentes partes das plantas, como nas folhas de *Clusia nemorosa* e *Maytenus ilicifolia*, nas raízes de *Cannabis sativa* e nas flores de *Mammea siamensis* (HAN et al., 2019). Em especial, estudos fitoquímicos indicam que essa molécula é abundantemente encontrada na espécie *Maytenus ilicifolia* (NIERO; FALONI DE ANDRADE; FILHO, 2011), planta medicinal conhecida como espinheira santa, popularmente utilizada devido às suas propriedades anti-inflamatórias, especialmente no tratamento de distúrbios estomacais (ALVES et al., 2018).

A friedelina possui uma estrutura molecular característica dos terpenos, sendo constituído por seis unidades isoprênicas em cinco anéis carbônicos formados por ligações saturadas. Além disso, avaliando a estrutura química do composto, pode-se observar a presença de oito grupamentos CH₃ e um grupamento metil no esqueleto da molécula.

Figura 12– Estrutura molecular do triterpeno pentacíclico friedelina



Friedelina consiste em um metabólito secundário vegetal da classe dos terpenos. FONTE: Sigma Aldrich

Essa molécula é reconhecida por possuir diversas propriedades farmacológicas. Estudos indicam o potencial efeito antitumoral desse triterpeno, por causar citotoxicidade em células de câncer de mama (SUBASH-BABU, 2017).

Adicionalmente, há registros que essa molécula apresenta atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas (ANTONISAMY; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011), além de efeitos vasodilatadores e antioxidantes (SUNIL et al., 2013). O tratamento sistêmico com friedelina exerce um importante papel anti-inflamatório no modelo experimental de colite ulcerativa em camundongos, além dos efeitos hepatoprotetor e hipolipidêmico (SUNIL et al., 2013; DURAI PANDIYAN et al., 2016).

Outro aspecto importante sobre a friedelina refere-se a sua segurança devido a sua baixa toxicidade. Em linhagens celulares não tumorais, a friedelina não apresentou atividades citotóxicas em altas concentrações. Além disso, em um teste de toxicidade aguda em ratos, a friedelina revelou-se um agente seguro no contexto do tratamento oral em doses até 80 mg/kg (ANTONISAMY et al., 2015; JIANG et al., 2022).

Adicionalmente, estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa na UFAL mostraram que este triterpeno possui um potente efeito anti-inflamatório, por reduzir tanto o recrutamento celular quanto a produção de citocinas induzidas pelo estímulo com LPS e com alérgeno (FERRO et al., 2017). No entanto, apesar de todos esses efeitos farmacológicos reportados, estudos que visem caracterizar o efeito imunomodulador da friedelina em células imunes isoladas (timócitos e linfócitos) e a melhor caracterização dos seus efeitos anti-alérgicos ainda não foram realizados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

No presente estudo, objetivou-se avaliar os efeitos da friedelina sobre timócitos e linfócitos *in vitro* e *in vivo*, bem como caracterizar as suas ações anti-inflamatórias no modelo de asma alérgica experimental em camundongos.

3.2 Objetivo específicos

De forma específica, objetivou-se:

1. Avaliar, em timócitos e linfócitos, o efeito *in vitro* da friedelina sobre:
 - a. A viabilidade celular
 - b. A migração celular
 - c. A produção de interleucina 2 (IL-2)
2. Investigar, no timo de camundongo, o efeito do tratamento sistêmico com friedelina sobre:
 - a. O peso relativo do timo
 - b. A celularidade de timócitos e o padrão das diferentes subpopulações de timócitos.
 - c. A taxa de apoptose dos timócitos
3. Avaliar o efeito da friedelina no modelo de asma alérgica induzido por ovalbumina, caracterizando sua influência sobre:
 - a. A estrutura e a celularidade do timo
 - b. O recrutamento de leucócitos para as vias aéreas
 - c. A população de células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+) nas vias aéreas

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, as metodologias foram agrupadas em três (03) seções de forma a melhor apresentar os métodos utilizadas para cada grupo de objetivo específico. De forma simétrica, o capítulo de resultados também seguirá este racional em 3 capítulos.

Seção 1 – Efeito *in vitro* da friedelina sobre timócitos e linfócitos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 de ambos os sexos, com idades entre 4 e 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BioCen-UFAL). Os animais foram mantidos em regime temporal controlado (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à água e à ração durante todos os protocolos experimentais. Cabe ressaltar que antes de todos os experimentos, os animais passaram por um período de aclimação de 7 dias. Todos os experimentos aqui apresentados foram realizados em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFAL, com a devida aprovação sob o registro CEUA nº 17/2021.

4.2 Coleta de timócitos e linfócitos

Os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, mediante a administração de tiopental (150 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p). Após a eutanásia e a exposição da caixa torácica dos animais, o timo foi assepticamente coletado e macerado para a obtenção dos timócitos. As células foram, então, semeadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 µM de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina. Os linfócitos maduros foram recuperados dos linfonodos axilares e foram submetidos ao mesmo protocolo de obtenção acima descrito.

4.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT

O potencial da friedelina (Sigma-Aldrich, EUA) em afetar a viabilidade de timócitos *in vitro* foi avaliado mediante o ensaio de MTT. Este ensaio consiste em um

método colorimétrico que avalia, de forma indireta, a viabilidade celular por mensurar a atividade mitocondrial das células (MOSMAM, 1983). Nesse ensaio, timócitos (1×10^6 células/poço) foram semeados em microplacas de 96 poços na presença de diferentes concentrações de friedelina (0,1, 1, 10, 50 e 100 μM) por 1 ou 6 horas. Após a incubação com o tratamento, 22,5 μL /poço de MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] (5 mg/mL em PBS) foi adicionado em cada poço por 4 horas. Após a exposição das células ao MTT, foi adicionado 150 μL de dimetilsufóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi mensurada usando um espectrofotômetro de microplacas e a densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm. Os resultados foram representados pela porcentagem de célula viáveis, a qual foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{Densidade óptica das células tratadas}}{\text{Densidade óptica das células NÃO tratadas}} \times 100$$

4.4 Ensaio de migração celular

O efeito da friedelina sobre a migração de timócitos e linfócitos *in vitro* foi avaliado utilizando o sistema por *transwell*. Para esse propósito, foram utilizados insertos contendo membranas de policarbonato de 6,5 mm e poros com dimensões de 5 μm . Esses insertos foram cuidadosamente posicionados em placas de 24 poços, a fim de proporcionar um ambiente adequado para a análise da capacidade de migração celular. As membranas dos insertos foram previamente tratadas com PBS-BSA 1% por 1h antes de receberem as células.

Nesse protocolo experimental, timócitos e linfócitos foram submetidos a um pré-tratamento com diferentes concentrações de friedelina (0,1, 1 e 10 μM) por 30 minutos. Posteriormente, 500 μL de meio RPMI-1640 contendo ou não estímulo quimioatraente (CXCL12, 200 ng/mL) foram adicionados na câmara inferior do sistema. Em seguida, as células (1×10^6), na presença ou ausência do tratamento com friedelina, foram semeadas na câmara superior de *transwell*, e mantidas por 3 horas. Após o período de migração, os insertos foram cuidadosamente removidos dos poços e o meio contendo as células migrantes na câmara inferior foi coletado para a contagem celular mediante o uso da câmara de Neubauer. Após a contagem celular, as células migrantes foram imunomarcadas para as moléculas de membrana CD4/CD8 e

analisadas por meio de citometria de fluxo, com fim de identificar as diferentes subpopulações de timócitos e linfócitos migrantes.

4.5 Imunomarcção das células por citometria de fluxo

Com o objetivo de realizar a imunofenotipagem de timócitos e linfócitos, a imunomarcção dessas células foi realizada mediante o uso de anticorpos específicos. Para isso, foi utilizado o ensaio de citometria de fluxo, que envolve a marcação de proteínas celulares por anticorpos específicos conjugados a fluoróforos.

Resumidamente, as células coletadas para a imunomarcção foram centrifugadas e incubadas com diferentes anticorpos conjugados a fluoróforos para as moléculas de interesse. Após a incubação com estes anticorpos por 30 minutos, as células foram submetidas a lavagens sequenciais, e, então, fixadas com formaldeído a 2%. Posteriormente, as células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II e a aquisição dos dados foi realizado pelo software Diva. Os anticorpos utilizados nesse trabalho e suas especificações estão discriminados na tabela abaixo.

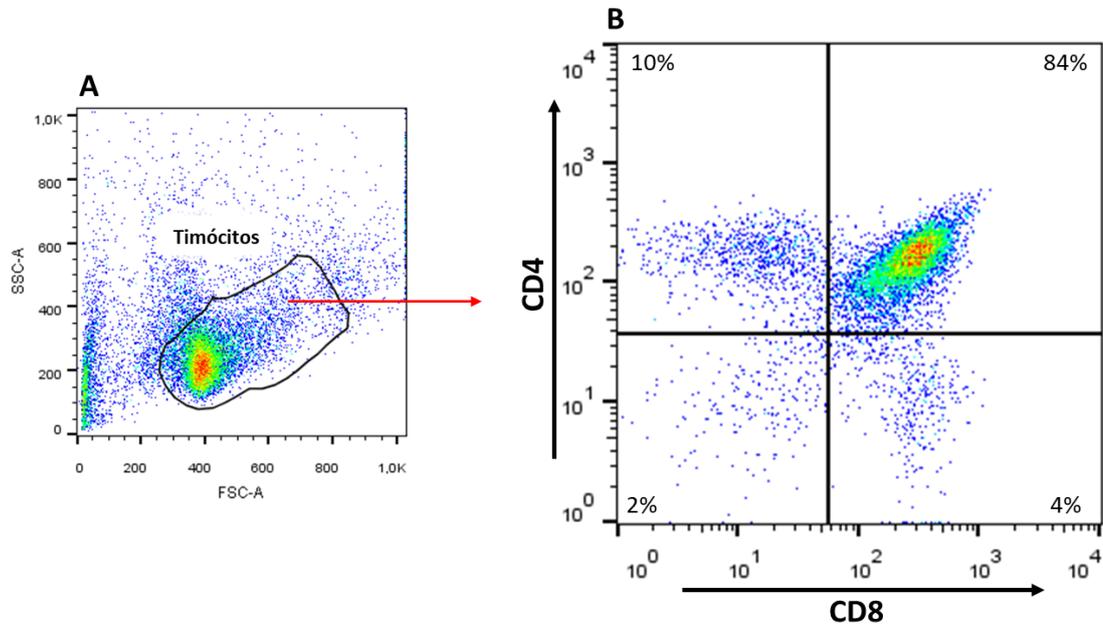
Tabela 2 – Anticorpos utilizados para citometria de fluxo

Anticorpo	Molécula-alvo	Fluorocromo
Anti-CD4	Co-receptor do TCR para ligação ao MHC de classe II	APC/FITC
Anti-CD8	Co-receptor do TCR para ligação ao MHC de classe I	PercP
Anti-CD25	Receptor da IL-2	PE
Anti-CD 184	Receptor CXCR4	PE
Anti-FOXP3	Fator de transcrição FOXP3	APC

Todos os anticorpos foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante

Para a análise das diferentes subpopulações de timócitos, utilizou-se a marcação para os receptores de membrana CD4 e CD8. A figura 13 ilustra a estratégias de *gate* utilizada para a avaliação dos timócitos.

Figura 13 – Estratégia de *gate* utilizada para determinar as diferentes subpopulações de timócitos.



(A) Os timócitos foram avaliados de acordo com parâmetros predeterminados de tamanho e granulosidade. (B) O quadrante superior direito representa os timócitos positivos para ambos os receptores (CD4⁺CD8⁺); O quadrante inferior esquerdo representa os timócitos negativos para ambos os receptores (CD4⁻CD8⁻); O quadrante superior esquerdo representa os timócitos positivos apenas para CD4 (CD4⁺); O quadrante inferior direito representa timócitos positivos apenas para CD8 (CD8⁺).

4.6 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

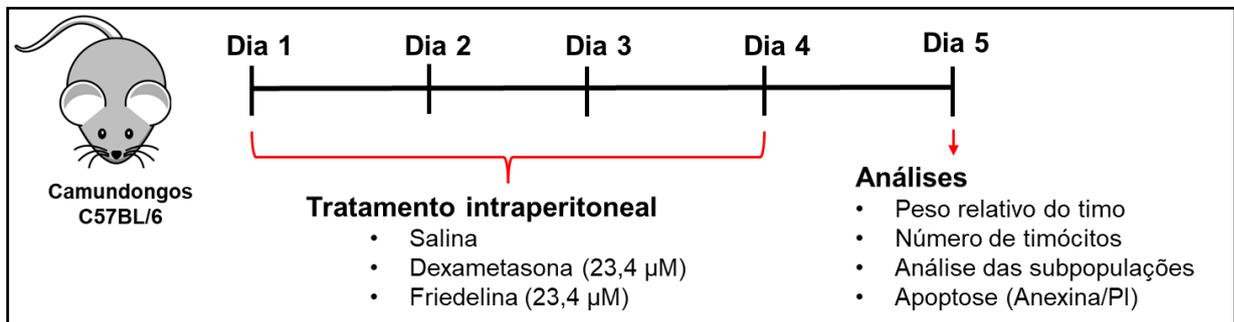
A fim de avaliar o efeito da friedelina sobre a produção de IL-2 por timócitos e linfócitos, foi utilizado o ensaio de ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Resumidamente, timócitos e linfócitos foram semeados em microplacas de 24 poços e submetidos a um pré-tratamento com friedelina (0,1, 1 e 10 μ M) por 30 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas novamente com friedelina na presença ou ausência do estímulo concanavalina A (ConA, 0,5 μ g/mL) por 6 horas. Após esse período de incubação, o sobrenadante da cultura celular foi coletado e analisado quanto ao conteúdo de IL-2 por meio do kit ELISA comercial, seguindo as instruções do fabricante. Os valores de absorbância das amostras foram medidos a 450 nm em um leitor de microplacas. A concentração de IL-2 nas amostras foi mensurada de acordo com a curva padrão, e os resultados obtidos foram apresentados em picogramas por mililitro (pg/mL).

Seção 2 – Efeito do tratamento sistêmico com friedelina sob o timo de camundongos

4.7 Protocolo de tratamento *in vivo*

Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento sistêmico com friedelina sobre a estrutura e celularidade do timo, camundongos da linhagem C57BL/6 foram submetidos a um tratamento com uma dose diária de friedelina (23,4 $\mu\text{mol/kg}$) por quatro dias consecutivos (figura 14).

Figura 14 – Esquema da abordagem *in vivo* utilizada para avaliar o efeito do tratamento sistêmico com friedelina sobre o timo de camundongos



Modelo utilizado para análise dos efeitos do tratamento sistêmico com friedelina sobre o timo de animais C57BL/5. Os animais ($n=7$) foram tratados por 4 dias consecutivos com salina, dexametasona (23,4 $\mu\text{mol/kg}$) ou friedelina (23,4 $\mu\text{mol/kg}$) por via intraperitoneal. 24h após o tratamento, os animais foram eutanasiados e um conjunto de análises foram realizadas incluindo: 1 – peso relativo do timo; 2 – Contagem de timócitos; 3 – Análise das subpopulações de timócitos; 4 – Ensaio de apoptose por anexina/PI.

Para estes experimentos, os animais foram divididos em 3 grupos distintos:

1. **Animais tratados com solução salina (NaCl, 0,9%):** Animais que receberam diariamente solução salina por via intraperitoneal por 4 dias consecutivos.
2. **Animais tratados com dexametasona:** Animais tratados diariamente com dexametasona (23,4 $\mu\text{mol/kg}$) por via intraperitoneal por 4 dias consecutivos
3. **Animais tratados com friedelina:** Animais tratados diariamente com friedelina (23,4 $\mu\text{mol/kg}$) por via intraperitoneal por 4 dias consecutivos

Torna-se importante ressaltar que, com o fim de comparar os efeitos da dexametasona e da friedelina sobre o timo dos animais, decidiu-se adotar o mesmo regime de tratamento e as mesmas concentrações molares dessas moléculas. Vinte

e quatro horas após o último tratamento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e uma série de análises foram realizadas.

4.8 Análise macroscópica do timo e avaliação do peso relativo

Após 24 h do último tratamento, os animais foram pesados com auxílio de uma balança, e, após a eutanásia, a caixa torácica foi aberta e o timo foi coletado e pesado para registrar o peso úmido. Os valores obtidos foram utilizados para calcular o peso relativo do timo, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Peso relativo do timo} = \frac{\text{Peso do timo (mg)}}{\text{Peso do animal (g)}}$$

Para a análise macroscópica do timo, foi realizada a aquisição de fotografias do órgão com câmera digital.

4.9 Contagem de timócitos totais e análise das subpopulações

Após coleta e pesagem, os timos foram acondicionados em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio RPMI-1640. Em seguida, os órgãos foram macerados com auxílio de um êmbolo de seringa estéril, e as células foram contadas, pelo método de exclusão com o corante azul de trypan com auxílio da câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram marcadas para CD4 e CD8 e analisadas por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.5.

4.10 Quantificação da apoptose por Anexina/PI

Com o propósito de avaliar se o tratamento sistêmico com friedelina seria capaz de induzir morte nos timócitos, buscamos identificar timócitos em apoptose através da marcação por Anexina V e iodeto de propídio. Resumidamente, as células (1×10^6) foram lavadas com PBS, centrifugadas e acondicionadas em tubos para posterior marcação. Em seguida, 1 μ L de FITC Anexina V e 1 μ L de solução de iodeto de propídio (PI) foram adicionados a cada amostra. Após 20 min de incubação em temperatura ambiente no escuro, as células foram analisadas por citometria de fluxo.

Seção 3 – Efeito farmacológico do tratamento com friedelina sobre a asma alérgica induzida por ovalbumina em camundongos

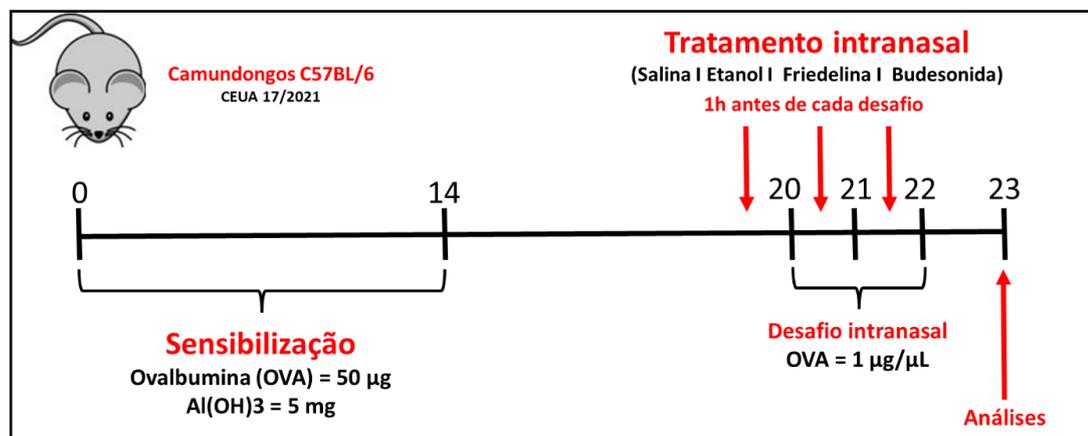
4.11 Modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina

Para avaliar o efeito da friedelina na inflamação alérgica foi utilizado o modelo de asma induzida por ovalbumina (OVA) (figura 15). Para tanto, camundongos foram sensibilizados com injeção subcutânea de 200 μ L de solução contendo ovalbumina (50 μ g) e hidróxido de alumínio (5 mg) nos dias 0 e 14. Em seguida, nos dias 20, 21 e 22, os animais foram anestesiados com isofluorano e submetidos ao desafio intranasal com 25 μ L de OVA na concentração de 1 μ g/ μ L. Uma hora antes de cada desafio, os animais foram tratados por via intranasal com salina, veículo, friedelina ou budesonida (fármaco referência). Os grupos experimentais (n=10) estão detalhados a seguir:

1. **Grupo salina:** Animais desafiados com salina e tratados com salina.
2. **Grupo OVA:** Animais desafiados com OVA e tratados com salina.
3. **Grupo veículo:** Animais desafiados com OVA e tratados com veículo (etanol 1%).
4. **Grupo Bud:** Animais desafiados com OVA e tratados com budesonida (7,5 mg/kg).
5. **Grupo FD0,1:** Animais desafiados com o OVA e tratados com friedelina (0,1 mg/kg).
6. **Grupo FD10:** Animais desafiados com o OVA e tratados com friedelina (10 mg/kg).

Após 24h do último tratamento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, e uma série de experimentos foram realizados.

Figura 15 – Modelo de asma alérgica experimental induzido por ovalbumina



Protocolo experimental utilizado para avaliar os efeitos da friedelina. Nos dias 0 e 14, os animais foram sensibilizados com ovalbumina. Já nos dias 20, 21 e 22 os animais foram estimulados por via i.n. com OVA. 1h antes de cada desafio, os animais foram tratados com salina, etanol, friedelina ou budesonida. Após 24h do último desafio, os animais foram eutanasiados e as análises foram realizadas.

4.12 Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar foi realizado com o propósito de avaliar a quantidade de leucócitos recrutados para as vias aéreas de animais asmáticos após estímulo com OVA e tratamento com fiedelina. Após 24 h do último desafio, os animais foram eutanasiados e tiveram as suas traqueias expostas e, mediante o uso de uma cânula traqueal, as vias aéreas dos camundongos foram lavadas por três vezes consecutivas com 500 µl de PBS contendo 10 mM de EDTA. Posteriormente, o fluido contendo as células foi centrifugado (300 ×g a 4°C) por 10 minutos e o “pellet” obtido foi ressuscitado em 1 mL de PBS-EDTA 10 mM. Em seguida, um volume de 10 µL contendo células foram usadas para coloração com solução de Turkey (90µL) e contadas em câmara de Neubauer por microscopia de luz.

Adicionalmente, para a realização da contagem diferencial dos leucócitos, uma alíquota do lavado broncoalveolar foi utilizada para preparação de lâminas contendo citocentrifugados, as quais foram coradas com May-Grunwald-Giemsa, e contadas sob microscopia de luz no aumento de 100X. Com essa contagem, foi possível determinar a porcentagem de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares.

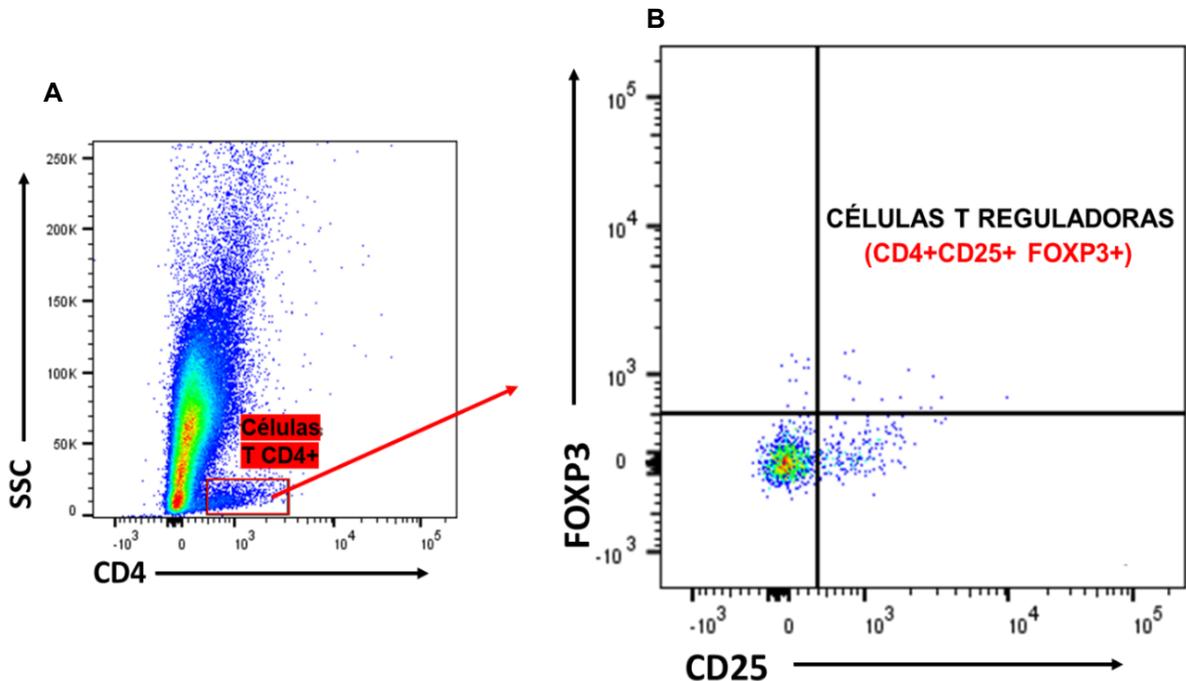
4.13 Marcação de células T reguladoras (Tregs)

Para a imunodeteção das Tregs, as células do lavado broncoalveolar foram marcadas para as proteínas de superfície CD4 e CD25, e para o fator de transcrição FOXP3. Resumidamente, o lavado broncoalveolar foi coletado e centrifugado (300 ×g a 4°C, por 10 minutos) para obtenção do “pellet” de células. Na primeira etapa foi realizada a marcação extracelular com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 por 20 minutos na presença de SBF a 4% em PBS. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas com solução “BD Cytotfix/Cytoperm” por mais 20 minutos. Em uma segunda etapa, foi realizada a marcação intracelular, na qual as células já marcadas (CD4 e CD25) foram incubadas por mais 30 minutos com o anticorpo anti-FOXP3 diluído em “Perm/Wash buffer”. Os isotipos controles IgGs conjugados aos seus respectivos fluorocromos foram utilizados como controles negativos.

Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e analisadas por meio do citômetro de fluxo FACSCanto II, sendo a aquisição dos dados realizada utilizando o software Diva. As análises das células CD4+ e CD4+CD25+FOXP3+ foram realizadas

pelo do software FlowJo versão 10.81 seguindo a estratégia de *gate* detalhado na figura a seguir.

Figura 16 – Estratégia de *gate* utilizada para a análise das células CD4+CD25+FOXP3+ por citometria de fluxo.



Gráficos de citometria de fluxo representando as proporções de células Treg (CD4+CD25+FOXP3+). **(A)** Gráfico *density plot* da citometria de fluxo das células do lavado broncoalveolar. As células totais foram separadas com base nos parâmetros SSC (granulosidade) em relação ao marcador CD4, permitindo a identificação e seleção de células CD4+ para a análise posterior. **(B)** Dentro do *gate* de células CD4+, as células foram avaliadas quanto aos marcadores FOXP3 e CD25. Células positivas para ambos os marcadores foram identificadas imunofenotipicamente como células Treg.

4.14 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), realizados em triplicata e analisados estatisticamente empregando-se o teste t ou a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Newman Keuls. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc, San Diego CA, EUA).

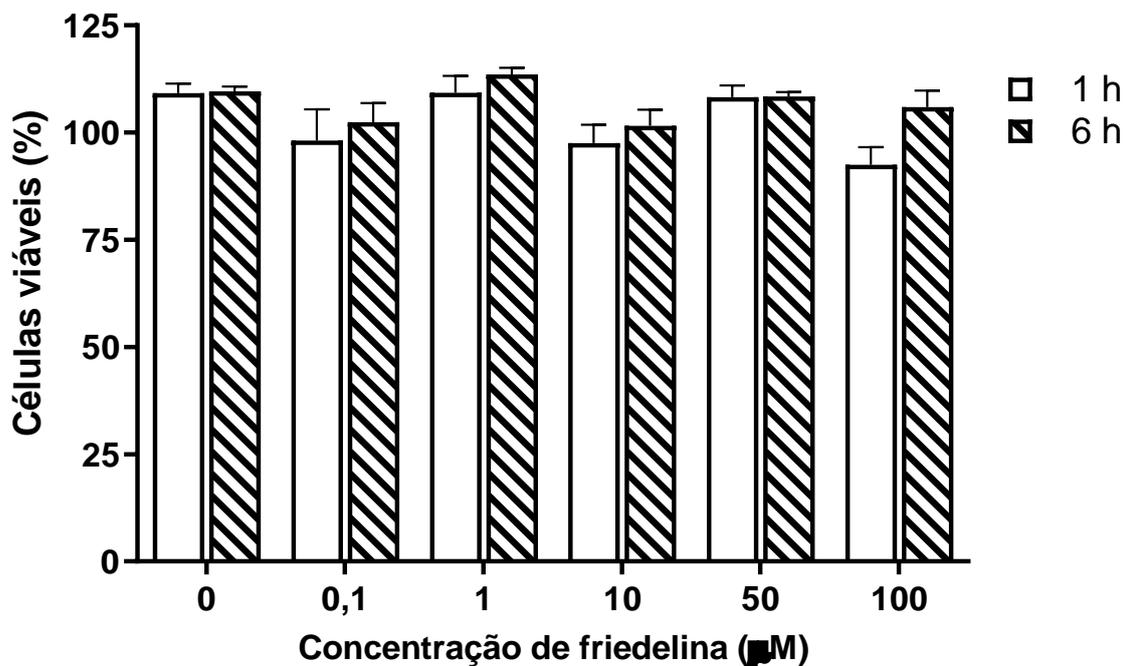
5 RESULTADOS

Seção 1 – Efeito *in vitro* da friedelina sobre timócitos e linfócitos

5.1 Efeito da friedelina sobre a viabilidade de timócitos *in vitro*

Inicialmente, decidiu-se avaliar o efeito da friedelina sobre a viabilidade dos timócitos totais pela técnica de MTT. Como evidenciado na figura 17, o tratamento com friedelina por 1 ou 6 horas, em todas as concentrações testadas (0,1, 1, 10, 50 e 100 μM), não foi capaz de alterar o perfil de viabilidade celular dos timócitos *in vitro*. Na medida em que o tratamento com friedelina não apresentou atividade citotóxica em timócitos, decidiu-se utilizar as concentrações de 0,1, 1 e 10 μM para realizar os próximos experimentos.

Figura 17 – Friedelina não apresenta citotoxicidade em timócitos *in vitro*

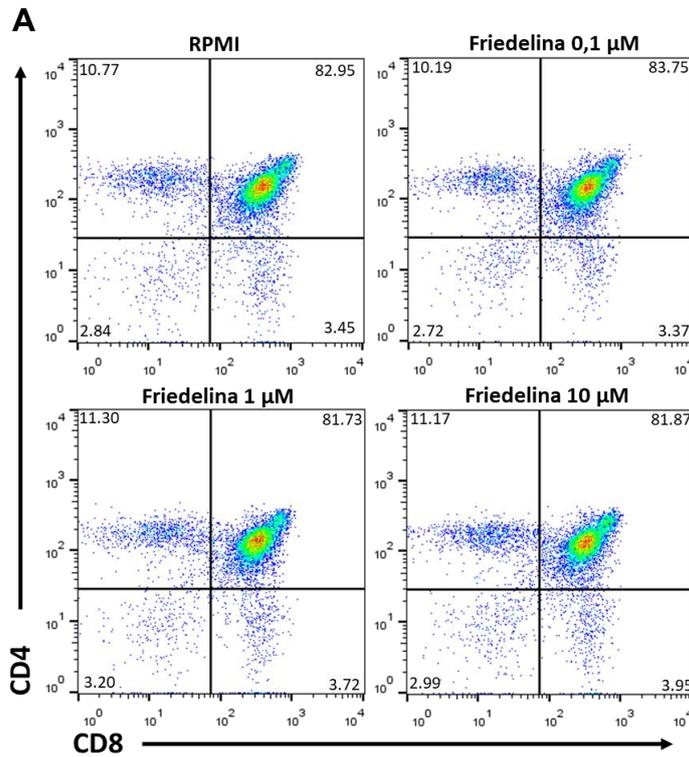


O ensaio de viabilidade celular foi realizado mediante a técnica de MTT. O gráfico representa a porcentagem de células viáveis nos diferentes grupos experimentais. As colunas e as barras verticais representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. As barras brancas e hachuradas representam o tratamento de 1h e 6h, respectivamente.

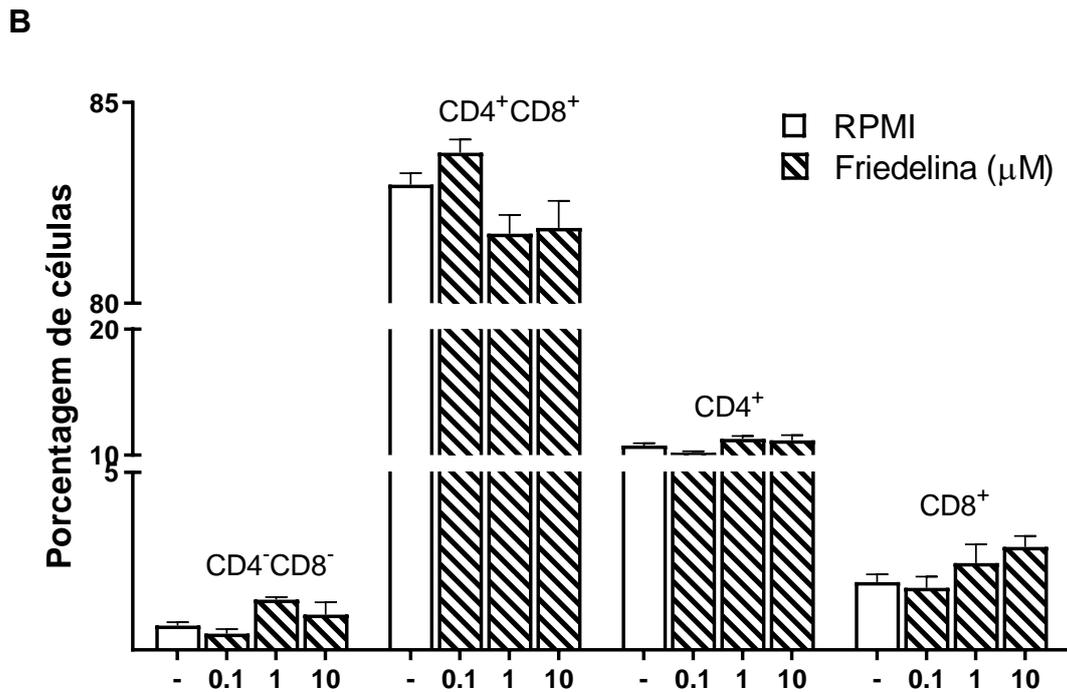
5.2 Efeito da friedelina sobre o perfil das subpopulações de timócitos

Como o tratamento com a friedelina não alterou a viabilidade dos timócitos totais, decidiu-se verificar se as subpopulações de timócitos seriam afetadas de forma específica após tratamento com a friedelina. Como mostrado na figura 18, as células do grupo controle apresentaram 2,9% de células duplo negativas, 83% de células duplo positivas (CD4+CD8+), 10,7% de células CD4+ e 3,5% de células CD8+. O tratamento por 6h com friedelina nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μ M não induziu qualquer alteração na porcentagem dos 4 distintos subtipos de timócitos.

Figura 18 – A friedelina não altera o perfil das subpopulações de timócitos



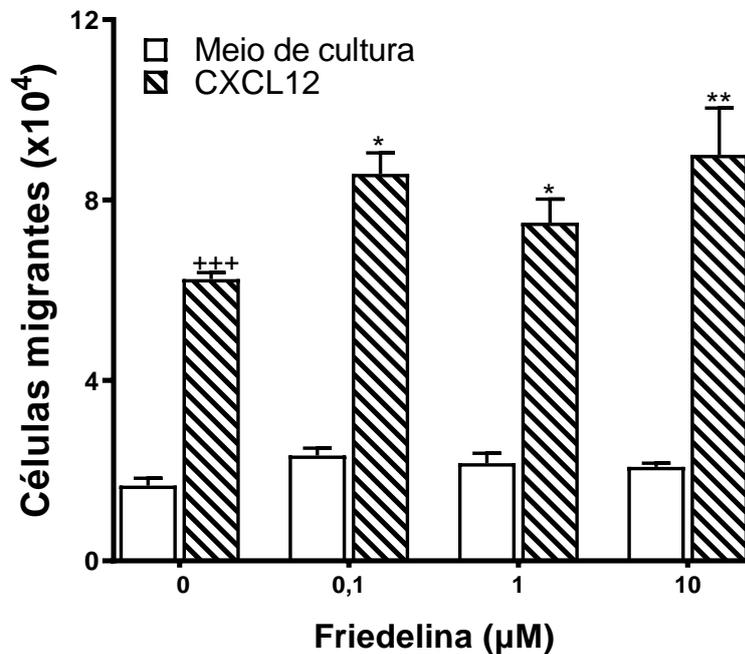
A imunofenotipagem dos timócitos foi realizada por citometria de fluxo. (A) Gráfico *dotplot* da citometria de fluxo de timócitos. As células foram separadas em relação aos marcadores CD4 e CD8, o que permitiu determinar a porcentagem das subpopulações: timócitos duplo negativos (CD4-CD8-), duplo positivos (CD4+CD8+), Simple positivos (CD4+ e CD8+). (B) O gráfico representa a porcentagem das diferentes subpopulações. As colunas e as barras verticais representam a média \pm SEM de três experimentos independentes



5.3 Efeito da friedelina sobre a migração de timócitos *in vitro*

Conforme demonstrado na figura 19, os timócitos expostos à quimiocina CXCL12 aumentaram a capacidade migratória em cerca de 3,75 vezes quando comparado às células estimuladas apenas com meio de cultura (RPMI-1640). O tratamento com friedelina (0,1, 1, 10 μM) não alterou a migração basal dos timócitos totais, sugerindo ausência de efeitos quimioestimulantes intrínsecos. De forma interessante, pôde-se observar que o tratamento com friedelina incrementou a capacidade migratória dos timócitos estimulados com CXCL12.

Figura 19 – Friedelina aumenta a migração de timócitos estimulados por CXCL12

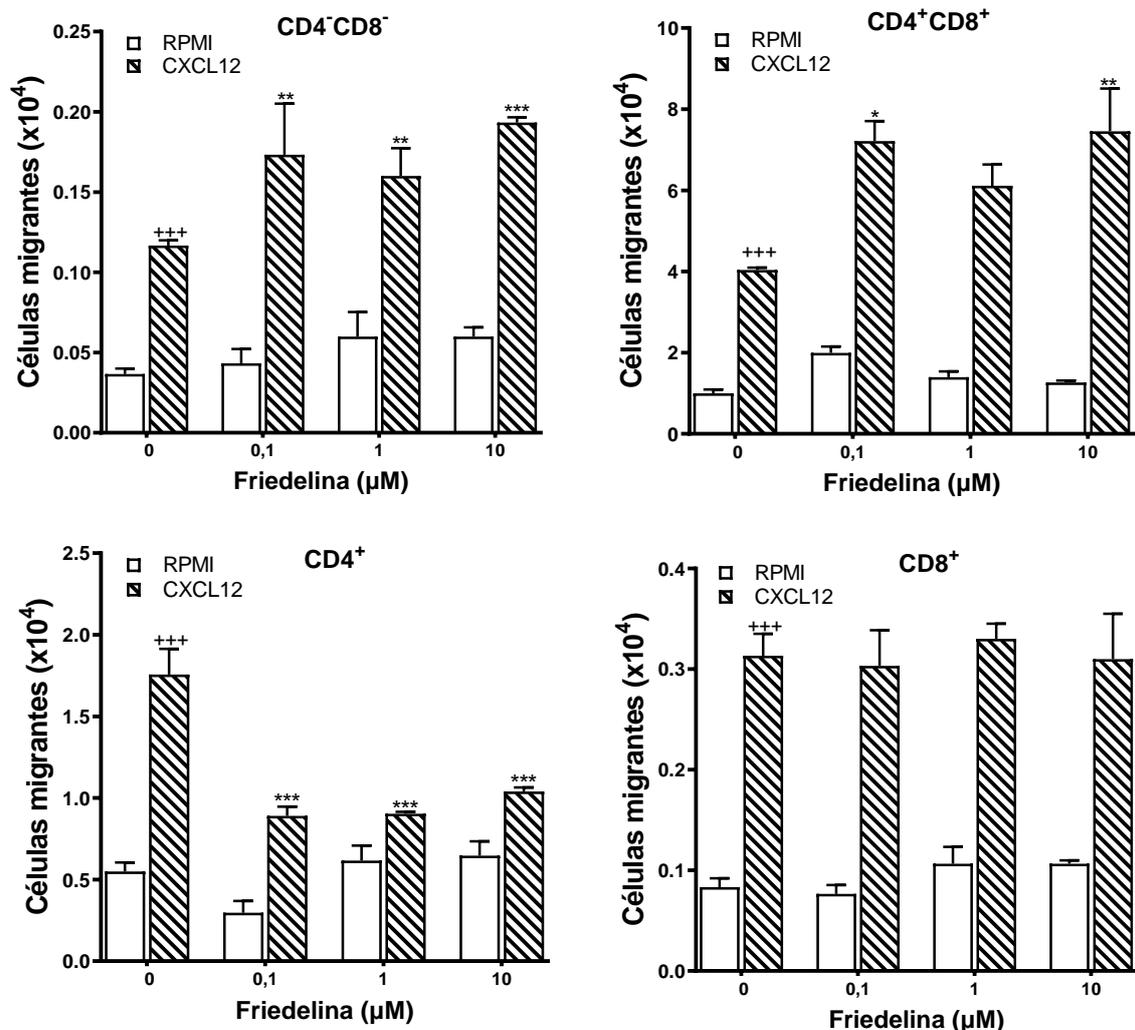


A migração celular foi avaliada utilizando o sistema de *transwell*. Timócitos foram pré-tratados com friedelina por 30 minutos. Na câmara inferior do sistema, foi adicionado 500 μL de meio RPMI contendo ou não CXCL12. Posteriormente, as células foram plaqueadas na câmara superior do *transwell*, na presença ou ausência do tratamento com friedelina, e permitidas a migrar por 3 h. O número de células migrantes foi obtido mediante a contagem celular por Neubauer. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ (CXCL12 vs. controle); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Friedelina vs. CXCL12).

Em seguida, para identificar como cada subpopulação de timócito respondeu ao estímulo quimiotático sob tratamento com friedelina, foi realizada a marcação para CD4 e CD8 para avaliação das células estimuladas a migrar por CXCL12. Como mostrado na figura 20, todas as subpopulações de timócitos migraram em resposta ao estímulo quimiotático (CXCL12). De maneira interessante, a friedelina incrementou

exclusivamente a migração de células imaturas, duplo negativas ($CD4^-CD8^-$) e duplo positivas ($CD4^+CD8^+$). No entanto, a friedelina não causou nenhuma alteração no padrão de migração em timócitos $CD8^+$, porém, a população de timócitos $CD4^+$ teve sua resposta migratória suprimida pelo tratamento com friedelina. Esses resultados indicam que o tratamento com friedelina é capaz de modular a migração dos timócitos de maneira diferencial, com efeito supressor da migração de forma seletiva sobre a subpopulação de timócitos $CD4^+$.

Figura 20 – Friedelina modula de maneira diferencial a migração das diferentes subpopulações de timócitos estimulados por CXCL12

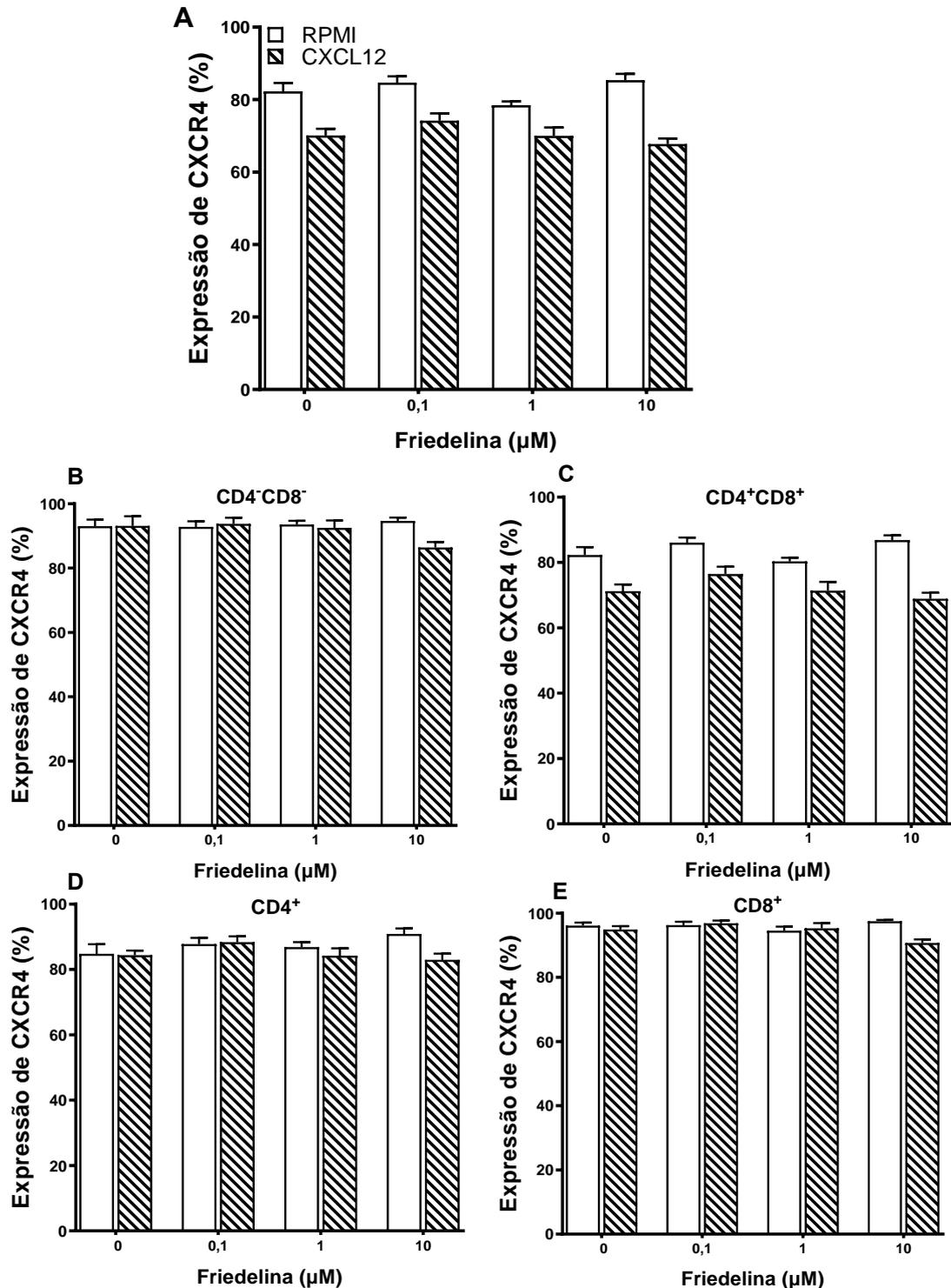


A migração celular foi avaliada utilizando o sistema de *transwell*. Os timócitos migrantes foram coletados, marcados para CD4 e CD8 e analisados por citometria de fluxo, a fim de determinar as diferentes subpopulações dessas células. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. +++p < 0,001 (CXCL12 vs. controle); *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Friedelina vs. CXCL12).

5.4 Efeito da friedelina sobre a expressão do receptor CXCR4 em timócitos

Para melhor caracterizar esse efeito modulador diferencial na migração de timócitos, foi realizada a marcação, por citometria de fluxo, para a molécula CXCR4, que é o receptor do estímulo quimioatraente CXCL12. Como mostrado na figura 21, o tratamento com friedelina, em todas as concentrações testadas, não foi capaz de alterar os níveis de expressão dessa proteína de membrana, quando comparado com o grupo controle.

Figura 21 – Friedelina não altera os níveis de expressão de CXCR4 em timócitos estimulados por CXCL12

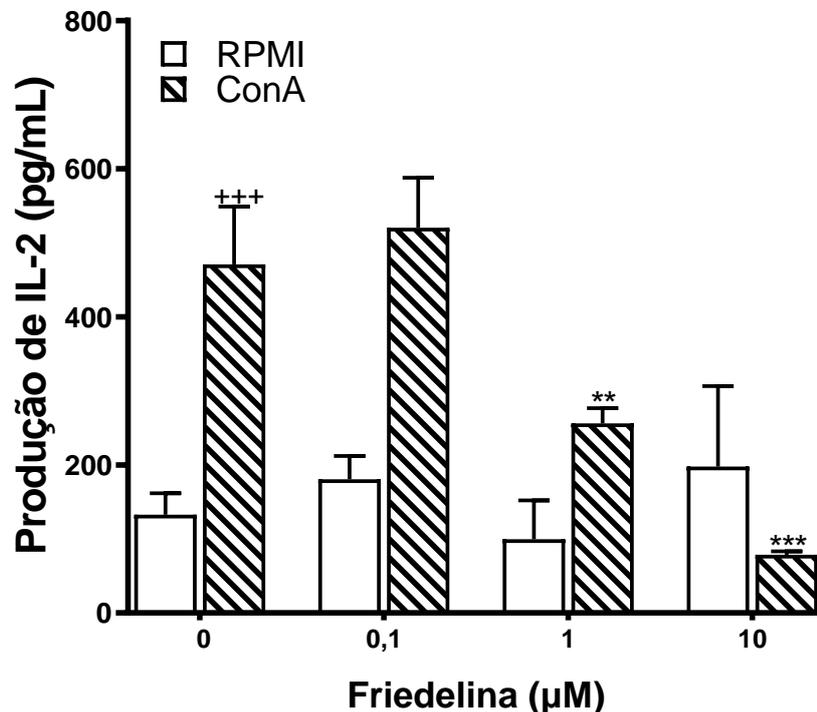


Os timócitos migrantes foram marcados para CD4, CD8 e CD184 e analisados por citometria de fluxo, a fim de determinar a expressão de CXCR4 nas diferentes subpopulações dessas células. **(A)** Marcação de CXCR4 em timócitos totais. **(B,C,D,E)** Marcação de CXCR4 nas diferentes subpopulações. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * $p < 0,001$ (CXCL12 vs. controle).

5.5 Efeito da friedelina sobre a produção de IL-2 em timócitos

Como observado na figura 22, o estímulo de ConA foi capaz de aumentar em 3,5× a produção da citocina IL-2 em linfócitos ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo controle. No entanto, de maneira interessante, foi avaliado que o tratamento com friedelina nas concentrações de 1 e 10 μM em células estimuladas por conA foi capaz de reduzir, de forma significativa e em níveis basais, a produção dessa citocina em comparação com as células estimuladas e tratadas apenas com RPMI. Cabe ressaltar que o tratamento com as diferentes concentrações de friedelina em timócitos não estimulados por conA, não alterou o padrão de produção de IL-2.

Figura 22 – Friedelina diminui a produção de IL-2 em timócitos estimulados por conA



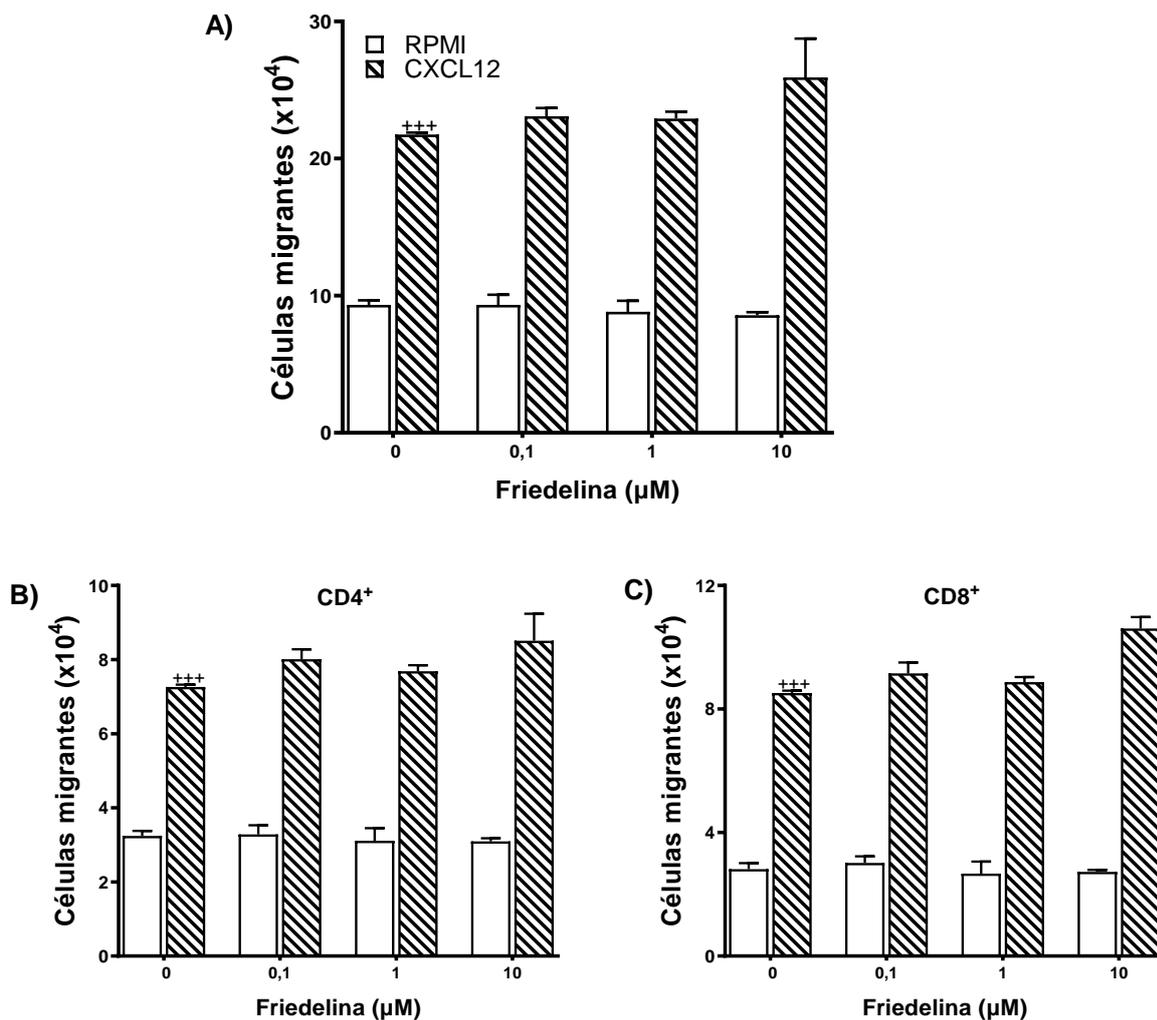
A produção de IL-2 foi mensurada pela técnica de ELISA. As colunas e as barras verticais representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ (ConA vs. controle); ^{*} $p < 0,05$, ^{**} $p < 0,01$, ^{***} $p < 0,01$ (Friedelina vs. ConA).

5.6 Efeito da friedelina sobre a migração de linfócitos

A fim de verificar se os efeitos da friedelina se estenderia para células T maduras, decidiu-se avaliar se a friedelina também afetaria a capacidade migratória de linfócitos coletados de linfonodos axilares. Como apresentado na figura 23, o

estímulo com CXCL12 aumentou a migração dos linfócitos totais quando comparado com o grupo controle, porém, o tratamento com friedelina não foi capaz de alterar, na presença ou ausência do estímulo, o padrão migratório dessas células (figura 23A). O mesmo cenário foi evidenciado quando os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ migrantes foram analisados (figura 23B, 23C).

Figura 23 – Friedelina não altera os a migração de linfócitos estimulados por CXCL12

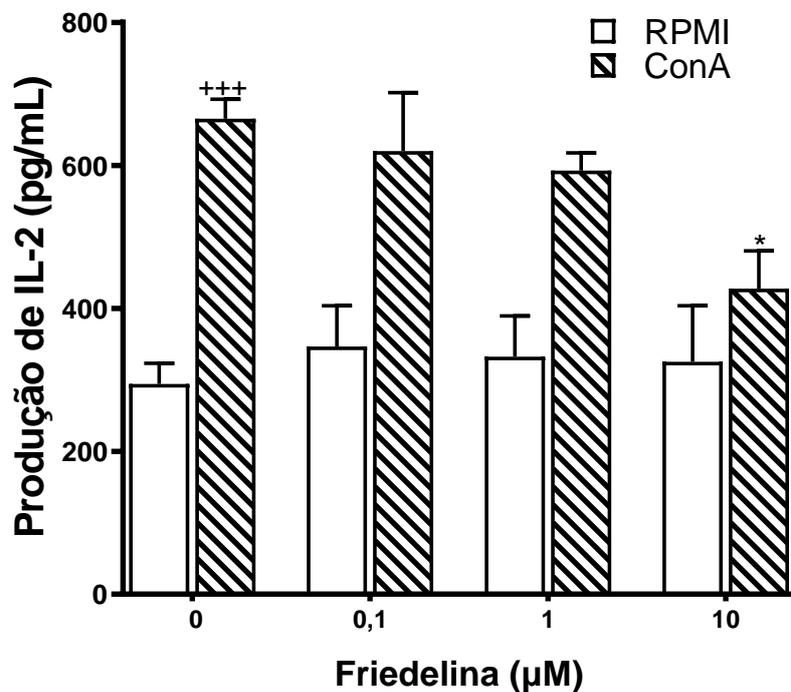


A migração celular foi avaliada utilizando o sistema de *transwell*. Linfócitos foram pré-tratados com friedelina por 30 min. Na câmara inferior do sistema, foi adicionado 500 μL de meio RPMI contendo ou não CXCL12. Posteriormente, as células foram plaqueadas na câmara superior do *transwell*, na presença ou ausência do tratamento com friedelina, e permitidas a migrar por 3 h. Os linfócitos migrantes foram coletados, marcados para CD4 e CD8 e analisados por citometria de fluxo. (A) Migração dos linfócitos totais. (B) Migração dos linfócitos T CD4⁺. (C) Migração dos linfócitos T CD8⁺ A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. ⁺⁺⁺p < 0,001 (CXCL12 vs. controle).

5.7 Efeito da friedelina sobre a produção de IL-2 por linfócitos

Em relação a produção de IL-2 em linfócitos, foi observado um padrão semelhante ao evidenciado em timócitos. Conforme mostrado na figura 24, o estímulo com conA, aumentou em 2,2× a produção de IL2 ($p < 0,001$), ao se comparar com o grupo controle. Por outro lado, em células estimuladas, o tratamento com friedelina, na concentração de 10 μM , foi capaz de reduzir a produção dessa citocina.

Figura 24 – O tratamento com friedelina reduz a produção de IL-2 em linfócitos estimulados por conA



A produção de IL-2 foi mensurada pela técnica de ELISA. As colunas e as barras verticais representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ (ConA vs. controle); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ (Friedelina vs. ConA)

Com base nesses resultados, foi evidenciado que a friedelina apresenta um efeito direto em timócitos e linfócitos, modulando a migração dos timócitos e reduzindo a produção de IL-2 em ambas as células.

Seção 2 – Efeito do tratamento sistêmico com o friedelina sob o timo de animais camundongos

5.8 Efeito do tratamento com friedelina sobre aspectos macroscópicos e peso relativo do timo de camundongos

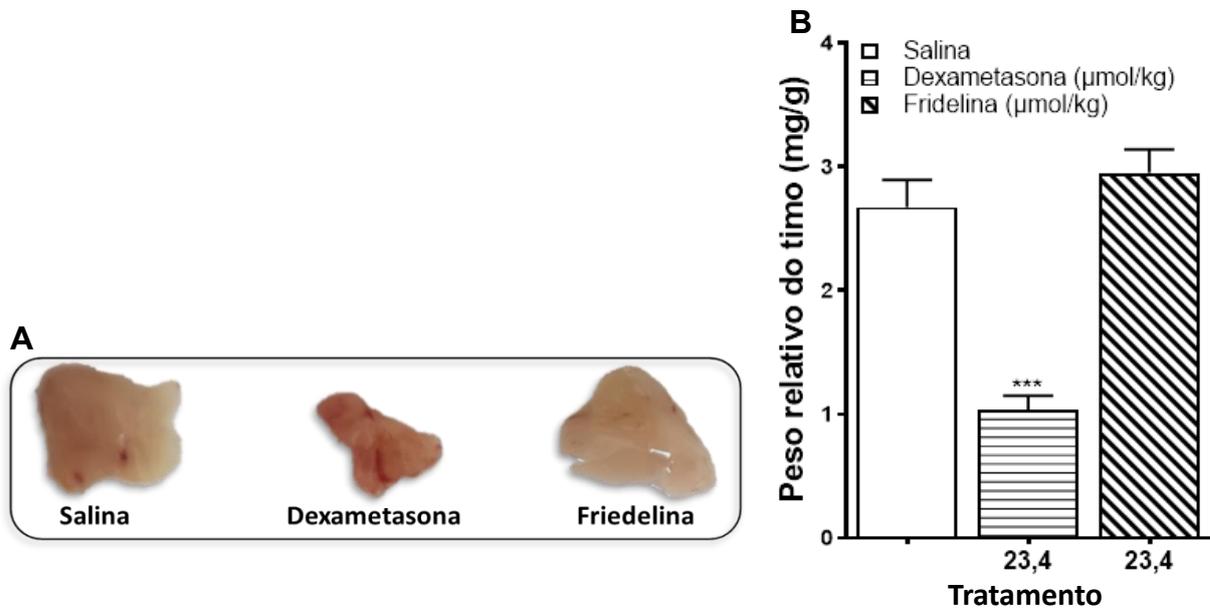
A figura 25A ilustra os aspectos macroscópicos do timo de animais submetidos ao tratamento sistêmico com salina, dexametasona ou friedelina. Como é possível observar, o timo de animais tratados com dexametasona apresenta uma evidente diminuição no tamanho, assim como uma significativa mudança em sua coloração. Por outro lado, foi evidenciado que o tratamento sistêmico com a friedelina não foi capaz de causar qualquer alteração morfológica do órgão, mantendo o aspecto de tamanho e coloração semelhante ao timo proveniente de animais do grupo controle tratados apenas com salina.

Esses dados foram corroborados com a análise do peso relativo do timo (figura 25B), em que se pôde evidenciar que o tratamento sistêmico com dexametasona resultou em uma redução de aproximadamente 250% no peso relativo do órgão ($p < 0,001$), quando comparado com o grupo controle. Todavia, de forma interessante, foi observado que o tratamento com friedelina não causou modificação no peso relativo do timo, ao se comparar com o grupo controle (figura 25B).

5.9 Efeito do tratamento com friedelina sobre o número de timócitos e suas subpopulações no timo de camundongos

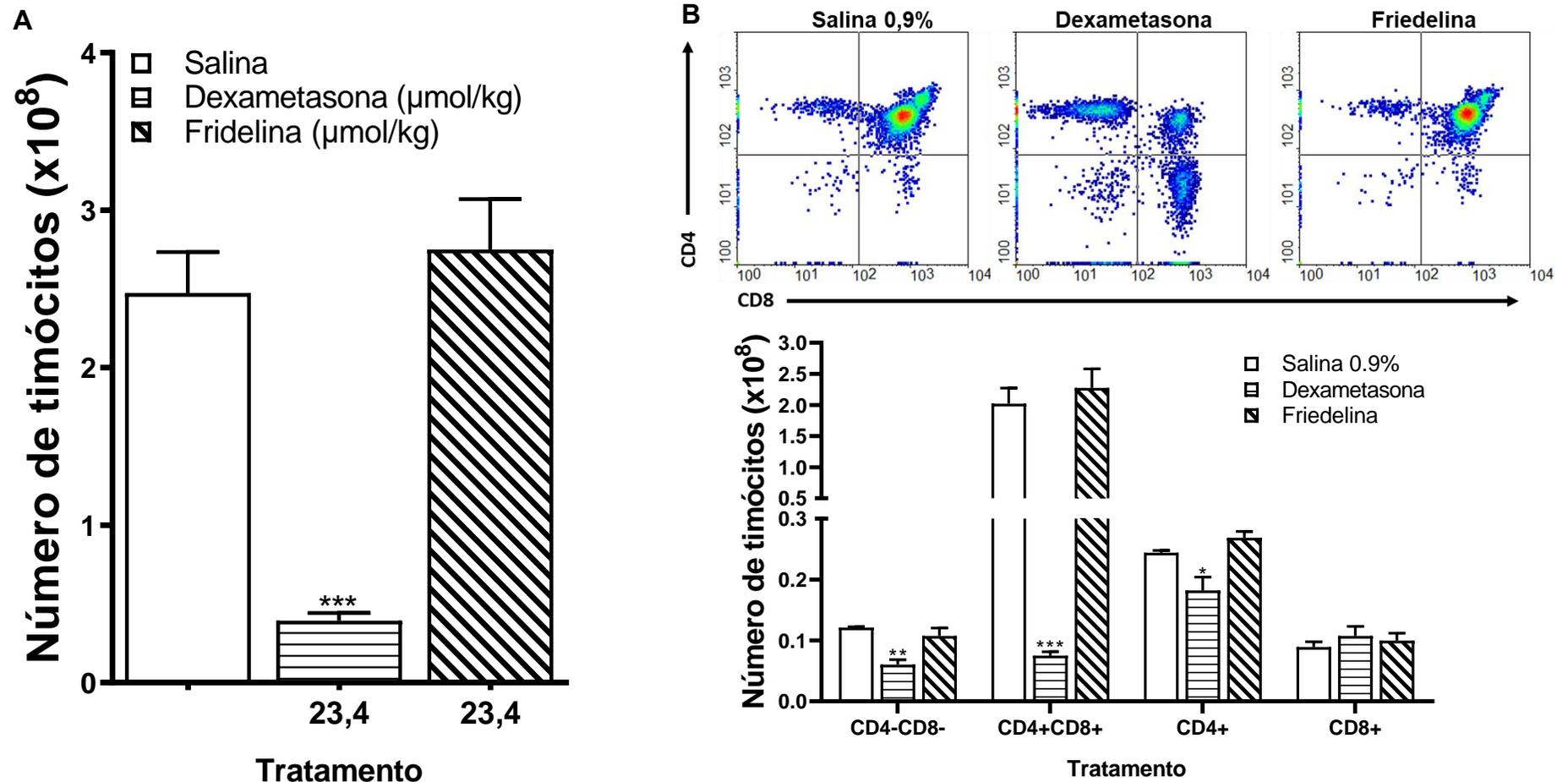
Como verificado na figura 26, o tratamento com dexametasona foi capaz de causar uma diminuição considerável no número de timócitos, ao se comparar com o grupo controle tratado apenas com salina. Além disso, é possível evidenciar na figura 26B, uma diminuição nas porcentagens das diferentes subpopulações de timócitos, em especial das células $CD4^-CD8^-$, $CD4^+CD8^+$ e $CD4^+$, quando comparado com o grupo controle. No entanto, foi observado que o tratamento sistêmico com a friedelina não foi capaz de alterar o número de timócitos nem tampouco modificar as porcentagens das diferentes subpopulações dessas células, quando comparado com o grupo controle.

Figura 25 – O tratamento sistêmico com friedelina não altera o padrão macroscópico e o peso relativo do timo de camundongos



Os animais foram submetidos ao tratamento intraperitoneal com salina, dexametasona ou friedelina por 4 dias consecutivos. 24 h após o último tratamento, os animais foram eutanasiados e as análises foram realizadas (A) O padrão macroscópico do timo foi avaliado mediante fotografias dos órgãos. (B) O peso relativo do timo foi obtido mediante a fórmula descrita na página 44. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ (Salina vs. Dexametasa).

Figura 26 – O tratamento sistêmico com friedelina não altera o número de timócitos totais e as diferentes subpopulações dessas células no timo de camundongos

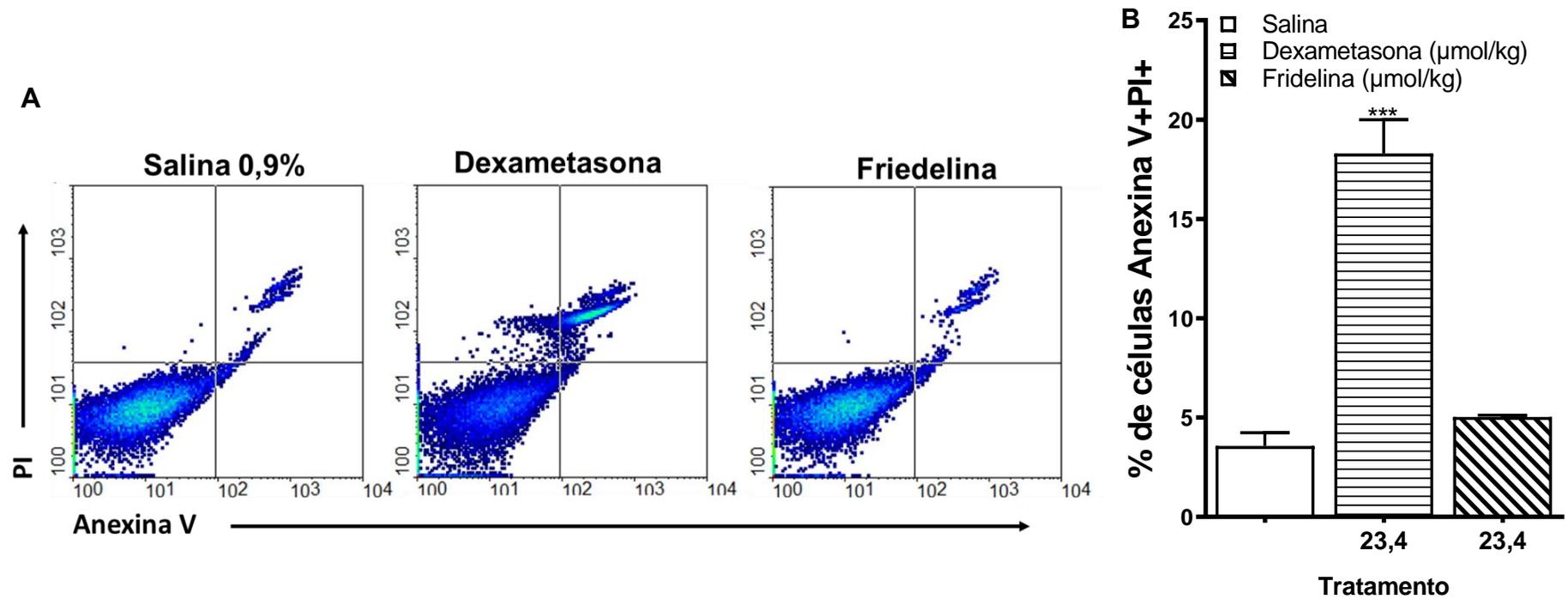


Os animais foram submetidos ao tratamento intraperitoneal com salina, dexametasona ou friedelina por 4 dias consecutivos. 24h após o último tratamento, os animais foram eutanasiados e as análises foram realizadas (A) Os timos foram macerados e os linfócitos contados por Neubauer. (B) O padrão das diferentes subpopulações de timócitos foi avaliado por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ (Salina vs. Dexametasona).

5.10 Efeito do tratamento sistêmico com friedelina sobre a morte de timócitos em camundongos

A morte celular por apoptose foi outro parâmetro avaliado nos timos de animais submetidos ao tratamento sistêmico com salina, dexametasona e friedelina. A figura 27 mostra os resultados obtidos pelo ensaio de morte celular por anexina/PI. Como pode-se observar, aproximadamente apenas 5% dos timócitos provenientes dos animais do grupo controle se apresentaram positivos para anexina/PI, ou seja, em apoptose. Por outro, o tratamento com dexametasona, foi capaz de elevar, de forma significativa, a porcentagem de células em apoptose para 19,5% ($p < 0,001$), o que indica um aumento em 400% no apoptose. De forma interessante, o tratamento com friedelina não alterou a porcentagem de células positivas para anexina/PI, mantendo o patamar de células apoptóticas semelhante àquele apresentado pelas células do grupo controle. Com base nesses resultados, pode-se concluir que a friedelina, diferentemente do corticoide dexametasona, não induz efeitos imunotóxicos sobre o timo e timócitos de animais.

Figura 27 – O tratamento sistêmico com friedelina não altera a porcentagem de timócitos em apoptose no timo de camundongos



Os animais foram submetidos ao tratamento intraperitoneal com salina, dexametasona ou friedelina por 4 dias consecutivos. 24h após o último tratamento, os animais foram eutanasiados e as análises foram realizadas. A apoptose foi mensurada mediante o ensaio de anexina V/PI por citometria de fluxo. (A) Gráfico *density plot* da citometria de fluxo em timócitos. As células foram separadas em relação aos marcadores PI e Anexina V, o que permitiu determinar a porcentagem de apoptose nas células. (B) O gráfico representa a porcentagem de apoptose em timócitos. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ (Salina vs. Dexametasona).

Seção 3 – Efeito do tratamento com friedelina sobre a asma alérgica induzida por ovalbumina em camundongos

5.11 Efeito da friedelina sobre o peso relativo e a celularidade do timo de animais asmáticos

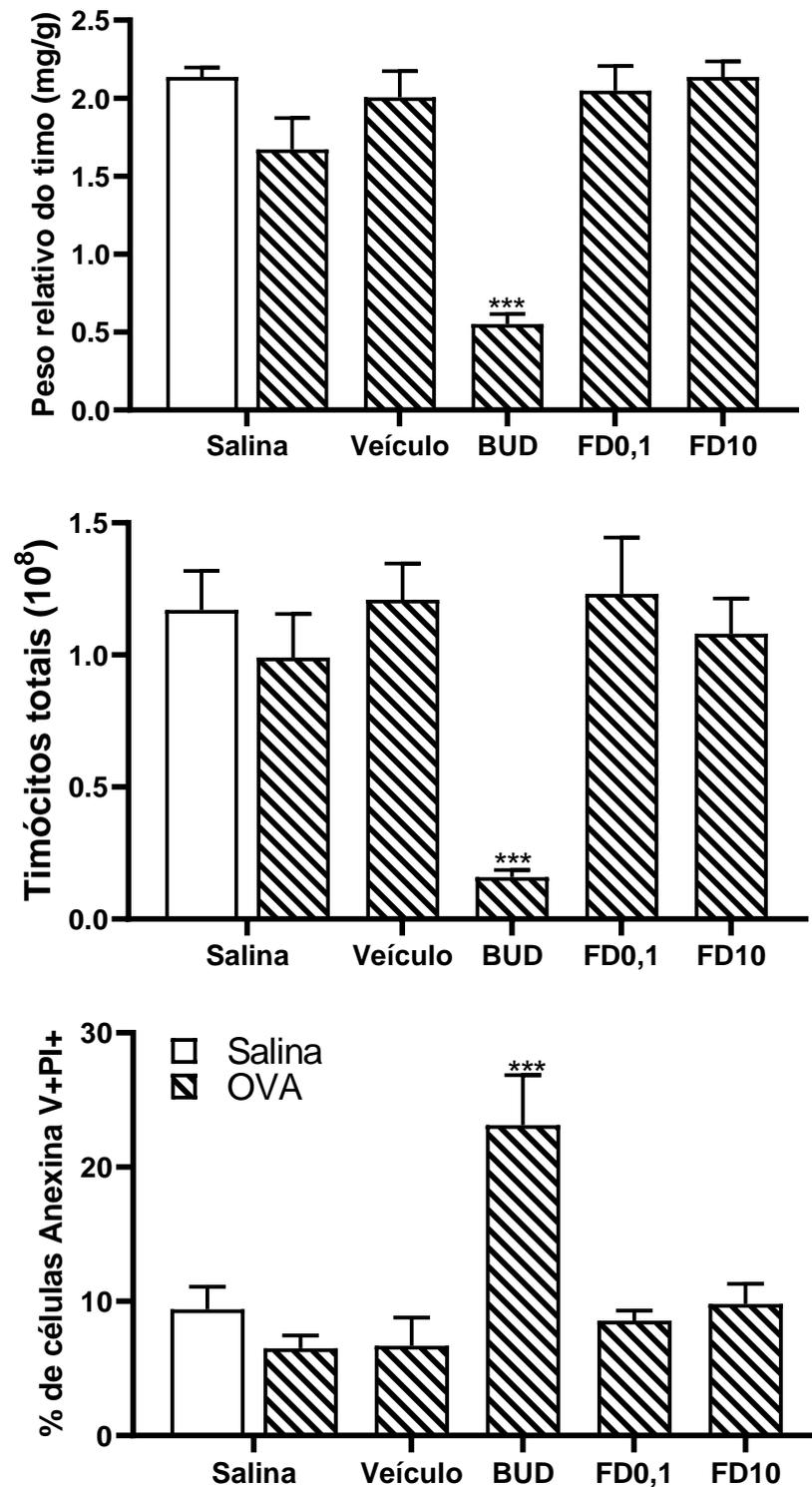
Com o objetivo de melhor caracterizar os efeitos da friedelina sobre o timo, decidiu-se por aprofundar a investigação utilizando um modelo de asma alérgica em camundongos. Essa abordagem é interessante pelo fato de que a maioria dos fármacos utilizados para o tratamento dessa condição, sabidamente induzir imunossupressão com implicações deletérias nos órgãos linfoides, em especial no timo.

Como evidenciado na figura 28, o tratamento com o budesonida, corticoide de referência no tratamento da asma, causou uma diminuição considerável no peso relativo e na celularidade do timo, quando comparado com os animais tratados apenas com salina, o que indica um claro efeito tóxico desse fármaco. Entretanto, de maneira diversa, foi observado que o tratamento nasal com friedelina, por sua vez, não acarretou nenhuma alteração no peso relativo e na celularidade desse órgão.

5.12 Efeito da friedelina sobre a porcentagem de células em apoptose no timo de animais asmáticos

Como mostrado na figura 28, o tratamento nasal com budesonida foi capaz aumentar significativamente a porcentagem de timócitos marcados por anexina V, quando comparado com animais tratados apenas com salina. Por outro lado, o tratamento com friedelina, em todas as doses utilizadas, não alterou a porcentagem de células em positivas para anexina V, mantendo o padrão de células em apoptose semelhante àqueles apresentados no grupo controle.

Figura 28 – O tratamento intranasal com friedelina não causa efeitos deletérios no timo de animais asmáticos

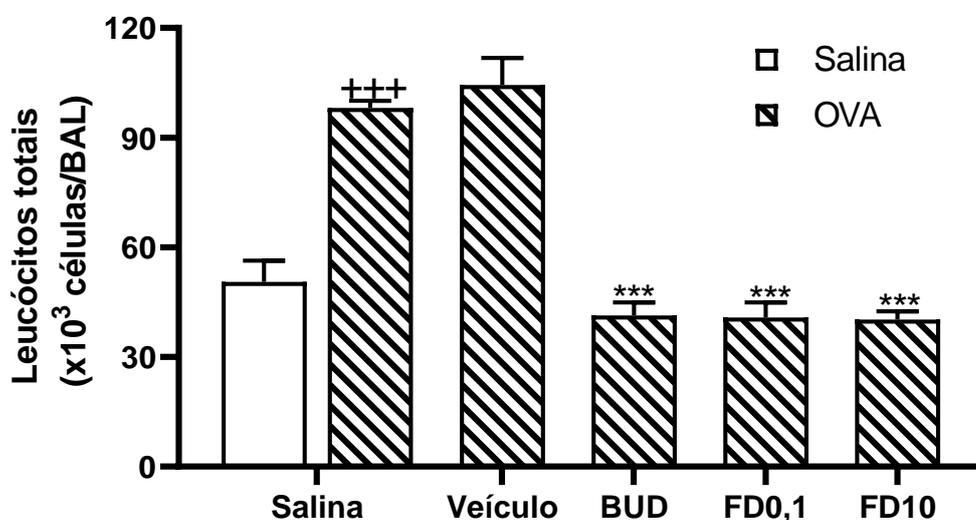


Os animais foram tratados por via intranasal com salina, etanol (veículo), budesonida (fármaco de referência) ou friedelina 1 hora antes de cada desafio. Após a eutanásia, o timo dos animais foi coletado e uma série de análises foi realizada, (A) Peso relativo do timo. (B) Contagem de timócitos totais. (C) Apoptose dos timócitos provenientes de animais submetidos ao modelo de asma alérgica.

5.13 Efeito da friedelina sobre o recrutamento de leucócitos para as vias aéreas de animais asmáticos estimulados com OVA

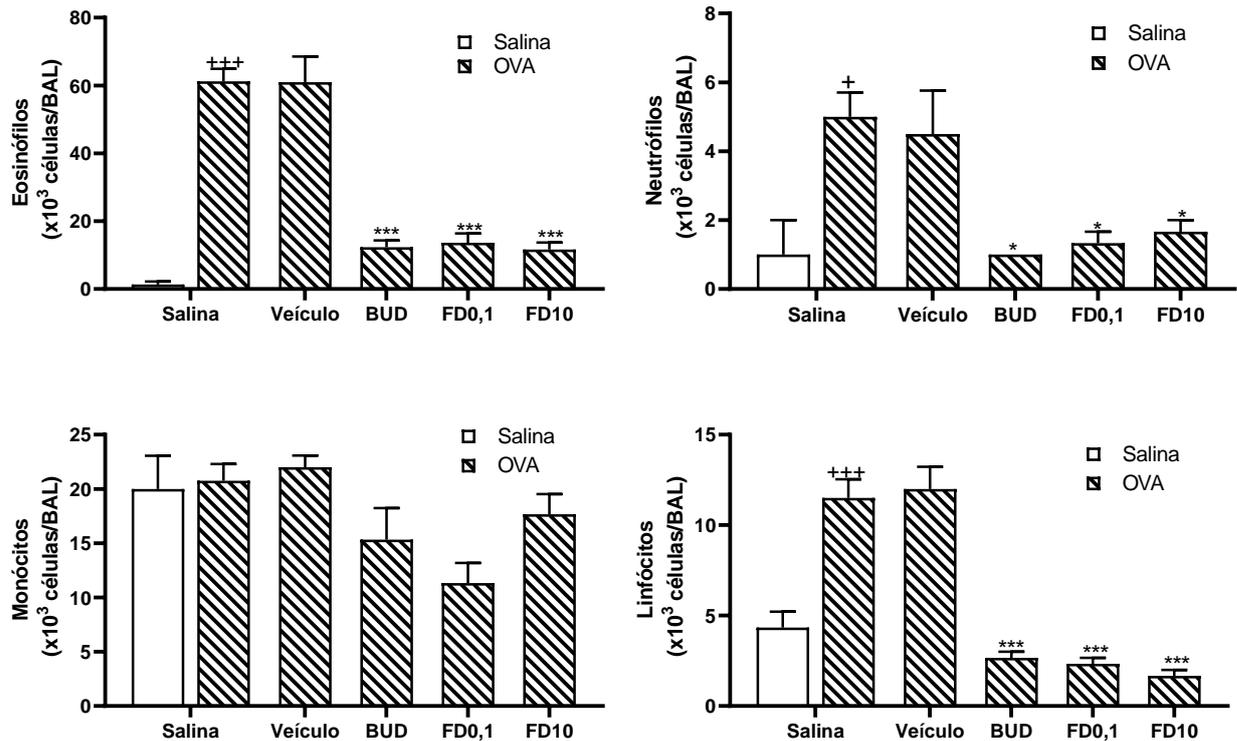
Com o objetivo de caracterizar o efeito anti-inflamatório *in vivo* da friedelina, o modelo de asma alérgica induzido por ovalbumina em camundongos C57BL/6 foi utilizado. Nesse cenário, inicialmente, decidiu-se avaliar o papel desse triterpeno pentacíclico sobre a inflamação alérgica induzida por ovalbumina nas vias aéreas dos animais. Na figura 29 e 30, o gráfico representa a contagem total e diferencial dos leucócitos, respectivamente, nos diferentes grupos experimentais. O lavado broncoalveolar de animais asmáticos (sensibilizados e desafiados com OVA) apresentou um aumento na quantidade de leucócitos totais, especialmente um aumento considerável na contagem de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos. De maneira interessante, o tratamento intranasal com friedelina (0,1 e 10 mg/kg) em animais asmáticos reduziu o número dessas células no lavado broncoalveolar. Vale pontuar que o tratamento intranasal com budesonida, fármaco utilizado no tratamento de inflamação alérgica, também foi capaz de acarretar diminuição considerável no número de leucócitos nas vias aéreas dos animais. O tratamento intranasal com o veículo (etanol 1%), por sua vez, não causou alteração no parâmetro avaliado.

Figura 29 – O tratamento intranasal com friedelina diminui o recrutamento de leucócitos totais nas vias aéreas de animais asmáticos



A asma alérgica foi induzida por ovalbumina, conforme descrito na figura 15. Os animais foram tratados por via intranasal com salina, veículo (etanol 1%), budesonida (fármaco de referência) ou friedelina 1 hora antes de cada desafio. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *p < 0,05 (Controle vs. Ovalbumina); **p < 0,01 (Ovalbumina vs. Friedelina).

Figura 30 – O tratamento com friedelina diminui o número de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos nas vias aéreas de animais asmáticos...

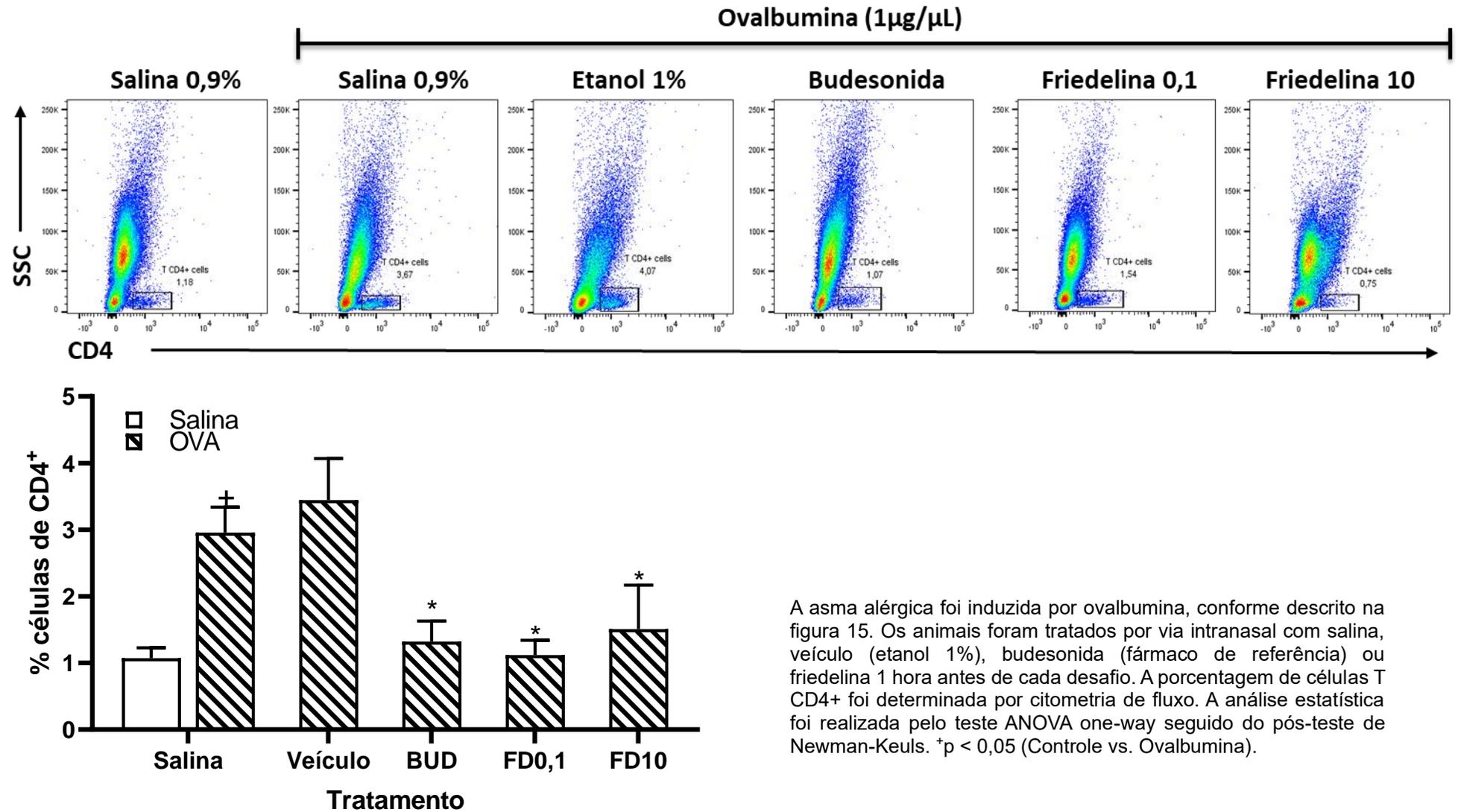


A asma alérgica foi induzida por ovalbumina, conforme descrito na figura 15. Os animais foram tratados por via intranasal com salina, veículo (etanol 1%), budesonida (fármaco de referência) ou friedelina 1 hora antes de cada desafio. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. ⁺p < 0,05 (Controle vs. Ovalbumina); ^{**}p < 0,01 (Ovalbumina vs. Friedelina).

5.14 Efeito da friedelina sobre a porcentagem de células T CD4+ nas vias aéreas de animais asmáticos estimulados com OVA

As células do lavado broncoalveolar foram coletadas e marcadas para a proteína CD4 a fim de determinar a porcentagem dos linfócitos T CD4+ nas vias aéreas dos animais. Conforme evidenciado na figura 31, animais asmáticos apresentaram um aumento considerável na porcentagem de células CD4+ quando comparadas com os animais do grupo controle. Por outro lado, pôde-se evidenciar que o tratamento nasal com friedelina foi capaz de reduzir, em todas as doses utilizadas, a porcentagem dessas células nas vias aéreas de animais asmáticos. Cabe ressaltar que o tratamento com fármaco de referência budesonida também reduziu a porcentagem dessas células.

Figura 31 – O tratamento intranasal com friedelina diminui a porcentagem de linfócitos T CD4+ totais nas vias aéreas de animais asmáticos



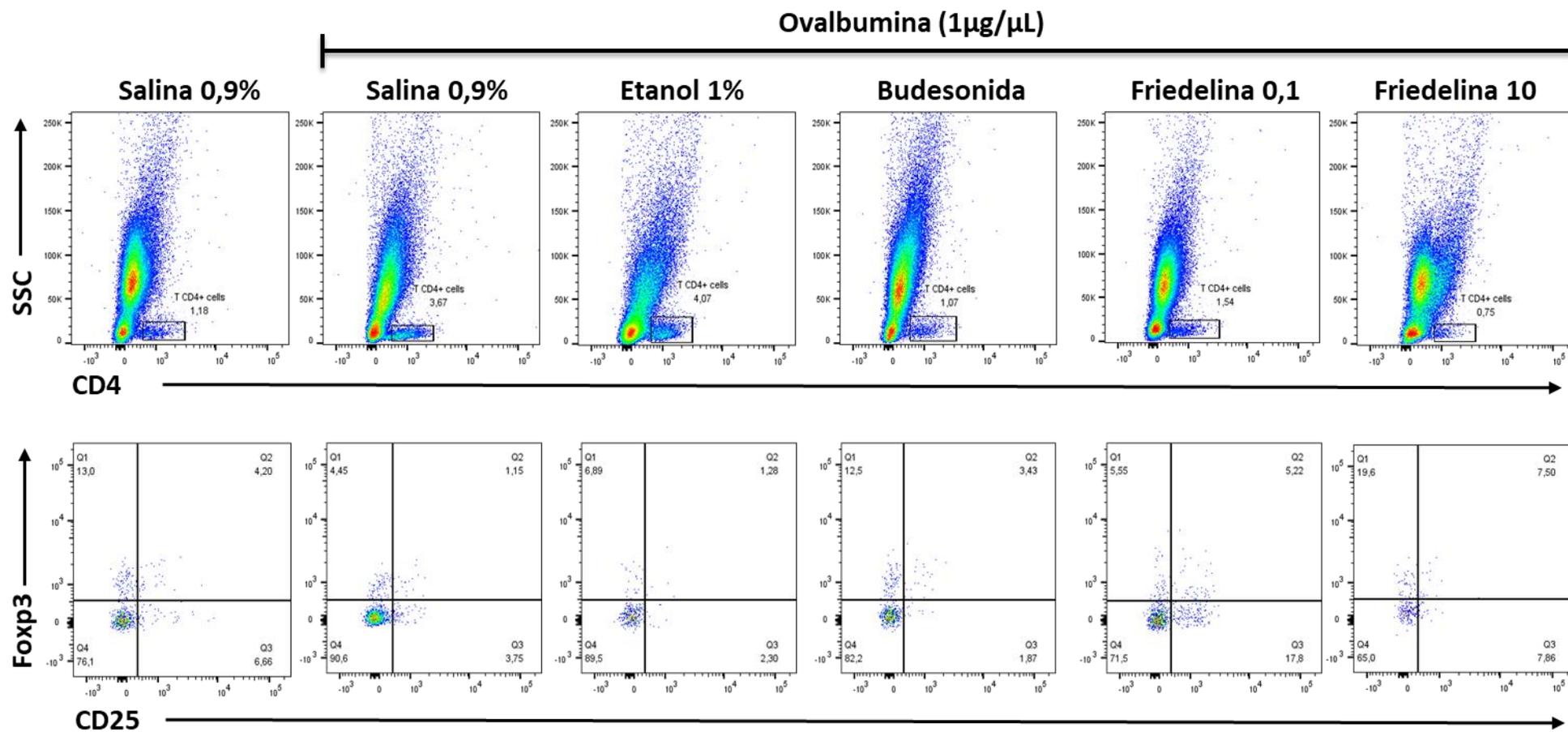
A asma alérgica foi induzida por ovalbumina, conforme descrito na figura 15. Os animais foram tratados por via intranasal com salina, veículo (etanol 1%), budesonida (fármaco de referência) ou friedelina 1 hora antes de cada desafio. A porcentagem de células T CD4+ foi determinada por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *p < 0,05 (Controle vs. Ovalbumina).

5.15 Efeito da friedelina sobre a porcentagem de células T reguladoras nas vias aéreas de animais asmáticos estimulados com OVA

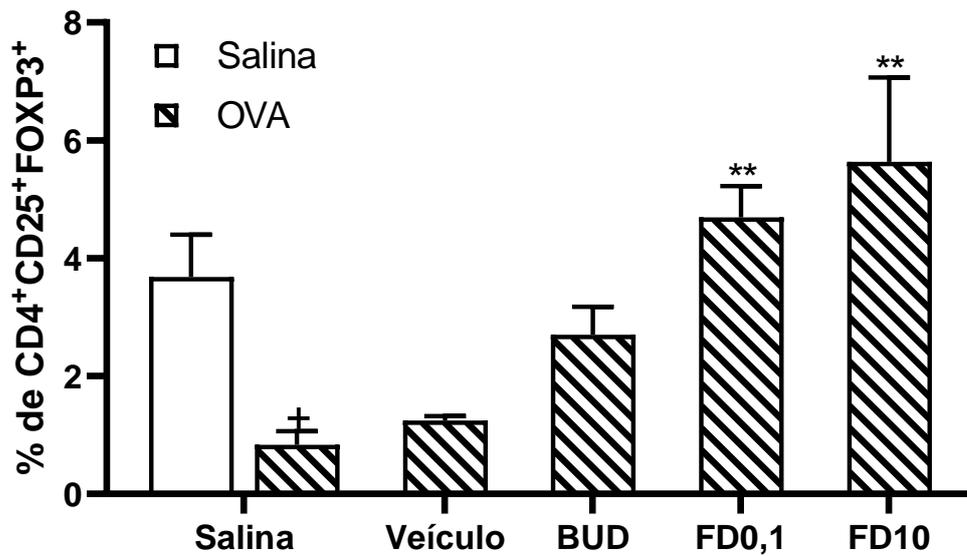
As células T reguladoras são caracterizadas por apresentar um importante papel no controle da inflamação. De fato, alguns estudos sugerem que o número dessas células se encontra reduzido na condição asmática. Nesse sentido, as células do lavado broncoalveolar foram utilizadas para a marcação e imunodeteção de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) por citometria de fluxo.

Conforme apresentado na figura 32, animais asmáticos (sensibilizados e desafiados com OVA) apresentaram uma redução considerável na porcentagem de células Tregs (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) no lavado broncoalveolar, quando comparados com os animais do grupo controle. No entanto, foi evidenciado que o tratamento intranasal com friedelina nas concentrações de 0,1 e 10 mg/kg foi capaz de restaurar a porcentagem dessas células no lavado broncoalveolar de animais asmáticos, tornando a porcentagem dessas células semelhante àquela apresentada nos animais do grupo controle. Cabe apontar que, apesar de haver uma tendência de aumento na porcentagem de células Tregs no lavado dos animais tratados com budesonida, essa diferença não foi estatisticamente relevante. Com base nesses resultados, pode-se concluir que o efeito antiasmático apresentado pela friedelina parece estar relacionado com o aumento da presença de linfócitos Tregs nas vias aéreas dos animais.

Figura 32 – O tratamento intranasal com friedelina restaura a porcentagem de linfócitos T reguladores nas vias aéreas de animais asmáticos



Continuação da figura 32



A asma alérgica foi induzida por ovalbumina, conforme descrito na figura 15. Os animais foram tratados por via intranasal com salina, veículo (etanol 1%), budesonida (fármaco de referência) ou friedelina 1 hora antes de cada desafio. A porcentagem de células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ foi determinada por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls. †p < 0,05 (Controle vs. Ovalbumina); **p < 0,01 (Ovalbumina vs. Friedelina).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos imunomoduladores do triterpeno pentacíclico friedelina em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Esse triterpeno tem sido caracterizado com possuidor de diversas atividades farmacológicas, incluindo efeitos antitumorais (SUBASH-BABU; LI; ALSHATWI, 2017; XIAO; CHANG; WANG, 2020), anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos (ANTONISAMY; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011), além de atividades vasodilatadoras e antioxidantes (SUNIL et al., 2013). No entanto, os seus efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios ainda não tinham sido investigados no modelo de asma alérgica experimental.

Neste cenário, buscou-se caracterizar inicialmente os efeitos diretos da friedelina sobre timócitos e linfócitos. Assim, primeiramente, por se tratar de uma abordagem *in vitro*, a escolha de concentrações que não causem a morte celular torna-se um fator importante na condução dos protocolos experimentais. No presente trabalho, os resultados obtidos por meio do ensaio de viabilidade celular por MTT demonstraram que o tratamento com a friedelina, em todas as concentrações testadas, não foi capaz de alterar a viabilidade dos timócitos *in vitro*.

Esses resultados estão em consonância com os achados de Subash-Babu e colaboradores (2017), nos quais foi observado que o tratamento com friedelina não causou citotoxicidade em células epiteliais e fibroblastos (SUBASH-BABU; LI; ALSHATWI, 2017). Além disso, outros triterpenóides, como lupeol e uvaol, também não alteraram a viabilidade de diversos tipos celulares, incluindo queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos (BESERRA et al., 2018; CARMO et al., 2020; KAEWTHAWEE; BRIMSON, 2013). Em contrapartida, foi constatado que alguns triterpenos, incluindo a friedelina, podem induzir morte celular em modelos celulares de câncer. De fato, foi evidenciado que o tratamento com friedelina apresentou efeitos citotóxicos em linhagens de leucemia e de câncer de mama (SUBASH-BABU; LI; ALSHATWI, 2017; TAWILA et al., 2020; XIAO; CHANG; WANG, 2020).

Em relação aos timócitos, até o momento, não foram encontrados estudos que tenham avaliado os efeitos de triterpenos ou de produtos naturais sobre a viabilidade dessas células, o que destaca o ineditismo do presente estudo ao abordar essa temática. Considerando que o tratamento com friedelina não apresentou atividade citotóxica em timócitos, optou-se por aprofundar o conhecimento e avaliar os efeitos

da friedelina sobre parâmetros celulares importantes nessas células, incluindo a migração celular e a produção da citocina IL-2.

A migração dos timócitos no microambiente tímico e dos linfócitos nos tecidos linfoides desempenha um papel crucial no desenvolvimento, maturação e função dessas células. A CCL12 é uma quimiocina essencial durante esse processo, estimulando a migração dos timócitos na região tímica e a atração de linfócitos para áreas de inflamação ou infecção (KUROWARABE et al., 2021). Nesse cenário, tendo em vista o importante papel da migração celular nessas células, optou-se por avaliar os efeitos da friedelina na migração de timócitos e linfócitos estimulados por CCL12.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a friedelina foi capaz de aumentar a migração dos timócitos totais em todas as concentrações testadas. Esses dados corroboram estudos prévios que indicam o potencial dessa molécula para estimular a migração de queratinócitos e fibroblastos (SOMWONG et al., 2022). Em conformidade com tais observações, há registros na literatura científica que outros produtos naturais da classe dos terpenos também são capazes de aumentar a migração celular. Alguns exemplos incluem o lupeol, o ácido oleanólico e o uvaol, moléculas conhecidas por promoverem a migração celular em diversos contextos, como cicatrização de feridas, doenças neurodegenerativas e angiogênese, respectivamente (BESERRA et al., 2018; CARMO et al., 2020; STELLING-FÉREZ; GABALDÓN; NICOLÁS, 2022; ZHANG et al., 2018). O efeito desses terpenóides em aumentar a migração celular pode ser atribuído à capacidade dessas substâncias de modular a expressão de proteínas e fatores de sinalização envolvidos durante o processo migratório.

Outrossim, a análise por citometria de fluxo das diferentes subpopulações de timócitos migrantes indicou que o efeito indutor da migração celular apresentado pela friedelina ocorreu especificamente em células imaturas, quais sejam duplo negativas (CD4⁻CD8⁻) e duplo positivas (CD4⁺CD8⁺). Contudo, foi constatado que o tratamento com friedelina reduziu a migração dos timócitos CD4⁺ e não causou alteração no padrão migratório de CD8⁺. Sabe-se que o potente efeito quimioatraente de CCL12 em timócitos e linfócitos está relacionado com a atuação dessa molécula nos receptores CXCR4, que modulam parâmetros intracelulares envolvidos na migração celular (DAY et al., 2010). Esse papel apresentado por CXCR4 parece ocorrer não apenas em timócitos e linfócitos, mas também em uma variedade de células. Zuo e

colaboradores (2017) mostraram que a expressão aumentada desse receptor promove um aumento na migração de células cancerígenas (ZUO et al., 2017).

Com base nesse contexto, partiu-se, então, para avaliar se o efeito modulador da friedelina na migração das diferentes subpopulações de timócitos poderia estar relacionado com alterações nos níveis do receptor CXCR4. Todavia, de acordo com os dados obtidos mediante o ensaio de citometria de fluxo, a friedelina não alterou a expressão de CXCR4 em timócitos, o que sugere que o efeito modulador da migração apresentado pela friedelina parece ocorrer por um mecanismo independente dos níveis de expressão desse receptor. Uma abordagem adequada para elucidar tal aspecto seria avaliar o grau de ativação/fosforilação do receptor, análise que carece ser realizada.

Cabe ressaltar que, ao se realizar os experimentos de migração celular em linfócitos, diferentemente do que ocorreu em timócitos, a friedelina não foi capaz de alterar o padrão migratório dessas células. Esses resultados podem estar relacionados com as diferenças no grau de maturação das células e as diferentes vias de sinalização ativadas em timócitos e linfócitos.

Além da migração celular, a produção de IL-2 é um fator importante nas funções de timócitos e linfócitos. É sabido que essa citocina apresenta uma potente capacidade para aumentar a proliferação e diferenciação de células T e timócitos *in vitro* (DOS REIS, 1989). Além disso, essa citocina está intimamente relacionada com o processo de expansão clonal, evento importante durante a resposta imune (CANTRELL; SMITH, 1984; CARR et al., 1945). Desta forma, decidiu-se avaliar os efeitos da friedelina na produção de IL-2 *in vitro*. Análise dos níveis de produção de IL-2 mediante a técnica de ELISA demonstrou que o tratamento com a friedelina apresentou efeito em diminuir a produção dessa citocina tanto em timócitos quanto em linfócitos estimulados por concanavalina A. Apesar de a IL-2 apresentar papel importante nas funções dessas células, a redução dos níveis dessa citocina pode ser interessante em situações em que há exacerbação da resposta imune, como por exemplo, em condições autoimunes e em doenças inflamatórias crônicas (MIZUI, 2019).

Nesse cenário, o estudo de Santos e colaboradores (2016) evidenciou que o extrato etanólico de *Eriosema crinitum* foi capaz de reduzir a produção de IL-2 em linfócitos. Esses resultados são particularmente relevantes, uma vez que análises fitoquímicas revelaram a presença de terpenos nesse extrato, o que sugere uma

possível associação com os efeitos observados (SANTOS et al., 2016). Em um outro estudo conduzido por Kaewthawee e colaboradores (2013), verificou-se que o tratamento com o triterpeno ácido ursólico apresentou efeito semelhante aos observados no presente trabalho. Embora o ácido ursólico isolado não tenha alterado a produção de IL-2 em linfócitos, constatou-se que esse triterpeno também foi capaz de reduzir a produção de IL-2 em linfócitos estimulados, corroborando os dados do presente estudo (KAEWTHAWEE; BRIMSON, 2013).

Em síntese, com esse primeiro conjunto experimental, foi possível concluir que o tratamento com friedelina apresentou um efeito direto em timócitos e linfócitos, modulando a capacidade migratória de forma diferencial em timócitos e diminuindo a produção da citocina IL-2 em ambas as células. Esses resultados são interessantes porque demonstram, pela primeira vez, efeitos diretos da friedelina em células imunes. Por estar envolvido no desenvolvimento e na maturação de linfócitos T, o timo é considerado um órgão bastante relevante. No entanto, é sabido que essa glândula é extremamente vulnerável a diversos fatores, incluindo doenças infecciosas, alguns tratamentos farmacológicos e estresse (CANNIZZO et al., 2011; GRUVER; SEMPOWSKI, 2008; VASCELLARI et al., 2012).

Assim, surgiu a proposta de avaliar se o tratamento com a friedelina poderia causar algum efeito citotóxico sobre o timo. Essa abordagem é particularmente interessante ao se levar em conta que a friedelina apresenta efeitos farmacológicos similares àqueles apresentados pelos corticoides (FERRO et al., 2017; SHI et al., 2021), fármacos que sabidamente induzem efeitos deletérios sobre esse órgão linfóide (CANNIZZO et al., 2010; CIFONE et al., 1999; FUKUYAMA et al., 2011) (AHMED; SRIRANGANATHAN, 1994). Desta forma, embora não se tenha observado efeitos citotóxicos da friedelina em timócitos *in vitro*, tornou-se interessante investigar os efeitos do tratamento com a friedelina sobre a estrutura e a celularidade do timo.

Para isso, os camundongos foram submetidos a um regime de tratamento intraperitoneal diário com salina, dexametasona ou friedelina por 4 dias consecutivos. Após esse período, os animais foram eutanasiados e uma série de análises foi realizada. Cabe ressaltar que o modelo utilizado foi orientado pela abordagem apresentada no trabalho de Ahmed e colaboradores (1994), que demonstrou, entre outros fatores, os efeitos citotóxicos da dexametasona sobre o timo. Nesse estudo, foi evidenciado que o tratamento intraperitoneal com dexametasona causou uma redução considerável no número de timócitos, particularmente nos tempos de 24h e 48h após

administração de dexametasona (AHMED; SRIRANGANATHAN, 1994). Em conformidade com esse estudo, os dados do presente trabalho evidenciaram que a dexametasona apresentou um efeito deletério no timo dos camundongos, uma vez que o tratamento sistêmico com essa substância induziu mudanças na estrutura macroscópica e no peso relativo do órgão, bem como uma redução no número de timócitos e uma modificação nas porcentagens das diferentes subpopulações dessas células.

Esses dados são corroborados pelos achados obtidos por Fukuyama e colaboradores (2011), em que foi observado que o tratamento intraperitoneal com dexametasona além de reduzir o peso total e peso relativo do timo, também foi capaz de reduzir a sua celularidade (FUKUYAMA et al., 2011). Além disso, Cannizzo e colaboradores (2010) demonstraram que o peso e volume do timo de bezerras foi significativamente reduzido após o tratamento com dexametasona em comparação com os animais do grupo controles (CANNIZZO et al., 2010). Em conjunto, essas observações indicam o efeito tóxico que esse corticoide apresenta sobre o timo. Em contraste, no presente estudo, foi possível observar que o tratamento intraperitoneal com friedelina não alterou nenhum dos parâmetros avaliados, o que sugere ausência de efeitos citotóxicos desse triterpeno sobre o timo. De fato, esses resultados são bastante relevantes e está em concordância com descobertas da literatura que demonstraram que o triterpeno lupeol, além de não causar citotoxicidade no timo, demonstrou exercer um efeito benéfico na preservação da estrutura tímica (BAE et al., 2023).

Adicionalmente, o tratamento com dexametasona também causou um aumento na porcentagem de células em morte por apoptose. Esses dados estão de acordo com a literatura científica, no qual foi avaliado que o tratamento com dexametasona foi capaz de induzir apoptose de timócitos (CIFONE et al., 1999; FUKUYAMA et al., 2011). Por outro lado, de forma interessante, no presente trabalho, foi possível observar que o tratamento sistêmico com a friedelina não alterou a porcentagem de timócitos em morte celular por apoptose. Em conformidade com tais resultados, um estudo revelou que o ácido betulínico, um triterpeno pentacíclico, além de não induzir apoptose em timócitos – conforme observou-se no presente trabalho –, foi capaz de proteger essas células dos efeitos da dexametasona (YI et al., 2016).

Dessa forma, tendo em vista que todos os aspectos aqui avaliados não foram, de nenhuma forma, alterados após o tratamento sistêmico com friedelina, é possível

considerar a segurança que o tratamento com esse triterpeno apresenta em relação ao timo. Em contrapartida, a dexametasona, corticoide amplamente utilizado para tratar diversas patologias com cunho inflamatório, causou um evidente efeito deletério ao timo.

Apesar dos dados anteriores evidenciarem um contraste evidente entre os efeitos da friedelina e do corticoide dexametasona no timo, essas avaliações foram realizadas em animais saudáveis. No entanto, é sabido que a administração dessas moléculas não ocorre em condições homeostáticas, mas sim em um contexto patológico (WANG et al., 2020). Diante desses fatores, surgiu a necessidade de melhor caracterizar os efeitos dessas moléculas sobre o timo em um contexto de doença. Portanto, optou-se por aprofundar a investigação do papel da friedelina no timo, utilizando um modelo de asma alérgica em camundongos. Essa abordagem é especialmente relevante, uma vez que muitos dos fármacos utilizados no tratamento da asma estão associados à indução de imunossupressão, com implicações prejudiciais nos órgãos linfoides, especialmente no timo (CANNIZZO et al., 2010; CIFONE et al., 1999; FUKUYAMA et al., 2011).

Nesse trabalho, utilizou-se o modelo de asma alérgica induzido por ovalbumina. Essa abordagem é amplamente utilizada na literatura científica, devido ao seu potencial em mimetizar os mecanismos subjacentes à asma alérgica, o que permite testar a eficácia de novos medicamentos e terapias, investigar os efeitos de diferentes intervenções e compreender melhor a fisiopatologia da doença (KIM; SONG; LEE, 2019). Nesse modelo, foi observado que o tratamento nasal com budesonida foi capaz de induzir uma diminuição considerável do peso relativo do timo, bem como levou uma redução no número de timócitos, quando comparado ao grupo controle. Além disso, o tratamento com esse corticoide causou um aumento considerável na apoptose dos timócitos.

A utilização da budesonida pode ser justificada pelo fato de esse fármaco ser amplamente utilizado no tratamento da asma. Além disso, esse corticoide é bastante benéfico para a aplicação tópica, pois exibem uma potente ação anti-inflamatória, mas é facilmente degradado após a absorção, minimizando as implicações sistêmicas (INAGAKI; NAGAI, 2001). Apesar disso, pôde observar que o tratamento local com esse corticoide apresentou efeitos deletérios sobre o timo, indicando que mesmo os corticoides com menores impactos sistêmicas, podem ser deletérios sobre esse órgão. No entanto, em conformidade com os resultados anteriores, a friedelina não

alterou nenhum dos parâmetros avaliados, o que reafirma a segurança do tratamento com esse triterpeno. Dessa forma, tendo em vista que a friedelina, diferentemente dos corticoides dexametasona e budesonida, não alterou os padrões macroscópicos e celulares do timo de animais saudáveis e de animais asmáticos, e considerando também os efeitos diretos desse triterpeno em tímócitos e linfócitos, optou-se por aprofundar o conhecimento e investigar o potencial imunomodulador dessa substância no contexto da asma alérgica.

Inicialmente, decidiu-se avaliar o efeito da friedelina sobre o recrutamento de leucócitos nas vias aéreas de animais asmáticos. A contagem celular realizada no fluido do lavado broncoalveolar revelou que animais asmáticos apresentaram um aumento considerável no número de leucócitos, quando comparado com o grupo controle. De maneira interessante, foi observado que o tratamento com friedelina, em ambas as doses utilizadas (0,1 e 10 mg/kg), foi capaz de reduzir o número dessas células, em especial de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, nas vias aéreas dos animais asmáticos. Esse mesmo padrão de redução foi observado quando os animais foram tratados com o corticoide de referência budesonida.

Esses dados sugerem que a friedelina apresenta um efeito anti-inflamatório por reduzir o recrutamento de leucócitos, evento importante na fisiopatologia da asma. De fato, alguns trabalhos vêm evidenciando o efeito anti-inflamatório da friedelina. Em estudos prévios foi observado que a friedelina reduz o recrutamento de leucócitos totais no contexto de pleurisia induzido por LPS e na asma alérgica (FERRO et al., 2017). Essas observações estão de acordo com dados da literatura que evidenciaram que o tratamento com os triterpenos lupeol, pristimerina, taraxasterol, ácido oleanólico e betulina também foram capazes de reduzir o recrutamento de leucócitos totais para as vias aéreas de animais submetidos ao modelo de asma alérgica induzido por ovalbumina (JIN et al., 2016; KAMARAJ et al., 2021; KIM; HONG; LEE, 2014; VASCONCELOS et al., 2008; ZHANG et al., 2013). Além disso, a atividade anti-inflamatória da friedelina foi reforçada em outros modelos de doença. No trabalho de Shi e colaboradores (2021), por exemplo, foi evidenciado que o tratamento com friedelina melhora o quadro de colite em camundongos por meio da inibição da resposta inflamatória (SHI et al., 2021). Esses achados sugerem que a friedelina e outros triterpenos apresentam um papel anti-inflamatório importante, o que pode apresentar implicações no contexto da asma alérgica.

Com base no efeito antiasmático da friedelina evidenciado no presente trabalho e corroborado pelos achados de FERRO e colaboradores (2017), decidiu-se avançar no conhecimento e investigar os mecanismos pelos quais a friedelina apresenta esse efeito. Nesse cenário, tornou-se interessante investigar se o efeito anti-inflamatório da friedelina poderia estar relacionado com a modulação de células T reguladoras nas vias aéreas dos animais asmáticos.

Um conjunto de dados vêm demonstrando o importante papel dos linfócitos T reguladores na asma. Um estudo conduzido por Provoost e colaboradores (2009) evidenciou que há uma deficiência na expressão da proteína FOXP3 no tecido pulmonar de pacientes asmáticos (PROVOOST et al., 2009). Um outro estudo observou que crianças asmáticas apresentaram uma baixa porcentagem de células T reguladoras no lavado broncoalveolar em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, foi observado que as células Treg de pacientes asmáticos possui uma diminuição na capacidade de suprimir a proliferação e produção de citocinas por linfócitos T *in vitro* (HARTL et al., 2007). Essas observações indicam que há uma redução no número e nas funções das células T reguladoras na condição asmática.

Nesse sentido, já foi documentado que a administração terapêutica de células T reguladoras em animais atenua a asma alérgica induzida pelo ovalbumina (KEARLEY; ROBINSON; LLOYD, 2008), enquanto a depleção dessas células leva a uma exacerbação dos quadros dessa doença (KHAN, 2020). Nesse cenário, abordagens terapêuticas que modulem o número e as funções de células T reguladoras podem ser úteis no tratamento da asma.

No modelo utilizado nesse trabalho, foi observado que os animais asmáticos apresentaram uma redução significativa nas porcentagens de linfócitos T reguladores, quando comparados com o grupo controle. Esse resultado está de acordo com a literatura, em que já foi observado que a porcentagem dessas células se encontra reduzida nas vias aéreas de animais asmáticos induzidos por ovalbumina (WU; YANG; WANG, 2017). Por outro lado, de forma interessante, pôde-se observar que o tratamento nasal com friedelina foi capaz de restaurar para níveis basais a porcentagem dessas células no lavado broncoalveolar. Esse dado indica que o efeito anti-inflamatório da friedelina parece estar relacionado com o aumento da quantidade de linfócitos T reguladores nas vias áreas de animais asmáticos

Há alguns estudos na literatura evidenciando que outros triterpenos também possuem a capacidade de modular o número dessas células no modelo de asma. Kim

e colaboradores (2014), por exemplo, observou por PCR e imunofluorescência que o tratamento de animais asmáticos com ácido oleanólico foi capaz de aumentar a expressão de FOXP3 no tecido pulmonar (KIM; HONG; LEE, 2014). Em um outro estudo, foi observado que animais asmáticos apresentaram uma diminuição significativa no mRNA de FOXP3, o qual foi restaurado com o tratamento com o produto natural rubusoside (WANG et al., 2020). Adicionalmente, estudos de reposicionamento de fármacos observaram que a pitavastatina também melhora a condição asmática por aumentar a porcentagem de células T reguladoras nas vias aéreas dos animais (WU; YANG; WANG, 2017).

Especialmente, os triterpenos ácido oleanólico e rubusoside acima mencionados, demonstraram a capacidade de aumentar a expressão do fator de transcrição FOXP3 no tecido pulmonar, o que pode estar associado a um aumento no número de células T reguladoras (KIM; HONG; LEE, 2014; WANG et al., 2020). No entanto, esses trabalhos apresentam a limitação de avaliar essa expressão por imunofluorescência ou PCR, técnicas que não permitem a identificação específica das células T reguladoras, visto que outras células também podem expressar esse fator de transcrição no tecido pulmonar (DEVAUD; DARCY; KERSHAW, 2014). Nesse sentido, torna-se importante pontuar que, no presente trabalho, as análises por citometria de fluxo permitiram a marcação específica dos linfócitos T reguladores mediante o uso da tripla marcação simultânea para as moléculas CD4, CD25 e Foxp3, proporcionando uma identificação mais precisa dessas células.

Por meio dessa abordagem experimental, foi possível demonstrar que a friedelina possui um efeito antiasmático por meio da modulação de linfócitos T reguladores. Esses efeitos foram comparáveis aos apresentados pelo corticoide budesonida, porém a friedelina se destacou por não apresentar efeitos prejudiciais ao timo dos animais com asmáticos.

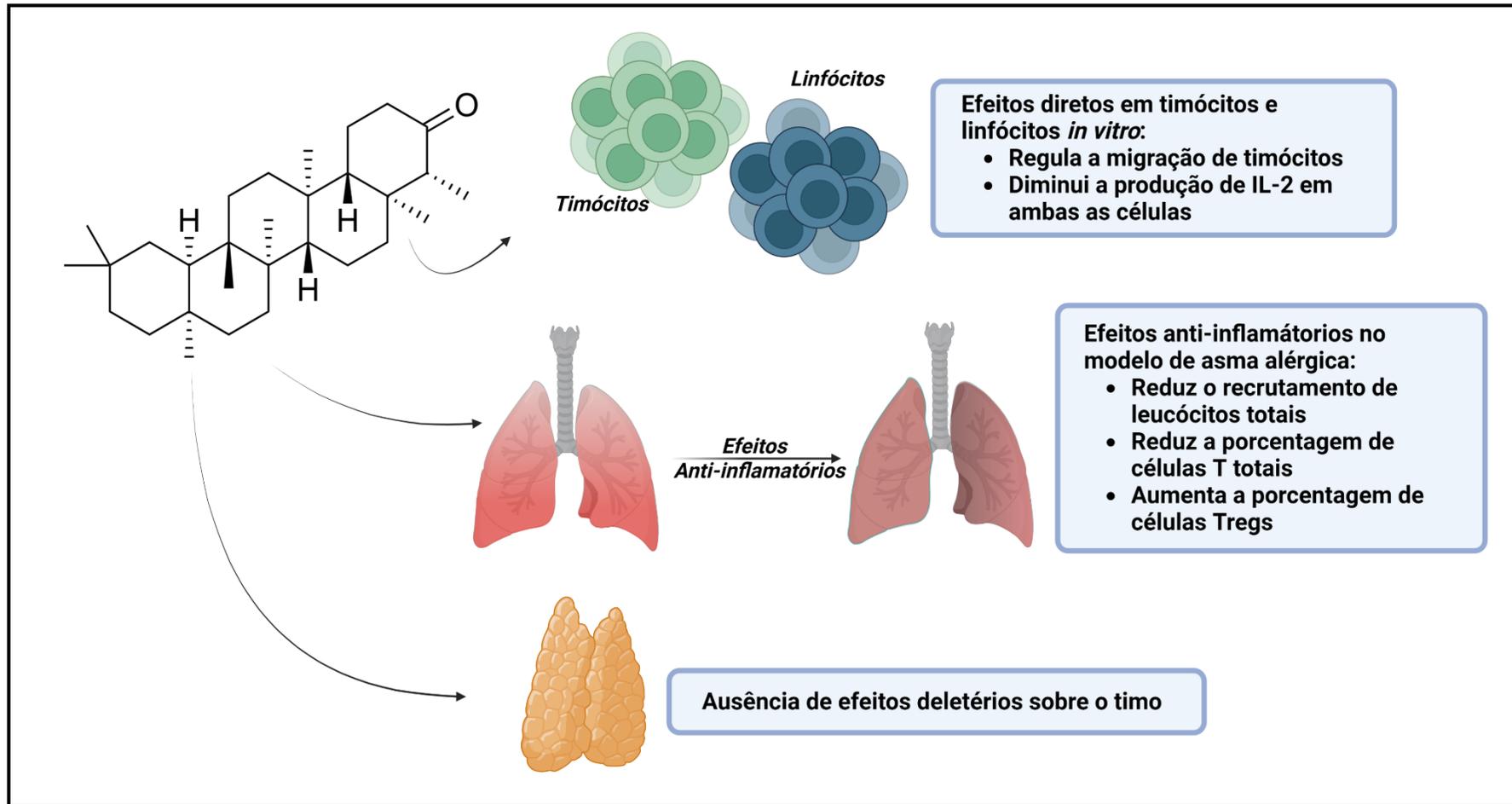
7 CONCLUSÃO

Em conjunto, esses resultados demonstram que a friedelina apresenta um efeito imunomodulador *in vitro* e *in vivo*, uma vez que o tratamento com esse triterpeno foi capaz de :

1. Apresentar efeitos diretos sobre timócitos e linfócitos *in vitro* por:
 - a. Regular a migração dos timócitos
 - b. Diminuir a produção de IL-2 em ambas as células.
2. Apresentar um efeito anti-inflamatório no modelo de asma alérgica experimental por:
 - a. Reduzir o recrutamento de leucócitos e a porcentagem de células T CD4+ nas vias aéreas de animais asmáticos
 - b. Aumentar a porcentagem de linfócitos T reguladores nas vias aéreas de animais asmáticos
3. Não alterar a estrutura e a celularidade do timo de animais asmáticos e não asmáticos.

Em conjunto, estes resultados sugerem que a friedelina pode ser um candidato importante no tratamento da asma alérgica.

Figura 33 – Esquema representando os efeitos imunomoduladores da friedelina *in vitro* e *in vivo*



FONTE: autor

REFERÊNCIAS

ALVES, T. B.; SOUZA-MOREIRA, T. M.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F.; FURLAN, M. Friedelin in *Maytenus ilicifolia* is produced by friedelin synthase isoforms. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 23, n. 3, 2018.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; INTERNATIONAL NATURAL PRODUCT SCIENCES TASKFORCE; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.

ATHANAZIO, R. et al. Prevalence of the eosinophilic phenotype among severe asthma patients in Brazil: the BRAEOS study. *Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, v. 48, n. 3, p. e20210367, 2022.

AZEVEDO, C. T.; COTIAS, A. C.; ARANTES, A. C. S.; FERREIRA, T. P. T.; MARTINS, M. A.; OLSEN, P. C. Assessment of allergen-responsive regulatory T cells in experimental asthma induced in different mouse strains. **Mediators of inflammation**, v. 2021, p. 7584483, 2021.

AZMAN, S.; SEKAR, M.; BONAM, S. R.; GAN, S. H.; WAHIDIN, S.; LUM, P. T.; DHADDE, S. B. Traditional medicinal plants conferring protection against ovalbumin-induced asthma in experimental animals: A review. **Journal of asthma and allergy**, v. 14, p. 641–662, 2021.

BAE, S.; JEONG, N.-H.; CHOI, Y.-A.; LEE, B.; JANG, Y. H.; LEE, S.; KIM, S.-H. Lupeol alleviates atopic dermatitis-like skin inflammation in 2,4-dinitrochlorobenzene/*Dermatophagoides farinae* extract-induced mice. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 27, 2023.

BAI, D.; SUN, T.; LU, F.; SHEN, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, B.; YU, G.; LI, H.; HAO, J. Eupatilin suppresses OVA-induced asthma by inhibiting NF- κ B and MAPK and

activating Nrf2 signaling pathways in mice. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1582, 2022.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005: Corticosteroids and inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 245–254, 2006.

BELLIO, M.; DOS REIS, G. A. Triggering of thymocyte function by IL-2 as the only exogenous stimulus; analysis of two distinct modes of IL-2-induced thymocyte proliferation and IL-3 secretion in vitro. **Immunology**, v. 68, n. 2, p. 175–180, 1989.

BEZERRA, J. J. L.; PINHEIRO, A. A. V.; BARRETO, E. DE O. Medicinal plants used in the treatment of asthma in different regions of Brazil: A comprehensive review of ethnomedicinal evidence, preclinical pharmacology and clinical trials. *Phytomedicine plus: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, v. 2, n. 4, p. 100376, 2022.

BLEECKER, E. R. et al. Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting β 2-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*, v. 388, n. 10056, p. 2115–2127, 2016.

BOUSQUET, J.; BOUSQUET, P. J.; GODARD, P.; DAURES, J.-P. The public health implications of asthma. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 7, p. 548–554, 2005.

BUHL, R. Anti-IgE antibodies for the treatment of asthma. **Current opinion in internal medicine**, v. 4, n. 2, p. 184–191, 2005.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of natural products**, v. 67, n. 12, p. 2141–2153, 2004.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91 Suppl 3, n. suppl 3, p. e20190105, 2019.

CANNIZZO, F. T.; CAPRA, P.; DIVARI, S.; CICCOTELLI, V.; BIOLATTI, B.; VINCENTI, M. Effects of low-dose dexamethasone and prednisolone long term administration in beef calf: chemical and morphological investigation. **Analytica chimica acta**, v. 700, n. 1–2, p. 95–104, 2011.

CANNIZZO, F. T.; SPADA, F.; BENEVELLI, R.; NEBBIA, C.; GIORGI, P.; BRINA, N.; BOLLO, E.; BIOLATTI, B. Thymus atrophy and regeneration following dexamethasone administration to beef cattle. **The veterinary record**, v. 167, n. 9, p. 338–343, 2010.

CANTRELL, D. A.; SMITH, K. A. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. **Science (New York, N.Y.)**, v. 224, n. 4655, p. 1312–1316, 1984.

CARMO, J.; CAVALCANTE-ARAÚJO, P.; SILVA, J.; FERRO, J.; CORREIA, A. C.; LAGENTE, V.; BARRETO, E. Uvaol improves the functioning of fibroblasts and endothelial cells and accelerates the healing of cutaneous wounds in mice. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 21, p. 4982, 2020.

CARR, J. M.; CARRASCO, M. J.; THAVENTHIRAN, J. E. D.; BAMBROUGH, P. J.; KRAMAN, M.; EDWARDS, A. D.; AL-SHAMKHANI, A.; FEARON, D. T. CD27 mediates interleukin-2-independent clonal expansion of the CD8+ T cell without effector differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 51, p. 19454–19459, 2006.

CHANG, W.; WANG, J.; XIAO, Y. Friedelin inhibits the growth and metastasis of human leukemia cells via modulation of MEK/ERK and PI3K/AKT signalling pathways. **Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 25, n. 3, p. 1594–1599, 2020.

CHERU, N.; HAFLER, D. A.; SUMIDA, T. S. Regulatory T cells in peripheral tissue tolerance and diseases. **Frontiers in immunology**, v. 14, p. 1154575, 2023.

CIFONE, M. G.; MIGLIORATI, G.; PARRONI, R.; MARCHETTI, C.; MILLIMAGGI, D.; SANTONI, A.; RICCARDI, C. Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis:

apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. **Blood**, v. 93, n. 7, p. 2282–2296, 1999.

CISTERNAS, M. G.; BLANC, P. D.; YEN, I. H.; KATZ, P. P.; EARNEST, G.; EISNER, M. D.; SHIBOSKI, S.; YELIN, E. H. A comprehensive study of the direct and indirect costs of adult asthma. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 111, n. 6, p. 1212–1218, 2003.

COTE-SIERRA, J.; FOUCRAS, G.; GUO, L.; CHIODETTI, L.; YOUNG, H. A.; HU-LI, J.; ZHU, J.; PAUL, W. E. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 11, p. 3880–3885, 2004.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 626–635, 2009.

DAY, C. E.; GUILLEN, C.; WILLARS, G. B.; WARDLAW, A. J. Characterization of the migration of lung and blood T cells in response CXCL12 in a three-dimensional matrix: T-cell migration in 3D in response to CXCL12. **Immunology**, v. 130, n. 4, p. 564–571, 2010.

DEL PRADO-AUDELO, M. L.; CORTÉS, H.; CABALLERO-FLORÁN, I. H.; GONZÁLEZ-TORRES, M.; ESCUTIA-GUADARRAMA, L.; BERNAL-CHÁVEZ, S. A.; GIRALDO-GOMEZ, D. M.; MAGAÑA, J. J.; LEYVA-GÓMEZ, G. Therapeutic applications of terpenes on inflammatory diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 704197, 2021.

DEVAUD, C.; DARCY, P. K.; KERSHAW, M. H. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 63, n. 9, p. 869–876, 2014.

DURAIKANDIYAN, V.; AL-DHABI, N. A.; STEPHEN IRUDAYARAJ, S.; SUNIL, C. Hypolipidemic activity of friedelin isolated from *Azima tetracantha* in hyperlipidemic rats. **Revista brasileira de farmacognosia: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 89–93, 2016.

DURRANT, D. M.; METZGER, D. W. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. **Immunological investigations**, v. 39, n. 4–5, p. 526–549, 2010.

FERRO, Janylle Nunes de Souza. Efeito farmacológico da friedelina livre e complexada em hidroxipropil- β -ciclodextrina em modelos de inflamação em roedores. 2016. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

FUKUYAMA, T.; KOSAKA, T.; TAJIMA, Y.; HAYASHI, K.; SHUTOH, Y.; HARADA, T. Detection of thymocytes apoptosis in mice induced by organochlorine pesticides methoxychlor. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 33, n. 1, p. 193–200, 2011.

GHANTE, M. H.; JAMKHANDE, P. G. Role of pentacyclic triterpenoids in chemoprevention and anticancer treatment: An overview on targets and underlying mechanisms. **Journal of pharmacopuncture**, v. 22, n. 2, p. 55–67, 2019.

GINA - Global strategy for asthma management and prevention. Disponível em: <<https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2023/05/GINA-2023-Full-Report-2023-WMS.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

GRUVER, A. L.; SEMPOWSKI, G. D. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 4, p. 915–923, 2008.

GUNDEL, R. H.; LETTS, L. G.; GLEICH, G. J. Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. **The journal of clinical investigation**, v. 87, n. 4, p. 1470–1473, 1991.

HAMID, Q.; TULIC', M. K.; LIU, M. C.; MOQBEL, R. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 111, n. 1 Suppl, p. S5–S12; discussion S12-7, 2003.

HAN, J. Y.; AHN, C.-H.; ADHIKARI, P. B.; KONDETI, S.; CHOI, Y. E. Functional characterization of an oxidosqualene cyclase (PdFRS) encoding a monofunctional friedelin synthase in *Populus davidiana*. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 95–111, 2019.

HAN, Y.; SUN, Z.; CHEN, W. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 1, p. 33, 2019.

HARTL, D.; KOLLER, B.; MEHLHORN, A. T.; REINHARDT, D.; NICOLAI, T.; SCHENDEL, D. J.; GRIESE, M.; KRAUSS-ETSCHMANN, S. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 119, n. 5, p. 1258–1266, 2007.

HENDERSON, I.; CAIAZZO, E.; MCSHARRY, C.; GUZIK, T. J.; MAFFIA, P. Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy? **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 160, p. 105189, 2020.

HENRIKSEN, D. P.; BODTGER, U.; SIDENIUS, K.; MALTBAEK, N.; PEDERSEN, L.; MADSEN, H.; ANDERSSON, E. A.; NORGAARD, O.; MADSEN, L. K.; CHAWES, B. L. Efficacy of omalizumab in children, adolescents, and adults with severe allergic asthma: a systematic review, meta-analysis, and call for new trials using current guidelines for assessment of severe asthma. **Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, v. 16, n. 1, p. 49, 2020.

HILLIER, S. G.; LATHE, R. Terpenes, hormones and life: isoprene rule revisited. **The journal of endocrinology**, v. 242, n. 2, p. R9–R22, 2019.

HOLGATE, S. T.; WENZEL, S.; POSTMA, D. S.; WEISS, S. T.; RENZ, H.; SLY, P. D. Asthma. **Nature reviews. Disease primers**, v. 1, n. 1, p. 15025, 2015.

HONDOWICZ, B. D. *et al.* Interleukin-2-dependent allergen-specific tissue-resident memory cells drive asthma. **Immunity**, v. 44, n. 1, p. 155–166, 2016.

HUANG, F. *et al.* CAVO inhibits airway inflammation and ILC2s in OVA-induced Murine asthma mice. **BioMed research international**, v. 2023, p. 1–11, 2023.

HUANG, W.; WANG, Y.; TIAN, W.; CUI, X.; TU, P.; LI, J.; SHI, S.; LIU, X. Biosynthesis investigations of terpenoid, alkaloid, and flavonoid antimicrobial agents derived from medicinal plants. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 10, p. 1380, 2022.

INAGAKI, N.; NAGAI, H. Drugs for the treatment of allergic diseases. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 86, n. 3, p. 275–280, 2001.

JI, N.-F.; XIE, Y.-C.; ZHANG, M.-S.; ZHAO, X.; CHENG, H.; WANG, H.; YIN, K.-S.; HUANG, M. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model. **International immunopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 76–81, 2014.

JIANG, H.; LIN, X.; LIANG, W.; LI, Y.; YU, X. Friedelin alleviates the pathogenesis of collagenase-induced tendinopathy in mice by promoting the selective autophagic degradation of p65. **Nutrients**, v. 14, n. 8, p. 1673, 2022.

JIN, Y.; WANG, Y.; ZHAO, D.; MA, S.; LU, J.; SHUANG, G. Pristimerin attenuates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 38, n. 3, p. 221–227, 2016.

JUERGENS, U. R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory medicine*, v. 97, n. 3, p. 250–256, 2003.

KAEWTHAWEE, N.; BRIMSON, S. The effects of ursolic acid on cytokine production via the MAPK pathways in leukemic T-cells. **EXCLI journal**, v. 12, p. 102–114, 2013.

KAMARAJ, Y.; DHAYALAN, S.; CHINNAIYAN, U.; KUMARESAN, V.; SUBRAMANIYAN, S.; KUMAR, D.; MUNIYANDI, K.; PUNAMALAI, G. Triterpenoid compound betulin attenuates allergic airway inflammation by modulating antioxidants, inflammatory cytokines and tissue transglutaminase in ovalbumin-induced asthma mice model. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 73, n. 7, p. 968–978, 2021.

KANAGALINGAM, T.; SOLOMON, L.; VIJEYAKUMARAN, M.; PALIKHE, N. S.; VLIAGOFTIS, H.; CAMERON, L. IL-2 modulates Th2 cell responses to glucocorticosteroid: A cause of persistent type 2 inflammation? *Immunity, inflammation and disease*, v. 7, n. 3, p. 112–124, 2019.

KARTINI, K.; WATI, N.; GUSTAV, R.; WAHYUNI, R.; ANGGADA, Y. F.; HIDAYANI, R.; RAHARJO, A.; ISLAMIE, R.; PUTRA, S. E. D. Wound healing effects of *Plantago major* extract and its chemical compounds in hyperglycemic rats. **Food bioscience**, v. 41, n. 100937, p. 100937, 2021.

KEARLEY, J.; ROBINSON, D. S.; LLOYD, C. M. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 122, n. 3, p. 617- 624.e6, 2008.

KEMPKES, R. W. M.; JOOSTEN, I.; KOENEN, H. J. P. M.; HE, X. Metabolic pathways involved in regulatory T cell functionality. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2839, 2019.

KHAN, M. A. Regulatory T cells mediated immunomodulation during asthma: a therapeutic standpoint. **Journal of translational medicine**, v. 18, n. 1, p. 456, 2020.

KIM, D. I.; SONG, M.-K.; LEE, K. Comparison of asthma phenotypes in OVA-induced mice challenged via inhaled and intranasal routes. **BMC pulmonary medicine**, v. 19, n. 1, p. 241, 2019.

KIM, S.-H.; HONG, J.-H.; LEE, Y.-C. Oleanolic acid suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Th2-mediated allergic asthma by modulating the transcription factors T-bet, GATA-3, ROR γ t and Foxp3 in asthmatic mice. **International immunopharmacology**, v. 18, n. 2, p. 311–324, 2014.

KOS, K. *et al.* Tumor-educated Tregs drive organ-specific metastasis in breast cancer by impairing NK cells in the lymph node niche. **Cell reports**, v. 38, n. 9, p. 110447, 2022.

KOSHAK, A.; WEI, L.; KOSHAK, E.; WALI, S.; ALAMOUDI, O.; DEMERDASH, A.; QUTUB, M.; PUSHPARAJ, P. N.; HEINRICH, M. Nigella sativa supplementation improves asthma control and biomarkers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Phytotherapy research: PTR*, v. 31, n. 3, p. 403–409, 2017.

KUROWARABE, K.; ENDO, M.; KOBAYASHI, D.; HAYASAKA, H. CXCL12-stimulated lymphocytes produce secondary stimulants that affect the surrounding cell chemotaxis. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 28, n. 101128, p. 101128, 2021.

LI, X.; ZHENG, Y. Regulatory T cell identity: formation and maintenance. **Trends in immunology**, v. 36, n. 6, p. 344–353, 2015.

LIANG, P.; PENG, S.; ZHANG, M.; MA, Y.; ZHEN, X.; LI, H. Huai Qi Huang corrects the balance of Th1/Th2 and Treg/Th17 in an ovalbumin-induced asthma mouse model. **Bioscience reports**, v. 37, n. 6, p. BSR20171071, 2017.

LIN, C.-C. *et al.* Shegan-Mahuang Decoction ameliorates asthmatic airway hyperresponsiveness by downregulating Th2/Th17 cells but upregulating CD4+FoxP3+ Tregs. **Journal of ethnopharmacology**, v. 253, n. 112656, p. 112656, 2020.

LIU, J.; XIONG, H.; CHENG, Y.; CUI, C.; ZHANG, XIAN; XU, L.; ZHANG, XUEMEI. Effects of taraxasterol on ovalbumin-induced allergic asthma in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n. 3, p. 787–793, 2013.

LIU, Y.; ZHANG, P.; LI, J.; KULKARNI, A. B.; PERRUCHE, S.; CHEN, W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. **Nature immunology**, v. 9, n. 6, p. 632–640, 2008.

LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 12, p. 838–848, 2010.

LU, L.; CHEN, J.; LI, M.; TANG, L.; WU, R.; JIN, L.; LIANG, Z. β -carotene reverses tobacco smoke-induced gastric EMT via Notch pathway in vivo. **Oncology reports**, 2018.

LUO, P. *et al.* Celastrol induces ferroptosis in activated HSCs to ameliorate hepatic fibrosis via targeting peroxiredoxins and HO-1. **Acta pharmaceutica Sinica. B**, v. 12, n. 5, p. 2300–2314, 2022.

LUO, W.; HU, J.; XU, W.; DONG, J. Distinct spatial and temporal roles for Th1, Th2, and Th17 cells in asthma. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 974066, 2022.

MALKO, D.; ELMZZAHI, T.; BEYER, M. Implications of regulatory T cells in non-lymphoid tissue physiology and pathophysiology. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 954798, 2022.

MANARIN, G.; ANDERSON, D.; SILVA, J. M. E.; COPPEDE, J. DA S.; ROXO-JUNIOR, P.; PEREIRA, A. M. S.; CARMONA, F. Curcuma longa L. ameliorates asthma control in children and adolescents: A randomized, double-blind, controlled trial. *Journal of ethnopharmacology*, v. 238, n. 111882, p. 111882, 2019.

MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R.; GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA) PROGRAM. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 469–478, 2004.

MASPERO, J. et al. Type 2 inflammation in asthma and other airway diseases. *ERJ open research*, v. 8, n. 3, p. 00576–02021, 2022.

MASYITA, A.; MUSTIKA SARI, R.; DWI ASTUTI, A.; YASIR, B.; RAHMA RUMATA, N.; EMRAN, T. B.; NAINU, F.; SIMAL-GANDARA, J. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food chemistry: X**, v. 13, n. 100217, p. 100217, 2022.

MATHUR, S.; HOSKINS, C. Drug development: Lessons from nature. **Biomedical reports**, v. 6, n. 6, p. 612–614, 2017.

MEWALAL, R.; RAI, D. K.; KAINER, D.; CHEN, F.; KÜLHEIM, C.; PETER, G. F.; TUSKAN, G. A. Plant-derived terpenes: A feedstock for specialty biofuels. **Trends in biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 227–240, 2017.

MIZUI, M. Natural and modified IL-2 for the treatment of cancer and autoimmune diseases. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 206, p. 63–70, 2019.

MORIANOS, I.; SEMITEKOLOU, M. Dendritic cells: Critical regulators of allergic asthma. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 7930, 2020.

MOSNAIM MD, G.; BIZIK MD, B. K.; WILSON PA-C, C.; BENSCH PA-C, G. Efficacy and safety of add-on tiotropium in the management of uncontrolled asthma: a patient case series. **The Journal of asthma: official journal of the Association for the Care of Asthma**, v. 59, n. 6, p. 1231–1236, 2022.

NAKAMUTA, J. S.; PUGLIA, A. L. P.; MEIRELES, P.; BLANCO, D. C.; LIMA, M. A.; BIRCK, M. G.; BRAGA, M. C.; OLIVEIRA, R. W. DE; JULIAN, G. S.; FORESTIERO, F. J. Asthma control in Brazil: a systematic review. *The Journal of asthma: official journal of the Association for the Care of Asthma*, v. 60, n. 5, p. 868–880, 2023.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NIERO, R.; ANDRADE, S. F. DE; CECHINEL FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the Maytenus genus. *Current pharmaceutical design*, v. 17, n. 18, p. 1851–1871, 2011.

NUNES, C.; PEREIRA, A. M.; MORAIS-ALMEIDA, M. Asthma costs and social impact. **Asthma research and practice**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

OH, E.; HONG, J.; YUN, C.-O. Regulatory T cells induce metastasis by increasing $\text{tgf-}\beta$ and enhancing the epithelial–mesenchymal transition. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 11, p. 1387, 2019.

OHUE, Y.; NISHIKAWA, H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? **Cancer science**, v. 110, n. 7, p. 2080–2089, 2019.

PACHECO, J. R. S.; AZEVEDO, P. V. M.; PADILHA, A. R. G.; MONTEIRO, F. DO N.; BRANCO, L. A. M.; FACHIN, L. P. Perfil epidemiológico da Asma em unidades hospitalares de Alagoas: Epidemiological profile of Asthma in hospital units in Alagoas. *Brazilian Journal of Development*, p. 60009–60015, 2022.

PACIFIC NORTHWEST NATIONAL LABORATORY (U.S.); UNITED STATES. DEPARTMENT OF ENERGY. OFFICE OF SCIENTIFIC AND TECHNICAL INFORMATION. **A survey of opportunities for microbial conversion of Biomass to hydrocarbon compatible fuels**. United States Department of Energy, 2010.

PAVÓN-ROMERO, G. F.; SERRANO-PÉREZ, N. H.; GARCÍA-SÁNCHEZ, L.; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, F.; TERÁN, L. M. Neuroimmune pathophysiology in asthma. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 663535, 2021.

PEREIRA BESERRA, F.; XUE, M.; MAIA, G. L. DE A.; LEITE ROZZA, A.; HELENA PELLIZZON, C.; JACKSON, C. J. Lupeol, a pentacyclic triterpene, promotes

migration, wound closure, and contractile effect in vitro: Possible involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK pathways. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 11, p. 2819, 2018.

PITCHON, R. R.; ALVIM, C. G.; ANDRADE, C. R. DE; LASMAR, L. M. DE L. B. F.; CRUZ, Á. A.; REIS, A. P. D. Asthma mortality in children and adolescents of Brazil over a 20-year period. *Jornal de pediatria*, v. 96, n. 4, p. 432–438, 2020.

PRETORIUS, E. Corticosteroids, depression and the role of serotonin. **Reviews in the neurosciences**, v. 15, n. 2, p. 109–116, 2004.

PROVOOST, S.; MAES, T.; VAN DURME, Y. M.; GEVAERT, P.; BACHERT, C.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; BRUSSELLE, G. G.; JOOS, G. F.; TOURNOY, K. G. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. **Allergy**, v. 64, n. 10, p. 1539–1546, 2009.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 42, n. 1, p. 15–31, 2016.

RIDOLO, E.; PUCCIARINI, F.; NIZI, M. C.; MAKRI, E.; KIHLOGREN, P.; PANELLA, L.; INCORVAIA, C. Mabs for treating asthma: omalizumab, mepolizumab, reslizumab, benralizumab, dupilumab. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 16, n. 10, p. 2349–2356, 2020.

RUSS, B. E.; PRIER, J. E.; RAO, S.; TURNER, S. J. T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Frontiers in genetics*, v. 4, p. 218, 2013.

SANTOS, M. G.; ALMEIDA, V. G.; AVELAR-FREITAS, B. A.; GRAEL, C. F. F.; GREGÓRIO, L. E.; PEREIRA, W. F.; BRITO-MELO, G. E. A. Phytochemical screening of the dichloromethane □ ethanolic extract of *Eriosema campestre* var. *macrophyllum* roots and its antiproliferative effect on human peripheral blood lymphocytes. **Revista brasileira de farmacognosia: orgao oficial da Sociedade Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 4, p. 464–470, 2016.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23–43, 2002.

SHI, B.; LIU, S.; HUANG, A.; ZHOU, M.; SUN, BOYUN; CAO, H.; SHAN, J.; SUN, BO; LIN, J. Revealing the mechanism of friedelin in the treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology and experimental verification. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2021, p. 4451779, 2021.

SOLEÉ, D. et al. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: nine-year follow-up study (2003-2012). *Jornal de pediatria*, v. 91, n. 1, p. 30–35, 2015.

SOMANTRI, A. D.; KURNIA, D.; ZAINUDDIN, A.; DHARSONO, H. D. A.; SATARI, M. H. Action mode of ursolic acid as a natural antioxidant and inhibitor of superoxide dismutase: In vitro and in silico study. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 12, n. 4, p. 389–394, 2021.

SOMWONG, K.; LERTPATIPANPONG, P.; NIMLAMOOD, W.; PANYA, A.; TRAGOOLPUA, Y.; YONGSAWAS, R.; GRITSANAPAN, W.; PANDITH, H.; BAEK, S. J. Effect of *Holoptelea integrifolia* (Roxb.) Planch. N-hexane extract and its bioactive compounds on wound healing and anti-inflammatory activity. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 23, p. 8540, 2022.

STELLING-FÉREZ, J.; GABALDÓN, J. A.; NICOLÁS, F. J. Oleonic acid stimulation of cell migration involves a biphasic signaling mechanism. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 15065, 2022.

STIRBULOV, R.; LOPES DA SILVA, N.; MAIA, S. C. O. M.; CARVALHO-NETTO, E.; ANGELINI, L. Cost of severe asthma in Brazil-systematic review. **The Journal of asthma: official journal of the Association for the Care of Asthma**, v. 53, n. 10, p. 1063–1070, 2016.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2, p. S73–S80, 2010.

SUBASH-BABU, P.; LI, D. K.; ALSHATWI, A. A. In vitro cytotoxic potential of friedelin in human MCF-7 breast cancer cell: Regulate early expression of Cdkn2a and pRb1, neutralize mdm2-p53 amalgamation and functional stabilization of p53. **Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 69, n. 8, p. 630–636, 2017.

SUNIL, C.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. leaves. **Food chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 860–865, 2013.

TAWILA, A. M.; SUN, S.; KIM, M. J.; OMAR, A. M.; DIBWE, D. F.; AWALE, S. A triterpene lactone from *Callistemon citrinus* inhibits the PANC-1 human pancreatic cancer cells viability through suppression of unfolded protein response. **Chemistry & biodiversity**, v. 17, n. 10, p. e2000495, 2020.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 1–8, 2019.

THIBAUT, F. Corticosteroid-induced psychiatric disorders: genetic studies are needed. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 269, n. 6, p. 623–625, 2019.

TO, T.; STANOJEVIC, S.; MOORES, G.; GERSHON, A. S.; BATEMAN, E. D.; CRUZ, A. A.; BOULET, L.-P. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC public health**, v. 12, n. 1, 2012.

VASCELLARI, M.; CAPELLO, K.; STEFANI, A.; BIANCOTTO, G.; MORO, L.; STELLA, R.; POZZA, G.; MUTINELLI, F. Evaluation of thymus morphology and serum cortisol concentration as indirect biomarkers to detect low-dose

dexamethasone illegal treatment in beef cattle. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 129, 2012.

VASCONCELOS, J. F.; TEIXEIRA, M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUEIROZ, L. P. DE; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1216–1221, 2008.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 7, p. 523–532, 2008.

WALSH, G. M. Anti-IL-5 monoclonal antibodies for the treatment of asthma: an update. **Expert opinion on biological therapy**, v. 20, n. 10, p. 1237–1244, 2020.

WANG, C.; TANG, J.; QIAN, B.; ZENG, Z.; GAO, Y.; SONG, J.-L. Rubusoside alleviates the ovalbumin-induced mice allergic asthma by modulating the NF- κ B activation. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 5, p. e13187, 2020.

WIEST, M.; UPCHURCH, K.; YIN, W.; ELLIS, J.; XUE, Y.; LANIER, B.; MILLARD, M.; JOO, H.; OH, S. Clinical implications of CD4⁺ T cell subsets in adult atopic asthma patients. **Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, v. 14, n. 1, 2018.

WILLOUGHBY, J. A., Sr; SUNDAR, S. N.; CHEUNG, M.; TIN, A. S.; MODIANO, J.; FIRESTONE, G. L. Artemisinin blocks prostate cancer growth and cell cycle progression by disrupting Sp1 interactions with the cyclin-dependent kinase-4 (CDK4) promoter and inhibiting CDK4 gene expression. **The journal of biological chemistry**, v. 284, n. 4, p. 2203–2213, 2009.

WÓJCIK-PSZCZOŁA, K.; POCIECHA, K.; CHŁOŃ-RZEPA, G.; ZADROŻNA, M.; NOWAK, B.; PLUTECKA, H.; KOCZURKIEWICZ-ADAMCZYK, P.; PRZEJCZOWSKA-POMIERNY, K.; PEKALA, E.; GOSENS, R.; WYSKA, E. Inhaled pan-phosphodiesterase inhibitors ameliorate ovalbumin-induced airway inflammation

and remodeling in murine model of allergic asthma. **International immunopharmacology**, v. 119, n. 110264, p. 110264, 2023.

WU, S.; YANG, R.; WANG, G. Anti-asthmatic effect of pitavastatin through aerosol inhalation is associated with CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells in an asthma mouse model. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 6084, 2017.

YAGHOUBI, M.; ADIBI, A.; SAFARI, A.; FITZGERALD, J. M.; SADATSAFAVI, M. The projected economic and health burden of uncontrolled asthma in the United States. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 200, n. 9, p. 1102–1112, 2019.

YANG, Z.; LI, X.; FU, R.; HU, M.; WEI, Y.; HU, X.; TAN, W.; TONG, X.; HUANG, F. Therapeutic effect of Renifolin F on airway allergy in an ovalbumin-induced asthma mouse model in vivo. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 12, p. 3789, 2022.

YI, J.; ZHU, R.; WU, JIANPING; WU, JING; XIA, W.; ZHU, L.; JIANG, W.; XIANG, S.; TAN, Z. In vivo protective effect of betulinic acid on dexamethasone induced thymocyte apoptosis by reducing oxidative stress. **Pharmacological reports: PR**, v. 68, n. 1, p. 95–100, 2016.

ZAROBKIEWICZ, M. K.; WAWRYK-GAWDA, E.; KOWALSKA, W.; JANISZEWSKA, M.; BOJARSKA-JUNAK, A. $\gamma\delta$ T lymphocytes in asthma: A complicated picture. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 69, n. 1, p. 4, 2021.

ZHANG, J.; ZOU, Y.; CHEN, L.; XU, Q.; WANG, Y.; XIE, M.; LIU, X.; ZHAO, J.; WANG, C.-Y. Regulatory T cells, a viable target against airway allergic inflammatory responses in asthma. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 902318, 2022.

ZHANG, S. Q.; LIN, K. L.; LAW, C. Y.; LIU, B.; FU, X. Q.; TSE, W. S.; WONG, S. S. M.; SZE, S. C. W.; YUNG, K. K. L. Oleanolic acid enhances neural stem cell migration, proliferation, and differentiation in vitro by inhibiting GSK3 β activity. **Cell death discovery**, v. 4, n. 1, p. 48, 2018.

ZHANG, W.; LI, W.; DU, J. Association between dietary carotenoid intakes and the risk of asthma in adults: a cross-sectional study of NHANES, 2007-2012. **BMJ open**, v. 12, n. 6, p. e052320, 2022.

ZHAO, H.; WU, L.; ZHANG, Y.; FENG, S.; DING, Y.; DENG, X.; FENG, R.; LI, J.; MA, T.; HUANG, C. Betulinic acid prevents liver fibrosis by binding Lck and suppressing Lck in HSC activation and proliferation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 296, n. 115459, p. 115459, 2022.

ZHU, X.; CUI, J.; YI, L.; QIN, J.; TULAKE, W.; TENG, F.; TANG, W.; WEI, Y.; DONG, J. The role of T cells and macrophages in asthma pathogenesis: A new perspective on mutual crosstalk. **Mediators of inflammation**, v. 2020, p. 7835284, 2020.

ZUO, J.; WEN, M.; LI, S.; LV, X.; WANG, L.; AI, X.; LEI, M. Overexpression of CXCR4 promotes invasion and migration of non-small cell lung cancer via EGFR and MMP-9. **Oncology letters**, v. 14, n. 6, p. 7513–7521, 2017.