



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - SBFIS

LAÍS FERRAZ BRITO SOUSA

**Avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória,
antioxidante e antitumoral da associação de β -cariofileno e
ácido docosahexanóico em modelos experimentais**

Vitória da Conquista, BA
2022

LAÍS FERRAZ BRITO SOUSA

Avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral da associação de β -cariofileno e ácido docosahexanóico em modelos experimentais

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas / Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Barreto Campos

Vitória da Conquista, BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

S725

Sousa, Laís Ferraz Brito

Avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral da associação de β -cariofileno e ácido docosahexanóico em modelos experimentais / Laís Ferraz Brito Sousa --Vitória da Conquista, 2022.

152 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Coorientador: Prof. Guilherme Barreto Campos

Tese (Doutorado – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2022.

1. Inflamação. 2. Terapêutica. 3. *β -cariofileno*. 4. Ácido Docosahexanóico. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Marques, Lucas Miranda. III. Campos, Guilherme Barreto. IV. Título.

CDU: 615.276

Elaborado por Marcos Aurélio Ribeiro da Silva CRB5/1858.

LAÍS FERRAZ BRITO SOUSA

Avaliação das atividades biológicas da associação de β -cariofileno e ácido docosahexanóico em modelos experimentais in vitro e in vivo.

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia.

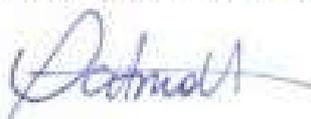
Vitória da Conquista – BA, 12 de agosto de 2022.



Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Orientador)
Universidade Federal da Bahia



Prof.ª Dr.ª Dalana Silva Lopes (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia



Prof.ª Dr.ª Regiane Yatsuda (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Fabricio Freire de Melo (Examinador)
Universidade Federal da Bahia



Prof.ª Dr.ª Hellen Braga Martins Oliveira (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

À Deus, toda honra e glória por esta vitória! Tão grata, Senhor, por ter me concedido a dádiva de viver e crescer, me fortalecendo sempre mais com Teu amor. Aos amigos espirituais, por todo cuidado e orientação.

Aos meus pais, Maria José e Ivânio, por todo amor, proteção, dedicação e pelos tão úteis ensinamentos – sem vocês, literalmente, eu nada seria. Ao meu esposo, Uelton, pelo aconchego, carinho, companheirismo e compreensão. Ao nosso filho, Martin, luz da minha vida, maior demonstração do amor de Deus por mim, minha maior dádiva é ser sua mãe. À minha avó Lelina, meu tesouro. Ao meu padrinho Weliton (*in memoriam*) e família, empre grata pelo zelo e incentivo à educação. Aos demais familiares, amigos e colegas de trabalho, muito obrigada pelo apoio e torcida.

De todo coração, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, por ter aceitado me guiar nessa caminhada, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, por ter me auxiliado com tanta compreensão, paciência e tranquilidade, por ter me corrigido e me ensinado tanto. Eu nunca vou conseguir agradecer o suficiente!

Ao incrível grupo do Projeto Micro, em especial, a Anne, Beatriz, Bruna, Deborah, Hellen, Jana, July, Karol, Lucas, Manoel e Mariane. Sem vocês, não teria sido possível chegar até aqui. Às colegas do 103, que me ajudaram muito nessa caminhada, Lorena e Talita, muito obrigada. Ao professor Bruno Moreira e ao seu aluno Breno, pela imensa contribuição com o ensaio antioxidante. À professor Daiana e aos seus alunos Luísa e Vinícius, por todo auxílio com o desenvolvimento da etapa antitumoral.

Aos professores Regiane, Gil, Telma, Amélia, Guilherme e Robson, por cada pedacinho de conhecimento adquirido com vocês ao longo desses anos. Aos componentes da banca: titulares, Daiana, Fabrício, Hellen e Regiane, e suplentes, Amélia, Erika, Nathan e Telma, por terem aceitado o convite.

Àqueles que fazem parte dos meus 15 anos de UFBA, queridos professores que nunca deixarão de ser fontes de amizade e inspiração (Luiz Gustavo, Cláudio, Márcio Vasconcelos e Maria Paula) e demais funcionários do IMS.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

SOUSA, Laís Ferraz Brito. **Avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral da associação de β -cariofileno e ácido docosahexanóico em modelos experimentais.** 2022. 152 f. Tese (Doutorado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2022.

Introdução: Inflamação é uma resposta biológica complexa, causada por trauma, infecções, reações imunológicas ou presença de corpo estranho, que envolve os sistemas imune, autonômico, vascular e somatossensorial e cursa com a síntese de mediadores inflamatórios e indução de dor por ativação de nociceptores. Produtos naturais têm sido avaliados nesse contexto como alternativa terapêutica no combate a diversas doenças inflamatórias, infecciosas e neoplasias. Dentre eles, destacam-se os óleos essenciais de plantas aromáticas, como o β -cariofileno (BCP), e os ácidos graxos poli-insaturados, como o Ácido Docosahexanóico (DHA). **Objetivo:** Avaliar as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral da associação BCP-DHA em modelos experimentais. **Materiais e métodos:** Para tanto, os efeitos antinociceptivos foram avaliados em modelos animais através dos testes de contorção abdominal induzida por ácido acético (AC), do edema de pata induzido por injeção intraplantar de formalina (F) e da hipernocicepção de Von Frey (VF). Para determinar os efeitos anti-inflamatórios, monócitos isolados do sangue periférico de homens adultos participantes foram infectados com *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e incubados com tratamento, para posterior dosagem de citocinas e análise da expressão gênica. A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método DPPH. Foi realizado o ensaio de citotoxicidade para determinar a viabilidade celular das linhagens pulmonares maligna (A549) e normal (BEAS-2B) frente ao tratamento com BCP-DHA e, em seguida, foram feitos os testes de adesão e migração celular, bem como análise da expressão gênica com as doses das associações determinadas no teste anterior. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prisma 6.0, considerando $p < 0,05$. **Resultados:** Efeitos antinociceptivos foram observados nos três testes realizados (AC, F, VF) ao comparar os grupos controle (salina) e tratados com BCP-DHA, obtendo significância estatística ($p < 0,05$). Houve redução significativa dos níveis de GM-CSF, TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, bem como aumento de IL-10 nos grupos submetidos ao tratamento com a associação BCP-DHA, assim como regulação negativa da expressão dos genes envolvidos na cascata de sinalização inflamatória intracelular (IL-2, IL-6, IRF7, NLRP3 e TYK2) em todos os grupos que receberam o tratamento, independente da presença de infecção. No teste do DPPH apenas o BCP apresentou sequestro significativo de radicais livre, com EC 50 = 2,82 \pm 0,06 M. Houve atividade citotóxica significativa das 2 combinações de BCP-DHA testadas sobre linhagem tumoral A549, bem como importante inibição dos processos de adesão e migração celular. Observou-se subexpressão de genes envolvidos no ciclo celular, no reparo do DNA, da excisão de nucleotídeos, de bases mal pareadas e pós replicação, na manutenção de telômeros, oncogenes e supressores tumorais, sugerindo importante efeito sobre o ciclo celular das células tumorais. Diante disso, nossos resultados inferem fortemente que a associação

de BCP-DHA surge como uma possível nova alternativa terapêutica com efeitos analgésico, anti-inflamatório, pró-apoptótico e antiproliferativo.

Palavras-chave: Anti-inflamatório. Antinociceptivo. Produtos naturais. β -cariofileno. Ácido docosahexanóico.

ABSTRACT

SOUSA, Laís Ferraz Brito. **Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant and antitumor activities of the association of β -caryophyllene and docosahexaenoic acid in experimental models.** 2022. 152 f. Tese (Doutorado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2022.

Introduction: Inflammation is a complex biological response, caused by trauma, infections, immunological reactions or the presence of a foreign body, which involves the immune, autonomic, vascular and somatosensory systems and courses with the synthesis of inflammatory mediators and induction of pain by activating nociceptors. Natural products have been evaluated in this context as a therapeutic alternative in the fight against various inflammatory and infectious diseases and neoplasms. Among them, the essential oils of aromatic plants, such as β -caryophyllene (BCP), and polyunsaturated fatty acids, such as Docosahexaenoic acid (DHA) stand out. **Objective:** To evaluate the antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant and antitumor activities of the BCP-DHA association in experimental models. **Materials and methods:** For that, the antinociceptive effects were evaluated in animal models through the tests of abdominal writhing induced by acetic acid (AC), paw edema induced by intraplantar injection of formalin (F) and Von Frey hypernociception (VF). To determine the anti-inflammatory effects, monocytes isolated from peripheral blood of participating adult males were infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and incubated with treatment for subsequent cytokine measurement and gene expression analysis. The antioxidant capacity was evaluated by the DPPH method. The cytotoxicity assay was carried out to determine the cell viability of malignant (A549) and normal (BEAS-2B) lung strains against treatment with BCP-DHA, and then adhesion and cell migration tests were performed, as well as analysis of gene expression with the doses of the associations determined in the previous test. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prisma 6.0 software, considering $p < 0.05$. **Results:** Antinociceptive effects were observed in the three tests performed (AC, F, VF) when comparing the control (saline) and BCP-DHA treated groups, obtaining statistical significance ($p < 0.05$). There was a significant reduction in the levels of GM-CSF, $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 and IL-12, as well as an increase in IL-10 in the groups submitted to treatment with the BCP-DHA association, as well as negative regulation of the expression of genes involved in the intracellular inflammatory signaling cascade (IL-2, IL-6, IRF7, NLRP3 and TYK2) in all groups that received treatment, regardless of the presence of infection. In the DPPH test, only BCP showed significant scavenging of free radicals, with $\text{EC } 50 = 2.82 \pm 0.06 \text{ M}$. There was significant cytotoxic activity of the 2 combinations of BCP-DHA tested on A549 tumor cell line, as well as important inhibition of cell adhesion and migration processes. There was an underexpression of genes involved in the cell cycle, DNA repair, nucleotide excision, mismatched bases and post replication, maintenance of telomeres, oncogenes and tumor suppressors, suggesting an important effect on the cell cycle of tumor cells. Therefore, our results strongly infer that the association of BCP-DHA appears as a possible new therapeutic alternative with analgesic, anti-inflammatory, pro-apoptotic and antiproliferative effects.

Keywords: Anti-inflammatory. antinociceptive. Natural products. β -caryophyllene. Docosahexaenoic acid.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação de estado de saúde geral dos participantes..... 64

Tabela 2. Descrição de atividade antioxidante através do método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) com variação das doses de Beta-cariofileno (BCP) e ácido docosahexanóico (DHA) utilizadas e percentual de sequestro de radicais livres (FRS%)
..... 70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Prevalencia do MRSA no mundo. Percentual de *Staphylococcus aureus* isolados que são resistentes a oxacilina (isto é, isolados de *S. aureus* resistente à meticilina - MRSA). Dados incluem taxas agregadas de resistência. Dadas diferenças no escopo das coletas e métodos testados, deve-se ter cautela ao comparar dados entre os países. Dados representados são adaptados do Center for Disease Dynamics, Economics & Policy Resistance Map; dados para os seguintes países são adaptados da referência 223., Elsevier: Argélia, Bolívia, Brasil, Camarões, República Central da África, Chile, Colômbia, Egito, Hong Kong, Indonésia, Costa do Marfim, Japão, Quênia, Malta, Marrocos, Nigéria, Paraguai, Peru, Senegal, Cingapura, Coreia do Sul, Sri Lanka, Túnisia e Uruguai. Fonte: Lee et al. (2018) 32

Figura 2. Mediadores inflamatórios críticos para o microambiente tumoral. O microambiente inflamatório de um tumor é uma rede intrincada que consiste em vários tipos de células, citocinas, enzimas e vias de sinalização. A elevação de alguns tipos de citocinas está associada a indução e progressão de tumores. Elas estão envolvidas em um sistema coordenado, onde promovem desenvolvimento e nutrição das células neoplásicas, evasão do sistema imune, angiogênese e metástase. Fonte: Lan et al. (2021) 36

Figura 3. Efeitos imunomoduladores de diferentes produtos naturais de plantas na ativação e supressão de múltiplas vias de sinalização celulares. Diversos receptores de flores de crescimento (fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos) e suas respectivas vias de sinalização *downstream*, vias Ras-MAPK (como ERK/MAPK/JNK), via JAK/STAT, via PI3K/Akt, e fatores de transcrição como NF-κB e AP-1 são supressos pela imunomodulação de produtos naturais de plantas. Alguns induzem a supressão da p53 e resultam na fragmentação do DNA das células cancerígenas, com paralela alta indução de espécies reativas de oxigênio e indução da interrupção do ciclo celular e apoptose. Fonte: Aravindaram e Yang (2010)..... 42

Figura 4. Representação esquemática do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético..... 47

Figura 5. Representação esquemática do teste da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina..... 48

Figura 6. Representação esquemática do teste de pressão crescente na pata – hipernocicepção de Von Frey..... 49

Figura 7. Representação esquemática do isolamento de monócitos do sangue periférico humano, infecção com MRSA e tratamento com BCP-DHA..... 51

Figura 8. Figura 8. Número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos Balb-C. (A) Fêmeas. (B) Machos. (C) Comparação entre os sexos. S =salina; BCP= beta-cariofileno; DHA= ácido docosahexanóico; B/D= associação de BCP e DHA; I= indometacina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. I; c $p < 0.05$ vs. BCP; * $p < 0,05$ 59

Figura 9. Número de flinches apresentados por camundongos Balb-C após administração intraplantar de formalina (1,5%). (A) Fêmeas no período de 0 a 5 minutos. (B) Fêmeas no período de 5 a 30 minutos. (C) Machos no período de 0 a 5 minutos. (D) Machos no período de 5 a 30 minutos. (E) Comparação entre os sexos no tempo de 0 a 5 minutos. (F) Comparação entre os sexos no tempo de 0 a 5 minutos. S = salina; BCP = beta-cariofileno; DHA = ácido docosahexanóico; BD = associação de BCP e DHA; M = morfina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. M; c $p < 0.05$ vs. BCP; d $p < 0,05$ vs. BD; * $p < 0,05$ 61

Figura 10. Pesos das patas dos camundongos Balb-C que receberam injeção intraplantar de formalina (1,5%). (A) Fêmeas. (B) Machos. (C) Comparação entre os sexos. S = salina; BCP = beta-cariofileno; DHA = ácido docosahexanóico; B/D =

associação de BCP e DHA; M = morfina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. p < 0.05 vs. S..... 62

Figura 11. Intensidade de nocicepção pelo Δ limite de retirada da pata após injeção de Carragenina (100 ug) em camundongos Balb-C. (A) Fêmeas. (B) Machos. (C) Comparação entre os sexos. S = salina; BCP = beta-cariofileno; DHA = ácido docosahexanóico; BD = associação de BCP e DHA. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. a p < 0.05 vs. S; b p < 0.05 vs. BCP; * p < 0,05..... 63

Figura 12. Concentração das citocinas GM-CSF (A), TNF α (B), IL-1 β (C), IL-6 (D), IL-10 (E) e IL-12 (F) no sangue periférico de homens participantes. C = controle (salina estéril); BCP = beta-cariofileno; DHA = ácido docosahexanóico; B/D = associação de BCP e DHA, LPS = lipopolissacarídeos, C80 = cepa C80, IT B = infectado e tratado com BCP, IT D = infectado e tratado com DHA, IT B/D = infectado e tratado com associação BCP e DHA, TI B = tratado com BCP e infectado, TI D = tratado com DHA e infectado, TI B/D = tratado com associação de BCP e DHA e infectado. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. a p < 0.05 vs. C; b p < 0.05 vs. LPS; c p < 0,05 vs. C80..... 65

Figura 13. Análise de 84 genes envolvidos na resposta inflamatória do grupo de monócitos do grupo tratado com a associação de beta-cariofileno e ácido docosahexanóico (50+50 mg/dL) com o grupo somente infectado com *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * p < 0,05..... 67

Figura 14. Análise de 84 genes envolvidos na resposta inflamatória do grupo de monócitos infectados com *S. aureus* e tratado após 6h com a associação de beta-cariofileno e ácido docosahexanóico (50 + 50 mg/dL) com o grupo somente infectado com *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * p < 0,05..... 68

Figura 15. Análise de 84 genes envolvidos na resposta inflamatória do grupo de monócitos do grupo tratado com a associação de beta-cariofileno e ácido

docosahexanóico (50+50 mg/dL) e infectado com *S. aureus* resistente à metilina após 30 minutos com o grupo somente infectado com com *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * p<0,05..... 69

Figura 16. Análise da citotoxicidade da A549, por teste de MTT, mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA. Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média ± DPM. * p<0,05..... 71

Figura 17. Análise da citotoxicidade da BEAS-2B, por teste de MTT, mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA. Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média ± DPM. * p<0,05 72

Figura 18. Figura 18. Análise da citotoxicidade da A549 (A) e da BEAS-2B (B), mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA, sendo BD1 (7,8 ug/mL de BCP + 18 ug/mL de DHA) e BD2 (7,8 ug/mL de BCP + 72 ug/mL de DHA). Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média ± DPM. * p<0,05..... 72

Figura 19. Análise da adesão da A549 (A) e da BEAS-2B (B), mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA, sendo BD1 (7,8 ug/mL de BCP + 18 ug/mL de DHA) e BD2 (7,8 ug/mL de BCP + 72 ug/mL de DHA). Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média ± DPM. * p<0,05..... 73

Figura 20. Análise da migração da A549 (A) e da BEAS-2B (B), mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA, sendo BD1 (7,8 ug/mL de BCP + 18 ug/mL de DHA) e BD2 (7,8 ug/mL de BCP + 72 ug/mL de DHA). Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média ± DPM. * p<0,05..... 73

Figura 21. Análise da expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA, comparando A549 com BEAS-2B não tratadas. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * p<0,05..... 75

Figura 22. Análise da expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA, comparando células do grupo tratado com BCP-DHA (7,8 ug/mL + 18 ug/mL, respectivamente) com o grupo controle. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * p<0,05..... 76

Figura 23. Análise da expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA, comparando células do grupo tratado com BCP-DHA (7,8 ug/mL + 72 ug/mL, respectivamente) com o grupo controle. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * p<0,05..... 78

Figura 24. Caracterização da atividade anti-inflamatória do tratamento com BCP-DHA frente à infecção por MRSA. O reconhecimento de *Staphylococcus aureus* pelos receptores tipo toll-like presentes na membrana celular dá início a uma cascata de sinalização intracelular que resulta na dissociação do complexo NF-κB/IκB, translocação do NF-κB para o núcleo da célula e estímulo à síntese de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento com BCP-DHA atua inibindo diferentes vias que resultariam na ativação do NF-κB, regulando negativamente a expressão dos genes MD2, IRF7, NLRP3 e TYK2, o que culmina em menor síntese e atuação de citocinas pró-inflamatórias..... 84

Figura 25. Hallmarkers revisados do câncer. Fonte: Fouad, Aanei (2017)..... 88

Figura 26. Caracterização da atividade antitumoral do tratamento com BCP-DHA em linhagem de câncer pulmão A549. A expressão de genes envolvidos no ciclo celular, no reparo do DNA, da excisão de nucleotídeos, de bases mal pareadas e pós replicação foi inibida pelo tratamento contendo a associação de 7,8 ug/mL de BCP com 18 ug/mL de DHA..... 92

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL: ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
ACTB: Actin beta
APEX1: Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1
ATCC: American type culture collection
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRIP: ATR Interacting Protein
ATRX: ATRX Chromatin Remodeler
BARD1: BRCA1 Associated RING Domain 1
BAX: BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
BBC3: BCL2 Binding Component 3
BCP: Beta-cariofileno
BD: Beta-cariofileno + Ácido docosahexanóico
BLM: BLM RecQ Like Helicase
BRCA1: BRCA1 DNA Repair Associated
BRIP: BRCA1 Interacting Helicase 1
B2M: Beta-2-Microglobulin
CAAE: Certificado de apresentação para apreciação ética
CASP1: Caspase 1
CB2R: Receptor canabinoide tipo 2
C3: Complement C3
CCL2: C-C Motif Chemokine Ligand 2
CCL5: C-C Motif Chemokine Ligand 5
CCR4: C-C Motif Chemokine Receptor 4
CCR5: C-C Motif Chemokine Receptor 5
CCR6: C-C Motif Chemokine Receptor 6
CCR8: C-C Motif Chemokine Receptor 8
CD4: CD4 Molecule
CD8A: CD8a Molecule
CD14: CD14 Molecule
CD40: CD40 Molecule
CD40LG: CD40 Ligand

CD80: CD80 Molecule
CD86: CD86 Molecule
CDC25A: Cell Division Cycle 25A
CDC25C: Cell Division Cycle 25C
CDK7: Cyclin Dependent Kinase 7
CDKN1A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
c-DNA: DNA complementar
CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA: Comitê de ética no uso de animais
Cg: Carragenina
CHEK1: Checkpoint Kinase 1
CHEK2: Checkpoint Kinase 2
CIB2: Calcium and Integrin Binding Family Member 2
CID: Classificação Internacional de Doenças
CMSP: Células mononucleares do sangue periférico
COX: Ciclo-oxigenase
COX-1: Ciclo-oxigenase 1
COX-2: Ciclo-oxigenase 2
CPSP: Dor crônica pós-cirúrgica
CRP: C-Reactive Protein
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CRY1: Cryptochrome Circadian Regulator 1
CSF2: Colony Stimulating Factor 2
CSNK2A2: Casein Kinase 2 Alpha 2
CXCL10: C-X-C Motif Chemokine Ligand 10
CXCR3: C-X-C Motif Chemokine Receptor 3
DAMP: Padrões moleculares associados a danos
DDB1: Damage Specific DNA Binding Protein 1
DDB2: Damage Specific DNA Binding Protein 2
DDIT3: DNA Damage Inducible Transcript 3
DDX58: DExD/H-Box Helicase 58

DHA: Ácido docosahexanoico
DMEM: Dulbecco modification of minimum essential media
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPM: Desvio padrão da média
DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DRG: Gânglios da raiz dorsal
EC50: Effective concentration
ERCC1: ERCC Excision Repair 1, Endonuclease Non-Catalytic Subunit
ERCC2: ERCC Excision Repair 2, TFIIH Core Complex Helicase Subunit
ERN: Espécies reativas de nitrogênio
ERO: Espécies reativas de oxigênio
EXO1: Exonuclease 1
FANCA: FA Complementation Group A
FANCD2: FA Complementation Group D2
FANCG: FA Complementation Group G
FASLG: Fas Ligand
FBS: Fetal bovine serum
FEN1: Flap Structure-Specific Endonuclease 1
FOXP3: Forkhead Box P3
GATA3: GATA Binding Protein 3
GADD45A: Growth Arrest and DNA Damage Inducible Alpha
GADD45G: Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gamma
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H2AFX: H2A.X Variant Histone
HLA-A: Major Histocompatibility Complex, Class I, A
HLA-E: Major Histocompatibility Complex, Class I, E
HPRT1: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HUS1: HUS1 Checkpoint Clamp Component
ICAM1: Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN: Interferon
IFNA1: Interferon Alpha 1

IFNAR1: Interferon Alpha and Beta Receptor Subunit 1

IFNB1: Interferon Beta 1

INFG: Interferon Gamma

INFG1: Interferon Gamma Receptor 1

IL-1: Interleukin 1

IL-1A: Interleukin 1 Alpha

IL-1 β : Interleukin 1 Beta

IL1R1: Interleukin 1 Receptor Type 1

IL-2: Interleukin 2

IL-4: Interleukin 4

IL-5: Interleukin 5

IL-6: Interleukin 6

IL-8: Interleukin 8

IL-10: Interleukin 10

IL-12: Interleukin 12

IL-13: Interleukin 13

IL-17A: Interleukin 17A

IL-18: Interleukin 18

IL-23A: Interleukin 23A

IMS: Instituto Multidisciplinar em Saúde

IkB: Inibidor de KB

IRAK: IL-1 receptor-associated kinase

IRF3: Interferon Regulatory Factor 3

IRF7: Interferon Regulatory Factor 7

ITGAM: Integrin Subunit Alpha M

JAK2: Janus Kinase 2

LIG1: DNA Ligase 1

LOX: Lipo-oxigenase

LY96: Lymphocyte antigen 96

LYZ: Lysozyme

MAPK1: Mitogen-Activated protein kinases 1

MAPK8: Mitogen-Activated Protein Kinase 8

MAPK12: Mitogen-Activated Protein Kinase 12

MBD4: Methyl-CpG Binding Domain 4, DNA Glycosylase
MBL2: Mannose Binding Lectin 2
MCPH1: Microcephalin 1
MD2: Myeloid differentiation 2
MDC1: Mediator of DNA Damage Checkpoint 1
MDM2: Murine double minute 2
MHL1: MutL Homolog 1
MHL3: MutL Homolog 3
MPG: N-Methylpurine DNA Glycosylase
MPO: Myeloperoxidase
MRE11: MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease
mRNA: RNA mensageiro
MSH2: MutS Homolog 2
MSH3: MutS Homolog 3
MX1: MX Dynamin Like GTPase 1
Myd88: Myeloid differentiation protein
NaCl: Cloreto de sódio
NBN: Nibrin
NFAT1: Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB: Fator nuclear kappa B
NFKB1: Nuclear Factor Kappa B Subunit 1
NFKBIA: NFKB Inhibitor Alpha
NLRP3: NLR Family Pyrin Domain Containing 3
NOD1: Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 1
NOD2: Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2
NTHL1: Nth Like DNA Glycosylase 1
OGG1: 8-Oxoguanine DNA Glycosylase
PARP1: Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PBS: Phosphate-buffered saline
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PD-1: Programmed cell death-1
PGE2: Prostaglandina E2
PI3K/Akt: Fosfatidilinositol 3-quinase/Proteína quinase B

PMS1: PMS1 Homolog 1, Mismatch Repair System Component
PMS2: PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component
PNKP: Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase
PPM1D: Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1D
PPP1R15A: Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A
PRKDC: Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit
RAD1: RAD1 Checkpoint DNA Exonuclease
RAD9A: RAD9 Checkpoint Clamp Component A
RAD17: RAD17 Checkpoint Clamp Loader Component
RAD18: RAD18 E3 Ubiquitin Protein Ligase
RAD21: RAD21 Cohesin Complex Component
RAD50: RAD50 Double Strand Break Repair Protein
RAD51: RAD51 Recombinase
RAD51B: RAD51 Paralog B
RAG1: Recombination Activating 1
RBBP8: RB Binding Protein 8, Endonuclease
REV1: REV1 DNA Directed Polymerase
RNF168: Ring Finger Protein 168
RNF8: Ring Finger Protein 8
RORC: RAR Related Orphan Receptor C
RPA: RPA Interacting Protein
RPLP0: Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
RPMI: Roswell park memorial institute
RT - qPCR: Reverse transcription quantitative PCR
S. aureus: Staphylococcus aureus
SIRT1: Sirtuin 1
SLC11A: Solute Carrier Family 11 Member 1
SLC11A1: Solute Carrier Family 11 Member 1
SMC1A: Structural Maintenance Of Chromosomes 1A
SUMO1: Small Ubiquitin Like Modifier 1
STAT1: Signal Transducer and Activator Of Transcription 1
STAT3: Signal Transducer and Activator Of Transcription 3
STAT4: Signal Transducer and Activator Of Transcription 4

STAT6: Signal Transducer and Activator Of Transcription 6

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TAB: TAK1-binding proteins

TAK: TGF- β activated kinase-1

TBARS: Detecção de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TBX21: T-Box Transcription Factor 21

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β : Fator de crescimento e transformação beta

TGO: Transaminase glutâmico-oxalacética

TGP: Transaminase glutâmico-pirúvica

TICAM1: TIR Domain Containing Adaptor Molecule 1

TLR1: Toll-like Receptor 1

TLR2: Toll-like Receptor 2

TLR3: Toll-like Receptor 3

TLR4: Toll-like Receptor 4

TLR5: Toll-like Receptor 5

TLR6: Toll-like Receptor 6

TLR7: Toll-like Receptor 7

TLR8: Toll-like Receptor 8

TLR9: Toll-like Receptor 9

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

TOPBP1: DNA Topoisomerase II Binding Protein 1

TP53: Tumor Protein P53

TP53BP1: Tumor Protein P53 Binding Protein 1

TP73: Tumor Protein P73

TRAF: Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6

TYK2: Tyrosine Kinase 2

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

UFBA: Universidade Federal da Bahia

UNG: Uracil DNA Glycosylase

XPA: XPA, DNA Damage Recognition and Repair Factor

XPC: XPC Complex Subunit, DNA Damage Recognition and Repair Factor

XRCC1: X-Ray Repair Cross Complementing 1

XRCC2: X-Ray Repair Cross Complementing 2

XRCC3: X-Ray Repair Cross Complementing 3

XRCC6: X-Ray Repair Cross Complementing 6

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
O processo inflamatório	28
Infecções x Inflamação.....	31
Carcinogênese	34
Estresse oxidativo x Produtos naturais.....	40
3 OBJETIVOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Aspectos Éticos e Legais.....	46
4.3 Animais	46
4.4 Modelos Animais	47
4.4.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	47
4.4.2 Teste da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina.....	47
4.4.3 Avaliação da hipernocicepção - teste de pressão crescente na pata	48
4.5 Modelos <i>in vitro</i>	49
4.5.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo de monócito/macrófago humano	49
4.5.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH 53	
4.5.3 Avaliação da atividade antitumoral.....	54
4.6 Análise Estatística	57
BCP e DHA diminuem a nocicepção aguda e tardia.....	58
BCP isolado apresentou alto potencial antioxidante no método DPPH.....	69
BCP e DHA reduzem a viabilidade celular e capacidade invasiva da linhagem A549.....	70
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	116
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS.....	120
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	121
ANEXO C – ARTIGO SUBMETIDO A SCIENTIFIC REPORTS	123

1 INTRODUÇÃO

Inflamação é uma reação fisiológica a lesões e danos teciduais decorrentes da presença de trauma, infecção, corpo estranho ou reação imunológica (ETIENNE et al., 2021). O maior mecanismo de defesa está no sistema imune inato, onde na vigência de uma possível invasão de microrganismos ou células tumorais há ação de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. O sistema imune adaptativo inclui a atividade de células mais especializadas, como linfócitos B e T, na erradicação de patógenos através da produção de receptores específicos e anticorpos (AZAB et al., 2016). A inflamação cursa com a síntese de mediadores inflamatórios e indução de dor por ativação e sensibilização de nociceptores. A dor possui um papel crucial no organismo, protegendo contra estímulos nocivos e promovendo a reparação de injúrias locais (MATSUDA et al., 2019). À codificação e processamento neural do estímulo nocivo chama-se nocicepção, processo que se inicia com a transformação de estímulos ambientais (físicos ou químicos) em potenciais de ação nos receptores de dor, localizados nas fibras nervosas periféricas, e culmina na transferência destes para o sistema nervoso central, através da transdução de sinal (ALVES et al., 2017; MATSUDA et al., 2019).

Inflamar é, portanto, uma etapa vital para o organismo, pois contribui para o retorno da homeostasia. A nível tecidual os sinais inflamatórios de dor, rubor, calor, edema e perda de função são resultantes da atuação das respostas celulares ao dano (CHEN et al., 2018). Nesse ambiente diversos mediadores inflamatórios são sintetizados e secretados, sendo divididos em duas classes: pró e anti-inflamatórios. Dentre os pró-inflamatórios alguns exemplos são citocinas (interferons, interleucinas e fator de necrose tumoral alfa), quimiocinas (proteína quimioatraente de monócitos 1), eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos) e o fator de transcrição nuclear NF- κ B. A interleucina 10, no entanto, possui ambas as propriedades pró e anti-inflamatória, sendo, por isso, considerada regulatória (AZAB et al., 2016).

Uma das causas mais comuns e impactantes de inflamação na saúde pública é a infecção por *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-positiva, encontrada na microbiota nasal de 20 a 40% da população humana. A ruptura de barreiras mucosas e cutâneas por doenças crônicas, lesões de pele ou intervenções cirúrgicas propicia o acesso de *S. aureus* aos tecidos e/ou corrente sanguínea, causando a infecção (LEE et al., 2018). Pode ser sensível ao antibiótico meticilina (MSSA) ou resistente à meticilina (MRSA),

tendo esse último sido descrito pela primeira vez em 1961 e, desde então, tornou-se a principal causa de bacteremia, com piores desfechos clínicos, como endocardite, osteomielite, sepse e choque séptico, e altos custos hospitalares (HASSOUN et al., 2017; LEE et al., 2018). A progressão da infecção inicial culmina em complicações que tornam o paciente séptico eletivo para vaga em leito de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e o condicionam a pior prognóstico, além de apresentar custos substanciais às instituições de saúde (MARTIN, 2012).

Outra condição clínica associada a inflamação é o câncer, doença crônica de alta morbimortalidade, que configura há algum tempo um grande problema de saúde pública mundial e acometeu quase 20 milhões de pessoas no ano de 2020 (SUNG et al., 2020). O Instituto Nacional do Câncer (2019) estima que esta doença seja responsável por uma incidência de 625 mil novos casos por ano, no triênio 2020-2022, ressaltando o impacto do problema no país. A evolução epidemiológica do câncer está associada às transformações decorrentes dos processos de urbanização e industrialização, como migrações internacionais, mudanças nos padrões de produção e consumo de alimentos e bebidas, prática de atividade física, comportamento sedentário e obesidade. Além disso, deriva de alterações gênicas, herdadas geneticamente ou desenvolvidas após exposição a fatores ambientais (poluição, agentes tóxicos, radiação, oxidação, vírus, bactérias e substâncias químicas) (GARÓFOLO, 2012; WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2018; FRIEDENREICH et al., 2021).

Os mecanismos de ação responsáveis pelo processo inflamatório associado ao câncer ainda não são totalmente compreendidos devido ao complexo crosstalk entre genes oncogênicos e pró-inflamatórios. Porém, sabe-se de alguns mediadores moleculares que regulam tanto a inflamação quanto o câncer, como NF- κ B (fator nuclear kappa B) e STAT (signal transducer and activator of transcription), os quais têm sido considerados alvos promissores para prevenção e tratamento dessas doenças. Trabalhos evidenciam ainda relevante papel dos oncogenos [p.ex., Murine double minute 2 (MDM2) e Nuclear factor of activated T-cells (NFAT1)] e genes supressores tumorais (p.ex., p53) na inflamação relacionada ao câncer (ARAVINDARAM, YANG, 2010; QIN et al., 2017).

As células cancerígenas atuam de forma tão eficiente na síntese de fatores da inflamação, como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos para tornar viável o crescimento e a multiplicação do tumor, que o sistema imunológico do indivíduo não

consegue combater e reparar as lesões. Estas substâncias contribuem não somente para a proliferação celular como também para permeabilizar as barreiras ao redor e promover fluxo sanguíneo e de nutrientes através da angiogênese (BARRETO et al., 2011). A constante inflamação culmina em hipermetabolismo e hipercatabolismo, com estímulo à gliconeogênese, mobilização das reservas orgânicas de proteínas e lipídeos, intenso catabolismo muscular e adiposo (WAITZBERG, 2017). Junto a isso, ocorre hipóxia tecidual, aumento da síntese de lactato e dano endotelial devido a maior produção de radicais livres e consequente estresse oxidativo, sendo que estes são responsáveis pela progressão e a transformação tumoral (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

Nos últimos tempos, o interesse sobre os produtos naturais tem aumentado no contexto de inibição de radicais livres, atenuação da inflamação, assim como no segmento dos antibióticos e estudo de antineoplásicos (AZAB et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2021). Os produtos naturais são a maior fonte química de drogas anti-inflamatórias e antitumorais descobertas. Dentre eles, os sesquiterpenos são uma grande classe de metabólitos secundários derivados de plantas que exibem vários efeitos biológicos e já têm sido utilizados na medicina tradicional contra inflamação e câncer. Dentre os produtos naturais, óleos essenciais (OE), substâncias voláteis e de odor forte presentes em plantas aromáticas, têm sido estudados em vários contextos (FERREIRA, 2014; NEGREIROS, 2014). Dentre eles, o β -cariofileno (BCP) – um sesquiterpeno bicíclico encontrado, nos OE de *cannabis sativa*, canela, cravo, orégano, óleo-resina de copaíba e pimenta preta – se destaca em razão de suas propriedades anti-edematogênica, anti-inflamatória, antitumoral e bactericida (SCANDIFFIO et al., 2020). Ácidos graxos poli-insaturados como o ácido docosahexanóico (DHA), um derivado do ômega 3, também tem sido pesquisado na modulação da inflamação, por meio da síntese de mediadores bioativos atuantes na resolução da inflamação (SUN et al., 2018).

Tem sido demonstrado ainda que o BCP pode ter efeitos melhorados quando administrado juntamente com o DHA, mas, até então, apenas a atividade antinociceptiva desta combinação foi testada em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (FIORENZANI et al., 2014). Tomando este trabalho como base, selecionamos estas substâncias para investigação de seus efeitos biológicos. Em um estudo anterior analisamos a atividade anti-inflamatória da associação de β -cariofileno e ácido docosahexanóico em um modelo de sepse induzida por *S. aureus* com camundongos machos Balb/C (BRITO et al., 2019). Nele observamos efeito positivo na redução da

migração de neutrófilos no modelo de peritonite induzida por carragenina, redução da contagem total e diferencial de leucócitos após a infecção bacteriana, menor migração de neutrófilos nas análises histológicas de rim e pulmão e menor carga bacteriana no grupo tratado.

Diante das atividades biológicas já bem estabelecidas de cada composto isolado, esse estudo supõe uma nova alternativa terapêutica para modelos de dor, inflamação e câncer considerando a associação de beta-cariofileno e ácido docosahenoico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O processo inflamatório

Achados sobre inflamação são mais antigos do que a humanidade, sendo os primeiros sinais de processo inflamatório encontrados em ossos de dinossauros. O primeiro diagnóstico preciso de desordens inflamatórias data do século 19, em múmias egípcias, por Marc Armand Ruffer. No mesmo período, a análise da múmia de Ramses II permitiu inferir que o faraó sofria de aterosclerose. Os sinais cardinais da inflamação (dor, edema, rubor e calor) foram definidos por Aulus Cornelius Celsus (25 BC-50 AD), enciclopedista romano, em sua declaração ainda válida sobre o tema: “*Notae vero inflammationis sunt quatuor: rubor et tumor cum calore and dolore*” (CAVAILLON, 2021). Em acréscimo aos sinais clássicos da inflamação, perda da integridade tecidual e funcionalidade foram descritas posteriormente como consequências importantes da inflamação descontrolada (LAURIDSEN, 2018).

A inflamação é parte de uma resposta biológica complexa que, à princípio é genérica, mas também é considerada como um mecanismo de imunidade inata. Após contato com um fagócito, os patógenos/corpos estranhos são endocitados e destruídos por uma série de enzimas digestivas e espécies reativas de oxigênio produzidas dentro da célula. Esse processo é reconhecido como uma resposta inflamatória importante na resposta imune do hospedeiro (LAURIDSEN, 2018). Trata-se de uma reação protetiva envolvendo células imunes, veias e mediadores moleculares, cuja função é eliminar a causa inicial da injúria celular, limpar células necróticas e danos teciduais e iniciar o reparo tecidual. Estas reações devem ser rigorosamente controladas para restabelecer a homeostasia do hospedeiro e, nesse contexto, supressores da sinalização de citocinas são importantes reguladores (DELGADO-ORTEGA et al., 2013).

Caracterizado como um dos sinais cardinais, a dor tem função crucial no organismo, protegendo contra danos e proporcionando a reparação de injúrias locais (MATSUDA et al., 2019). O processo de nocicepção é a codificação e processamento neural do estímulo nocivo, iniciado com a transformação de estímulos ambientais (físicos ou químicos) em potenciais de ação nos receptores de dor, localizados nas fibras nervosas periféricas, finalizado com a transferência destes para o sistema nervoso central, através da transdução de sinal (ALVES et al., 2017). Os nociceptores primários

responsivos à lesão tecidual incluem fibras C não mielinizadas e fibras A δ mielinizadas que terminam na pele, músculos, articulações e órgãos viscerais, com seus corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e nos trigêmeos. Antigamente, a dor era descrita como nociceptiva ou neuropática, o que excluía muitos pacientes, visto que aqueles diagnosticados com fibromialgia ou lombalgia inespecífica, por exemplo, não contemplam uma ativação óbvia de nociceptores nem uma lesão ou doença comprovada do sistema somatossensorial. Por isso, novos descritores foram adicionados para melhor classificar os pacientes, a dor nociplástica e a dor musculoesquelética secundária crônica (TROUVIN, PERROT, 2019). A percepção de dor está tipicamente associada à inflamação. Quando aguda, a inflamação desempenha um papel protetor ou de sobrevivência removendo estímulos prejudiciais, iniciando o processo de cicatrização e restaurando a integridade do tecido (JI et al., 2018).

A liberação de citocinas e quimiocinas pelos nociceptores pode regular rapidamente células imunes e atrair células circulantes para o local da inflamação, envolvendo aferentes primários e corpos celulares no nervo e nos DRG. A quimiocina CCL2, por exemplo, é sintetizada por nociceptores e regula a ativação local de macrófagos no DRG após quimioterapia via sinalização, resultando na dor neuropática. Já a ativação de nociceptores como as fibras C produz inflamação neurogênica através da liberação de neuropeptídeos (p. ex., substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina ou prostanoídes) (BARAL, UDIT, CHIU, 2018). A inflamação neurogênica acontece resulta em rápido extravasamento de plasma e edema, mesmo antes da infiltração de células imunes, e exerce papel crucial em doenças inflamatórias, como asma e psoríase, assim como em outras condições de dor, como enxaqueca e síndrome da dor regional complexa após fratura óssea. A liberação espinal de IL-1 β promove sensibilização central e hipersensibilidade na dor inflamatória via regulação transcricional, causando upregulation da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e prostaglandinas E2 (PGE2) (JI et al., 2016).

A dor aguda é iniciada pela inflamação e tem função biológica de proteger a integridade tecidual. A cronificação é um processo mal adaptativo e não tem benefício fisiológico, sendo caracterizada por dor crônica (tipo queimação) assim como dor desencadeada em resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia) ou não nocivos (alodinia). Acredita-se que a dor crônica seja resultado da plasticidade neuronal nas vias de codificação da dor, ou seja, da sensibilização periférica dos neurônios sensoriais

primários dos gânglios da raiz dorsal e dos gânglios trigêmeos e da sensibilização dos neurônios que processam a dor na medula espinhal e no cérebro. Geralmente, cirurgias de grande porte resultam em alta incidência de dor crônica pós-cirúrgica (CPSP), com acometimento de 20% a 50% dos pacientes de toracostomias e mastectomias e até 80% de pós-amputações, sendo que 5% a 10% sofrem de dor crônica intensa. A dor crônica tem sido reconhecida como um estado de dor que continua além do tempo real de cura, faltando desta forma a função de alerta agudo da nocicepção biológica. A Classificação Internacional de Doenças (CID) define a dor crônica como aquela que persiste ou se repete por mais de três meses (MATSUDA et al., 2019).

Em comparação com a inflamação aguda, que pode transmitir sinais de alerta, a inflamação sustentada pode levar a doenças crônicas, como aterosclerose, dor crônica e câncer (CHEN et al., 2021). A dor crônica pode se apresentar como resultado de uma lesão ou doença, mas não é somente um sintoma e sim uma condição separada por si só, por isso, ela possui sua própria taxonomia e definição médica. De acordo com o Global Burden of Disease Study (2016), a alta prevalência de dor e doenças relacionadas é a principal causa de incapacidade e carga de doença mundial. São cerca de 1,9 bilhão de pessoas afetadas por dor de cabeça do tipo tensional recorrente, condição esta que caracteriza a dor crônica sintomática mais comum no mundo. Trata-se de um dos principais problemas de saúde pública que acomete 1 em cada 3 americanos e custa cerca de 635 bilhões de dólares por ano. Estima-se que 10,4% a 14,3% das pessoas que vivem com dor crônica apresentem dor crônica incapacitante de moderada a grave (MILLS, NICOLSON, SMITH, 2019).

Além do que se previa anteriormente, pesquisas demonstram que há interação bidirecional entre o sistema nervoso sensorial e o sistema imune, onde os nociceptores periféricos parecem “ouvir” as células imunes quando estas liberam citocinas. Mediadores inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α e IL-1 β) e quimiocinas pró-inflamatórias (como CCL2 e CCL5) se ligam aos nociceptores e assim os sensibilizam, estimulando diretamente os receptores expressos nos terminais e/ou corpos celulares dos nociceptores, como os receptores acoplados à proteína G, receptores ionotrópicos e receptores da tirosina quinase (JI et al., 2018).

Em contrapartida, os nociceptores também enviam sinais às células imunes, através da liberação de neuropeptídeos, citocinas, quimiocinas e microRNAs, para modular a atividade do sistema imunológico, por meio da atuação em células imunes residentes (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas). Desta forma, a dor não é só um sinal cardinal da inflamação, mas também participa regulando a imunidade. A literatura recente trata, inclusive, do crosstalk entre nociceptores e micróglia (macrófagos do sistema nervoso central), demonstrando que a ativação de receptores associados a processos infecciosos, como os toll-like (TLRs), em nociceptores libera CCL2, uma quimiocina pró-inflamatória, e, assim, ativa macrófagos e potencializa a dor patológica (CHEN et al., 2021).

Infecções x Inflamação

Uma das principais causas de inflamação são as infecções, dentre elas, de forma mais impactante, a sepse, que é um conjunto de manifestações graves no organismo, subsequentes a uma infecção inicial, que pode se concentrar em vários órgãos ou em apenas um, e implicar na falência orgânica devido à exacerbada resposta inflamatória desencadeada (ILAS, 2015). Os principais agentes etiológicos são bactérias, vírus e fungos, mas a infecção mais frequente decorre das respostas inflamatórias e metabólicas à presença de bactérias (gram-negativas ou gram-positivas) (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Staphylococcus aureus, bactéria gram-positiva, encontrada na microbiota nasal de 20% a 40% da população humana é uma das principais responsáveis por inflamação na saúde pública. Invade o organismo através da ruptura de barreiras mucosas e cutâneas, lesões de pele ou intervenções cirúrgicas, acessando tecidos e sangue (LEE et al., 2018). Foi descrita pela primeira vez em 1961, podendo ser sensível ao antibiótico meticilina (MSSA) ou resistente à meticilina (MRSA), e, desde então, tornou-se a principal causa de bacteremia, com piores desfechos clínicos, como endocardite, osteomielite, sepse e choque séptico, além de apresentar custos substanciais às instituições de saúde (MARTIN, 2012; HASSOUN et al., 2017). Segundo Evans et al. (2021), no Surviving Sepsis Campaign, entre pacientes com cultura positiva para MRSA, um atraso de 24-48 horas no início da antibioticoterapia pode estar associado

com maior mortalidade. A prevalência da resistência ao MRSA no mundo está ilustrada na Figura 1.

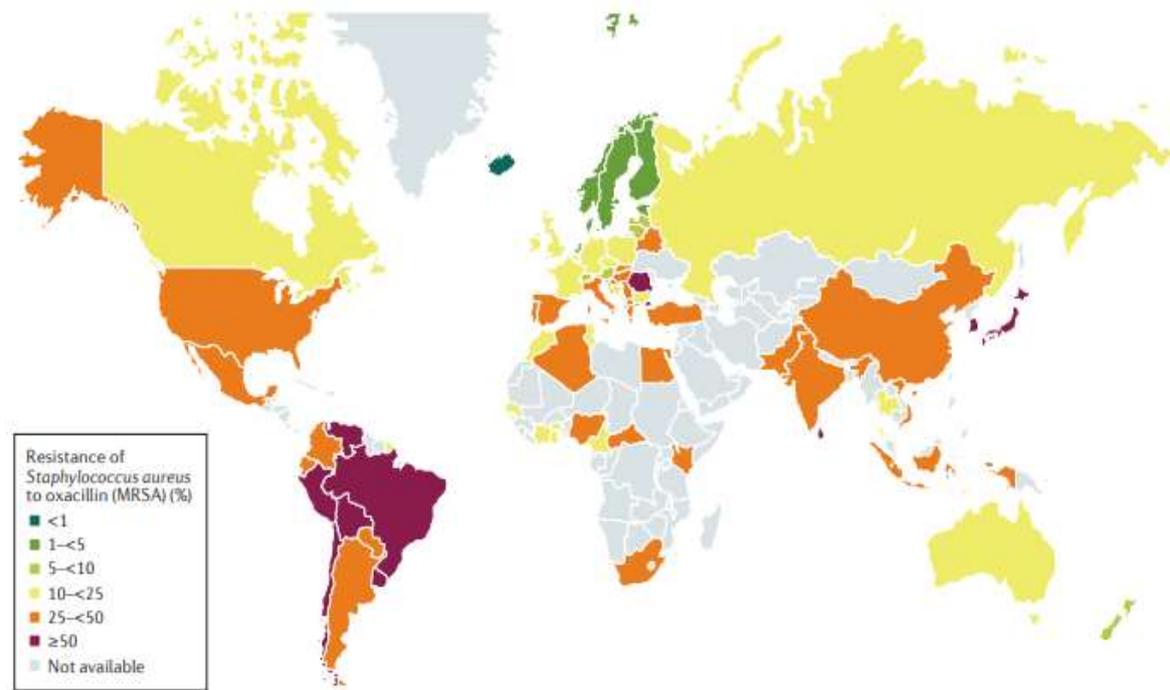


Figura 1. Prevalencia do MRSA no mundo. Percentual de *Staphylococcus aureus* isolados que são resistentes a oxacilina (isto é, isolados de *S. aureus* resistente à meticilina - MRSA). Dados incluem taxas agregadas de resistência. Dadas diferenças no escopo das coletas e métodos testados, deve-se ter cautela ao comparar dados entre os países. Dados representados são adaptados do Center for Disease Dynamics, Economics & Policy Resistance Map; dados para os seguintes países são adaptados da referência 223., Elsevier: Argélia, Bolívia, Brasil, Camarões, República Central da África, Chile, Colômbia, Egito, Hong Kong, Indonésia, Costa do Marfim, Japão, Quênia, Malta, Marrocos, Nigéria, Paraguai, Peru, Senegal, Cingapura, Coreia do Sul, Sri Lanka, Túnisia e Uruguai. Fonte: Lee et al. (2018).

A infecção promove no organismo tanto uma resposta pró-inflamatória quanto anti-inflamatória, no intuito de eliminar o patógeno e de restaurar danos teciduais e contribuir para cicatrização (ILAS, 2015). Portanto, um desequilíbrio destes mecanismos pode originar dano tecidual excessivo ou imunossupressão e susceptibilidade aumentada ao desenvolvimento de infecções secundárias, devido às respostas pró-inflamatória ou anti-inflamatória exacerbadas, respectivamente (CAWCUTT; PETERS, 2014). Além desta descompensação orgânica, outros fatores

possuem papel crucial na fisiopatologia da sepse, como estresse oxidativo, ativação celular e endotelial, liberação de citocinas pró-inflamatórias e anormalidades de coagulação, com estímulo excessivo da cascata e produção demasiada de fibrina, resultando em bloqueio do acesso do oxigênio aos tecidos e lesões inflamatórias (SILVEIRA et al., 2014).

Os metabólitos bacterianos atuam sobre o sistema imunológico de duas formas: diretamente, sobre o sistema complemento e algumas células (endoteliais, fagócitos, fibroblastos, linfócitos, leucócitos polimorfonucleares, etc) e, de forma indireta, induzindo uma cascata inflamatória por meio do estímulo à síntese de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon γ (IFN- γ) e interleucinas (IL) 1 β , IL-6, IL-4, IL-5 e IL-12, por macrófagos e monócitos (PRAUCHNER, 2016; KUMAR, 2020). O processo inflamatório primário da sepse é de responsabilidade da resposta imune inata, mediado pelos TLRs e CD14 (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). Quando ativados, os TLRs iniciam uma cascata de eventos intracelulares, cujo efeito final é a translocação nuclear do NF- κ B, o qual induz a expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e de moléculas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . Estas, por sua vez, ativam a resposta imune adaptativa que amplifica a imunidade inata (SZILÁGYI et al., 2020).

Alterações metabólicas e disfunções celulares se desenvolvem devido a uma condição de dano mitocondrial, chamada de hipóxia citopática, que bloqueia o metabolismo aeróbio, por meio da redução da síntese aeróbica de adenosina trifosfato (ATP), mesmo quando o fornecimento de oxigênio é suficiente (HUSSAIN et al., 2016). O comprometimento da fosforilação oxidativa na mitocôndria, associado à redução do fluxo sanguíneo nos capilares e diminuição do débito cardíaco, contribui para a elevação do metabolismo anaeróbio e hiperlactatemia, e, por fim, o desenvolvimento da falência orgânica (SCAINI et al., 2011). Além disso, há hipermetabolismo intencional, como resposta orgânica à presença da infecção, de forma a oferecer energia e substrato aos sistemas imune e de coagulação para lutar contra os patógenos, interromper sangramentos e restituir tecidos lesados (MORELLI; ENOKIDA, 2013). A liberação de hormônios catabólicos (glucagon, catecolaminas e glicocorticoides) agrava o quadro, gerando: hiperglicemia, resistência periférica à insulina e danos endoteliais; aumento da mobilização de gordura para geração de energia; intensa depleção proteica, com utilização do esqueleto carbônico para obtenção

energética, formação de proteínas de fase aguda, em detrimento da síntese de proteínas plasmáticas, e maior excreção urinária de nitrogênio (WAITZBERG, 2017; GHEORGHITĂ et al., 2015).

Carcinogênese

O termo câncer contempla uma centena de doenças que, em comum, apresentam a característica de crescimento celular desordenado, traduzindo-se em células malignas, de rápida proliferação, geralmente, invasivas e agressivas, capazes de se alastrar por tecidos e órgãos próximos ou distais, designando a metástase (BRITO et al., 2012; GARÓFOLO, 2012). A doença é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial, com estimativa de 25 milhões de novos casos em todo o mundo para 2020 e de 625 mil casos novos de câncer no Brasil no triênio 2020-2022. No geral, o tipo mais incidente é o de pele não melanoma; nos homens os mais incidentes são próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral; e nas mulheres, mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide (INCA, 2019). Com etiologia multifatorial, o câncer agrega a influência de fatores endógenos e exógenos na oncogênese. Consiste em componente endógeno a genética e constituem os fatores exógenos aqueles relacionados ao ambiente, como, por exemplo, alimentação pobre em fibras, vegetais e frutas e rica em nitritos e nitratos, tabagismo, etilismo, sedentarismo, estresse, obesidade e exposição à radiação ultravioleta (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2018). De acordo com Friedenreich et al. (2019), a carga ambiental é responsável por 1/3 dos casos de câncer no mundo e, portanto, cerca de 30% a 40% dos casos poderiam ser evitados. Sobre isso, Fishbein et al. (2020), concordam que controlar a inflamação e sua resolução serão um ponto crítico no sucesso da prevenção e tratamento do câncer.

A incidência da maioria dos tumores aumenta drasticamente com a idade e o câncer tem sido considerada a maior causa de morte entre homens e mulheres na faixa de 60-79 anos. A progressão tumoral requer mutações genéticas em vias de crescimento que levam ao fenótipo hiperproliferativo e mutações que inativam a apoptose. Muitos fatores associados com o envelhecimento celular, incluindo aumento do acúmulo de dano genômico (mutações pontuais, deleções e translocações), desgaste dos telômeros, alterações epigenéticas e desregulação da absorção de nutrientes, podem promover a carcinogênese. Fatores ambientais, aos quais somos expostos ao longo da vida, como

radiação ultravioleta, fumaça e poluição, contribuem para o acúmulo crônico de danos ao DNA e outros eventos associados com o envelhecimento celular (FANE, WEERARATNA, 2020).

Outro fator relacionado ao desenvolvimento tumoral que tem adquirido destaque na literatura é o microbioma. Integrantes da microbiota, juntamente com antígenos ambientais particulados não viáveis, são constantemente apresentados à mucosa e processados por células dendríticas e macrófagos. No sistema respiratório, microaspiração e bactérias presentes no trato respiratório inferior, semelhantes às da orofaringe, parecem ter papel central no seu desenvolvimento e inter-relacionam pulmão e intestino (COSTA et al., 2018). A comunidade microbiana de diferentes sítios corporais exerce papel fundamental na carcinogênese, podendo causar mudanças diretas nos processos de mutagênese, regulação de vias oncogênicas e modulação do sistema imune. A microbiota comensal atua sobre o microambiente imunológico, promovendo inflamação, redução da imunidade e interrompendo o crescimento tumoral (WONG-ROLLE et al., 2021). A análise do lavado broncoalveolar de pacientes com câncer e tumores benignos denotou a presença dos gêneros *Veillonella* e *Megasphaera* como preditores de câncer de pulmão, inferindo uma possível relação entre microbiota pulmonar alterada e câncer (VOGTMANN et al., 2016).

A inflamação crônica, induzida por agentes biológicos, físicos e químicos, pode estar associada com o aumento do risco de vários tipos de neoplasias. O link entre inflamação e câncer foi sugerido por estudos epidemiológicos e confirmado por terapias anti-inflamatórias que mostram eficácia na prevenção e tratamento do câncer. O fato da inflamação contínua durante longos períodos de tempo levar ao desenvolvimento tumoral foi descrito há muito tempo na medicina Ayurvedica, há cerca de 5000 anos. No século 19, Virchow descreveu que células inflamatórias estão presentes em tumores e que estes podem surgir em sítios crônicos de inflamação. Por isso, a inflamação é considerada como um alerta silencioso em doenças como o câncer (REUTER et al., 2010). Com isso, durante muito tempo a inflamação foi considerada como uma espada de dois gumes. Apesar do estímulo apropriado da inflamação ser capaz de induzir a elevação da resposta imune contra o câncer, estudos tem sugerido que fatores inflamatórios estão envolvidos no processo tumoral (GRETEN, GRIVENNIKOV, 2019).

Os processos inflamatórios participam na iniciação, promoção e metástase tumoral através de vários mecanismos. A iniciação tumoral envolve uma série de mutações genéticas e modificações epigenéticas que levam a ativação de vias tumorigênicas, bem como a perda da supressão tumoral. Em um ambiente inflamatório, macrófagos e neutrófilos são produtores ativos de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), causadores de dano ao DNA, intimamente associados com iniciação do processo neoplásico. O dano ao DNA induz, ainda, a liberação de citocinas, as quais regulam a expressão de vários genes, com superexpressão de oncogenes ou subexpressão de genes supressores tumorais. Há participação da inflamação também na progressão do câncer. O NF- κ B, por exemplo, controla a expressão de citocinas que regulam crescimento e migração tumoral. Mediadores como células e proteínas funcionais contribuem para angiogênese, inibição da resposta imune, regulação do metabolismo e outras atividades de suporte para promoção do câncer. A inflamação contribui, ainda, para o processo de metástase facilitando a invasão, o qual envolve migração celular, disseminação de células tumorais, sobrevivência das colônias metastáticas precoces e estabelecimento da transição epitélio mesenquimal (LAN et al., 2021), conforme ilustrado na Figura 2.

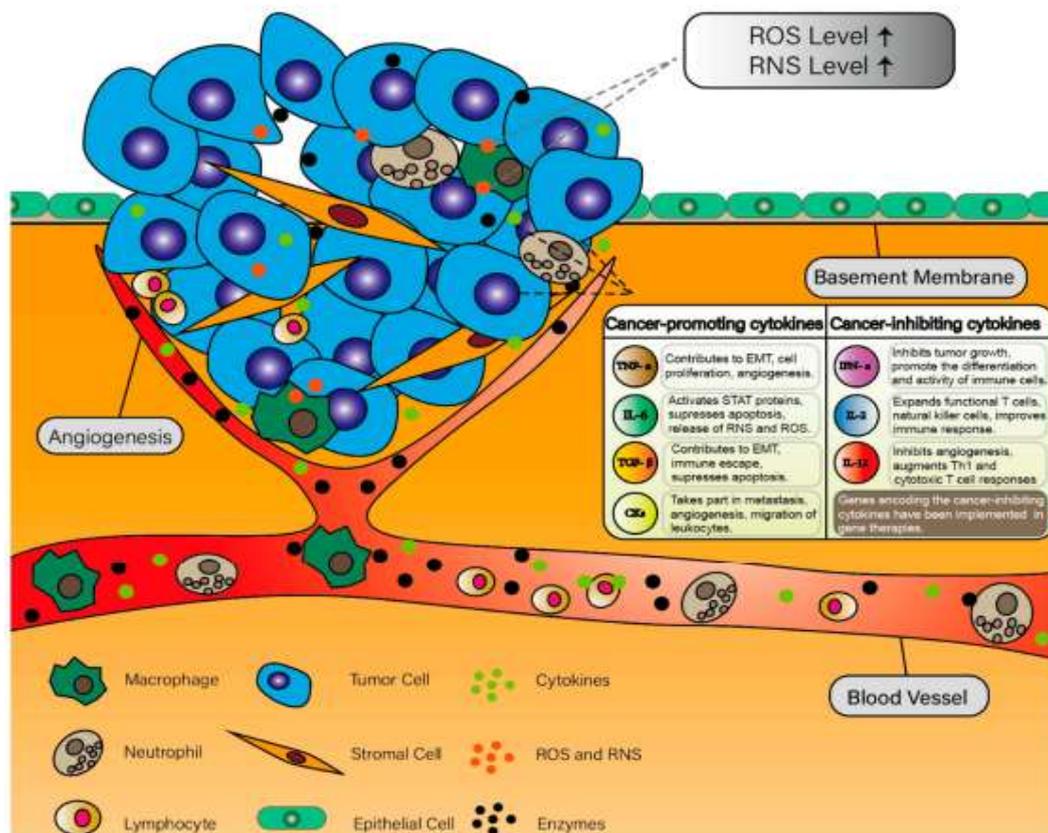


Figura 2. Mediadores inflamatórios críticos para o microambiente tumoral. O microambiente inflamatório de um tumor é uma rede intrincada que consiste em vários tipos de células, citocinas, enzimas e vias de sinalização. A elevação de alguns tipos de citocinas está associada a indução e progressão de tumores, envolvimento em um sistema coordenado, onde promovem desenvolvimento e nutrição, evasão do sistema imune, angiogênese e metástase. Fonte: Lan et al. (2021).

Do ponto de vista intracelular, genes são responsáveis pela síntese de proteínas e função metabólica. Variações genéticas naturais que ocorrem com uma certa frequência (1%-50%) na população geral são conhecidas como polimorfismos. O tipo mais comum de polimorfismo envolve a variação de uma base única, conhecido como polimorfismo de nucleotídeo único. Genes podem ser ativados ou inativados em resposta aos sinais metabólicos que o núcleo recebe da sinalização interna (como hormônios) ou fatores externos (como a dieta) (THEODORATOU et al., 2017). Duas propriedades relevantes das células tumorais, crescimento celular desordenado e habilidade de invasão, são resultado de alterações genéticas e epigenéticas, como mutações, instabilidade genômica, perda do heterozigoto e do imprinting. Estas modificações regulam a expressão sem alterar a sequência nucleotídica. (WANG et al., 2018).

Segundo Rahman et al. (2007), os genes relacionados com câncer são divididos em duas classes amplas, proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Proto-oncogenes, geralmente, estão envolvidos em vias que promovem o crescimento celular. Esses genes podem transformar células normais em neoplásicas por meio da ativação de mutações e alterações. As mutações em proto-oncogenes são dominantes na natureza, e as versões mutadas desses genes são conhecidas como oncogenes. Os genes supressores tumorais são considerados cruciais no reparo do dano ao DNA, inibição da divisão celular, indução de apoptose e supressão de metástase. Portanto, a perda da função desses genes pode resultar na iniciação e progressão tumoral. Estudos demonstram que uma única cópia de genes supressores tumorais é suficiente para controlar o processo de proliferação, mas a perda ou inativação de dois alelos desses genes culmina no desenvolvimento tumoral. Segundo Chen et al. (2021), os genes supressores tumorais são classificados em 5 tipos:

- 1) genes codificadores de proteínas intracelulares, que controlam a progressão em uma etapa específica do ciclo celular (p.ex.: pRB, p16);

- 2) genes codificadores de receptores ou transdutores de sinais de hormônios secretados ou sinais de desenvolvimento que inibem a proliferação celular (p.ex.: TGF- β);
- 3) genes codificadores de proteínas que controlam pontos chave do ciclo celular em resposta ao dano do DNA ou defeitos cromossomais (p.ex.: BRCA1, p16 e p14);
- 4) genes codificadores de proteínas que induzem apoptose (p.ex.: p53);
- 5) genes codificadores de proteínas envolvidas no reparo de erros do DNA (p.ex.: p53, MSH2).

Mais de 20% das neoplasias são associadas com inflamação crônica e desregulada. A inflamação crônica é comumente desencadeada pela ativação persistente do sistema imune, o que inevitavelmente resulta no acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas e, conseqüentemente, leva a transformação maligna (CHAI et al., 2015). Durante esse processo, muitos mediadores moleculares, incluindo citocinas, interleucinas, fatores de transcrição, genes supressores tumorais e oncogenes estão envolvidos no desenvolvimento do microambiente inflamatório tumoral. NF- κ B e STAT são fatores de transcrição pró-inflamatórios bem documentados que possuem participação fundamental na inflamação e no câncer. Após ativação induzida por estímulo inflamatório, o NF- κ B regula a transcrição da maior parte dos genes relacionados a inflamação e de genes relacionados a sobrevivência das células tumorais (como, c-Myc, ciclina D1 e Bcl-x1). A ativação do STAT contribui para o funcionamento da IL-6 e promove proliferação celular e oncogênese. Estudos indicaram que NF- κ B e STAT controlam a comunicação células tumorais e inflamatórias. Foi identificado que o NFAT desempenha importante papel na regulação da resposta inflamatória, desenvolvimento de câncer e metástase. Nos processos de iniciação e progressão foi bem estabelecida a atividade do HIF1 (hypoxia-inducible factor 1). Inibidores do oncogene MDM2 e ativadores da p53 têm sido desenvolvidos para prevenção e tratamento de câncer, sendo que alguns já estão em fase de ensaios clínicos. O MDM2 induz a expressão a nível transcricional do NF- κ B, independente da p53, e se liga diretamente aos dois primeiros sítios de ligação da p65, elevando sua expressão e ativando a expressão desse gene. Seus inibidores exercem potente efeito anti-inflamatórios em tecidos lesados através da inibição do NF- κ B (QIN et al., 2017).

Várias células imunes, incluindo macrófagos, células T CD4+, T citotóxicas CD8+, *natural killers*, células B, T reguladoras, células supressoras derivadas de mielóides e dendríticas, desempenham papéis fundamentais no processo patológico de

crescimento e desenvolvimento tumoral, assim como na resposta ao tratamento quimioterápico. Além disso, várias citocinas e quimiocinas inflamatórias (TGF- β , interleucinas, IFN- γ e TNF- α) podem ser sintetizadas e diversas vias de checkpoints imunológicos (como, PD-1, CTLA-4, NF κ B, PI3K/Akt, STAT e MAPK) podem ser ativadas na resposta imune do hospedeiro ao tumor (GALON, BRUNI, 2020). As principais funções do sistema imune no microambiente tumoral (TME) é monitorar a homeostase do tecido, proteger contra patógenos e invasores e agir na detecção e eliminação de células malignas. Porém, a disfunção imune resulta em escape das células tumorais da vigilância imunológica, reconhecimento imunológico e erradicação. Por isso, uma das vertentes atuais de estudo na área antitumoral tem sido a abordagem da imunoterapia tumoral, onde o próprio organismo do hospedeiro mobiliza suas células imunes para reconhecer e destruir as células tumorais (DENG et al., 2020).

Diversos tipos de tumores expressam níveis altos de espécies reativas e estão comumente expostos a situações de estresse, tais como hipóxia, perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, desequilíbrio no metabolismo oxidativo, além de fatores ambientais. Condições de estresse oxidativo causam lesões irreversíveis em lipídeos, proteínas e no DNA e participam de várias fases da transformação e progressão tumoral, estimulando a autossuficiência em sinais de crescimento, tornando a célula insensível aos sinais antiproliferativos, promovendo a evasão de apoptose, ativando o potencial replicativo ilimitado, a angiogênese sustentada, invasão e metástase, e aumentando metabolismo e inflamação (SILVA; JASIULIONIS, 2014). O crescimento tumoral acelerado ativa o sistema imunológico do indivíduo, e este, como forma de defesa, libera citocinas pró-inflamatórias no intuito de eliminar as células cancerosas. Todavia, a proliferação rápida e desmedida das células neoplásicas inviabiliza essa resposta, sequestra substratos proteico-energéticos para desenvolvimento e multiplicação celular e aumenta a produção de radicais livres e substâncias potencialmente catabólicas, como as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α (PATTERSON et al., 2018; CONLON et al., 2019). Estas induzem a proteólise muscular e a síntese de proteínas de fase aguda, e causam anorexia através da supressão dos centros de saciedade e do aumento da produção da lipoproteína lipase – enzima capaz de facilitar a liberação de ácidos graxos pelas lipoproteínas e propiciar a utilização destes como combustível energético pelos tecidos, aumentando o gasto energético do paciente (NI; ZANG, 2020).

Todas estas alterações modificam o metabolismo intermediário de macronutrientes, estimulando a gliconeogênese a partir da produção anaeróbia de lactato pela célula tumoral e a mobilização das reservas orgânicas de proteínas e lipídeos, e resultam no auge da desnutrição no câncer, denominado caquexia, cursando com intenso catabolismo muscular e adiposo e subsequente perda de peso, anemia, astenia e balanço nitrogenado negativo (WAITZBERG, 2017; NI; ZANG, 2020). Dadas todas estas alterações metabólicas, o paciente oncológico desenvolve imunocomprometimento e fragilidade orgânica, tanto em decorrência da doença quanto do seu próprio tratamento e, por isso, torna-se bastante susceptível à ocorrência de agravos da condição clínica capazes de agravar o quadro, como: constipação intestinal, desnutrição, dor, inapetência, hiperglicemia, mucosite e outras infecções, disfagia e odinofagia, náuseas e vômitos e xerostomia (GARÓFOLO, 2012).

Estresse oxidativo x Produtos naturais

Radicais livres (RL), ou espécies reativas, são espécies independentes que possuem um ou mais elétrons não pareados. Esta característica lhes confere maior reatividade química e grande instabilidade, pois, desta forma, tendem a agrupar o elétron não pareado com outro que esteja em estruturas próximas à sua formação (SILVA et al., 2010; COTINGUIBA et al., 2013). As principais espécies reativas são as de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). Podem ser formados a partir de fatores ambientais, como radiação, poluição, tabagismo e alimentação inadequada, ou produzidos durante o metabolismo aeróbico humano, em situações fisiológicas e com funções orgânicas, à exemplo do controle da pressão sanguínea, sinalização celular, apoptose, fagocitose de agentes agressores e fertilização (SILVA; FERRARI, 2011).

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou retardar o processo oxidativo por inativação de radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio ou elétrons (antioxidantes primários) ou por ligação a íons metálicos; inativação de EROs, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação UV (antioxidantes secundários) (SILVA et al., 2010). Os antioxidantes podem ser divididos em dois grupos: os enzimáticos, constituído das enzimas endógenas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase), e os não enzimáticos, composto de vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outras substâncias, como flavonoides,

licopeno e bilirrubina (VASCONCELOS et al., 2014). Em alimentos, as propriedades antioxidantes naturais estão associadas, especialmente, à presença de compostos fenólicos, carotenoides, vitamina E, vitamina C, zinco e selênio (OLIVEIRA, 2011).

Quando os RL são produzidos em excesso obrigam o organismo acionar seu sistema antioxidante para restabelecer o equilíbrio, pois o estresse oxidativo pode resultar em efeitos deletérios, como mutagênese, carcinogênese, lesão endotelial, progressão de doenças cardiovasculares e de infecções (VASCONCELOS et al., 2007; REUTER 2010). Durante a sepse, há um aumento exponencial da produção de radicais livres, ocasionando um estresse oxidativo, e uma diminuição das reservas antioxidantes corporais, o que dificulta a neutralização do excesso de pró-oxidantes circulantes e a atenuação do dano celular (LOBO; SANTOS, 2012). No câncer, a atuação dos radicais livres é paradoxal, pois se em condições fisiológicas os mesmos promovem estase do ciclo celular, senescência, apoptose, necrose e inibem a angiogênese, o estresse oxidativo promove dano direto ao DNA, estímulo à proliferação, invasividade, angiogênese, metástase e supressão da apoptose. O estresse oxidativo torna os antioxidantes endógenos incapazes de neutralizar a produção de substâncias nocivas. Ademais, falta de alguns desses mecanismos enzimáticos, como a cobre-zinco superóxido dismutase, a manganês superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, facilita o desenvolvimento de variedades de câncer (GARÓFOLO, 2012).

Há alguns anos, têm aumentado o interesse sobre o potencial terapêutico dos produtos naturais, principalmente, das indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. O reino animal é uma reserva ainda pouco conhecida que possui imensa riqueza de compostos naturais bioativos. Microorganismos e fungos também podem fornecer produtos biologicamente ativos, mas a maior parte dos estudos atuais focam na atividade biológica de produtos naturais provenientes de espécies de plantas (EKIERT, SZOPA, 2020). Historicamente, produtos naturais eram a fonte de praticamente todas as preparações medicinais e, recentemente, atividades antimicrobianas e antitumorais têm sido destacadas (Figura 3). Uma análise dos medicamentos novos aprovados pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos no período entre 1981 e 2010 revelou que 34% deles eram baseados em produtos naturais ou derivados diretos dos mesmos, incluindo estatinas, drogas antineoplásicas e imunossuppressores (HARVEY et al., 2015).

Dentre os produtos naturais, estão os óleos essenciais (OE), substâncias complexas e voláteis, naturalmente presentes em plantas aromáticas, que são assim chamados devido à sua composição à base de substâncias lipofílicas, que os diferem da composição glicerídica dos óleos e gorduras mais comuns (DING et al., 2010). Possuem uma variedade de propriedades medicinais (antimicrobianos, analgésicos, anti-inflamatórios, antitumorais, sedativos, espasmódicos e anestésicos locais) (NEGREIROS, 2014; HOFFMAN, 2020). Há, inclusive, estudos que demonstram a capacidade antibacteriana de diversos OE sobre a fase estacionária do *S. aureus*, o que equivale ao efeito *in vivo* da bactéria (XIAO et al., 2020).

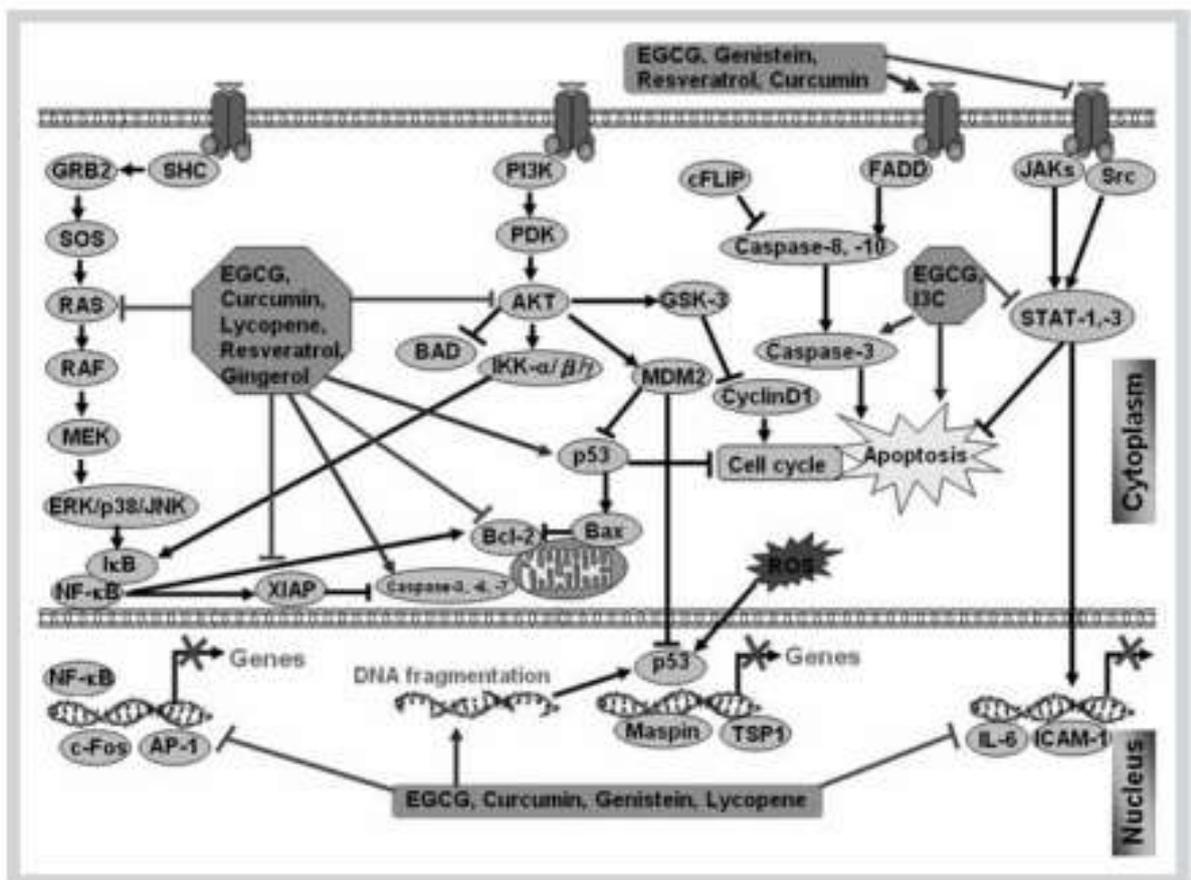


Figura 3. Efeitos imunomoduladores de diferentes produtos naturais de plantas na ativação e supressão de múltiplas vias de sinalização celulares. Diversos receptores de flores de crescimento (fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos) e suas respectivas vias de sinalização *downstream*, vias Ras-MAPK (como ERK/MAPK/JNK), via JAK/STAT, via PI3K/Akt, e fatores de transcrição como NF-κB

e AP-1 são supressos pela imunomodulação de produtos naturais de plantas. Alguns induzem a supressão da p53 e resultam na fragmentação do DNA das células cancerígenas, com paralela alta indução de espécies reativas de oxigênio e indução da interrupção do ciclo celular e apoptose. Fonte: Aravindaram e Yang (2010).

Dentre OE, neste estudo tratamos do β -cariofileno (BCP), um sesquiterpeno bicíclico encontrado, principalmente, nos óleos essenciais de canela, cravo, óleo-resina de copaíba e pimenta preta, teoricamente, com propriedades anti-edematogênica, anti-inflamatória, antitumoral, antialérgica, bactericida e repelente (ARIZUKA et al., 2017; RAMSEYA et al., 2020). Além das fontes naturais supracitadas, o BCP é um dos principais componentes (35%) do óleo essencial da *Cannabis sativa*, sob a isoforma (E)-BCP. Seu papel anti-inflamatório (na dose de 5 mg/kg), provavelmente, está relacionado à ligação seletiva ao sítio CP55,940 dos receptores canabinoides tipos 2 (CB2), os quais são responsáveis pela inibição da inflamação e formação de edema (GERTSCH et al., 2008). Os receptores CB2 estão presentes, principalmente, em células do sistema imune (linfócitos B >Natural Killer> monócitos > neutrófilos > linfócitos T CD8 > células TCD4), baço, timo e tronco encefálico (GALIÈGUEB et al., 1995). Efeitos anti-inflamatório e bactericida do BCP foram observados no controle de crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus* (KIM et al., 2008). Também foi demonstrado forte potencial antigenotóxico do BCP *in vivo* e atividade antioxidante e indutora da enzima Glutathione S-Transferase (GST), de forma dose-dependente (ÁLVAREZ-GONZÁLEZ et al., 2014). Em outro estudo, o BCP induziu a apoptose, por condensação da cromatina e fragmentação do DNA, e inibiu a clonogenicidade, migração e invasão celular (DAHAM et al., 2015).

Outro produto natural descrito na literatura, há quase 20 anos, é o ácido graxo poliinsaturado DHA, o qual possui atividade positiva na reperfusão sanguínea de locais com lesão renal aguda induzida por oclusão da artéria renal em camundongos, na dose de 4 mg/kg de DHA via injeção intraperitoneal, provavelmente, devido à inibição da produção de TNF- α e ativação do gene da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (KIELAR et al., 2003). Sua administração também foi capaz de reduzir o estresse oxidativo após injúria e de modular a resposta inflamatória pós-trauma (HUANG et al., 2007). Mediadores lipídicos derivados do seu metabolismo, como resolvinas e protectinas, são fortes contribuintes pró-resolutivos da última fase do processo

inflamatório, protegendo o organismo contra a exacerbação da resposta inflamatória (OZ; CHEN; NEUMAN, 2009).

Efeitos antinociceptivos do DHA foram abordados no trabalho de Nakamoto et al. (2010), os quais afirmaram que estes são dose-dependentes contra estímulos químicos e térmicos e que são anulados quando os animais são pré-tratados com naloxona (antagonista de receptor opioide), o que leva a crer que o DHA controla a dor por meio da atuação sobre receptores opioides. Slagsvold et al. (2010) relatam que o DHA aumentou a quimiosensibilidade das células neoplásicas, enquanto Rahman et al. (2013) afirmam que o DHA inibiu a migração de células cancerígenas da mama para os ossos e diminuiu a reabsorção óssea. Estes efeitos, provavelmente, estão associados à redução dos derivados lipídicos pró-inflamatórios, à inibição do NF-B e à diminuição da sinalização do receptor do fator de crescimento nas membranas lipídicas (FABIAN; KIMLER; HURSTING, 2015). A evidencia mais forte aponta que o DHA está relacionado a capacidade cognitiva e desenvolvimento visual. Ele é encontrado em altas concentrações em fosfolípídeos de membrana de neurônios, onde exerce diversos papéis fisiológicos, incluindo regulação da fluidez da membrana, liberação de neurotransmissores, expressão genica, mielinização e crescimento e diferenciação celular (RICHARD; CALDER, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar as atividades antinociceptivas, anti-inflamatórias, antioxidante e antitumoral da combinação do β -cariofileno (BCP) com o Ácido Docosahexanóico (DHA) em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos animais de ambos os sexos, tratados com BCP-DHA;
- Analisar o perfil de citocinas pró-inflamatórias produzido por cultura de monócitos humanos, tratados com BCP-DHA;
- Comparar a modulação de genes envolvidos nas respostas imune e inflamatória relacionados à infecção de monócitos humanos, tratados com BCP-DHA;
- Investigar o potencial antioxidante da associação BCP-DHA;
- Verificar a atividade antitumoral sobre linhagens de células tumorais pulmonares A549 e de células normais BEAS-2B, tratadas com BCP-DHA;
- Comparar a modulação de genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA, em linhagens de células tumorais pulmonares A549 e de células normais BEAS-2B, tratadas com BCP-DHA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos e Legais

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (IMS/UFBA) após aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) e do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia, sob protocolos nº 2.791.699 e 060/2018, respectivamente (Anexo A). Todos os procedimentos somente foram iniciados mediante a aprovação por este e após consentimento informado dos doadores (Anexo B). A cepa 80 de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) utilizada no estudo foi obtida de outro estudo, isolada do swab nasal de criança saudável (CARVALHO et al., 2017).

4.2 β -cariofileno e Ácido Docosahexanóico

Nos experimentos nós usamos β -cariofileno (BCP) e Ácido Docosahexanóico (DHA) comercializados pela Sigma Aldrich®. O DHA foi diluído em etanol 10%, conforme recomendação do fabricante.

4.3 Animais

Foram utilizados 168 camundongos, sendo 84 fêmeas e 84 machos, da linhagem Balb-C, com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos no Biotério para Camundongos do IMS/UFBA (6 animais por gaiola), sob condições controladas de luz (luzes acesas de 7 às 19 horas) e temperatura ($23\pm 3^\circ$ C) e tiveram livre acesso à água e à ração.

4.4 Modelos Animais

4.4.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Foram utilizados 30 camundongos (Balb-C) para cada sexo, em jejum de 12 horas, tratados com 24 horas de antecedência. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais, sendo administrado por via subcutânea:

- Grupo 1: solução de NaCl 0,9% (10 mg/kg)
- Grupo 2: BCP (5 mg/kg)
- Grupo 3: DHA (5 mg/kg)
- Grupo 4: BCP + DHA (2,5 mg/kg de cada)
- Grupo 5: indometacina (10 mg/kg)

No dia seguinte, os animais receberam uma injeção de ácido acético (0,6%; 10 mL/kg, intraperitoneal). As contorções abdominais, seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 20 minutos como indicativo de nocicepção (CRUZ et al., 2016), conforme ilustrado na Figura 4.

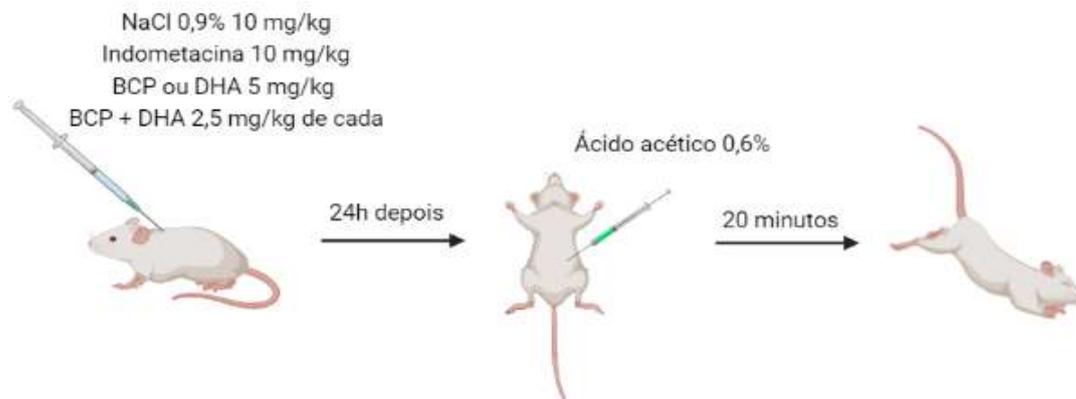


Figura 4. Representação esquemática do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

4.4.2 Teste da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina

Foram utilizados 30 camundongos (Balb-C) para cada sexo, em jejum de 12 horas, tratados com 24 horas de antecedência. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais, sendo administrado por via subcutânea:

- Grupo 1: solução de NaCl 0,9% (10 mg/kg)

- Grupo 2: BCP (5 mg/kg)
- Grupo 3: DHA (5 mg/kg)
- Grupo 4: BCP + DHA (2,5 mg/kg de cada)
- Grupo 5: morfina (5 mg/kg)

No dia seguinte, foi administrada uma solução de formalina na concentração de 1,5 % (formaldeído, intraplantar, 20 μ L), na pata posterior direita dos animais. Foi quantificado o número de flinches (sacudir da pata), durante um período de 30 minutos, como indicador de nocicepção. Os primeiros cinco minutos determinam resposta à dor de origem neurogênica, enquanto os 15 minutos finais determinam resposta à dor de origem inflamatória. Neste teste, também foi aferido o edema formado na pata direita, sendo calculada a diferença entre o peso da pata direita e o da pata esquerda através da pesagem das duas patas (CRUZ et al., 2016), conforme ilustrado na Figura 5.

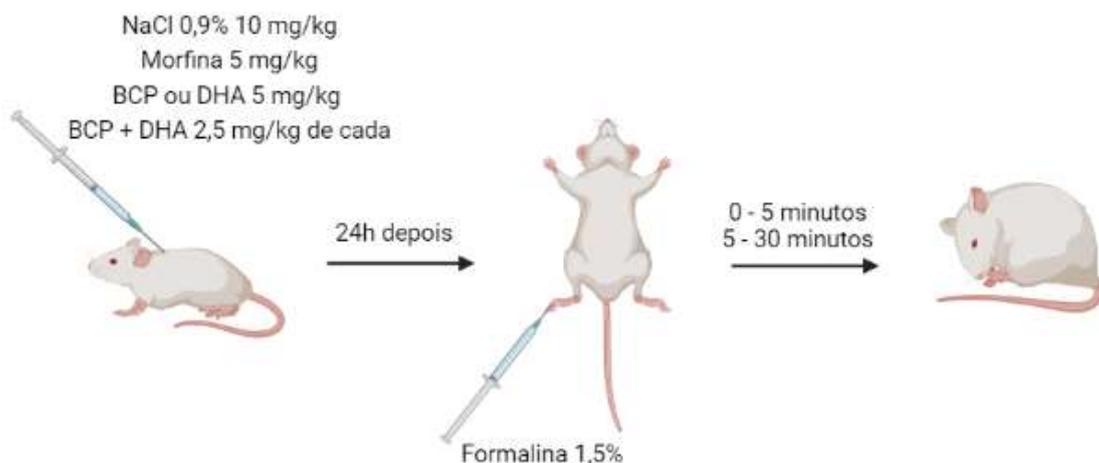


Figura 5. Representação esquemática do teste da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina.

4.4.3 Avaliação da hipernocicepção - teste de pressão crescente na pata

O Von Frey filamentos é um método para determinar nocicepção mecânica (FREY, 1896). Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha constituída de arame não maleável, durante 30 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. O teste consiste em produzir uma pressão na pata do animal com um transdutor de força de mão adaptado com uma ponta (0,8 mm² diâmetro da ponta, eletrônica de Von Frey, Insight Equipamentos©, Brasil). O estímulo foi automaticamente interrompido quando o animal apresentou uma resposta

caracterizada como sacudida (*flinches*) da pata estimulada, e a intensidade foi registrada. O intervalo entre dois ensaios consecutivos na mesma pata foi de pelo menos 1 min, totalizando seis ensaios de cada animal. A força máxima aplicada foi de 50 g.

Foram utilizados 24 camundongos (Balb-C) para cada sexo, em jejum de 12 horas, tratados com 24 horas de antecedência. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo administrado por via subcutânea:

- Grupo 1: solução de NaCl 0,9% (10 mg/kg)
- Grupo 2: BCP (5 mg/kg)
- Grupo 4: DHA (5 mg/kg)
- Grupo 5: BCP + DHA (2,5 mg/kg de cada)

No dia seguinte foi injetada carragenina (100 µg/pata, i.pl.) na superfície ventral da pata traseira direita dos animais e após 3 horas o teste Von Frey foi realizado. A intensidade de hipernocicepção constitui em quantificar a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora) do valor de reação (Figura 6).

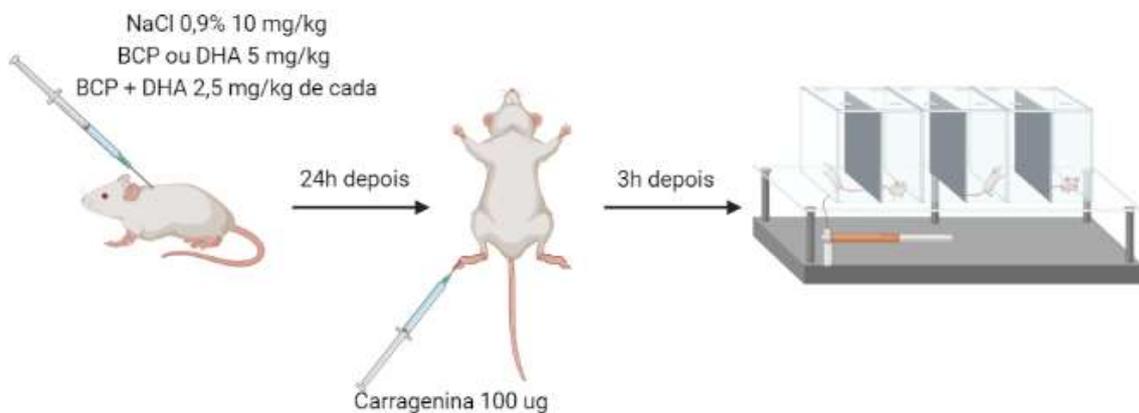


Figura 6. Representação esquemática do teste de pressão crescente na pata – hipernocicepção de Von Frey.

4.5 Modelos *in vitro*

4.5.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo de monócito/macrófago humano

4.5.1.1 Coleta e seleção de monócitos humanos

As coletas de sangue periférico foram realizadas com 3 participantes homens, maiores de 18 anos, que aceitaram participar do estudo, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Previamente, foram realizados exames laboratoriais (como hemograma, glicemia, perfil lipídico e transaminases hepáticas) para análise do estado de saúde dos participantes. As amostras de sangue (20 mL) foram mantidas refrigeradas e processadas em até 2 horas após a coleta. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram separadas por centrifugação em coluna de Ficol (200 x g durante 10 min a 4°C) e ressuspensas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (FBS, GIBCO BRL). Após a avaliação da quantidade e viabilidade adequada das células, estas foram mantidas por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂. Os monócitos foram incubados em estufa até o momento da inoculação e/ou tratamento com BCP e DHA (OLIVEIRA et al., 2021; AGNEW e COLDITZ, 2008; LEWANDOWSKA-SABAT et al., 2013).

4.5.1.2 Infecção de monócitos e tratamento com BCP-DHA

Monócitos foram previamente cultivados em frascos de poliestireno utilizando meios específicos para cada tipo celular (incubação: 37°C com 5% de CO₂). Ao atingir a confluência ideal de aproximadamente 70% (~10⁶/mL), as células foram infectadas com MRSA (1 x 10⁸) e incubadas previamente com BCP-DHA (Sigma Aldrich) na concentração de 1 mg/mL (total de 50 uL de cada, totalizando 100 µL), por 30 minutos a 37°C (10⁻¹⁰ a 10⁻⁷ M) (AOMATSU et al., 2013). Controles negativos, contendo as células infectadas sem tratamento ou não infectadas e tratadas também foram analisados. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Abaixo seguem os grupos do estudo:

- Controle negativo: injeção de salina, BCP, DHA ou B/D → coleta de sobrenadante após 6 horas.
- Infectado: LPS ou C80 → coleta de sobrenadante após 6 horas.
- Infectado e tratado: infecção com C80 → tratamento com BCP, DHA ou B/D após 6 horas → coleta de sobrenadante após 30 minutos.
- Tratado e infectado: tratamento com BCP, DHA ou B/D → infecção com C80 após 30 minutos → coleta do sobrenadante após 6 horas.

Após este processo e decorrido o tempo determinado da avaliação, o sobrenadante de cada cultura foi recolhido e congelado a -70°C para posterior dosagem da produção de citocinas (Figura 7). Para o ensaio de expressão gênica, as suspensões celulares foram transportadas para microtubos para a extração de RNA (ROSENDAL et al., 1995, LEWANDOWSKA-SABAT et al., 2013).

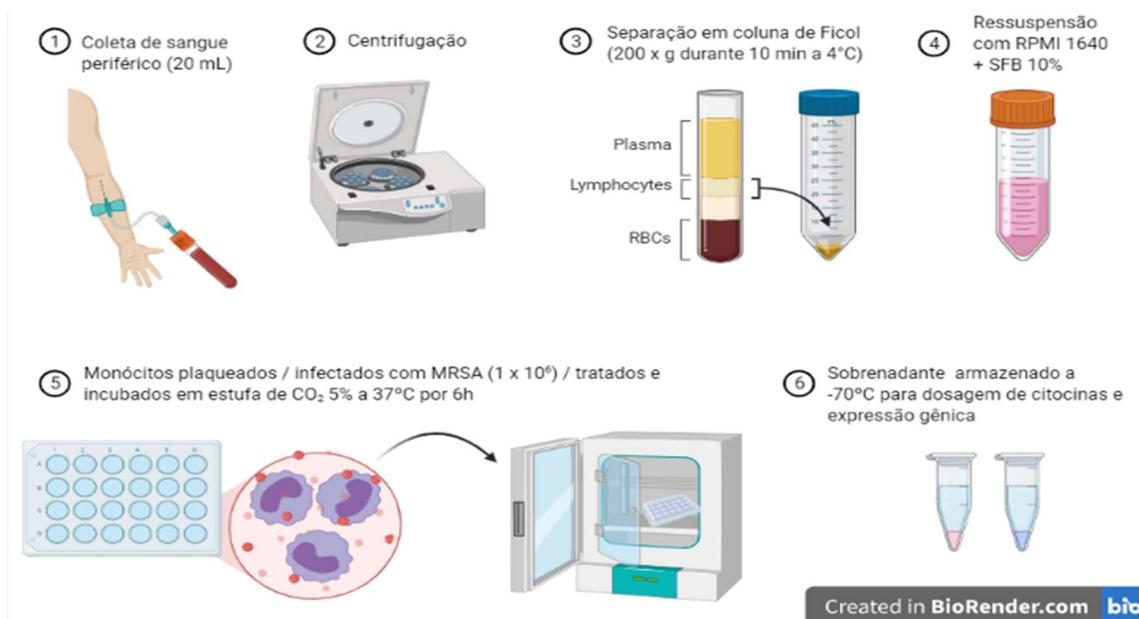


Figura 7. Representação esquemática do isolamento de monócitos do sangue periférico humano, infecção com MRSA e tratamento com BCP-DHA.

4.5.1.3 Dosagem das citocinas

A dosagem das citocinas foi realizada no sobrenadante da cultura celular, por meio do ensaio para detecção por citometria de fluxo, utilizando-se para isso, kit comercial Human Th1/Th2/Th17/Th22 13plex – Flow Cytomix (eBioscience: Bender Med Systems GmbH), para quantificar Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), Interleucina-1 ($\text{IL-1}\beta$), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-12 (IL-12) e Fator de Necrose Tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante dos anticorpos específicos. Para análise dos dados foi utilizado o Flow Cytomix Pro Software, conforme orientações do fabricante.

4.5.1.4 Análise de expressão gênica

A expressão gênica dos marcadores inflamatórios foi avaliada pela metodologia de PCR array. O mRNA das amostras de monócitos foi extraído com a utilização de TRIzol® LS (Life Technologies™) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A obtenção do cDNA foi feita por meio de uma retro-transcrição (RT) a partir do mRNA, utilizando-se o kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase com adição de oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm (OligodT) e inibidor de RNase. O cDNA obtido foi submetido a análise pelos kits Human Innate & Adaptive Immune Responses PCR Array (Qiagen-AS Bioscience), para a avaliação de 84 genes envolvidos na resposta do hospedeiro associada a inflamação e infecção bacteriana. Esses genes estão envolvidos na imunidade inata, adaptativa, humoral, resposta inflamatória, resposta de defesa a bactérias e vírus. São eles:

- Receptores de Reconhecimento Padrão: DDX58 (RIG-I), NLRP3, NOD1 (CARD4), NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9;
- Citocinas: CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10, IFNA1, IFNB1, IL18, IL1A, IL1B, IL2, IL8, TNF α ;
- Outros genes: APCS, C3, CASP1 (ICE), CD14, CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG (TNFSF5), CD8A, CRP, HLA-A, HLA-E, IL1R1, IRAK1, IRF3, IRF7, ITGAM, LY96 (MD-2), LYZ, MAPK1 (ERK2), MAPK8 (JNK1), MBL2, MPO, MX1, MYD88, NFKB1, NFKBIA, STAT1, TICAM1 (TRIF), TRAF6.
- Marcadores Th1/Resposta Imune: CCR5, CD80, CXCR3, IFNG, IL18, IL23A, SLC11A1, STAT4, TBX21, TLR4, TLR6;
- Marcadores Th2/Resposta Imune: CCR4, CCR8, CD86, GATA3, IFNB1, IL10, IL13, IL18, IL4, IL5, IL6, NOD2, STAT6;
- Marcadores Th17: CCR6, IL17A, RORC, STAT3;
- Marcadores Treg: CCR4, CCR8, FOXP3, IL10;
- Ativação Célula T: CD80, CD86, ICAM1, IFNG, IL23A, IL6, SLC11A.
- Citocinas: CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10 (INP10), IFNA1, IFNG, IL10, IL13, IL17A, IL18, IL2, IL23A, IL4, IL5, IL6, IL8, TNF α ; -
- Outros Genes: CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG (TNFSF5), CD8A, CRP, FASLG (TNFSF6), HLA-A, IFNAR1, IFNGR1, IL1B, IL1R1, IRF3, IRF7, ITGAM, JAK2, MAPK8 (JNK1), MBL2, MX1, NFKB1, RAG1, STAT1.

Imunidade humoral: C3, CCL2 (MCP-1), CCR6, CRP, IFNB1, IFNG, IL6, MBL2, NOD2, TNF α .

Resposta inflamatória: APCS, C3, CCL5 (RANTES), CRP, FOXP3, IL1A, IL1B, IL4, IL6, MBL2, STAT3, TNF α .

Resposta de defesa a bactérias: IFNB1, IFNG, IL23A, IL6, LYZ, MBL2, MYD88, NOD1 (CARD4), NOD2, SLC11A1, TLR1, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9, TNF α .

Resposta de defesa a vírus: CD4, CD40 (TNFRSF5), CD86, CD8A, CXCL10 (INP10), DDX58 (RIG-I), HLA-A, IFNAR1, IFNB1, IL23A, IL6, IRF3, NLRP3, TICAM1 (TRIF), TLR3, TLR7, TLR8, TYK2.

4.5.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH

A determinação da atividade antioxidante de BCP, DHA e da associação de ambos foi realizada de acordo com o proposto por Moreira et al. (2019), com uma solução metanólica estoque de DPPH (Sigma, 40 mg/mL) e soluções com os compostos isolados e associados, em doses diversas, preparados em metanol. As medições de absorvância das misturas de reações (300 mL de solução da amostra ou padrão ou metanol para controle e 2,7 mL de solução estoque DPPH) foram realizadas a 515 nm, imediatamente após 30 minutos de incubação da reação em temperatura ambiente, protegida da luz, em espectrofotômetro (Cary 50 UV-VIS, Varian, Austrália). A quercetina foi usada como padrão e foi preparada da mesma forma das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. A porcentagem de eliminação de radicais livres (% FRS) foi calculado como:

$$\% \text{ FRS} = [(AC - AS) / AC] \times 100$$

onde AC = absorvância final do controle, AS = absorvância final da amostra.

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (EC50), foi calculada por regressão linear, onde o eixo das abscissas representa a amostra (ug/mL) ou concentrações do controle positivo e a ordenada a porcentagem de sequestro de radicais livres (% FRS). Quando necessário, diluições foram realizadas nas concentrações das amostras e do padrão para permitir o cálculo do EC50.

4.5.3 Avaliação da atividade antitumoral

4.5.3.1 Linhagens celulares

O câncer de pulmão é o segundo mais comuns no mundo, contribuindo para 12,2% do total de novos casos diagnosticados em 2020, respectivamente (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2022). No Brasil, o câncer de pulmão está entre os cinco mais incidentes em ambos os sexos, de acordo com o INCA (2019). Por isso, a linhagem pulmonar foi selecionada para o presente estudo, visto que se trata de representante tumoral de impacto para homens e mulheres.

Por isso, selecionamos para o presente trabalho células humanas de câncer de pulmão (A549) e linhagem normal de pulmão (BEAS-2B), todas obtidas do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) e autenticadas pelo ATCC.

4.5.3.2 Cultura das células

Todas as células foram cultivadas em meio RPMI (Invitrogen) com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 und/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina ou canamicina, mantidas a 37°C em câmara incubadora com 5% de CO₂ e 95% de ar. As células foram passadas aproximadamente 2 vezes/semana e aquelas que atingirem confluência de 80-90% foram utilizadas para tratamento. A cultura e os ensaios antitumorais foram adaptadas do trabalho de Gimenes et al. (2017).

4.5.3.3 Ensaio de viabilidade/citotoxicidade por redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT))

A viabilidade de células tratadas com BCP (7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg/mL) e DHA (1,125; 2,256; 4,5; 9; 18; 36; 72 µg/mL) foi avaliada pelo método de MTT. As células foram plaqueadas ($1,5 \times 10^4$ células/poço) em placa de 96 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações BCP, DHA ou meio de cultura (grupo controle) por 24h, e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. No dia seguinte, as células foram incubadas com 5 mg/mL de MTT por 3 h a 37 °C. Cristais de formazano resultantes da redução de MTT foram dissolvidos com a adição de 100 µL de PBS contendo 10% de SDS e 0,01 M HCl (18 h, 37°C e 5% CO₂). A absorbância

(570 nm) foi lida em um espectrofotômetro scanner multipoços (Thermo Scientific).

4.5.3.4 Ensaio de adesão celular

Foi avaliada a capacidade do BCP-DHA de inibir a adesão celular. Para tanto, as células A549 e BEAS-2B (3×10^4 células/poço) foram pré-incubadas com duas diferentes concentrações de BCP-DHA [BD1 (7,8 ug/mL de BCP + 18 ug/mL de DHA) e BD2 (7,8 ug/mL de BCP + 72 ug/mL de DHA)] ou meio (controle) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 2 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. As células não aderidas foram removidas por lavagem com PBS e as células aderidas foram mensuradas pelo ensaio do MTT (item 4.5.3.3).

4.5.3.5 Ensaio de Migração (Motilidade) Celular

O ensaio de migração foi realizado utilizando inserto de cultura de células de poros de 8µM (Greiner Bio-One, Suíça). As células A549 e BEAS-2B foram pré-incubadas em meio sem SFB e com 2 diferentes concentrações de BCP-DHA [BD1 (7,8 ug/mL de BCP + 18 ug/mL de DHA) e BD2 (7,8 ug/mL de BCP + 72 ug/mL de DHA)] por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, células na concentração de 1×10^5 /transwell foram semeadas na câmara superior dos insertos. A câmara inferior foi preenchida com meio composto por 10% SFB. As células foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa de CO₂ 5%. As células que não migraram foram retiradas com swab, enquanto as células que migraram foram coradas com Kit Panotico (Laborclin, Brasil), fotografadas e contadas usando o software Image J (Wayne Rasband, NIMH, NIH, USA). O controle positivo foi composto por células com meio contendo SFB 10%, o controle negativo foi representado por células com meio sem SFB.

4.5.3.6 Análise de expressão gênica

Para a expressão gênica foi utilizado as células tratadas como no modelo de adesão. Para tanto, as células A549 e BEAS-2B (3×10^4 células/poço) foram pré-incubadas com duas diferentes concentrações de BCP-DHA [BD1 (7,8 ug/mL de BCP + 18 ug/mL de DHA) e BD2 (7,8 ug/mL de BCP + 72 ug/mL de DHA)] ou meio

(controle) por 30 minutos a 37°C. O RNA total foi extraído por meio da aplicação direta de 3mL de TRIzol (Invitrogen) por placa confluenta da cultura celular, transferido para tubos de 1,7mL e adicionado de 200µL de clorofórmio. Os tubos foram homogeneizados por 15 segundos (vórtex), incubados por 5 minutos e centrifugados a 14000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado 500 µL de Isopropanol, homogeneizado e acondicionado à -80°C pelo período mínimo de 16 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14000 g por 15 minutos a 4°C e o RNA precipitado lavado três vezes com etanol 75% a 4°C (preparado com água ultrapura livre de DNase/RNase) por meio de centrifugações de 15 minutos a 14000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado, os tubos com o sedimento foram invertidos para eliminar o excesso de etanol e o RNA ressuspendido em 100 µL de água ultrapura livre de DNase/RNase. As amostras foram tratadas com RQ1 RNase-free DNase® (PROMEGA, Wisconsin, EUA) e quantificadas por sua densidade óptica a 260nm. A pureza e qualidade da solução foram atestadas pelas razões 260/280nm e 260/230nm medidas no NanoDrop2000® (Thermo Scientific, Wilmington, DE). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (500ng de RNA por amostra). Baseado no menor valor de massa total entre todas as amostras, 550 ng de RNA foi submetido à transcrição reversa utilizando SuperScript™ III (Life Technologies, Carlsbad, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

O cDNA obtido foi submetido a análise pelo kit Human DNA Damage Signaling Pathway (Qiagen-SABioscience, Brasil). Todos os procedimentos e análise de dados foram realizados de acordo com as instruções e software do fabricante. O kit Human DNA Damage Signaling Pathway qPCR array (Qiagen) analisa a expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA. Os genes apresentados são aqueles associados à rede de sinalização ATR/ATM e aos alvos transcricionais da resposta a danos no DNA. Os danos no DNA podem resultar em parada do ciclo celular, apoptose e estabilização e reparo do genoma celular. São eles:

- Sinalização ATM/ATR: ATM, ATR, ATRIP, BARD1, BRCA1, CDC25A, CHEK1, CHEK2 (RAD53), CSNK2A2, FANCD2, H2AFX, HUS1, MDC1, PARP1 (ADPRT1), RAD1, RAD17, RAD50, RAD9A, RBBP8, RNF168, RNF8, SMC1A, TOPBP1, TP53 (p53).

- DNA Damage & Repair

Reparo por excisão de nucleotídeos (NER): CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2 (XPD), LIG1, NTHL1, OGG1, PCNA, PNKP, RPA1, SIRT1, TP53 (p53), XPA e XPC.

Reparo de excisão de base (BER): APEX1, FEN1, LIG1, MBD4, MPG, NTHL1, OGG1, PARP1 (ADPRT1), PCNA, TP53 (p53), UNG e XRCC1.

Reparo de incompatibilidade (MMR): ABL1, EXO1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, PCNA, PMS1, PMS2 e TP73.

Reparo de quebra de dupla fita (DSB): ATM, BLM, BRCA1, CHEK1, H2AFX, HUS1, LIG1, MDC1, MLH1, MRE11, NBN, PRKDC, RAD50, RAD51, RPA1, TP53BP1, XRCC2 e XRCC6.

Outros genes de reparo de DNA: ATR, ATRIP, ATRX, BARD1, BRIP1, CHEK2 (RAD53), CIB1, CRY1, FANCA, FANCD2, FANCG, GADD45A, GADD45G, RAD1, RAD17, RAD18, RAD21, RAD51B, RAD9A, RBBP8, REV1, RNF168, RNF8, SMC1A, SUMO1, TOPBP1, XRCC3.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). As comparações realizadas nos diferentes experimentos determinadas por variação individual ou variação do erro (s^2), por meio de análise do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e dos testes de Mann-Whitney por pares, quando os dados não apresentaram distribuição normal, ou ANOVA-Oneway. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando p -valor $< 0,05$ utilizando um intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

BCP e DHA diminuem a nociceção aguda e tardia

No teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,6%) foi observado um menor número de contorções entre as fêmeas no grupo tratado com indometacina, seguido do BCP isolado (Figura 8A). Nos machos, o grupo tratado apenas com BCP obteve resultado melhor do que aquele tratado com a indometacina, porém sem diferença estatística entre ambos. Houve diferença significativa entre os grupos tratados com DHA e BCP isolados (Figura 8B). Ao comparar os comportamentos entre os sexos dos grupos tratados é possível observar que houve diferença estatística apenas com relação ao grupo controle salina (Figura 8C).

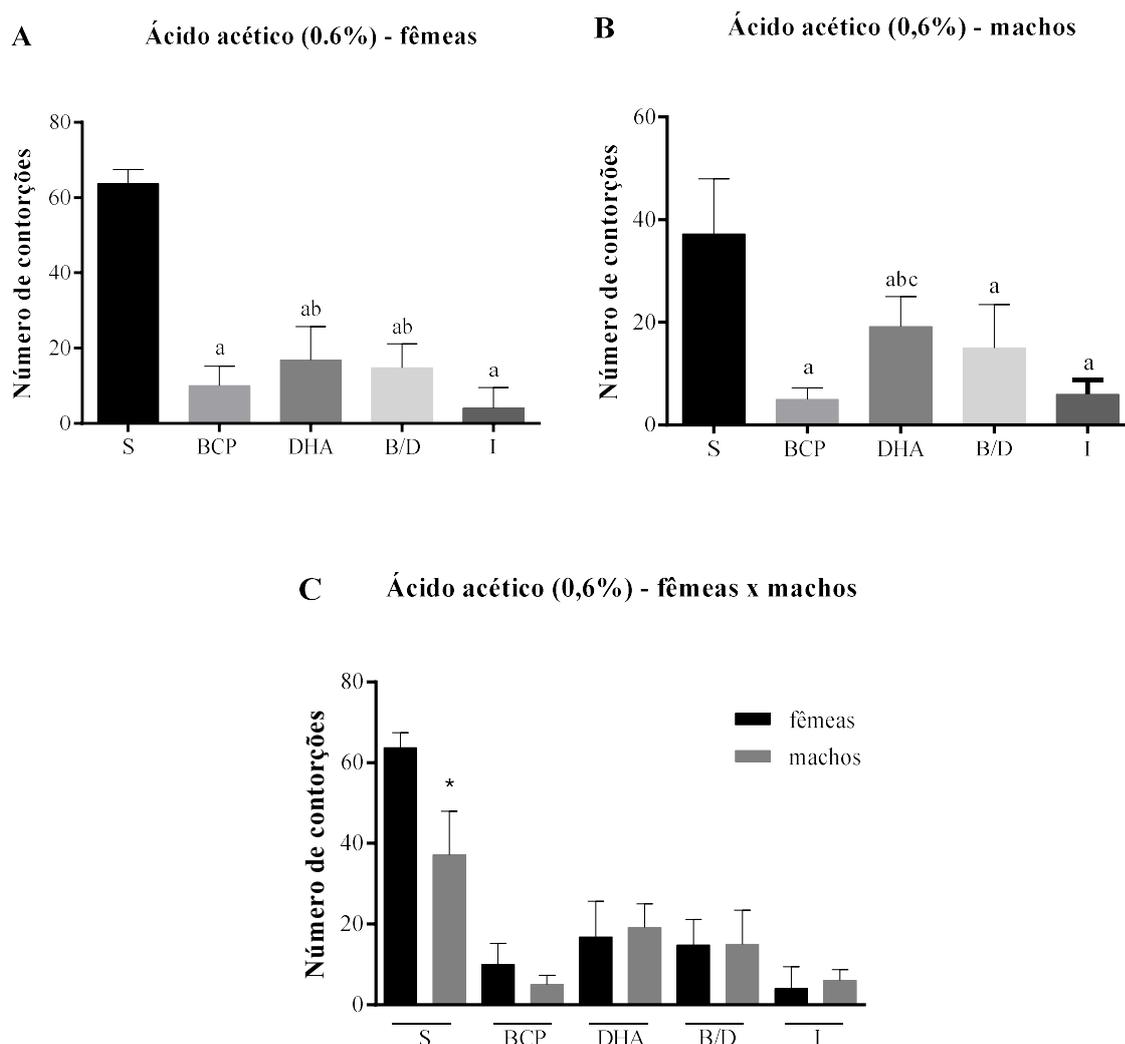


Figura 8. Número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos Balb-C. (A) Fêmeas. (B) Machos. (C) Comparação entre os sexos. S = salina; BCP = beta-cariofileno; DHA = ácido docosa-hexanóico; B/D = associação de BCP e DHA; I = indometacina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. I; c $p < 0.05$ vs. BCP; * $p < 0,05$.

Na fase neurogênica o grupo tratado com BCP apresentou redução significativa do número de “flinches” nas fêmeas, o que não foi observado nos demais tratamentos (Figura 9A). Não houve diferença estatística na avaliação dos machos no mesmo período (Figura 9B). Na comparação entre os sexos (Figura 9C) é possível observar que os níveis de nocicepção dos machos são mais altos que os das fêmeas, porém apenas no grupo tratado com analgésico padrão foi encontrada diferença estatística.

Na observação da segunda fase, os três tratamentos utilizados causaram redução significativa do número de sacudidas da pata das fêmeas, tendo o grupo tratado com a associação de BCP e DHA mostrado melhor resultado do que aquele que recebeu administração de morfina, um potente analgésico opioide, na redução da dor inflamatória (Figura 9D). Nos machos os melhores resultados alcançados no período de 5 a 30 minutos foram dos grupos tratados com BCP e DHA isolados (Figura 9E), porém apresentaram maior número de “flinches” quando comparados com as fêmeas, com significância estatística comprovada nos grupos tratados com associação B/D e com morfina (Figura 9F).

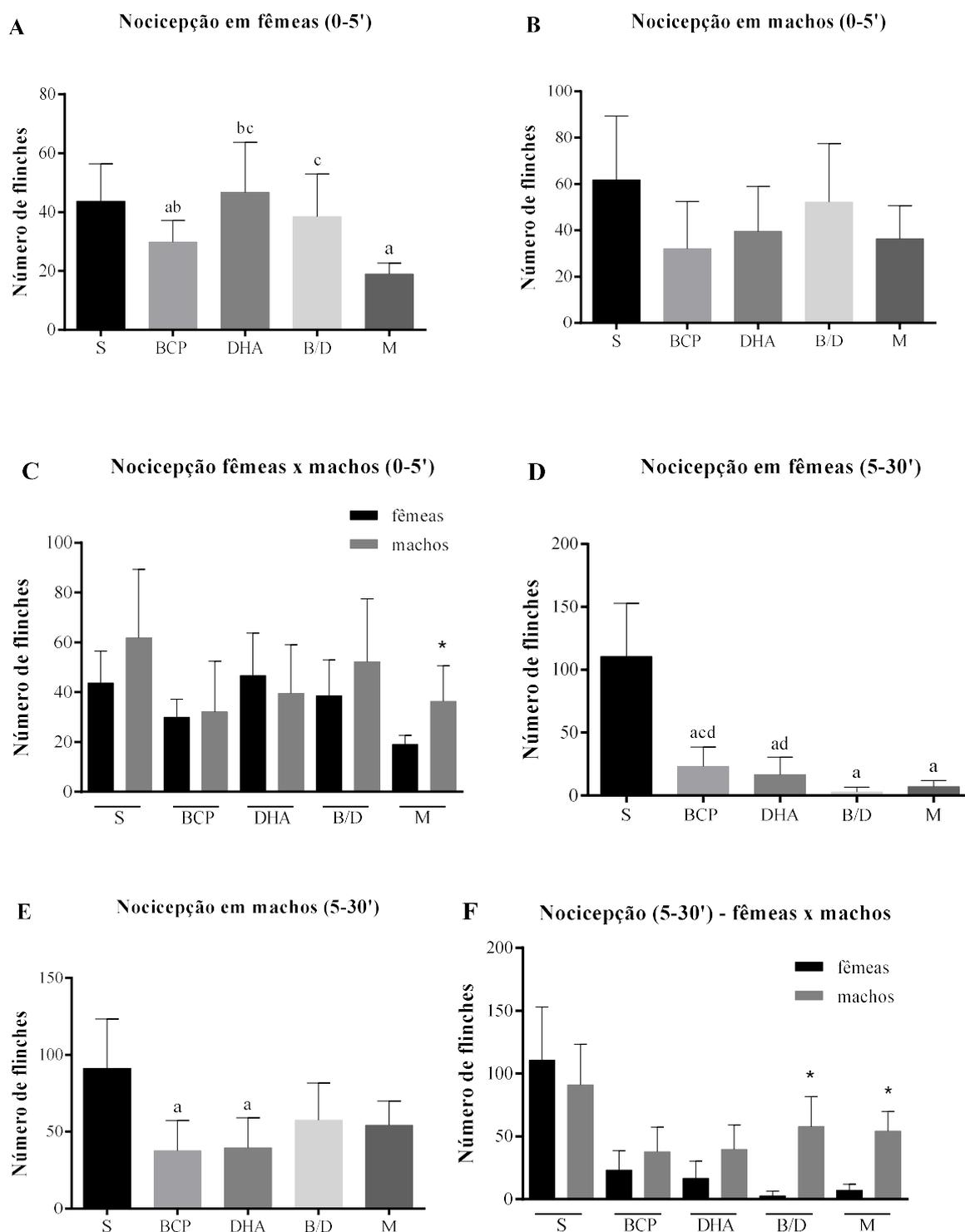


Figura 9. Número de flinches apresentados por camundongos Balb-C após administração intraplantar de formalina (1,5%). (A) Fêmeas no período de 0 a 5 minutos. (B) Fêmeas no período de 5 a 30 minutos. (C) Machos no período de 0 a 5 minutos. (D) Machos no período de 5 a 30 minutos. (E) Comparação entre os sexos no tempo de 0 a 5 minutos. (F) Comparação entre os sexos no tempo de 0 a 5 minutos. S =

salina; BCP = beta-cariofileno; DHA = ácido docosahexanóico; BD = associação de BCP e DHA; M = morfina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. M; c $p < 0.05$ vs. BCP; d $p < 0,05$ vs. BD; * $p < 0,05$.

Na figura 10 estão descritos os resultados do peso da pata. Apenas as fêmeas apresentaram redução do edema de pata nos grupos do BCP isolado e de sua associação com DHA (Figura 10A). A comparação entre os sexos também não mostrou diferença estatística significativa.

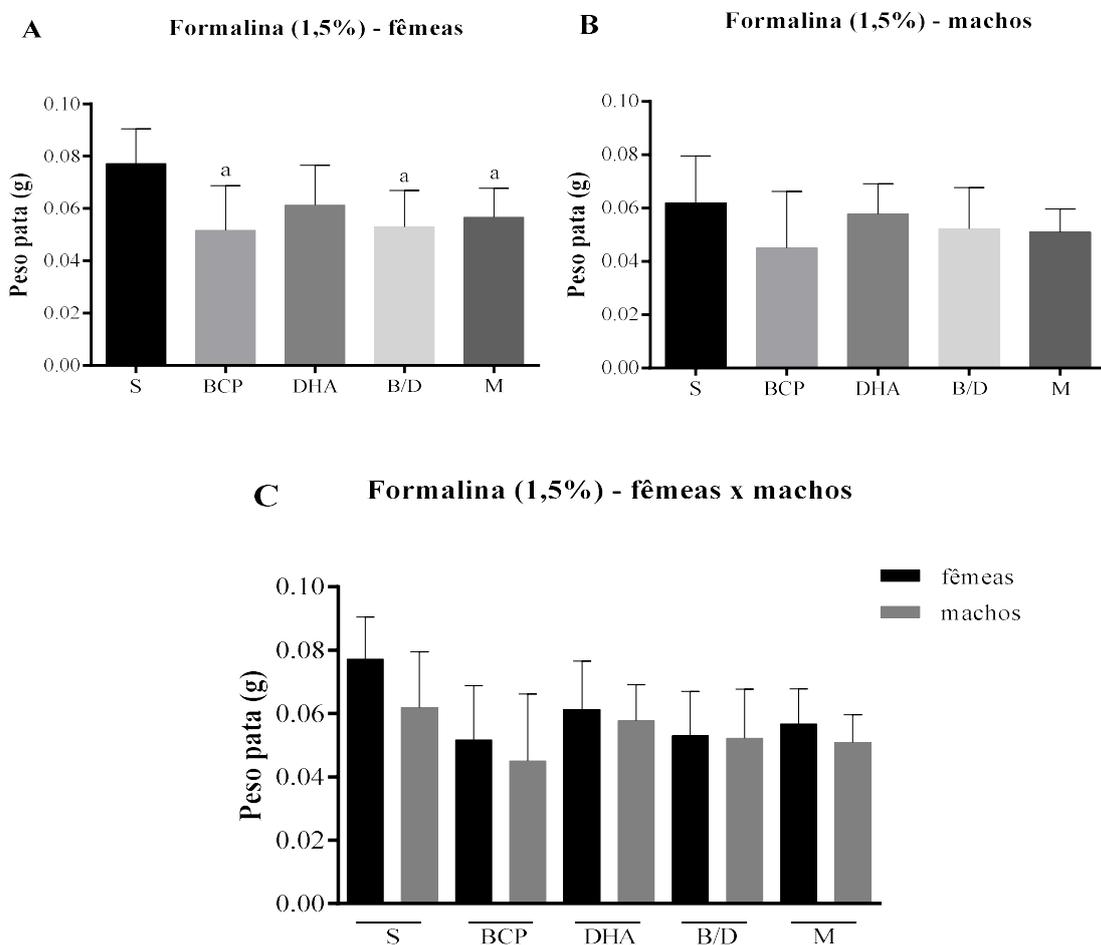


Figura 10. Pesos das patas dos camundongos Balb-C que receberam injeção intraplantar de formalina (1,5%). (A) Fêmeas. (B) Machos. (C) Comparação entre os sexos. S = salina; BCP = beta-cariofileno; DHA = ácido docosahexanóico; B/D = associação de BCP e DHA; M = morfina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média \pm DPM. $p < 0.05$ vs. S.

Os três tratamentos reduziram significativamente a intensidade de nociceção mecânica mensurada pelo método de Von Frey nas fêmeas e machos, sendo os melhores resultados obtidos nos grupos BCP nas fêmeas e DHA nos machos (Figuras 11A e 11B, respectivamente). Conforme consta na Figura 11C, os machos foram mais sensíveis a hipernociceção, com evidência estatística, no grupo tratado com BCP, ao passo que fêmeas foram mais sensíveis nos grupos tratados com DHA ou com a associação B/D, mas sem significância estatística.

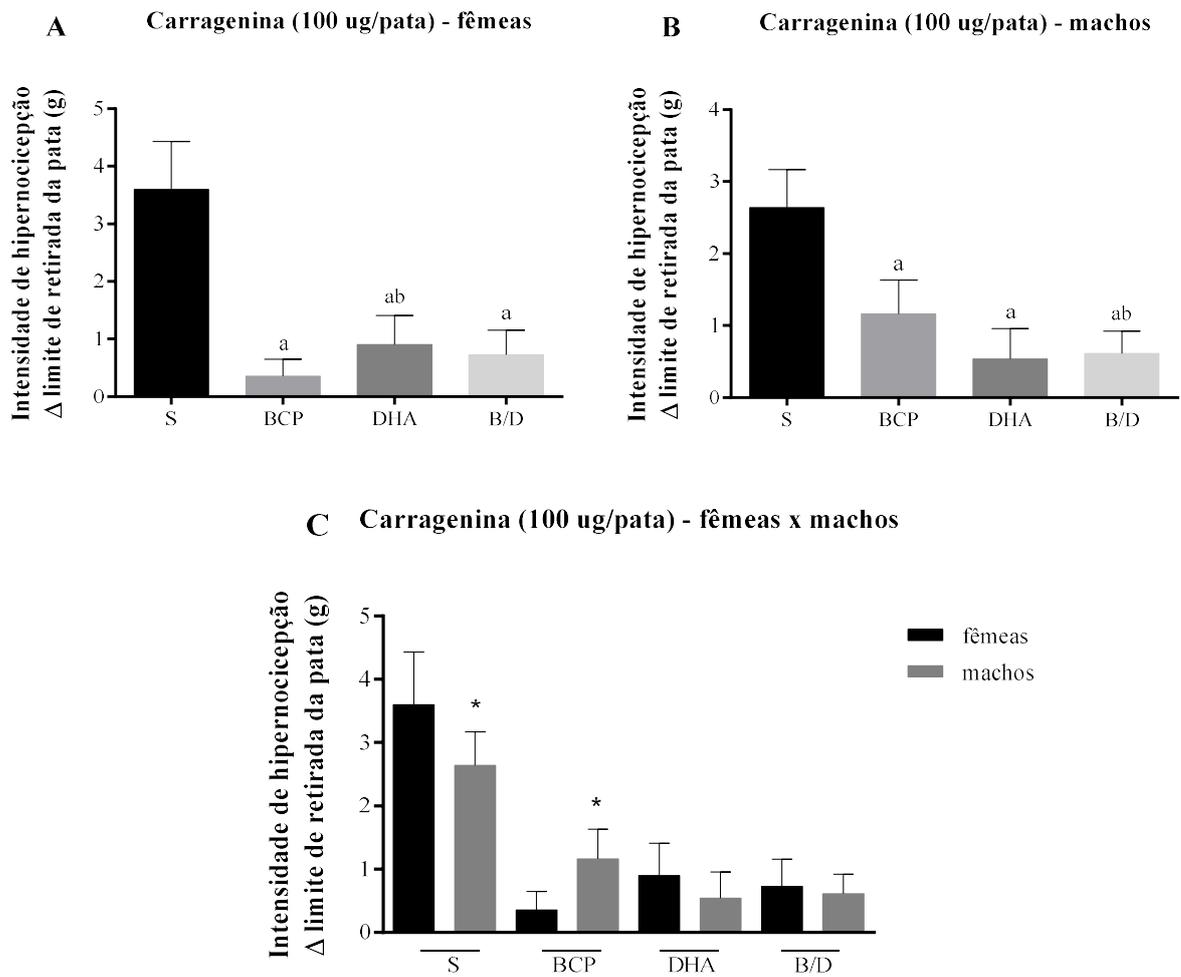


Figura 11. Intensidade de nociceção pelo Δ limite de retirada da pata após injeção de Carragenina (100 ug) em camundongos Balb-C. (A) Fêmeas. (B) Machos. (C) Comparação entre os sexos. S = salina; BCP = beta-cariofileno; DHA = ácido docosahexanóico; BD = associação de BCP e DHA. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. BCP; * $p < 0.05$.

BCP e DHA reduzem a inflamação em modelo de infecção induzida por MRSA

Os participantes do estudo estavam saudáveis e aptos para o ensaio, de acordo com as análises laboratoriais (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação de estado de saúde geral dos participantes.

	Média ± DPM	Valor de referência
Hemácias	5,52 ± 0,08	4,5 - 5,9 milhões/mm ³
Hemoglobina	15,76 ± 0,65	13,5 - 18 g/dL
Leucócitos totais	5570 ± 1194	4.000 - 10.000 / mm ³
Plaquetas	210.333 ± 60.748	150.000 - 450.000 / mm ³
Glicemia jejum	97,66 ± 10,78	65 - 99 mg/dL
Colesterol total	193,3 ± 39,71	< 190 mg/dL
HDL	71,6 ± 9,86	> 40 mg/dL
LDL	126,6 ± 52,65	< 130 mg/dL
VLDL	15 ± 5,29	< 40 mg/dL
Triglicerídeos	75 ± 25,94	< 150 mg/dL
TGO	22,6 ± 9,07	11 - 39 U/L
TGP	22,3 ± 14,04	11 - 45 U/L

Dados são expressos como média ± DPM.

As CMSPs dos participantes inoculadas com *S. aureus* cepa C80 apresentaram um aumento significativo na produção de GM-CSF em comparação ao grupo controle (inoculado com salina estéril, BCP, DHA e B/D) (Figura 12A). Tanto os grupos infectados e tratados quanto os tratados e infectados demonstraram redução da expressão desta citocina quando comparados com os grupos apenas infectados. Aqueles que foram primeiramente infectados e posteriormente tratados com BCP e DHA isolados apresentaram redução significativa da expressão de TNF- α quando comparados com o grupo infectado com cepa C80, enquanto o grupo infectado e tratado com a associação BCP-DHA mostrou significância em relação ao LPS (Figura 12B). O grupo que foi tratado e depois infectado demonstrou redução de TNF α em comparação a cepa C80. Os tratamentos provocaram redução significativa da expressão IL-1 β , sendo o grupo previamente infectado e tratado depois aquele que demonstrou maior diminuição desta citocina (Figura 12C). Na figura 12D é possível observar que houve redução

significativa na expressão de IL-6 pelos grupos tratados em relação ao apenas infectado com C80. Os grupos infectados e tratados com BCP e com a associação BCP-DHA apresentaram queda significativa na expressão de IL-12 (Figura 12E), enquanto a maior expressão de IL-10 foi notada no grupo tratado com DHA e infectado com *S. aureus* (Figura 12F).

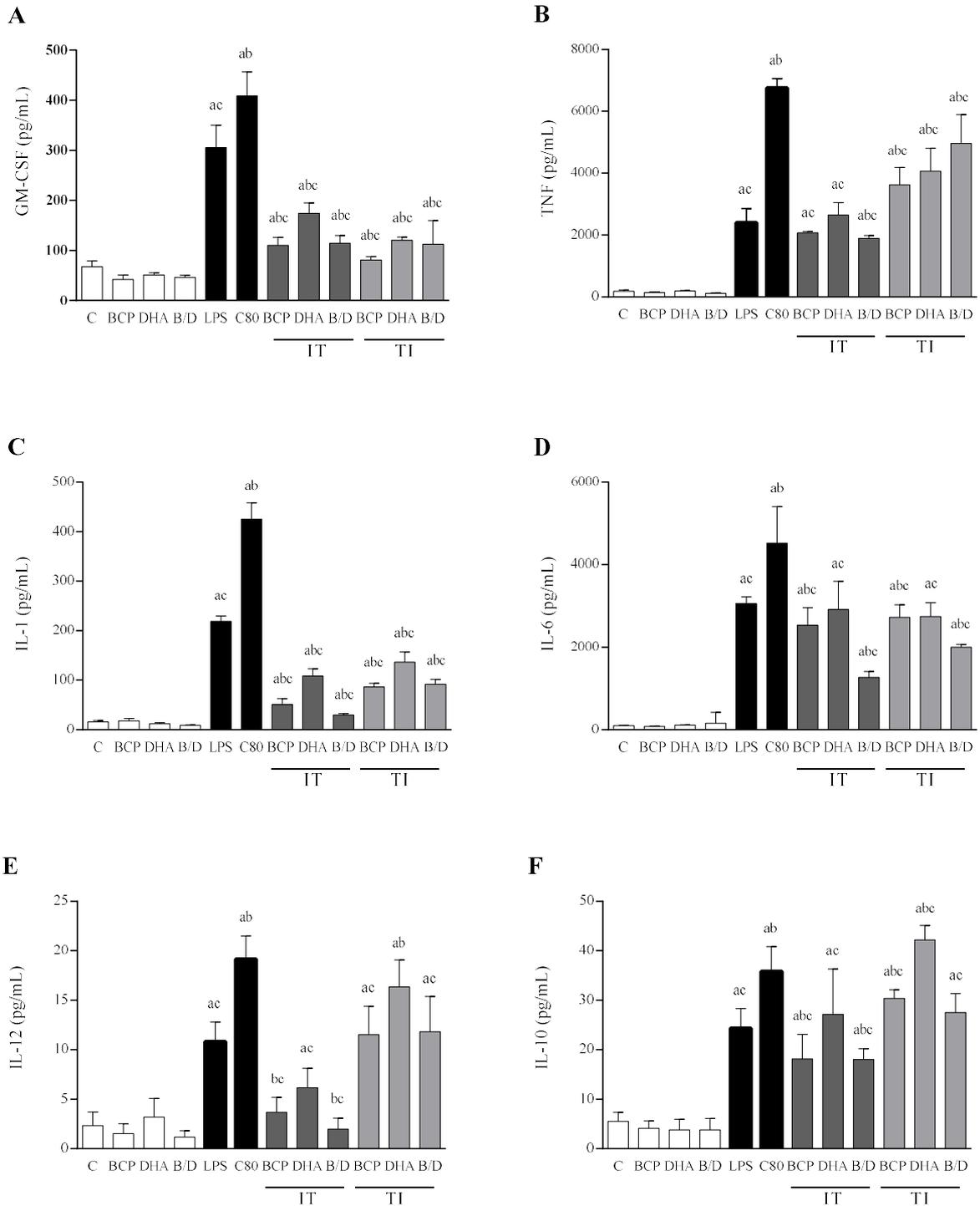


Figura 12. Concentração das citocinas GM-CSF (A), TNF α (B), IL-1 β (C), IL-6 (D), IL-10 (E) e IL-12 (F) no sangue periférico de homens participantes. C = controle (salina estéril); BCP = beta-cariofileno; DHA = ácido docosahexanóico; B/D = associação de BCP e DHA, LPS = lipopolissacarídeos, C80 = cepa C80, IT B = infectado e tratado com BCP, IT D = infectado e tratado com DHA, IT B/D = infectado e tratado com associação BCP e DHA, TI B = tratado com BCP e infectado, TI D = tratado com DHA e infectado, TI B/D = tratado com associação de BCP e DHA e infectado. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. C; b $p < 0.05$ vs. LPS; c $p < 0,05$ vs. C80.

A figura 13 apresenta a análise comparativa do grupo tratado com o grupo infectado. Os genes de imunidade inata CCL5, IL-2 e IL-6 relacionados com a síntese de citocinas pró-inflamatórias, IRF7, NLRP3, TLR6, TLR7 e TYK2, associados ao reconhecimento padrão e a resposta de defesa do organismo, foram subexpressos na presença do tratamento com BD, enquanto o MYD88, gene de resposta de defesa, foi hiperexpresso. Quando comparamos o grupo infectado e tratado com aquele que foi apenas tratado (Figura 14) verificamos que não houve hiperexpressão de nenhum gene com significância estatística, mas genes de ativação de citocinas pró-inflamatórias como CCL2, CSF2, IL-2, IL-6 e IL-17A, e aqueles envolvidos no reconhecimento padrão e na resposta de defesa a vírus e bactérias, como CD40, IRF7, LY96, NLRP3 e TYK2 sofreram subexpressão. Ao passo que a comparação entre o grupo tratado e infectado versus grupo apenas infectado demonstrou subexpressão significativa de CCL2, CCL5, CSF2, IL-2, IL-6, IL-17A, CD40, IRF7, NLRP3, LY96 e TYK2, como os grupos anteriores, e de CCR5 – gene marcador da resposta adaptativa Th1, e hiperexpressão de TLR7 e CCR4 – marcador Th2 (Figura 15).

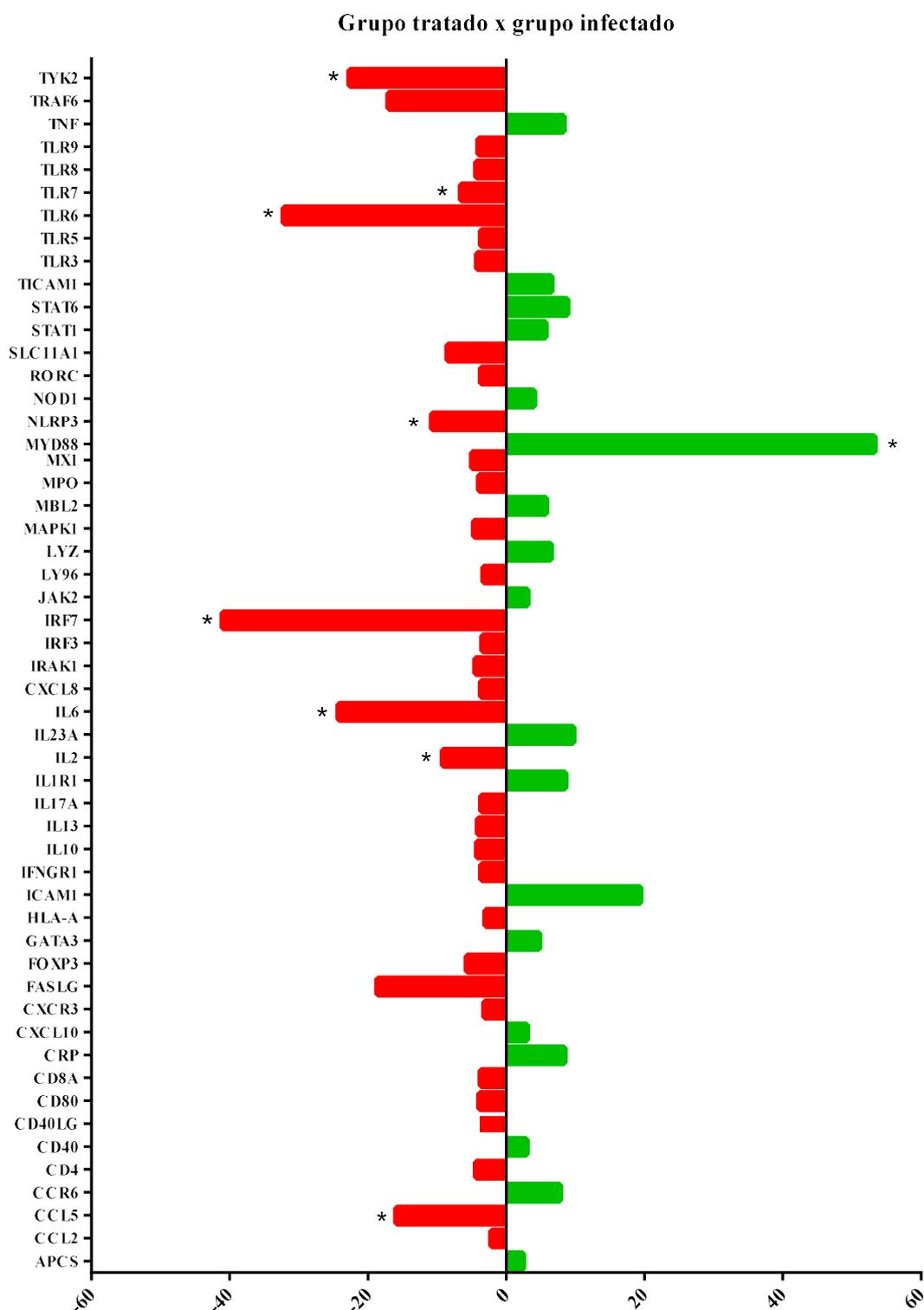


Figura 13. Análise de 84 genes envolvidos na resposta inflamatória do grupo de monócitos do grupo tratado com a associação de beta-cariofileno e ácido docosahexanóico (50+50 mg/dL) com o grupo somente infectado com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * p<0,05.

Grupo infectado e tratado x grupo infectado

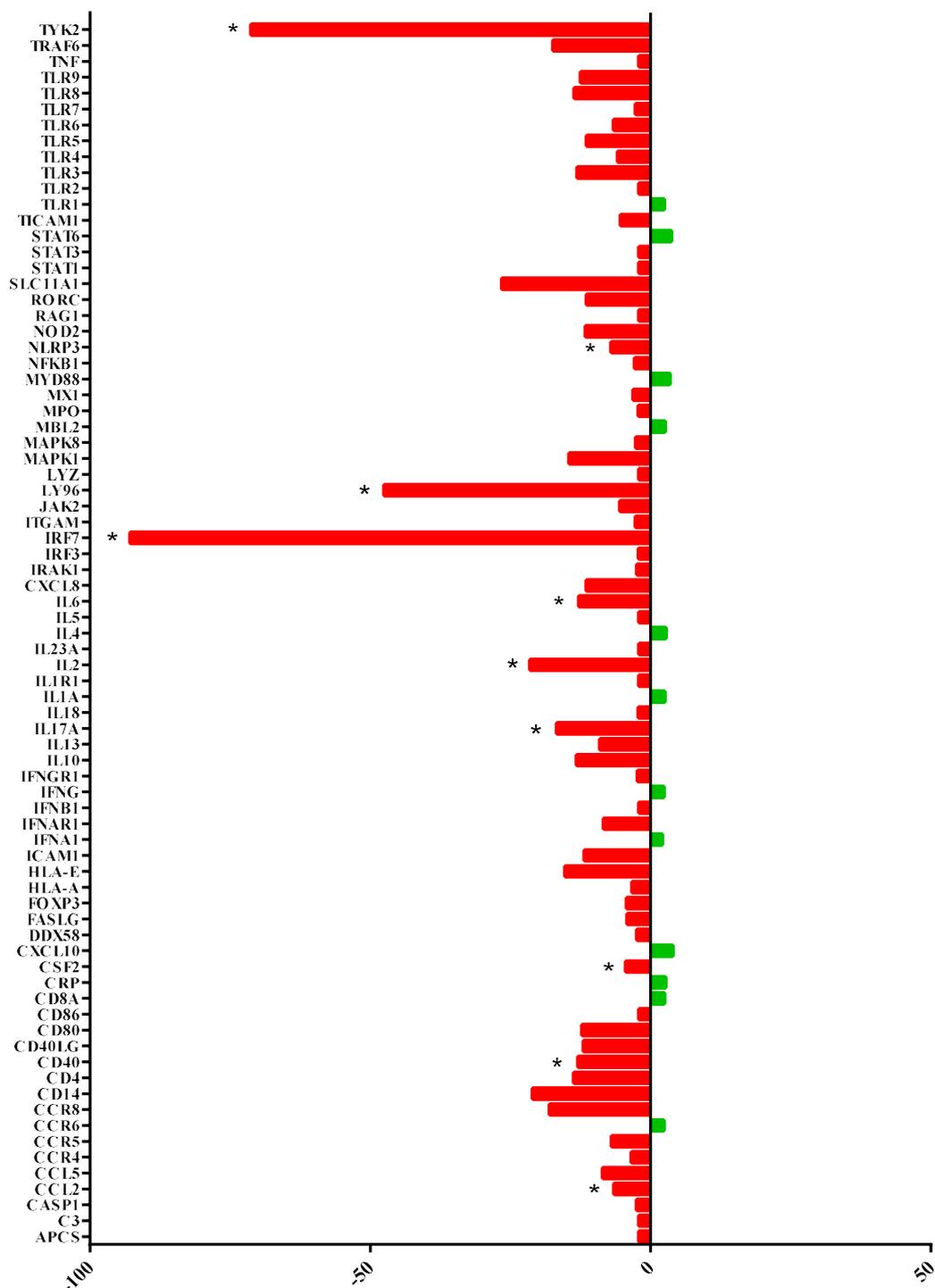


Figura 14. Análise de 84 genes envolvidos na resposta inflamatória do grupo de monócitos infectados com *S. aureus* e tratado após 6h com a associação de beta-cariofileno e ácido docosahexanóico (50 + 50 mg/dL) com o grupo somente infectado com *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * p<0,05.

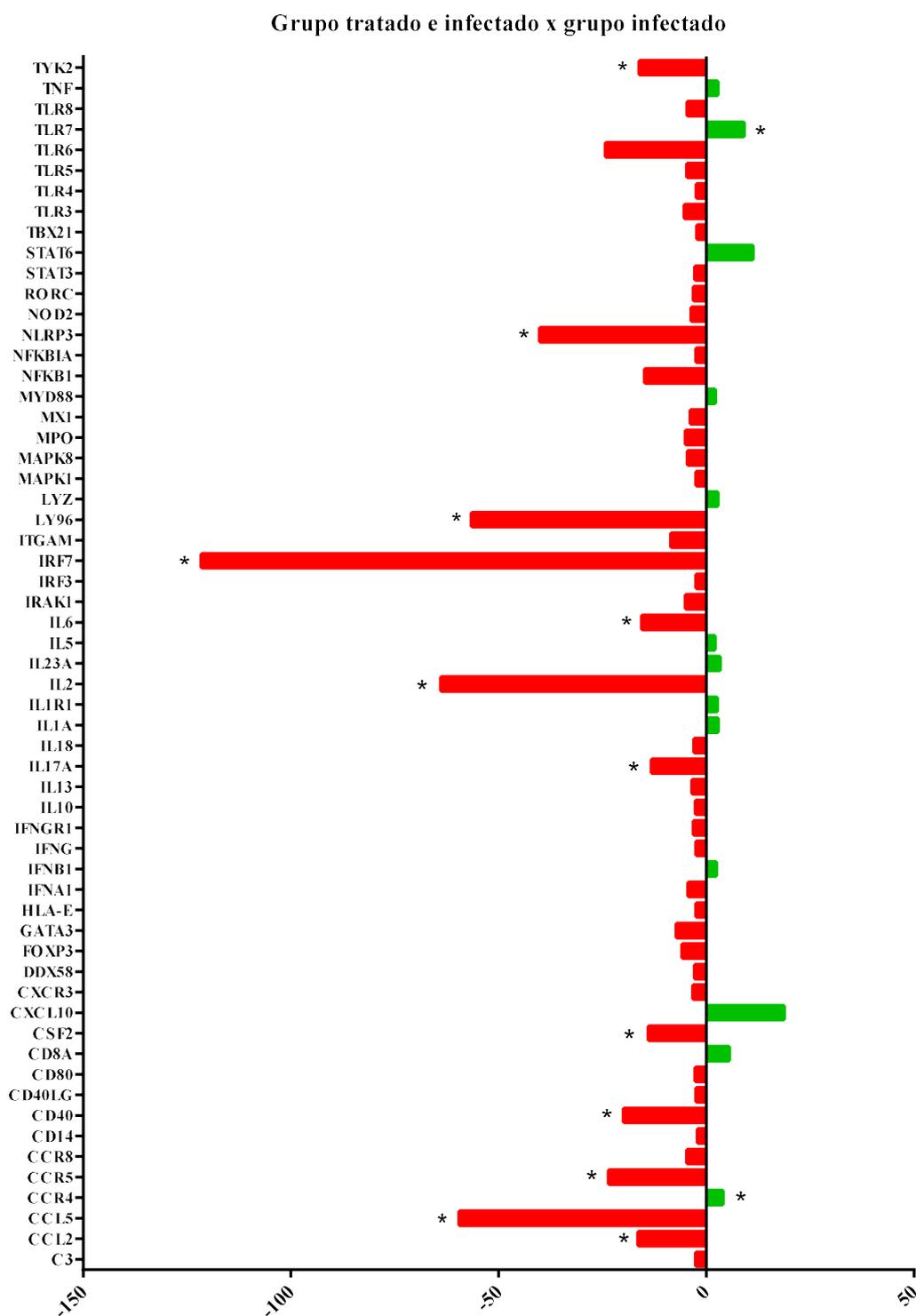


Figura 15. Análise de 84 genes envolvidos na resposta inflamatória do grupo de monócitos do grupo tratado com a associação de beta-cariofileno e ácido docosahexanóico (50+50 mg/dL) e infectado com *S. aureus* resistente à metilina após 30 minutos com o grupo somente infectado com com *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$.

BCP isolado apresentou alto potencial antioxidante no método DPPH

Várias doses de BCP e DHA foram testadas na verificação do potencial antioxidante (Tabela 2), porém mesmo na sua concentração mais elevada (10 mg/mL), conforme diluição recomendada pelo fabricante, o DHA apresentou sequestro de apenas 20,23% dos radicais livres, o que indica ausência de atividade antioxidante (AA). Em contrapartida, o EC 50 do BCP foi obtido na concentração de $2,82 \text{ M} \pm 0,06$.

Tabela 2. Descrição de atividade antioxidante através do método 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) com variação das doses de Beta-cariofileno (BCP) e ácido docosahexanóico (DHA) utilizadas e percentual de sequestro de radicais livres (FRS%).

Doses testadas	Absorbância média	FRS (%)
BCP 60 %	0,202	81,8
BCP 50%	0,225	78,96
BCP 40%	0,257	76,9
BCP 30 %	0,229	70,85
BCP 20%	0,298	62,12
BCP 17,5%	0,324	58,24
BCP 15 %	0,373	51,93
BCP 12,5%	0,399	48,58
BCP 10%	0,430	45,34
BCP 7,5%	0,507	36,85
BCP 5%	0,652	17,03
DHA 100%	0,771	1,99
DHA 50%	1,134	0
DHA 40%	1,135	0
DHA 30%	1,131	0
DHA 10 mg/mL	0,619	20,23
BD 50%	0,230	70,23
Controle	0,773	-

BCP e DHA reduzem a viabilidade celular e capacidade invasiva da linhagem A549

Após triagem inicial das doses de BCP e DHA sobre a viabilidade celular das linhagens maligna pulmonar A549 e normal pulmonar BEAS-2B, foi identificado que BCP foi citotóxico em todas as doses testadas com a linhagem A549, enquanto o tratamento com DHA não surtiu efeito significativo na redução da viabilidade das células (Figura 16). O mesmo foi observado no tratamento com BCP na linhagem BEAS-2B, ressaltando que nesse caso o DHA na dose de 72 $\mu\text{g/mL}$ conseguiu reduzir a viabilidade da mesma (Figura 17).

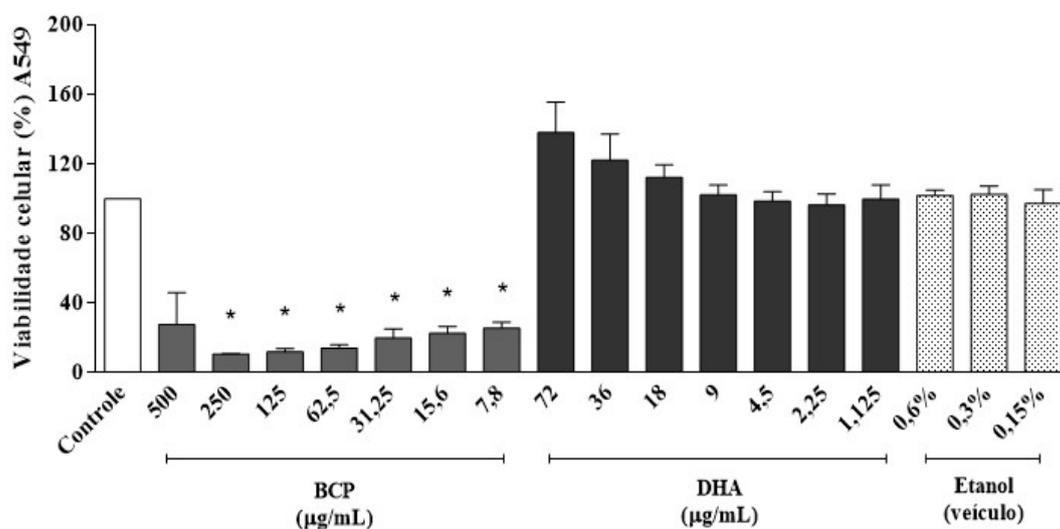


Figura 16. Análise da citotoxicidade da A549, por teste de MTT, mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA. Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$.

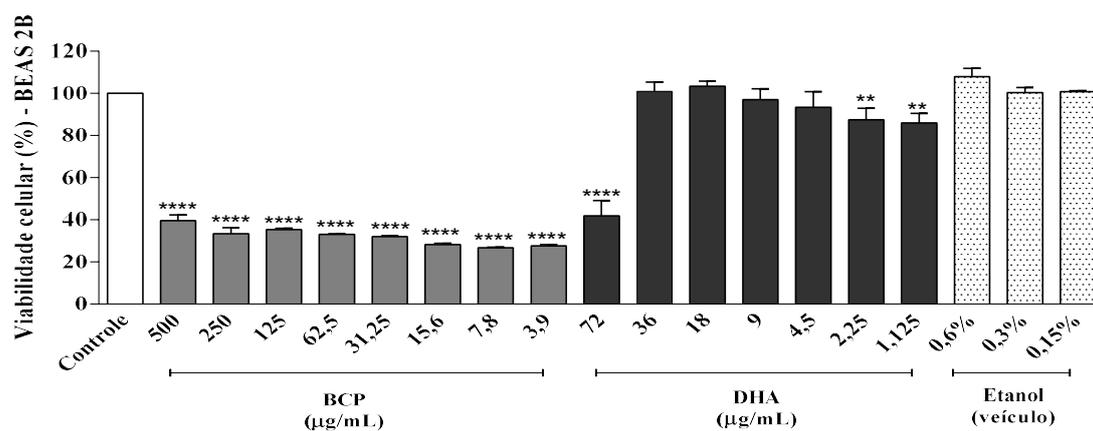


Figura 17. Análise da citotoxicidade da BEAS-2B, por teste de MTT, mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA. Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média ± DPM. * $p < 0,05$.

A partir do ensaio inicial de MTT foram selecionadas 1 dose de BCP (7,8 ug/mL) e 2 doses de DHA (18 e 72 ug/mL) para testar as associações das mesmas. Ambas as associações analisadas apresentaram diferença estatística com relação ao controle na citotoxicidade da linhagem A549 (Figura 18A). Na linhagem BEAS-2B apenas a associação 2 apresentou significância estatística (Figura 18B).

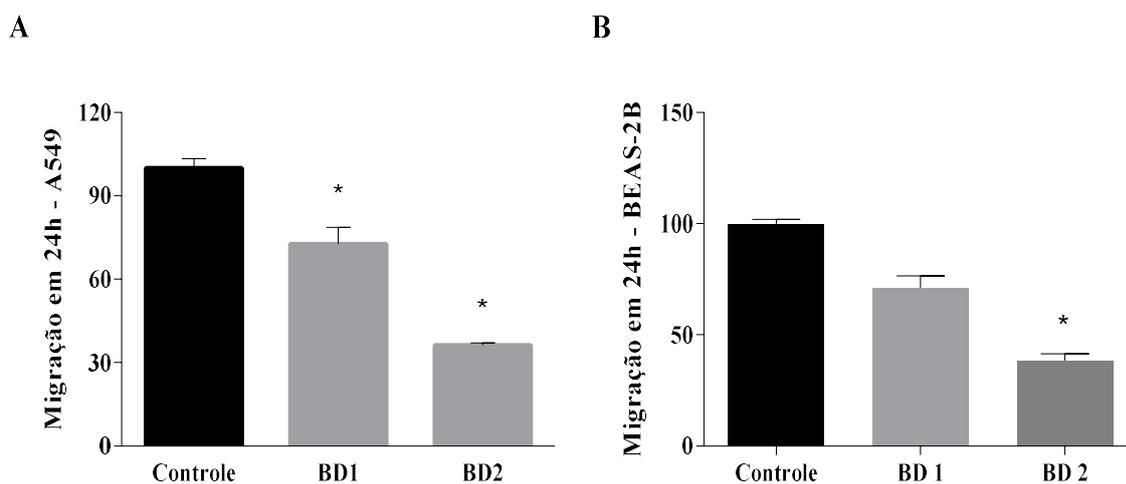


Figura 18. Análise da citotoxicidade da A549 (A) e da BEAS-2B (B), mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA, sendo BD1 (7,8 ug/mL de BCP + 18 ug/mL de DHA) e BD2 (7,8 ug/mL de BCP + 72 ug/mL de DHA). Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média ± DPM. * $p < 0,05$.

Na figura 19 é possível notar que no ensaio de adesão as duas associações apresentaram diferença estatística na linhagem A549 (A) e que apenas a associação BD 2 teve significância estatística na linhagem BEAS-2B (B).

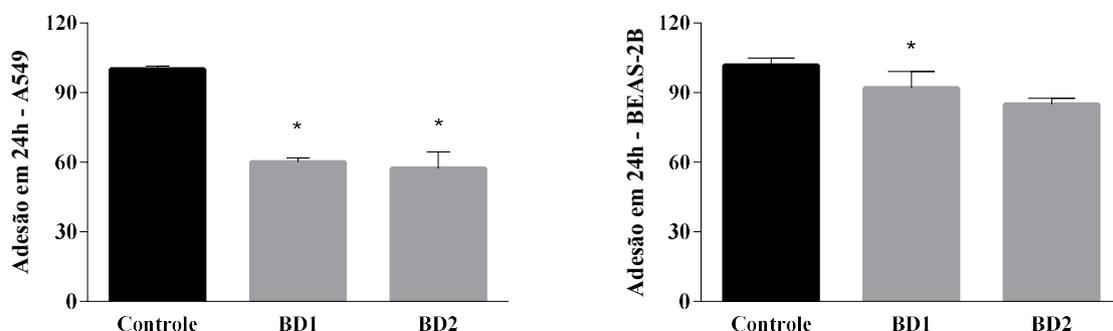


Figura 19. Análise da adesão da A549 (A) e da BEAS-2B (B), mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA, sendo BD1 (7,8 ug/mL de BCP + 18 ug/mL de DHA) e BD2 (7,8 ug/mL de BCP + 72 ug/mL de DHA). Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$.

Em seguida, no teste da migração, ambas dosagens associadas apresentaram diferença estatística significativa com relação ao controle na linhagem A549 (Figura 20A) e apenas o grupo BD2 foi efetivo na redução da migração celular em comparação ao controle da BEAS-2B (Figura 20B).

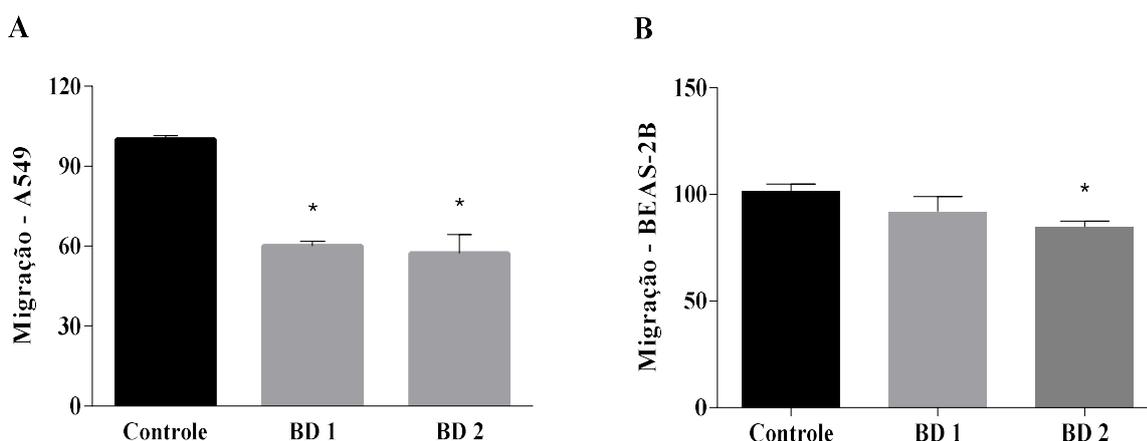


Figura 20. Análise da migração da A549 (A) e da BEAS-2B (B), mediante tratamento das culturas celulares com diferentes concentrações de BCP e DHA, sendo BD1 (7,8 ug/mL de BCP + 18 ug/mL de DHA) e BD2 (7,8 ug/mL de BCP + 72 ug/mL de DHA). Dados analisados pelo teste Anova One Way, expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$.

A análise comparativa da expressão gênica das linhagens celulares A549 e BEAS-2B está presente na figura 21. Genes envolvidos no ciclo celular (ATM, ATRIP, BARD1, RAD1, RAD17, RNF168), na manutenção dos telômeros (BLM, ERCC1), oncogenes (BAX), supressores tumorais (BRCA1), regulação do ciclo circadiano (CRY1), reparo da excisão de nucleotídeos (ERCC2), reparo do DNA (GADD45A, REV1), reparo de excisão de base (MPG), reparo de bases mal pareadas (PMS2) e ativação da TP53 (SIRT1) foram significativamente mais expressos nas células tumorais A549 do que nas células controle pulmonar BEAS-2B.

A549 x BEAS-2B sem tratamento

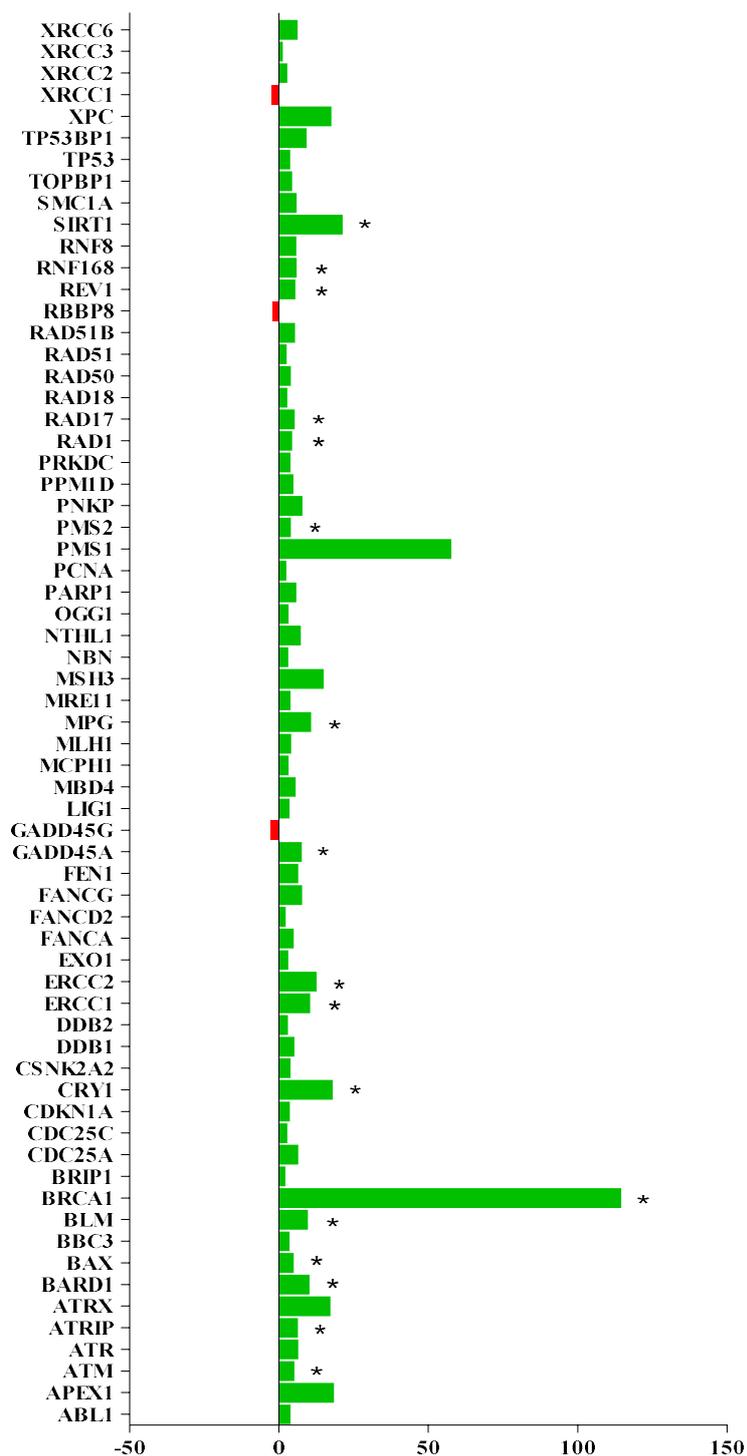


Figura 21. Análise da expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA, comparando A549 com BEAS-2B não tratadas. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$.

Na comparação do grupo tratamento 1 (7,8 ug/mL de BCP e 18 ug/mL de DHA) com o controle houve superexpressão significativa no grupo tratamento de genes envolvidos no ciclo celular (CDC25C, SMC1A), transporte nuclear, regulação da transcrição, apoptose e estabilidade proteica (DDIT3 e SUMO1), reparo de excisão de nucleotídeos (PNKP) e reparo do DNA (CHEK1) (Figura 22).

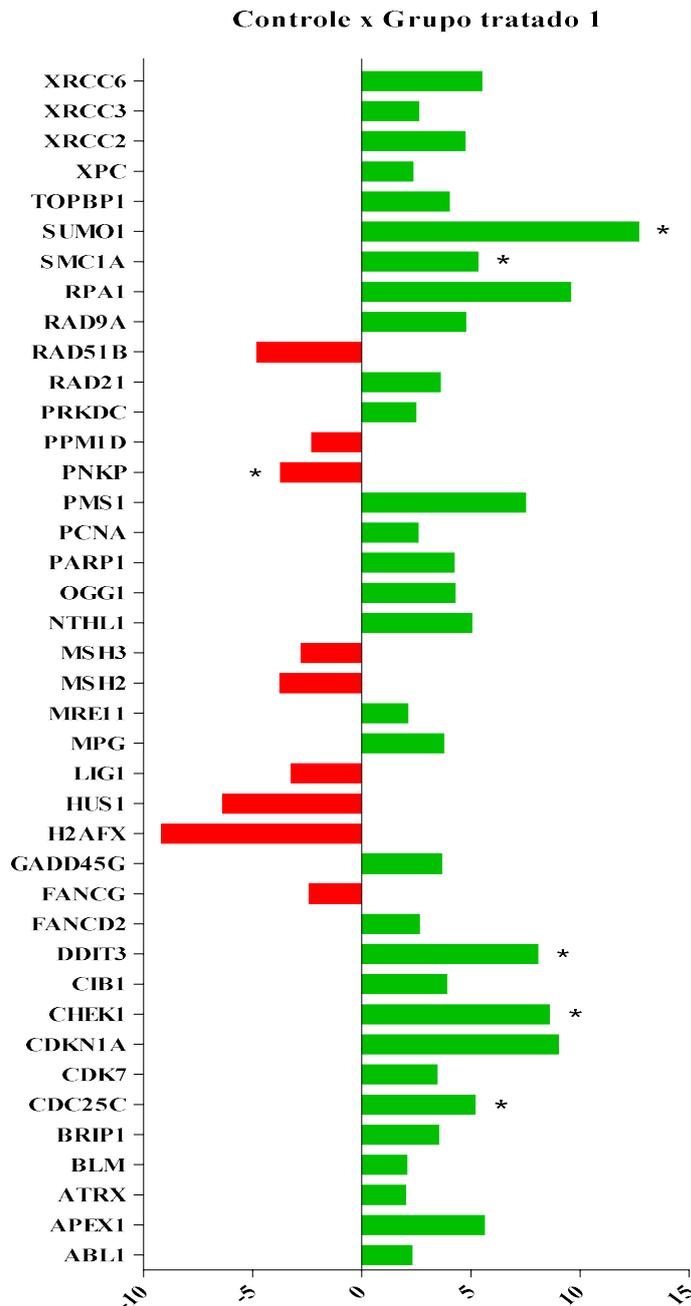


Figura 22. Análise da expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA, comparando células do grupo tratado com BCP-DHA (7,8 ug/mL + 18 ug/mL, respectivamente) com o grupo controle. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * $p < 0,05$.

Enquanto a análise da expressão gênica das células tratadas com a associação do grupo 2 (7,8 ug/mL de BCP com 18 ug/mL de DHA) demonstrou *down regulation* nas células tratadas de genes envolvidos no ciclo celular (ATM, BARD1, CDC25A, CSNK2A2, RAD1, RNF168, RNF8), oncogenes (BAX), supressores tumorais (BRCA1), reparo de excisão de nucleotídeos (DDB2, ERCC2, PNKP), manutenção de telômeros (ERCC1, PRKDC, RAD50), reparo do DNA (GADD45A, NBN, REV1), reparo de bases mal pareadas (MSH3, PMS2) e reparo pós-replicação (RAD18), com diferença estatística significativa (Figura 23).

Controle x Grupo tratado 2

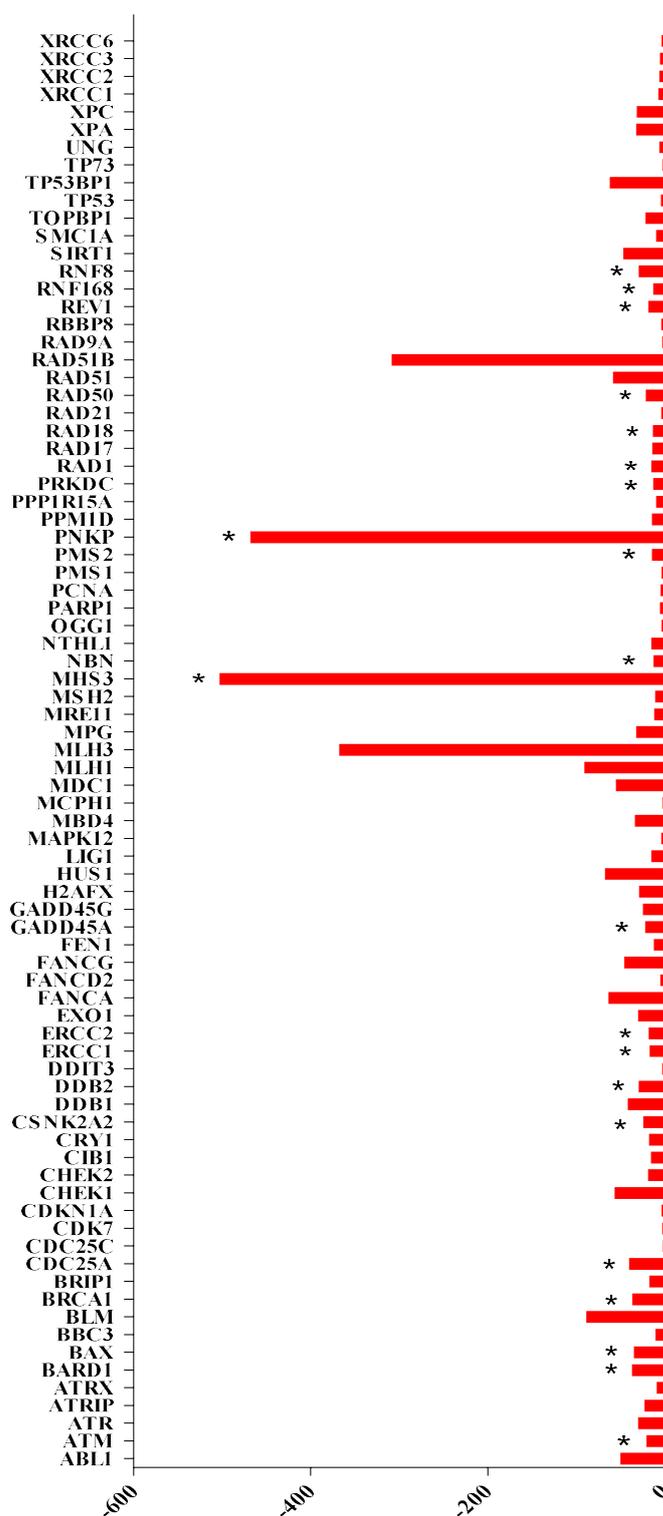


Figura 23. Análise da expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA, comparando células do grupo tratado com BCP-DHA (7,8 ug/mL + 72 ug/mL, respectivamente) com o grupo controle. Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney, expressos como média ± DPM. * p<0,05.

6 DISCUSSÃO

Há muito tempo os produtos naturais utilizados em preparações medicinais de conhecimento popular têm sido estudados no desenvolvimento de medicamentos, como agentes analgésicos, antimicrobianos, antitumorais e anti-inflamatórios (HARVEY et al., 2015). Mecanismos de inflamação e infecção configuram importantes focos de pesquisa, pois envolvem vários processos celulares (quimiotaxia, fagocitose, resposta imunológica, diferenciação e apoptose) (PIERETTI et al., 2016). No presente estudo identificamos que a associação BCP-DHA e o BCP isolado apresentaram as melhores respostas antinociceptivas no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em ambos os sexos. O teste da formalina demonstrou redução significativa do número de “flinches” nas fêmeas tratadas com BCP na fase neurogênica. Na fase inflamatória foi visto resultado melhor do tratamento com BCP-DHA em relação a morfina nas fêmeas e melhores resultados dos compostos isolados nos machos. Também visualizamos redução do edema de pata nas fêmeas dos grupos citados. Tanto BCP e DHA isolados quanto associados promoveram redução significativa da nocicepção mecânica na injeção intraplantar de Cg no teste de Von Frey nas fêmeas e nos machos.

No nosso estudo anterior, realizamos o teste de peritonite induzida por carragenina, modelo que cursa com inflamação semelhante àquela induzida pela formalina, e identificamos que houve menor migração de neutrófilos nos grupos de animais que receberam o tratamento com associação de BCP e DHA, nas três doses testadas, em comparação ao grupo controle negativo (BRITO et al., 2019). No presente trabalho, nossos achados de melhores respostas algícas de BCP isolado e BCP-DHA se assemelham aos encontrados por Fiorenzani et al. (2014) com o teste da formalina no primeiro trabalho que associou essas substâncias, com a ressalva de que eles trabalharam apenas com ratos machos e o presente estudo usou ambos os sexos.

Estudos tratam que as diferenças entre os gêneros contribuem para variações individuais na percepção e no tratamento da dor, contudo os mecanismos específicos da disparidade permanecem inconclusivos. É possível que interações entre fatores biológicos, socioculturais e psicológicos estejam envolvidos nesse processo, principalmente, hormônios sexuais, sistema opioide endógeno e fatores genéticos (PIERETTI et al., 2016; BARTLEY, FILLINGIM, 2013). Modelos experimentais de

dor destacam papel pronociceptivo do estrógeno em ratos machos que receberam injeção intracerebroventricular de estradiol, assim como efeito antinociceptivo na dor neuropática em camundongos (ALOISI, CECARRELI, 2000). Machos e fêmeas reagiram de formas diversas a mudanças estruturais e funcionais relacionadas a dor induzida por ligadura do nervo ciático, sendo que os machos apresentaram redução gradual da alodinia e recuperação completa, enquanto nas fêmeas alodinia e gliose perduraram por 4 meses, sugerindo que os resultados dos machos estão associados a testosterona e que as fêmeas são sensíveis às alterações séricas da testosterona (VACCA et al., 2016). No geral, as fêmeas parecem possuir maior sensibilidade a dor e melhor resposta analgésica em comparação aos machos. Além disso, os trabalhos sugerem que há diferenças nas respostas aos tratamentos farmacológicos e não farmacológicos, a depender do tipo de tratamento e da característica da dor (BARTLEY, FILLIGIM, 2013).

A nociceção como parte do processo inflamatório pode ser neurogênica ou inflamatória e seus estágios dependem da duração do processo assim como de fatores imunológicos (ARULSELVAN et al., 2016). O efeito antinociceptivo do BCP foi descrito no teste do ácido acético com resultado similar a indometacina (FERRAZ, 2016; SILVA, 2019), na dor neuropática em um modelo de diabetes induzida por estreptozotocina em camundongos (AGUILAR-ÁVILA et al., 2019) e em outro estudo que utilizou modelo de ligadura parcial do nervo ciático em camundongos (KUWAHATA et al., 2012). Possivelmente, isso se deve a sua ligação com sítio CP55.940 dos receptores canabinoides tipo 2 (CB2r), o que leva a inibição da ativação da micróglia durante a dor neuropática, causando analgesia via ativação dos CB2r supraespinal, espinal e periférico (CECCARELLI et al., 2020). O trabalho de Klauke et al. (2014), utilizando modelos de dor central e periférica, também descreveu que a supressão da dor e a atividade anti-inflamatória exercidas pelo BCP, provavelmente, estão relacionadas à ativação de CB2r, caracterizando o BCP como um agonista de receptores CB2 (BENTO et al., 2011). A atividade antinociceptiva do DHA em modelos álgicos térmicos e químicos é abolida na presença de naloxona, o que indica que ele atua na via opioide como um antagonista do receptor (NAKAMOTO, 2010). Nishinaka et al. (2013) afirmam que o DHA parece atuar na via da β -endorfina, pois cerca de 30 minutos após sua administração os níveis séricos da mesma estavam aumentados, assim como sua imunorreatividade cerebral. Em sua revisão sobre neuroinflamação e

sensibilização central em dor crônica e generalizada Ji et al. (2018) descreveram que baixas doses de metabólitos derivados do DHA que são resolutivos da inflamação, como lipoxina A4, resolvinas D1, D2 e E1, neuroprotectina D1 e maresina 1, reduzem a dor inflamatória, dor pós-operatória e dor neuropática em diferentes modelos animais. Portanto, destacamos o potencial efeito antinociceptivo dessa combinação.

De acordo com Dórea (2015), os testes do ácido acético e de Von Frey são utilizados também para avaliar a inibição da síntese de PGE2 e citocinas pró-inflamatórias. No modelo de infecção com MRSA do nosso estudo a dosagem de citocinas demonstrou que o tratamento com BCP-DHA reduziu significativamente os níveis de GM-CSF, TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-12. A síntese de IL-10 foi maior nos grupos tratados previamente e infectados depois e menor nos grupos infectados e tratados posteriormente. GM-CSF é um fator de crescimento hematopoiético conhecido por sua habilidade em formar colônias de granulócitos e macrófagos, sendo a ativação do seu receptor, o GM-CSFr, o pontapé inicial para uma cascata de sinalização intracelular que inclui a ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 (STAT5), Janus quinase (JAK), via MEK/ERK, fosfatidilinositol 2 quinase (PI3K) e NFkB (MC LEE et al., 2020), atuando nas células mieloides na inflamação e em doenças autoimunes (HAMILTON, 2019). No modelo de envelhecimento e análise de memória utilizado por Lindsey et al. (2017) não houve efeito do BCP sobre esta citocina. Por outro lado, a presença de DHA no meio contendo GM-CSF resultou na depleção do fator estimulante hematopoiético em um modelo de fibrose cística, levando ao entendimento de que a deficiência do AGPI e seus derivados resolutivos da inflamação é limitante para a inflamação desregulada presente na doença (BRAVO et al., 2010).

TNF- α possui ampla relevância funcional, principalmente, no que tange ao estímulo a apoptose celular, via Fas e Caspases, e resposta pró-inflamatória, via ativação do NF- κ b (KANY et al., 2019). Em um estudo prévio nós encontramos um aumento do TNF- α no grupo tratado com a associação de BCP-DHA no modelo de sepse utilizado (BRITO et al., 2019) e vimos que isso poderia estar relacionado ao fato de que o mesmo pode ser estimulado, também, por inibidores da COX e ambos os produtos naturais desenvolvem esse papel (CALDER, 2012). Resultado, esse, que diverge do que encontramos agora com diminuição da concentração desta citocina, utilizando modelo *in vitro*. Os principais secretores de IL-1 β são células

hematopoiéticas como monócitos, macrófagos como micróglia ou células de Kupffer, células dendríticas após ativação por padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (KANY et al., 2019). Trata-se de uma citocina intimamente ligada a inflamação e febre, sendo sua síntese associada a ativação do inflamassoma (DINARELLO, 2018). A característica pró-inflamatória também configura a IL-6, citocina envolvida nas respostas imunes, hematopoiese, metabolismo ósseo, desenvolvimento de doenças autoimunes, infecções bacterianas e efeitos colaterais metabólicos (MURAKAMI et al., 2019). Pesquisas *in vitro* supõem que a atividade agonista do BCP sobre os CB2r seja o principal mecanismo responsável pela inibição das vias pró-inflamatórias e da síntese de citocinas, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (KUWAHATA et al., 2012; FERREIRA, 2014). A inibição de IL-1 β e TNF- α pelo DHA também é descrita na literatura com destaque para maior ativação do PPAR- γ e inibição do NF- κ B (CERQUEIRA, 2013; LUZETE, 2015). A família de citocinas IL-12 está relacionada a modulação do comportamento das populações de células T e direcionamento das respostas imunes em várias doenças devido ao seu papel pró-inflamatório (VIGNALI, 2012). Elas atuam como um link entre a imunidade inata e adaptativa, intermediando a diferenciação de células T CD4 naive em subtipos T helper e regulando as funções de diferentes efetores celulares (YAN et al., 2018). Houve redução da IL-23, citocina da família da IL-12, no modelo de senescência animal tratado com BCP (HAMILTON, 2019) e o DHA inibiu a maturação das células dendríticas reduzindo os níveis da família IL-12 (IL-12p70, IL-23 e IL-27) (KONG et al., 2010).

Seguindo uma linha mais regulatória, a família IL-10 desenvolve importante papel na regulação da resposta imune durante a defesa do hospedeiro, em doenças autoimunes, inflamatórias e câncer. A IL-10 atua primariamente nos leucócitos com funções imunossupressoras, enquanto outros membros da família agem preferencialmente em células epiteliais, onde controlam mecanismos de defesa contra infecções virais, bacterianas e fúngicas, protegem a integridade tecidual e promovem reparação e regeneração (WALTER, 2014; WANG et al., 2019). A suplementação com DHA promoveu a redução da síntese de IL-10 conferindo cardioproteção em um modelo de injúria miocárdica (HABICHT et al., 2020). Um estudo feito com o óleo essencial de *Polygonum minus*, identificou o BCP como um de seus componentes e o utilizou como controle positivo no modelo de hepatotoxicidade induzida por cisplatina, evidenciando redução da concentração de IL-10 e, portanto, hepatoproteção (RASHID,

2020). Logo, a redução da mesma no nosso estudo demonstra proteção contra a exacerbação da inflamação no processo infeccioso.

Muitos efeitos anti-inflamatórios no organismo ocorrem por meio da alteração do padrão da expressão de genes da imunidade inata. No nosso estudo observamos que o tratamento com BCP-DHA, independente da presença de infecção, regulou negativamente a expressão gênica de IL-2, IL-6, IRF7, NLRP3 e TYK2, atuando diretamente na inibição do NF- κ B, na síntese e atividade de citocinas pró-inflamatórias (Figura 24). Dentro das vias de sinalização dos interferons (IFN), IRF7 tem sido reconhecido como o maior regulador da sinalização do IFN tipo 1, sendo envolvido no controle da inflamação excessiva e autoimunidade (SOUSA, 2015; WU et al., 2019). Em um modelo de lúpus induzido por sílica, o DHA inibiu a expressão de IRF7 e de outros genes associadas ao IFN na resposta inflamatória (BENNINGHOFF et al., 2019). Na via inflamatória há também o envolvimento do NLRP3, um integrante do complexo multiproteico citosólico do inflamassoma gerado em macrófagos derivados da medula óssea, estimulados por agentes microbianos ou não. O inflamassoma NLRP3 possui papel crítico na imunidade inata, estimulando a síntese de caspase-1 ativa, a qual converte os precursores de IL-1 β e IL-18 nas suas formas biologicamente ativas, numa sequência de respostas inflamatórias que leva a piroptose (OZENVER; EFFERTH, 2021). Foi vista atividade inibitória do BCP sobre o NLRP3 em um modelo de artrite gotosa em animais (LI et al., 2021) e do DHA sobre o inflamassoma NLRP3 induzido pela inalação de sílica (WIERENGA, 2019). Trouxemos de novidade para a literatura a atuação do BCP-DHA na regulação negativa da tirosina quinase não-receptora TYK2, cuja ativação regula as vias de transdução de sinal dos receptores de IL-12, IL-23 e IFN tipo 1, estando cada um deles implicados na patogênese de várias doenças inflamatórias (BURKE et al., 2019; ZARRIN et al., 2020).

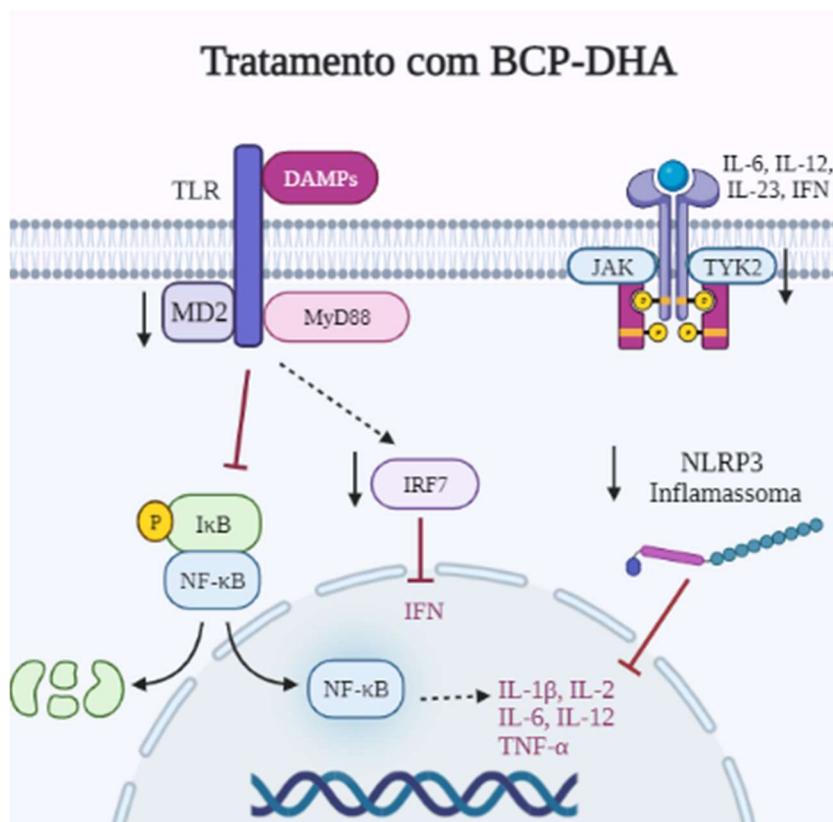


Figura 24. Caracterização da atividade anti-inflamatória do tratamento com BCP-DHA frente à infecção por MRSA. O reconhecimento de *Staphylococcus aureus* pelos receptores tipo toll-like presentes na membrana celular dá início a uma cascata de sinalização intracelular que resulta na dissociação do complexo NF-κB/IκB, translocação do NF-κB para o núcleo da célula e estímulo à síntese de citocinas pró-inflamatórias. O tratamento com BCP-DHA atua inibindo diferentes vias que resultariam na ativação do NF-κB, regulando negativamente a expressão dos genes MD2, IRF7, NLRP3 e TYK2, o que culmina em menor síntese e atuação de citocinas pró-inflamatórias.

Sob o estímulo infeccioso, vimos no nosso trabalho que houve ainda subexpressão de genes relacionados a vias inflamatórias, como CCL2, CSF2, CD40 e LY96. CCL2 é uma proteína quimioatraente de monócitos expressa em células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos, astrócitos, células T e tumorais, após estímulo inflamatório (p. ex. IL-1β, IL-6, TNFα, LPS, GM-CSF) (GSCHWANDTNER et al., 2019). O tratamento com DHA levou a rápida e limitada expressão de CCL2 no modelo de lesão miocárdica, indicando a inflamação restrita (HABITCH et al., 2020). No modelo de colite induzida por dextrano sulfato de sódio, houve regulação negativa

da expressão de CCL2 após o tratamento com BCP (CHO et al., 2007). O gene CSF2, que codifica a citocina GM-CSF, está diretamente envolvido na conversão do fenótipo M1 em M2 nos macrófagos, exercendo papel crucial na inflamação (LI et al., 2020). CD40 pertence à família do TNF α e, portanto, desempenha efeito pró-inflamatório e pró-trombótico (ANTONIADES et al., 2009). É sabido, conforme supracitado, que BCP e DHA atuam regulando negativamente a expressão das citocinas GM-CSF e TNF α . LY96, ou fator mieloide de diferenciação 2 (MD2), é um co-receptor que, mediante a identificação do LPS, se acopla ao TLR4 formando o complexo LPS-MD2-TLR4 e promove o recrutamento da proteína de diferenciação mieloide (Myd88), ativando as MAPKs e o NF κ B, resultando no estímulo a síntese de citocinas pró-inflamatórias (WANG, 2020). Na literatura são descritos efeitos agonistas do BCP sobre o CB2r e, dentre eles, está a inibição do complexo CD14/TLR4/MD2 como potente via de regulação da inflamação (SHARMA, 2016; JOHNSON et al., 2020), e foi sugerido recentemente que o DHA iniba a formação deste complexo, impedindo a cascata de sinalização inflamatória intracelular ao competir com o LPS pelo sítio de ligação (HWANG et al., 2016).

No grupo apenas tratado houve regulação positiva do Myd88, uma proteína adaptadora *downstream* dos TLRs, à exceção do TLR3, crítica para a transdução de sinais na via que resulta na ativação do NF- κ B (ZHENG et al., 2020). Apesar dos estudos descreverem que BCP e DHA promovem supressão da expressão do Myd88 (YOUNI, MOHAMED, 2019; LI et al., 2020; LI et al., 2021), nós encontramos o efeito contrário. No grupo tratado e infectado posteriormente houve aumento da expressão do TLR7 e do CCR4, um receptor de quimiocina predominantemente expresso pelas células Th2, relacionado com doenças inflamatórias e neoplasias de células T, como leucemias e linfomas (YOSHIE, MATUSHIMA, 2014; MATSUO et al., 2018; BOZZA et al., 2021).

Reações inflamatórias e estresse oxidativo caminham juntos em diversos cenários, desde as doenças infecciosas, agudas ou crônicas, até o desenvolvimento do câncer (REUTER et al., 2010). Na sepse, por exemplo, há hiperinflamação a partir da ativação da resposta imune por endotoxinas da parede celular de Gram-negativos (lipopolissacarídeos) e/ou exotoxinas de alguns Gram-positivos (peptideoglicanos, ácido lipoteicóico), vírus ou fungos, que são responsáveis pelos chamados “padrões moleculares associados ao dano” (PAMPs) (GENTILE; MOLDAWER, 2013). O

reconhecimento dos PAMPs por TLRs presentes em células de defesa resulta em uma extensa cascata de eventos que engloba a ativação de linfócitos, macrófagos, neutrófilos e síntese de mediadores inflamatórios (CASTRO et al., 2008). Com isso, há síntese elevada de radicais livres criando um ambiente de estresse oxidativo e causando dano endotelial, alterações miocárdicas e falência múltipla de órgãos, pois estimula a produção de fatores quimiotáticos, recrutamento de neutrófilos, peroxidação lipídica, dano ao DNA e liberação de citocinas pró-inflamatórias (RITTER, 2007).

No nosso estudo, verificamos que o BCP isolado foi eficaz no sequestro de radicais livres, cursando com EC 50 de 2,82 M, porém o DHA não exerceu efeito antioxidante. Calleja et al. (2013), utilizando os métodos DPPH e TBARS (Detecção de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) para avaliação do efeito antioxidante do BCP em modelo animal de fibrose hepática causada por tetracloreto de carbono, também, encontraram atividade protetora do BCP. Por eles foram observadas reduções dos níveis séricos das transaminases hepáticas, da lactato desidrogenase, da fosfatase alcalina e da bilirrubina total, de forma dose-dependente, sendo tais resultados associados à inibição da peroxidação lipídica e da 5-lipoxigenase por parte do BCP. Em concordância com o nosso achado, Dahham et al. (2015) analisaram a capacidade antioxidante do BCP através do teste DPPH e observaram resultados muito próximos aos do ácido ascórbico, cujo poder antioxidante é amplamente reconhecido. Gushiken et al. (2022) testaram os efeitos do BCP em modelos de feridas em ratos e verificaram através da dosagem citocinas pró-inflamatórias e de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase) a existência de potente atividade antioxidante do sesquiterpeno. A supressão de mRNA de fatores relacionados ao estresse oxidativo mediante tratamento com BCP foi identificada por Arizuka et al. (2017) em modelo de esteatohepatite não-alcoólica. Ainda em função de seus efeitos contra os radicais livres, o BCP foi descrito por Hashiesh et al. (2020) como uma molécula promissora no tratamento do diabetes e suas complicações. Baixas doses de BCP em cultura de condrócitos humanos foram suficientes para obter efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, de forma sinérgica ao ácido ascórbico, padrão ouro na avaliação antioxidante. No mesmo trabalho a combinação de BCP, ácido ascórbico e D-glicosamina foi capaz de promover a expressão de colágeno tipo 2, demonstrando capacidade condroprotetora e evidenciando sua possível utilização adjuvante em casos de osteoartrite (MATTIUZZO et al., 2021).

Apesar da literatura ressaltar a capacidade antioxidante do DHA (SCHÜLLER, 2016), nosso trabalho prévio demonstrou resultado similar, onde o DHA isolado não conseguiu impor atividade antioxidante no método de Griess de redução de nitritos (BRITO et al., 2019). Por ser um ácido graxo poli-insaturado e possuir várias duplas ligações de carbono torna-se um alvo bastante susceptível de oxidação, a qual pode ser enzimática, pelas enzimas COX e LOX, ou não enzimática, por espécies reativas (APPOLINÁRIO et al., 2011). A oxidação enzimática origina uma série ímpar de mediadores anti-inflamatórios, similares à aspirina, enquanto a não enzimática gera metabólitos como neurofuranos, neuroprostanos, aldeídos e hidroperóxidos, capazes de atuar de modo deletério, quando em excesso, modificando estruturas e funções das membranas celulares (DEROGIS, 2014). Considerando estas afirmações, sugere-se que as altas concentrações de radicais livres possam ter promovido a oxidação não enzimática do DHA (BRITO et al., 2019).

O ambiente pró-oxidativo presente na inflamação é etapa crucial na carcinogênese, seja por mecanismos de oxidação, nitração, halogenação nuclear de DNA, RNA e lipídeos ou por ativação de vias de sinalização mediadas por ROS (REUTER et al., 2010). Na pesquisa com células tumorais pulmonares (A549) e células de controle pulmonar (BEAS-2B) encontramos potente efeito antineoplásico das associações BCP-DHA, com destaque para o grupo 2 testado na concentração de 7,8 ug/mL + 72 ug/mL, respectivamente, o qual obteve êxito nos 3 testes realizados – viabilidade celular, adesão e migração celular.

As características do câncer, também chamados hallmarkers, compreendem seis capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento das etapas tumorais. Elas constituem um princípio organizacional para racionalizar as complexidades da neoplasia e incluem: sustentação da sinalização proliferativa, resistência à morte celular, permissão da imortalidade replicativa, indução da angiogênese e ativação dos processos de invasão e metástase. Junto a isso, somam-se a instabilidade genômica, aliada a diversidade genética que acelera sua aquisição, e a inflamação, que gera diversas funções de referencia. A biologia dos tumores não pode se restringir somente a numeração dos traços das células tumorais, mas deve compreender as contribuições do microambiente tumoral para a carcinogênese (HANAHAN, WEINBERG, 2011). Fouad e Aanei (2017), revisaram os hallmarkers supracitados e ampliaram as definições incluindo o microambiente tumoral e a contribuição do sistema imune, considerando:

crescimento seletivo e proliferação vantajosa, resposta alterada ao estresse favorecendo a sobrevivência global, vascularização, invasão e metástase, microambiente de cumplicidade e modulação imunológica (Figura 25). Eles ressaltam que, talvez, a chave para prevenção do câncer estaria na compreensão das características das células normais e da senescência, relacionado-as as marcas do câncer na tentativa de quebrar esse vínculo.

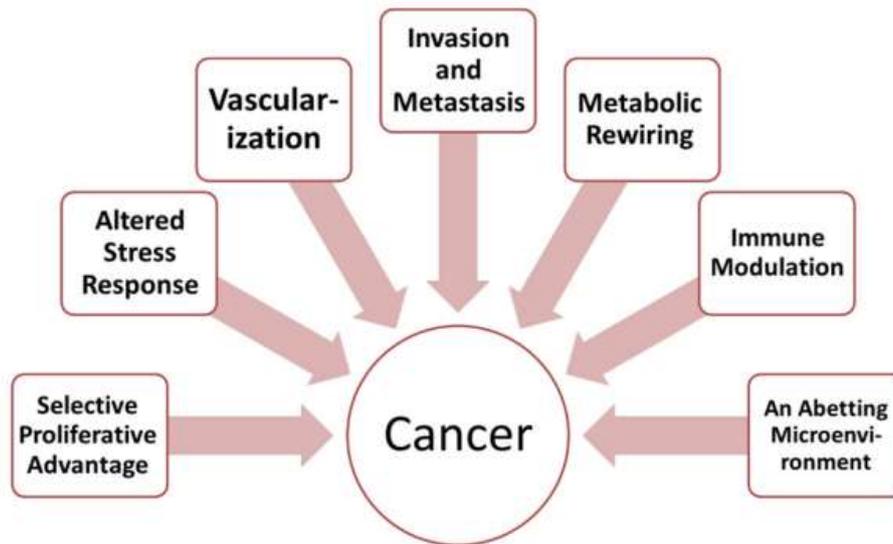


Figura 25. Hallmarkers revisados do câncer. Fonte: Fouad, Aanei (2017).

O BCP, em concentrações variáveis de 25 μM a 200 μM , reduziu a viabilidade celular da linhagem MM.1R de mieloma múltiplo, atingindo 80% de citotoxicidade quando testado na concentração de 50 μM . Foi ainda responsável por induzir apoptose por meio da ativação de moléculas como Bax e caspase 3 e por modular a proliferação celular através de um crosstalk entre Akt, β -catenina e ciclina D1/CDK em cultura de células MM.1S de mieloma múltiplo (MANNINO et al., 2021). Dentre várias linhagens de câncer testadas, o BCP demonstrou efeito anti-proliferativo seletivo contra câncer de cólon (HCT116, $\text{IC}_{50} = 19 \mu\text{M}$; HT29, $\text{IC}_{50} = 63 \mu\text{M}$) e de pâncreas (PANC-1, $\text{IC}_{50} = 27 \mu\text{M}$), induziu apoptose via condensação e fragmentação nuclear, incluindo ruptura da membrana mitocondrial, suprimiu a motilidade celular, migração, invasão e formação de colônias de câncer de cólon, de acordo com Dahham et al. (2015). Em um novo trabalho, Dahham et al. (2021) verificou que o BCP inibiu a motilidade da linhagem HUVEC, em 24h de tratamento, nas concentrações de 5 μM ($32 \pm 3,3\%$), 10 μM ($47,03 \pm 2,72\%$) e 20 μM ($62,02 \pm 2,23\%$). As atividades antineoplásicas dos canabinoides são baseadas basicamente em três mecanismos: indução de apoptose, repressão do ciclo celular e inibição de angiogênese e metástase. Por isso, o BCP é considerado um

importante candidato na terapêutica adjuvante no câncer (FIDYT et al., 2016). Uma variante do BCP, o óxido de BCP extraído da *Cinnamomum tamala*, exerceu efeito citotóxico em várias linhagens tumorais, como HeLa (adenocarcinoma cervical), HepG2 (leucemia), AGS (câncer de pulmão), SNU-1 e SNU-16 (câncer gástrico) (SHAHWAR et al., 2015).

Atividade antitumoral do DHA também foi bem descrita na literatura, como indutor de alta taxa de apoptose na concentração de 10 μ M sobre células de leucemia linfocítica crônica tipo B, de forma dose dependente, utilizando a fludarabina como controle positivo (GUIEZE et al., 2015). A associação de DHA e docetaxel promoveu inibição da metástase óssea, a partir de sítio primário pulmonar, em comparação com o quimioterápico isolado *in vivo*; inibição da migração celular e aumento do tempo de sobrevivência das células (30.6 dias *versus* 26.1 dias, respectivamente). Desta forma, sugeriu-se que a associação do DHA ao tratamento quimioterápico poderia exercer potencial terapêutico contra a metástase óssea em tumores de pulmão (JIANG et al., 2017). Utilizando as linhagens tumorais renais Caki-1 and 786-O, Tasaki et al. (2017) revelaram que o DHA reduziu a viabilidade e a proliferação celular através da indução de apoptose, assim como regulou positivamente a fosforilação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e negativamente a fosforilação do transdutor de sinal e ativador da transcrição STAT3 e Akt, moléculas chave na via de sinalização *downstream* do EGFR. Em modelo com células de câncer de ovário, de forma dose dependente, o DHA inibiu angiogênese, invasão e metástase, imprimindo *downregulation* sobre a expressão de genes relacionados com invasão e metástase (WAVE3, VEGF e MMP-9) e *upregulation* de genes anti-invasão/metástase (KISS-1, TIMP-1 e PPAR- γ), o que sugere que a suplementação dietética de DHA pode melhorar os desfechos clínicos no câncer (WANG et al., 2016). Estudo recente realizado com suplementação de DHA em ratos com câncer de mama aventou que metabólitos da via da lipoxigenase, como 4-DHA e 4-OXO-DHA são até mais eficientes na ativação do PPAR γ , na inibição do NF- κ B, supressão da PGE₂ e da sinalização PI3K / mTOR, indicando o 4-OXO-DHA como o metabólito de escolha para o futuro da quimioprevenção (CHEN et al, 2021).

No nosso estudo, as células A549 submetidas ao tratamento 1 (7,8 μ g/mL de BCP com 18 μ g/mL de DHA) apresentaram *up regulation* de genes envolvidos no ciclo celular (CDC25C, SMC1A), transporte nuclear, regulação da transcrição, apoptose e

estabilidade proteica (DDIT3 e SUMO1) e reparo do DNA (CHEK1), assim como subexpressão do PNKP – gene relacionado à excisão de nucleotídeos (HARICHARAN et al., 2014; MENYHÁRT et al., 2016). SMC1A é um gene envolvido na coesão dos cromossomos, reparo de DNA e é superexpresso em carcinomas colorretais e gliomas. CDC25C codifica a fosfatase 3, indutora da fase M do ciclo celular, está associado às propriedades neoplásicas das mutações na p53 (BARKEER et al., 2015). SUMO é um modificador pós-traducional da família ubiquitina que controla a função e o destino de milhares de proteínas. O processo de sumoilação desregulado está presente em várias doenças hematológicas malignas, onde participa da carcinogênese e da resposta neoplásica às terapias (BOULANGER et al., 2019). O DDIT3 funciona como um sensor de estresse celular que medeia a resposta de danos ao DNA e crescimento celular e, por pertencer à família de CCAAT proteínas de ligação de potenciador b (CEBPb), também, regula a diferenciação celular (LIN et al., 2020). CHEK1 codifica uma proteína quinase conservada e é considerado um ponto limitante de velocidade muito importante do ciclo celular, já que sua superexpressão pode ser um dos mecanismos que levam ao desenvolvimento de tumores malignos humanos, como câncer de pulmão, bexiga, cólon, estômago, ovário e colo do útero (WU et al., 2019).

Enquanto o tratamento 2 (7,8 ug/mL de BCP com 72 ug/mL de DHA) suprimiu a expressão de oncogenes (BAX), supressores tumorais (BRCA1), genes envolvidos no ciclo celular (ATM, BARD1, CDC25A, CSNK2A2, RAD1, RNF168, RNF8), no reparo do DNA (GADD45A, NBN, REV1), da excisão de nucleotídeos (DDB2, ERCC2, PNKP), de bases mal pareadas (MSH3, PMS2), reparo pós-replicação (RAD18) e na manutenção de telômeros (ERCC1, PRKDC, RAD50) (HARICHARAN et al., 2014; MENYHÁRT et al., 2016). O ciclo celular engloba uma série de eventos em que os componentes celulares são duplicados e, em seguida segregados em células-filhas. A replicação do DNA em eucariotos ocorre na fase de síntese (S) e a segregação cromossômica na fase de mitose (M). Duas fases gap separam as fases S e M, elas compõem o ciclo celular somático e são conhecidas como G1 e G2. Nelas ocorrem ganho de massa, integração de sinais de crescimento, síntese de RNAs e proteínas, síntese de DNA, organização do genoma replicado e preparo para segregação (BARNUM, O'CONNELL, 2014). O ciclo celular normal pode ser modulado por vários fatores, promovendo alterações na proliferação celular que representam características importantes das células tumorais. Nele, a passagem de fases é fortemente controlada.

Geralmente, após um dano ao genoma, ocorre uma resposta seguida pela ativação de checkpoints de dano ao DNA (nas fases G1 e G2), onde o ciclo celular é interrompido, restringindo, assim, a segregação cromossômica até o dano ser corrigido e os sistemas de reparo do DNA estimulados. A perda do checkpoint na fase G1 do ciclo celular é uma característica comum das células neoplásicas e favorece a replicação mutagênica de modelos danificados, falha esta que torna as células mais dependentes da fase S e pontos de verificação G2 para evitar a morte celular desencadeada por danos no DNA (DI SOTTO et al., 2020).

Os checkpoints e o reparo do DNA são as principais defesas contra a instabilidade genômica. A principal função dos checkpoints do dano e replicação é parar a progressão do ciclo celular quando ocorre dano ao DNA para remoção das lesões e reinício do ciclo. A primeira etapa na iniciação desses checkpoints é o reconhecimento do dano ao DNA, realizada pelos fatores RAD1, RAD9, RAD17, ATM, ATR. A ativação dessas proteínas fosforila substratos, como CHEK1, CHEK2 e P53 que, por sua vez, ativam proteínas efetoras que bloqueiam o ciclo celular. A proteína ATM, por exemplo, é essencial para a resposta imediata ao dano no DNA ocorrido em todas as fases do ciclo celular. Por ser supressora de tumor e ter a função de monitorar a integridade do genoma, a p53 possui papel crucial na carcinogênese e está associada a 50% de todos os tumores humanos (SILVA, 2018). Segundo a revisão de Newell et al. (2017), a administração de DHA consegue modular genes envolvidos nas fases S (ciclina A, ciclina E, CDK1, CDK2, pRB e p21), G1 (ciclina D1, CDK2, CDK4, pRB, p21) e G2 (ciclina B, CDK1, CDC25C, pRB, p21, GADD45A, GADD45B e GADD34). O BCP regula a via Akt, Wnt1, beta-catenina, o que demonstra que a estimulação dos CB2r reduz a proliferação através da modulação da sinalização Wnt/ β -catenina e regula o ciclo celular (MANNINO et al., 2021).

Nos últimos tempos, grandes avanços têm sido obtidos na identificação de reguladores do ciclo celular para melhor compreensão do processo de proliferação celular. O interesse por famílias de proteínas tem aumentado sobre a integração do metabolismo de adaptação que ocorre durante a proliferação celular e o controle da progressão do ciclo. As ciclinas e proteínas inibitórias CDKi mostram que os reguladores do ciclo celular podem controlar mudanças metabólicas necessárias para sobrevivência do tumor. Uma vez que as células neoplásicas altamente proliferativas estão sob alta pressão para cumprir suas demandas energéticas e biossintéticas é

importante a compreensão dos papéis canônicos do ciclo celular na regulação do tumoral e a descoberta de novos alvos metabólicos reguladores do ciclo celular, o que parece ser vantajoso na terapia combinada (LEAL-ESTEBAN, FAJAS, 2020). Como descrito anteriormente no presente estudo, não há na literatura relato de atividade antitumoral da associação de BCP e DHA. Por isso, pela primeira vez, demonstramos que eles possuem potente efeito citotóxico, inibem mecanismos de adesão e migração e ressaltamos em quais vias eles provavelmente atuam conjuntamente inibindo a replicação celular (Figura 26).

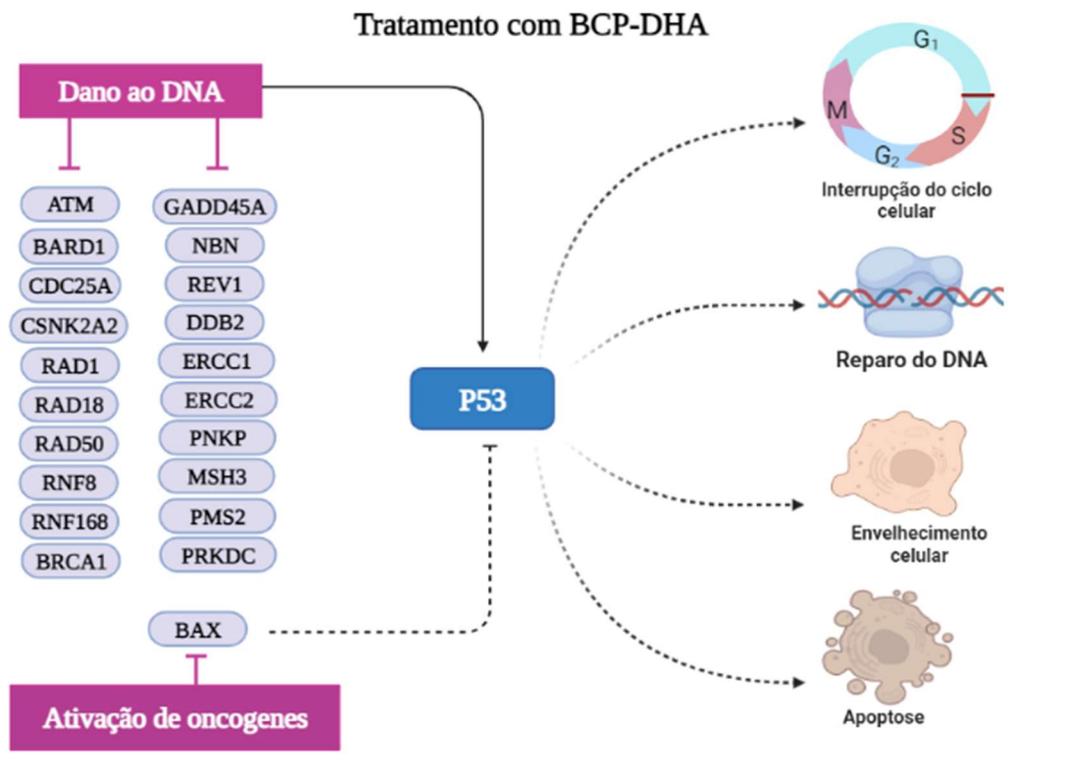


Figura 26. Caracterização da atividade antitumoral do tratamento com BCP-DHA em linhagem de câncer pulmão A549. A expressão de genes envolvidos no ciclo celular, no reparo do DNA, da excisão de nucleotídeos, de bases mal pareadas e pós replicação foi inibida pelo tratamento contendo a associação de 7,8 ug/mL de BCP com 18 ug/mL de DHA.

Diante disso, o maior destaque do presente trabalho foi a detecção das atividades analgésica, anti-inflamatória e antitumoral da associação de BCP e DHA, em modelos distintos. Identificamos vias de atuação até então não descritas na literatura no que tange a junção das duas substâncias nestes contextos. Fiorenzani et al. (2014) foi o primeiro trabalho a associar BCP e DHA, aplicando o modelo de nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina. Nós identificamos efeitos anti-inflamatório e bactericida em

nosso trabalho anterior, com redução da migração de neutrófilos em peritonite induzida por carragenina, menor contagem total e diferencial de leucócitos e menor recrutamento de neutrófilos nas análises histológicas de rim e pulmão após infecção bacteriana (BRITO et al., 2019). Agora identificamos vias de atuação até então não descritas na literatura no que tange à junção das duas substâncias nestes contextos. Logo, os resultados encontrados demonstram relevância, visto que nenhum outro estudo havia utilizado esta associação para investigação de efeitos anti-inflamatórios e antitumorais e que essa combinação pode configurar uma nova perspectiva terapêutica coadjuvante no combate à dor, inflamação, infecção e câncer, condições clínicas onerosas para a saúde pública, cujos índices de morbi-mortalidade são significativamente elevados e preocupantes. No entanto, mais estudos são necessários para aprofundar o entendimento desses efeitos *in vivo* e doses adequadas para uso.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Relevante potencial antinociceptivo da combinação BCP-DHA com resultados compatíveis com os fármacos de primeira escolha nos testes de nocicepção realizados;
- Inibição significativa dos níveis das citocinas pró-inflamatórias como GM-CSF, TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, sugerindo possível potencial anti-inflamatório;
- Regulação negativa de genes cruciais no processo inflamatório, como IL-2, IL-6, IRF7, NLRP3, CCL2, CSF2, CD40 e LY96, cujas vias resultam na inibição da dissociação do NF- κ B e na síntese/atuação de citocinas pró-inflamatórias;
- Primeira evidência da inibição do TYK2 pelo tratamento com BCP-DHA;
- Potente efeito antioxidante do BCP isolado;
- Atividade citotóxica significativa das 2 combinações de BCP-DHA testadas sobre linhagem tumoral A549, bem como importante inibição dos processos de adesão e migração celular;
- *Downregulation* de genes envolvidos no ciclo celular, no reparo do DNA, da excisão de nucleotídeos, de bases mal pareadas e pós replicação, na manutenção de telômeros, oncogenes e supressores tumorais mediante tratamento com BCP-DHA;
- Com isso, nossos resultados sugerem fortemente uma possível nova alternativa terapêutica nos contextos de dor, inflamação e câncer, sendo necessário que mais estudos sejam realizados para aprimorar doses e vias de administração.

REFERÊNCIAS

AGNEW, L.L.; COLDITZ, I.G. Development of a method of measuring cellular stress in cattle and sheep. **Vet Immunol Immunopathol.**, v. 123, n. 3–4, p. 197-204, 2008.

AGUILAR-ÁVILA, D.S. et al. B-Caryophyllene, a natural sesquiterpene, attenuates neuropathic pain and depressive-like behavior in experimental diabetic mice. **J Med Food**, v. 0, p. 1-9, 2019.

ALOISI, A.M.; CECCARELLI, I. Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. **Neuroscience**, v. 95, p. 559-66, 2000.

ÁLVAREZ-GONZALÉZ, I; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E; CASTRO-GARCÍA, S. Antigenotoxic capacity of beta-caryophyllene in mouse, and evaluation of its antioxidante and GST induction activities. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 39, n. 6, p. 849-859, 2014.

ALVES, J.E.O. et al. Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 8, p. 56-68, 2017.

ANTONIADES, C., BAKOGIANNIS, C., TOUSOULIS, D. et al. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, p. 669-677, 2009.

AOMATSU, M.; KATO, T.; KASAHARA, E. et al. Gender difference in tumor necrosis factor- α production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- γ . **Biochem Biophys Res Commun.** v. 441, n. 1, p. 220-225, 2013.

APPOLINÁRIO, P.P.; DEROGIS, P.B.M.C.; YAMAGUTI, T.H. et al. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurodegenerativas. **Química Nova**, v.34, n.8, p.1409-1416, 2011.

ARAVINDARAM, K.; YANG, N. Anti-Inflammatory Plant Natural Products for Cancer Therapy. **Planta Med**, v. 76, p. 1103–1117, 2010.

ARIZUKA, N; MURAKAMI, T; SUZUKI, K. The effect of β -caryophyllene on nonalcoholic steatohepatitis. **J Toxicol Pathol**, v. 30, p. 263–273, 2017.

ARULSELVAN, P. et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-15, 2016.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A.N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v. 21, v. 1321, p. 1-19, 2016.

AZAB, A., NASSAR, A. & AZAB, A.N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**. v. 21, n. 1321, p. 1-19, 2016.

BARAL, P.; UDIT, S.; CHIU, I.M. Pain and immunity: implications for host defence. **Nat Rev Immunol**. v. 19, n. 7, p. 433–447, 2019.

BARKEER, S. et al., Molecular mechanism of anticancer effect of Sclerotium rolfsii lectin in HT29 cells involves differential expression of genes associated with multiple signaling pathways: A microarray analysis. **Glycobiology**, v. 25, n. 12, P. 1375–1391, 2015.

BARNUM, K.J.; O'CONNELL, M.J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. **Methods Mol Biol**. v. 1170, p. 29–40, 2014.

BARRETO, R.S.; PEREIRA, G.A.S; COSTA, L.J. et al. O duplo papel da inflamação no surgimento das lesões cancerígenas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 14, n. 4, p. 107-114, 2011.

BARTLEY, E.J.; FILLINGIM, R.B. Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. **British Journal of Anaesthesia**, v. 111, p. 52–58, 2013.

BENNINGHOFF, A.D. et al. Docosahexaenoic acid consumption impedes early interferon- and chemokine-related gene expression while suppressing silica-triggered flaring of murine lupus. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-26, 2019.

BENTO, A.F.; MARCON, R.; DUTRA, R.C. et al. β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR- γ pathway. **Am J Pathol**, v. 178, p. 1153- 1166, 2011.

BOULANGER, M.; PAOLILLO, R.; PIECHACZYK, M. et al. The SUMO Pathway in Hematological malignancies and their response to therapies. **Int. J. Mol. Sci.**, v 20, p. 1-18, 2019.

BOZZA, S. et al. Small molecule CCR4 antagonists protect mice from aspergillus infection and allergy. **Biomolecules**, v. 11, p. 1-11, 2021.

BRAVO, E.; NAPOLITANO, M.R.; VALENTINI, S.B. et al. Neutrophil unsaturated fatty acid release by GM-CSF is impaired in cystic fibrosis. **Lipids Health Diseases**, v. 9, p. 1-5, 2010.

BRITO, L.F. et al. Perfil nutricional de pacientes oncológicos assistidos pela Casa de Acolhimento ao Paciente Oncológico do Sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira De Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 163-171, 2012.

BRITO, L.F. et al. Anti-inflammatory activity of β -caryophyllene combined with docosahexaenoic acid in a model of sepsis induced by *Staphylococcus aureus* in mice. **J Sci Food Agric.**, v. 99, p. 1-11, 2019.

BURKE, J.R. et al. Autoimmune pathways in mice and humans are blocked by pharmacological stabilization of the TYK2 pseudokinase domain. **Sci. Transl. Med.**, v. 11, eaaw 1736, 2019.

CALDER, P.C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. **J. Nutr.**, v. 142, p. 592S-599S, 2012.

CALLEJA, M.A.; VIEITES, J.M.; MONTERO-METERDEZ, T. A. et al. The antioxidant effect of b-caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 394–401, 2013.

CASTRO, E.O.; FIGUEIREDO, M.R.; BORTOLOTTI, L. et al. Sepsis e choque séptico na gestação: manejo clínico. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 30, n. 12, p. 631-638, 2008.

CAVAILLON, J.M. Once upon a time, inflammation. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, v. 27, p. 1-11, 2021.

CAWCUTT, K.A.; PETERS, S.G. Severe Sepsis and Septic Shock: Clinical Overview and Update on Management. **Mayo Clin Proc**. v. 89, n. 11, p. 1572-1578, 2014.

CECCARELLI, I. et al. The CB2 agonist β -Caryophyllene in male and female rats exposed to a model of persistent inflammatory pain. **Frontiers in neuroscience**, v. 14, p. 1-11, 2020.

CERQUEIRA, S.R.P. Os ácidos gordos ómega-3 e os seus efeitos anti-inflamatórios. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Saúde. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Porto. Porto, 2013.

CHAI, E.Z.; SIVEEN, K.S.; SHANMUGAM, M.K. et al. Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer [J]. **Biochem J**, v. 468, n. 1, p. 1–15, 2015.

CHEN, L., DENG, H., CUI, H. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, p. 7204-7218, 2018.

CHEN, K.M.; THOMPSON, H.; VANDEN-HEUVEL, J.P. et al. Lipoxygenase catalyzed metabolites derived from docosahexaenoic acid are promising antitumor agents against breast cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 410, p. 1-10, 2021.

CHEN, O.; DONNELLY, C.R.; JI, R. Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 62, p. 17–25, 2021.

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

CONLON, K.C.; MILJKOVIC, M.D.; WALDMANN, T.A. Cytokines in the treatment of cancer. **J Interferon Cytokine Res.**, v. 39, n. 1, p. 6-21, 2019.

COSTA, A.N.; COSTA, F.M.; CAMPOS, S.V. et al. Microbioma pulmonar: desafios de um novo paradigma. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 44, n. 5, 2018.

COTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S. et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-7, 2013.

CRUZ, M. P. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and Flavones Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). **PLoS ONE**, v. 1, n. 3, p. 1-29, 2016.

DAHAM, S.S.; TABANA, Y.M.; IQBAL, M.A. et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, p. 11808-11829, 2015.

DAHAM, S.S. et al. β -Caryophyllene induces apoptosis and inhibits angiogenesis in colorectal cancer models. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22, n. 10550, p. 1-20, 2021.

CARVALHO, S. P. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV and V isolated from healthy children attending public daycares in northeastern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 21, p. 464–467, 2017.

DELGADO-ORTEGA, M.; MARC, D.; DUPONT, J. et al. SOCS proteins in infectious diseases of mammals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 151, n. 1–2, p. 1-19, 2013.

DENG, L.; QI, M.; LI, N. et al. Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. **J Leukoc Biol.**, v. 108, p.493–508, 2020.

DEROGIS, P.B.M.C. Estudos dos produtos da oxidação não enzimática do ácido docosahexanóico como possíveis biomarcadores para doenças neurodegenerativas. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

DI SOTTO, A.; GIACOMO, S.; RUBINI, E. et al. Modulation of STAT3 Signaling, Cell Redox Defenses and Cell Cycle Checkpoints by β -Caryophyllene in Cholangiocarcinoma Cells: Possible Mechanisms Accounting for Doxorubicin Chemosensitization and Chemoprevention. **Cells**, v. 9, n. 858, p. 1-34, 2020.

DINARELLO, C.A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunol Rev**, v. 281, p. 8–27, 2018.

DING, L.; JING, H.; QIN, B. et al. Regulation of cell division and growth in roots of *Lactuca sativa* L. seedlings by the Ent-Kaurene diterpenoid ramosin B. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 5, p. 553-63, 2010.

DÓREA, R.S.D.M. Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações da folha de *Schinopsis brasiliensis* Engler coletada no semiárido da Bahia. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2015.

ETIENNE, R., VIEGAS, F.P.D.; VIEGAS JR, C. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Rev. Virtual Quim.**, v. 13, n. 1, p. 1-25, 2021.

EVANS, L. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. **Intensive Care Med**, v. 47, p. 1181–1247, 2021.

FABIAN, C.J.; KIMLER, B.F.; HURSTING, S.D. Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 62, p. 1-11, 2015.

FANE, M.; WEERARATNA. How the ageing microenvironment influences tumour progression. **Nat Rev Cancer.**, v. 20, n. 2, p. 89–106, 2020.

FERRAZ, I.G. Estudo de atividades farmacológicas do óleo essencial extraído de *Eugenia brejoensis* Mazine. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.

FERREIRA, A.R.A. Uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos. Dissertação de mestrado. 87 p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

FERREIRA, D.A.S. Avaliação do efeito protetor do beta cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

FIORENZANI, P., LAMPONI, S., MAGNANI, A et al. *In Vitro* and *In Vivo* Characterization of the New Analgesic Combination Beta-Caryophyllene and Docosahexaenoic Acid. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

FISHBEIN, A.; HAMMOCK, B.D. SERHAN, C.N. et al. Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 218, p. 1-36, 2021.

FOUAD, Y.A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res**, v. 7, n. 5, p. 1016-1036, 2017.

FREY, V. Abhandlungen der Königl. Sächsische. **Gesellschaft der Wissenschaften**. v. 23, p. 188, 1896.

FRIEDENREICH, C.M.; STONE, C.R.; CHEUNG, W.Y. et al. Physical activity and mortality in cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. **JNCI Cancer Spectr.** v. 4, n. 1, p. 1-23, 2019.

FRIEDENREICH, C.M.; RYDER-BURBIDGE, C; MCNEIL, J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. **Molecular Oncology**, v. 15, p. 790–800, 2021.

GALIÈGUEB S.; MARY, S.; MARCHAND, J. et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, n. 1, p. 54-61, 1995.

GALON, J.; BRUNI, D. Tumor immunology and tumor evolution: intertwined histories. **Immunity**. v. 52, p. 55-81, 2020.

GARÓFOLO, A. Nutrição clínica, funcional e preventiva aplicada à oncologia: teoria e prática profissional. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012.

GENTILE, L.F.; MOLDAWER, L.R. DAMPS, PAMPS and the Origins of SIRS in bacterial Sepsis. **Shock**. v. 39, n. 1, p. 113-114, 2013.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Science – PNAS**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GHEORGHITĂ, V.; BARBU, A.E.; GHEORGHIU, M.L. et al. Endocrine dysfunction in sepsis: a beneficial or deleterious host response? **GERMS**, v.5, n. 1, p. 17-25, 2015.

GIMENES, S. N. C., LOPES, D. S., ALVES, P. T. et al. Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7077, 2017.

GRETEN, F.R.; GRIVENNIKOV, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, v. 51, p. 27–41, 2019.

GSCHWANDTNER, M.; DERLER, R.; MIDWOOD, K.S. More than just attractive: How CCL2 influences myeloid cell behavior beyond chemotaxis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1-29, 2019.

GUIÈZE, R.; GYAN, E., TOURNILHA, O. et al. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. **Hematology Reports**, v. 7, n. 6043, p. 90-92, 2015.

GUISHIKEN, L.F.S.; BESERRA, F.P.; HUSSNI, M.F. et al. Beta-caryophyllene as an antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1-21, 2022.

HABICHT, I. et al. DHA supplementation attenuates MI-induced LV matrix remodeling and dysfunction in mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1-14, 2020.

HAMILTON, J.A. GM-CSF in inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, p. 1-19, 2019.

HANAHAN, D.; WEINBER, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARICHARAN, S.; BAINBRIDGE, M.N.; SCHEET, P. et al. Somatic mutation load of estrogen receptor-positive breast tumors predicts overall survival: an analysis of genome sequence data. **Breast Cancer Res Treat**, v. 146, p. 211–220, 2014.

HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R. A.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**. AOP, published online (2015).

HASHIESH, H.M.; MEERAN, N.; SHARMA, C. et al. Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Cannabinoid in Diabetes and Associated Complications. **Nutrients**, v. 12, n. 2963, p. 1-30, 2020.

HASSOUN, A.; LINDEN, P.K.; FRIEDMAN, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical Care**. v. 21, n. 211, p. 1-10, 2017.

HOFFMANN, K.H. Essential oils. **Z. Naturforsch.** Editorial. v. 75, p 7-8, 2020.

HUANG, W.L.; KING, V.R.; CURRAN, O.E. et al. A combination of intravenous and dietary docosahexaenoic acid significantly improves outcome after spinal cord injury. **Brain**, v. 130, n.11, p. 3004-3019, 2007.

HWANG, D.H.; KIM, J.; LEE, J.Y. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. **Eur J Pharmacol.**, v. 15, p. 24-35, 2016.

ILAS-INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. Disponível em: <http://www.sepsisnet.org/pg.php?v=o-que-e-sepse>. Acesso em 22 de janeiro de 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JI, R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**. v. 4, n. 354, p. 572–577, 2016.

JI, R.; NCKLEY, A.; HUH, Y. et al. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. **Anesthesiology**, v. 129, n. 2, p. 343–366, 2018.

JIANG, S.; LIU, Z.; WU, L. et al. Tumor targeting with docosahexaenoic acid-conjugated docetaxel for inhibiting lung cancer metastasis to bone. **Oncology Letters**. v. 16, p. 2911-2920, 2018.

JOHNSON, S. A.; RODRIGUEZ, D.; ALLRED, K. A systematic review of essential oils and the endocannabinoid system: a connection worthy of further exploration. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p. 1-13, 2020.

KANY, S.; VOLLRATH, J.T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease. **Int. J. Mol. Sci.** v. 20, p. 1-31, 2019.

KIELAR, M. L.; JEYARAJAH, D. R.; ZHOU, X. J. et al. Docosahexaenoic acid ameliorates murine ischemic acute renal failure and prevents increases in mrna abundance for both TNF- α and inducible nitric oxide synthase. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.14, n. 2, p. 389–396, 2003.

KIM, Y.S.; PARK, S.J.; LEE, E.J. et al. Antibacterial compounds from Rose Bengal-sensitized photooxidation of beta-caryophyllene. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, p. 540-545, 2008.

KLAUKE, A.L.; RACZ, I.; PRADIER, B. et al. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid betacaryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 608–620, 2014.

KONG, W., YEN, J., VASSILIOU, E. et al. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and *in vitro* and *in vivo* expression of the IL-12 cytokine Family. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 1-10, 2010.

KUMAR, V. Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. **International Immunopharmacology**, v. 89, p. 1-25, 2020.

KUWAHATA, H. et al. Local peripheral effects of β -caryophyllene through cb2 receptors in neuropathic pain in mice. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 3, p. 397-403, 2012.

KUWAHATA, H. et al. Local peripheral effects of β -caryophyllene through cb2 receptors in neuropathic pain in mice. **J Interferon Cytokine Res**, v. 32, p. 60-5, 2012.

LAN, T.; CHEN, L.; WEI, X. Inflammatory cytokines in cancer: comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy. **Cells**, v. 10, p. 1-16, 2021.

LAURIDSEN, C. From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system. **Poultry Science**, v. 0, p. 1–7, 2018.

LEAL-ESTEBAN, L.C.; FAJAS, L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. **BA - Molecular Basis of Disease**, v. 165715, p. 1-10, 2020.

LEE, A.S.; LENCASTRE, H.; GARAU, J. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews | Disease Primers**. v. 4, p. 1-23, 2018.

LEWANDOWSKA-SABAT, A.M.; BOMAN, G.M.; DOWNING, A. et al. The early phase transcriptome of bovine monocyte-derived macrophages infected with *Staphylococcus aureus* in vitro. **Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2013.

LI, J. et al. Resolvin D1 mitigates non-alcoholic steatohepatitis by suppressing the TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK pathways and activating the Nrf2 pathway in mice. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 1-13, 2020.

LI, W. et al. β -caryophyllene ameliorates MSU-induced gouty arthritis and inflammation through inhibiting NLRP3 and NF- κ B signal pathway: *in silico* and *in vivo*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 1-13, 2021.

LI, Y. et al. Csf2 attenuated sepsis-induced acute kidney injury by promoting alternative macrophage transition. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1-14, 2020.

LIN, H. et al. DDIT3 modulates cancer stemness in gastric cancer by directly regulating CEBP β . **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p. 1-9, 2020.

LINDSEY, L.P. et al. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, improves working memory and reduces circulating levels of specific proinflammatory cytokines in aged male mice. **Behav Brain Res**, v. 17, p. 1-22, 2017.

LOBO, G.M.; SANTOS, M.P. Benefícios do uso da glutamina em pacientes críticos. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 27, n. 2, p. 112-8, 2012.

LUZETE, B.C. Efeitos do ácido docosahexaenoico (DHA) e do ácido araquidônico (AA) sobre a morte celular da linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. Brasília, 2015.

MARTIN, G.S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 10, n. 6, p. 701-706, 2012.

MANNINO, F.; PALLIO, G.; CORSARO, R. et al. Beta-Caryophyllene Exhibits Anti-Proliferative Effects through Apoptosis Induction and Cell Cycle Modulation in Multiple Myeloma Cells. **Cancers**, v. 13, n. 5741, p. 1-14, 2021.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal of Anesthesia**. v. 33, p. 131–139, 2019.

MATSUO, K. et al. CCR4 is critically involved in skin allergic inflammation of BALB/c mice. **J Invest Dermatol.**, v. 138, p. 1764-1773, 2018.

MATTIUZZO, E.; FAGGIAN, A.; VENERANDO, A. et al. In vitro effects of low doses of β -caryophyllene, ascorbic acid and d-glucosamine on human chondrocyte viability and inflammation. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 286, p. 1-13, 2021.

MC LEE, K.; ACHUTHAN, A.A.; HAMILTON, J.A. GM-CSF: a promising target in inflammation and autoimmunity. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 9, p. 225–240, 2020.

MENYHÁRT, O.; HARAMI-PAPP, H.; SUKUMAR, S. et al. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1866, p. 300–319, 2016.

MILLS, S.E.E.; NICOLSON, K.P.; SMITH, B.H. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. **British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 2, p. e273ee283, 2019.

MOREIRA, B.O.; CARVALHO, A.L.; ALVES, C.Q. Evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and biological activities of *Cenostigma macrophyllum* standardized extracts and determination and quantification of the main metabolites. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 9, p. 41256–41268, 2019.

MORELLI, N.R.; ENOKIDA, D.M. Trauma, Sepsis e Desnutrição: Um Estudo de Caso. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v.15, n. 1, p. 59-63, 2013.

MURAKAMI, M.; KAMIMURA, D.; HIRANO, T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. **Immunity**, v. 50, p. 812-831, 2019.

NAKAMOTO, K.; NISHINAKA, T.; MANKURA, M. et al. Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 6, p. 1070-1072, 2010.

NEGREIROS, M.O. Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Heterothalamus sp.* sobre *Enterococcus faecalis*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

NEWELL, M.; BAKER, K.; POSTOVIT, L.M. A Critical Review on the Effect of Docosahexaenoic Acid (DHA) on Cancer Cell Cycle Progression. **Int. J. Mol. Sci.** v. 18, v. 1784, p. 1-14, 2017.

NI, J; ZANG, L. Cancer cachexia: definition, staging, and emerging treatments. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 5597-5605, 2020.

NISHINAKA, T.; MATSUMOTO, K.; NAKAMOTO, K. et al. Elucidation of mechanisms underlying docosahexaenoic acid-induced antinociception. **Yakugaku Zasshi**, v. 133, n. 5, p. 493-9, 2013.

OLIVEIRA, A.M.C. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum spp.* Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição. Universidade Federal do Piauí. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Nutrição. Teresina, 2011.

OLIVEIRA, H.B.M. et al. Citral modulates virulence factors in methicillin-resistant **Staphylococcus aureus**. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-11, 2021.

OZ, H.S.; CHEN, T.S.; NEUMAN, M. Nutrition Intervention: A Strategy Against Systemic Inflammatory Syndrome. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 380-389, 2009.

OZENVER, N.; EFFERTH, T. Phytochemical inhibitors of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. **Pharmacological Research**, v. 170, p. 1-28, 2021.

PATTERSON, A.D.; GONZALEZ, F.J.; PERDEW, G.H. et al. Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 277–283, 2018.

PIERETTI, S. et al. Gender differences in pain and its relief. **Ann Ist Super Sanità**, v. 52, p. 164-189, 2016.

PRAUCHNER, C.A. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Burns**, 2016.

QIN, J.; WANG, W.; ZHANG, R. Novel natural product therapeutics targeting both inflammation and cancer. **Chin J Nat Med**. v. 15, n. 6, p. 401–416, 2017.

RAHMAN, M.; VEIGAS, M.; WILLIAMS, P.J. et al. DHA is a more potent inhibitor of breast cancer metastasis to bone and related osteolysis than EPA. **Breast Cancer Res Treat**. v. 141, n. 3, p. 1-19, 2013.

RAHMAN, N. SCOTT, R.H. Cancer associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. *Human Molecules Genetics*. v. 16, p. 60-66, 2007.

RAMSEYA, J.T.; SHROPSHIREA, B.C.; NAGYA, T.R. et al. Essential Oils and Health. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 93, p.291-305, 2020.

RASHID, N.A. et al. *Polygonum minus* essential oil modulates cisplatin induced hepatotoxicity through inflammatory and apoptotic pathways. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 1246-1265, 2020.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radic Biol Med**. v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.

RICHARD, C.; CALDER, P.C. Docosahexaenoic Acid. **Adv Nutr**, v. 7, p. 1139–1141, 2016.

RITTER, C. Estresse oxidativo e desenvolvimento de doenças inflamatórias agudas: possível papel terapêutico de antioxidantes. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. Instituto de Ciências Básicas em Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

ROSENDAL, G. The convention on biological diversity: a viable instrument for conservation and sustainable use? **Green Globe Yearbook of International Co - operation on Environment and Development**, p. 69-81, 1995.

SCAINI, G.; ROCHI, N.; BENEDET, J. et al. Inibição da atividade da citrato sintase cerebral em um modelo animal de sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v.23, n.2, p. 158-163, 2011.

SCANDIFFIO, R.; GEDDO, F.; COTTONE, E. et al. Protective Effects of (E)- β -Caryophyllene (BCP) in Chronic Inflammation. **Nutrients**, v. 12, n. 3273, p. 1-24, 2020.

SCHÜLLER, A.K. Antioxidantes restauram alterações provocadas pela ovariectomia no fígado de ratas. Dissertação de Mestrado. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2016.

SILVA, M.P.N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p 59-77, 2006.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, E. D. Expressão de genes reguladores do ciclo celular e apoptose em explantes de tumores mamários de fêmeas caninas tratados com diferentes isômeros de ácido linoleico conjugado. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade Estadual de Santa Catarina. Lages, 2018.

SHAHWAR, D.S.; ULLAH, M.A.; KHAN, N. et al. Anticancer activity of Cinnamon tamala leaf constituents towards human ovarian cancer cells. **Pak. J.Pharm. Sci.** v. 28, p. 969–972, 2015.

SHARMA, C. Polypharmacological properties and therapeutic potential of B-Caryophyllene: a dietary phytocannabinoid of pharmaceutical promise. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, p. 1-28, 2016.

SILVA, L.L.; D'AMICO, E.A. Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em pacientes sob terapia antiplaquetária à base de ácido acetilsalicílico. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. 6, p. 463-468, 2010.

SILVA, C.M.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Cienc. Cult.**, v. 66, n.1, p. 38-42, 2014.

SILVA, E.A. avaliação química e farmacológica do óleo destilado de copaíba (*Copaifera* spp. – *Leguminosae Caesalpinoideae*) e aplicações biotecnológicas. Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica. Manaus, 2019.

SILVEIRA, S.R.; FERREIRA, L.F.L.; LAGE, M.H.H. Fisiopatologia da sepse: revisão de literatura. **PUBVET**, v. 8, n. 9, p. 1-45, 2014.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P.; CALIXTO-LIMA, L. et al. Sepse: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 2011.

SLAGSVOLD, J.E.; PETTERSEN, C.H.H.; STØRVOLD, G.L. et al. DHA alters expression of target proteins of cancer therapy in chemotherapy resistant SW620 colon cancer cells'. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 5, p. 611-621, 2010.

SOUSA, J.C. Fatores reguladores de interferon (IRFs) em pacientes com síndrome mielodisplásica. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE. 2015.

SUN, G.Y.; SIMONYIA, A.; FRITSCHER, K.L. Docosahexaenoic acid (DHA): An essential nutrient and a nutraceutical for brain health and diseases. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 136, p. 3–13, 2018.

SUNG, H.; FERLAY, J; SIEGEL, R.L. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **Ca Cancer J Clin**, v. 71, p. 209–249, 2021.

SZILÁGYI, B.; FEJES, Z.; PÓCSI, M. et al. Role of sepsis modulated circulating microRNAs. **The Journal of International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 130, n. 2, p. 128-145, 2019.

TASAKI, S.; HORIGUCHI, A.; ASANO, T. et al. Docosahexaenoic acid inhibits the phosphorylation of STAT3 and the growth and invasion of renal cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, p. 1146-1152, 2017.

THEODORATOU, E.; TIMOFEEVA, M.; LI, X. Nature, Nurture and cancer risks: Genetic and nutritional contributions to câncer. **Annu Rev Nutr.**, v. 21, n. 37, p. 293–320, 2017.

TROUVIN, A.; PERROT, S. New concepts of pain. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 1014152, p. 1-10, 2019.

VACCA, V.; MARINELLI, S.; PIERONI, L. et al. 17beta-estradiol counteracts neuropathic pain: a behavioural, immunohistochemical, and proteomic investigation on sex-related differences in mice. **Sci Rep**, v. 8, n. 18980, 2016.

VASCONCELOS, S.M.L; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VASCONCELOS, T.B.; CARDOSO, A.R.N.R.; JOSINO, J.B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

VIGNALI, D.A.A.; KUCHROO, K. IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. **Nat Immunol.**, v. 13, p. 722–728, 2012.

VOGTMANN, E.; GOEDERT, J.J. Epidemiologic studies of the human microbiome and câncer. *Br J Cancer*. v. 114, n. 3, p. 237-242, 2016.

WAITZBERG, Dan Lineztky. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica - Vol. 1 - 5ª Ed.* Atheneu, 2017.

WALTER, M.R. The molecular basis of IL-10 function: from receptor structure to the onset of signaling. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 380, p. 191–212, 2014.

WANG, L. WUA, C.; RAJASEKARAN, N. Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: an overview. **Cell Physiol Biochem**, v. 51, p. 2647-2693, 2018.

WANG, X.; WONG, K.; OUYANG, W. et al. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 11, a028548, 2019.

WANG, Y. MD2 activation by direct AGE interaction drives inflammatory diabetic cardiomyopathy. **Nature Communications**, v. 11, p. 1-16, 2020.

WIERENGA, K.A. Docosahexaenoic acid suppresses silica-induced inflammasome activation and IL-1 cytokine release by interfering with priming signal. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-19, 2019.

WONG-ROLLE, A.; WEI, H.K.; ZHAO, C. et al. Unexpected guests in the tumor microenvironment: microbiome in câncer. **Protein Cell**, v. 12, n. 5, p. 426–435, 2021.

WORLD CANCER RESEARCH FUND/ AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective. Continuous Update Project Expert Report 2018.

WORLD CANCER RESEARCH FUND/ AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Worldwide cancer data. Disponível em: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>. Acessado em junho de 2022.

WU, M. et al. Interferon regulatory factor 7 (IRF7) represents a link between inflammation and fibrosis in the pathogenesis of systemic sclerosis. **Ann Rheum Dis.**, p. 1–9, 2019.

WU, M. et al. The clinical significance of CHEK1 in breast cancer: a high-throughput data analysis and immunohistochemical study. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 12, n. 1, p 1-20, 2019.

XI, S.; CUI, P.; SHI, W. et al. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 99, p. 1-10, 2020.

YAN, J.; SMYTH, M.J.; TENG, M.W.L. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 10, a028530, 2018.

YOUNIS, N.S.; MOHAMED, M. E. β -Caryophyllene as a potential protective agent against myocardial injury: the role of toll-like receptors. **Molecules**, v. 24, p. 1-16, 2019.

YOSHIE, O.; MATUSHIMA, K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. **International Immunology**, v. 27, p. 11–20, 2014.

ZARRIN, A.A.; BAO, K.; LUPARDUS, P. et al. Kinase inhibition in autoimmunity and inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 39-63, 2020.

ZHENG, C.; CHEN, J.; CHU, F. et al. Inflammatory role of TLR-MyD88 signaling in multiple sclerosis. **Front. Mol. Neurosci.**, v. 12, p. 1-12, 2020.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Avaliação das atividades biológicas da associação de β -cariofileno e ácido docosahexanóico em modelos experimentais.

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____,
profissão _____, residente e domiciliado na

portador da cédula de identidade, RG _____, e inscrito no
CPF _____ nascido em ____ / ____ / _____, abaixo

assinado, concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário do estudo “Avaliação das atividades biológicas da associação de β -cariofileno e ácido docosahexanóico em modelos experimentais”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

I) O estudo se faz necessário para avaliar o papel dos hormônios sexuais na resposta imunológica de monócitos e neutrófilos a ser estudado no projeto “Avaliação das atividades biológicas da associação de β -cariofileno e ácido docosahexanóico em modelos experimentais”;

II) Serei questionado sobre idade, altura, peso, saúde geral, história familiar, hábitos como álcool, tabagismo e uso de medicações. Indivíduos abaixo do peso, obesos, diabéticos e em uso de medicações não serão incluídos neste estudo. A nutricionista Laís Ferraz Brito estará presente durante todo o momento de aplicação do questionário para o esclarecimento de eventuais dúvidas;

III) A minha pressão arterial será aferida uma vez pela nutricionista Laís Ferraz Brito para averiguar o bom estado de saúde geral;

IV) A minha participação nesse projeto consiste em doar de 36 a 38 mL de sangue. A primeira coleta será realizada em um laboratório particular de análises clínicas em Vitória da Conquista/BA, com certificação de qualidade do Sistema Nacional de Acreditação – DICQ, após jejum de 12 horas, com avaliação de hemograma completo, perfil lipídico e glicemia. A quantidade de sangue coletada para realização de tais procedimentos varia entre 6 a 8 mL. O objetivo dessa primeira coleta é averiguar o bom estado de saúde geral do doador;

V) Após confirmação de bom estado de saúde geral, será realizada uma segunda coleta de 30 mL de sangue nos doadores. Essas coletas ocorrerão no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (IMS/UFBA), situado em Vitória da Conquista/BA, por enfermeiros habilitados (Clarrisa Leal Silva e Souza e Guilherme Barreto Campos). As amostras serão imediatamente encaminhadas ao laboratório de Microbiologia e Imunologia do IMS/UFBA, em caixas térmicas acondicionadas com gelo, para as devidas análises descritas na metodologia;

VI) No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor suportável decorrente da punção da pele. Para minimizar essa possível dor, é recomendado que os participantes tenham uma boa ingestão hídrica por um dia antes da coleta, visto que a ingestão de oito a dez copos de líquidos por dia ajuda o sangue a fluir melhor e torna as veias mais fáceis de serem encontradas e perfuradas. Também é recomendado caminhar enquanto espera o exame, para aumentar o fluxo do sangue e manter as veias cheias. Em caso de ansiedade, é recomendado que o participantes converse ou lembre-se de algo agradável enquanto espera pela coleta. Também é interessante ler ou ouvir música ou gravações que sejam relaxantes;

VII) Devo informar caso apresente tendência para sentir tontura ou desmaiar, para que a coleta seja realizada comigo deitado em maca para prevenir um desmaio e/ou queda. Caso eu sinta tontura ou sensação de desmaio em qualquer momento, abaixar a cabeça e colocá-la entre as pernas ou deitar-se vai ajudar-me a melhorar;

VIII) Será utilizado um sistema fechado, a vácuo, totalmente descartável. As agulhas deste sistema destacam-se pelo corte de seu bisel e sua excelente capacidade de deslizamento durante a punção, minimizando o desconforto da punção durante a coleta de sangue. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção

geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Se uma mancha roxa, eventualmente, aparecer no local da coleta, é recomendado que eu faça uma compressa de gelo no local, quatro vezes ao dia, nas primeiras 24 horas. Caso sinta alguma dor, é recomendado fazer uso de meu analgésico de costume. Se o hematoma trouxer alguma preocupação, devo informar no telefone (77) 3429-2719 ou por e-mail para lucasm@ufba.br;

IX) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;

X) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

XI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico;

XII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

XIII) Os dados dos participantes serão codificados de modo a serem anonimizados antes que outros integrantes/auxiliares da pesquisa tenham acesso, a fim de garantir a privacidade. Todos os participantes do projeto deverão assegurar o compromisso profissional com o sigilo absoluto das informações do TCLE. O questionário somente será acessado pela pesquisadora Laís Ferraz Brito. A confidencialidade das informações será assegurada mediante assinatura deste termo pelos responsáveis pela pesquisa. Não serão repassados a terceiros dados referentes aos participantes, uma vez que a entrevista será feita por apenas um entrevistador. Os mesmos serão utilizados apenas para controle do estado geral de saúde dos participantes;

XIV) Caso eu deseje, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

XV) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – IMS/UFBA -, no telefone (77) 3429-2720 (e-mail: cepims@ufba.br) ou (77) 3429-2719/ lucasm@ufba.br) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo;

XVI) Deverei rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo;

XVII) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apondo sua assinatura na última página do referido Termo;

XVIII) Resolução CNS 466/12 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Vitória da Conquista, BA.....de.....de 20.....

() Paciente / () Responsável

.....

Impressão Datiloscópica:



Responsável pelo Projeto:

PROF. DR. LUCAS MIRANDA MARQUES

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

Página 1 de 2



Universidade Federal da Bahia
Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira
COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS
(CEUA - IMS/CAT - UFBA)



PROJETO DE PESQUISA - Protocolo 060/2018 - Apreciação em 17/10/2018 – Aprovado com pendências
Título: Avaliação das atividades antinociceptivas da associação de β -cariofileno e ácido docosahexaenóico em modelos animais.
Protocolo: 060/2018
Pesquisador: Lucas Miranda Marques
Instituição: Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira – UFBA
PARECER DO RELATOR
Data da Relatoria: 15 de outubro de 2018
<p>O docente Lucas Miranda Marques solicita apreciação pela CEUA e emissão de parecer técnico acerca do projeto "Avaliação das atividades antinociceptivas da associação de beta-cariofileno e ácido docosahexaenóico em modelos animais". Encontra-se anexada ao processo toda a documentação comprobatória da solicitação, que inclui a carta de encaminhamento do projeto emitida pelo coordenador, o projeto de pesquisa completo, o formulário unificado para solicitação de autorização para uso de animais em ensino e/ou pesquisa preenchido, o Currículo Lattes do coordenador do projeto, a declaração de participação no projeto de todos os envolvidos, e a declaração do veterinário responsável por procedimentos anestésicos, cirúrgicos ou de eutanásia quando houver necessidade.</p> <p>Após avaliação da proposta, constatou-se que:</p> <ul style="list-style-type: none">• O coordenador do projeto apresenta experiência prévia com experimentação animal e ensaios de antinociceção;• O projeto apresenta visível relevância científica para a geração de conhecimentos que embasem novas alternativas terapêuticas na área de sepsis e câncer;• A sua realização justifica-se pela existência de apenas um estudo avaliando a associação do beta-cariofileno e ácido docosahexaenóico no contexto da analgesia;• As metodologias propostas para avaliação da atividade antinociceptiva, que incluem o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o teste de injeção intraplantar com formalina e o teste de pressão crescente na pata (método de Von Frey), estão de acordo com Boletim Técnico - n.º 97 (2014) - Métodos de avaliação laboratorial da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de produtos naturais / Ed. Ministério da Educação, Universidade Federal de Lavras – UFLA;• Não foram encontrados métodos substitutos validados para os ensaios antinociceptivos em animais;• Planejamento estatístico / delineamento experimental - Não apresentou a justificativa para definição do número de animais a serem utilizados ($n = 168$). <p>Diante das informações apresentadas, sugiro a aprovação do projeto pela CEUA, desde que se apresente a devida justificativa para o uso do número de animais definido.</p> <p>Parecer do Relator: Aprovado com pendências (prazo de trinta dias para reapresentação com as devidas adequações solicitadas).</p>
PARECER CONSUBSTANCIADO CEUA E CONSIDERAÇÕES FINAIS:
O parecer do relator transcrito acima foi apreciado na 21ª Reunião Ordinária do dia 17 de outubro de 2018, sendo aprovado por unanimidade.

CEUA - IMS/CAT - UFBA
Prédio Administrativo IMS/CAT - UFBA/ICP Saúde - Rua Desembargador, 50 - Quadra 17 - Lote 58 - Bairro Ondina - Vitória da Conquista - BA - CEP 45000-000
E-mail: comite@ceua.ufba.br e-mail: ceua@ufba.br

Página 1 de 2

Página 2 de 2

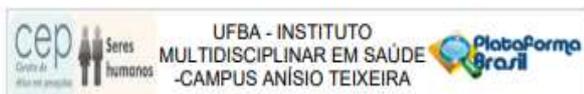
Este parecer 'Aprovado com pendências' significa que o projeto foi aprovado e sua execução pode ser iniciada, porém, é obrigatória a apresentação das adequações solicitadas. Estas adequações devem ser realizadas por escrito, e apresentadas na secretaria desta CEUA num prazo máximo de 30 dias corridos, a contar do recebimento desse parecer. Caso não sejam apresentadas no prazo o projeto irá assumir o status de Reprovado.

Status Final deste Parecer: Aprovado com pendências
(prazo de trinta dias para reapresentação com as devidas adequações).


Bruno Lopes Bastos
Coordenador CEUA - IMS/CAT - UFBA

Vitória da Conquista, 17 de outubro de 2018.

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ASSOCIAÇÃO DE B-CARIOFILENO E ÁCIDO DOCCOSAHEXANÓICO EM MODELOS EXPERIMENTAIS

Pesquisador: Lucas Miranda Marques

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 79446117.5.0000.5556

Instituição Proponente: Instituto Multidisciplinar em Saúde-Campus Anísio Teixeira

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

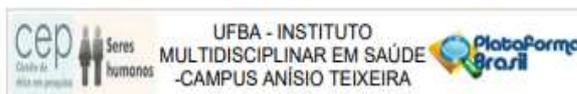
Número do Parecer: 2.791.699

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ASSOCIAÇÃO DE B-CARIOFILENO E ÁCIDO DOCCOSAHEXANÓICO EM MODELOS EXPERIMENTAIS" possui um pesquisador principal e uma discente. Trata-se de um estudo experimental que propõe avaliar novas perspectivas terapêuticas coadjuvantes com potencial terapêutico em inflamação, infecção, estresse oxidativo e carcinogênese em modelo experimental. O estudo será conduzido através da avaliação das atividades biológicas da associação B-CARIOFILENO e ÁCIDO DOCCOSAHEXANÓICO (BCP-DHA). Serão determinados os efeitos anti-inflamatório e antioxidante de neutrófilos e monócitos, isolados de sangue periférico de cinco homens voluntários, as células selecionadas serão infectadas com *Staphylococcus aureus* e incubadas com tratamento para posterior dosagem de citocinas, análise da expressão gênica, da captura do radical livre DPPH, de redução do ferro e do B-caroteno. Serão avaliados os efeitos antimicrobianos com cepa de *Staphylococcus aureus* através dos ensaios de concentração inibitória e bactericida mínima, inibição da aderência celular e inibição da formação de biofilme. Serão determinados os efeitos antitumorais com linhagens celulares malignas de cólon, mama e próstata e linhagens normais de fibroblastos de camundongos e células ganglionares da retina humana, por meio das técnicas de western blot, fragmentação nuclear, migração celular e invasão celular.

Endereço: Rua Homênio Barros, 58, Quadra 17, Lote 58
Bairro: CANDEIAS **CEP:** 45.020-094
UF: BA **Município:** VITÓRIA DA CONQUISTA
Telefone: (77)3429-2720 **E-mail:** cepira@ufba.br

Página 01 de 01



Continuação do Parecer: 2.791.699

Objetivo da Pesquisa:

Determinar as atividades biológicas da combinação do B-caroteno (BCP) com o Ácido Docosaheξανóico (DHA) em modelos experimentais in vitro e como específicos:

1. Analisar o perfil de citocinas produzido por cultura de monócitos e neutrófilos humanos em modelo de infecção in vitro, induzida por *Staphylococcus aureus*, com e sem tratamento com BCP-DHA; 2. Comparar a expressão de genes envolvidos nas respostas imune e inflamatória relacionados à infecção in vitro de monócitos e neutrófilos humanos induzida por *Staphylococcus aureus*, com e sem tratamento com BCP-DHA; 3. Investigar o potencial antioxidante da associação BCP-DHA em modelo de infecção in vitro, induzida por *Staphylococcus aureus*, em cultura de monócitos e neutrófilos – provenientes do sangue periférico de adultos saudáveis; 4. Avaliar a capacidade antimicrobiana da associação BCP-DHA sobre cepa de *Staphylococcus aureus* por métodos quantitativos e qualitativos; 5. Verificar a atividade antitumoral da associação BCP-DHA sobre linhagens de células cancerígenas humanas; 6. Comparar as concentrações das enzimas Ciclooxigenase 1 e 2 em linhagens de células cancerígenas, com e sem tratamento com BCP associado ao DHA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avaliação dos Riscos e Benefícios: A pesquisa será realizada conforme a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 486 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde (Brasil), por se tratar de um estudo envolvendo seres humanos. O estudo prevê como riscos o desconforto associado à coleta de sangue, onde poderá haver dor suportável decorrente da punção venosa. Informa que complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. Os pesquisadores ressaltam que pequena perda de sangue do local da punção geralmente causam um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias e que se houver hematoma no local da coleta, recomenda que seja realizada uma compressa de gelo no local, quatro vezes ao dia, nas primeiras 24 horas. Os pesquisadores informam no TCLE que os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo e que os participantes concordarão que os mesmos sejam divulgados em publicações científicas, desde que os dados pessoais não sejam mencionados. Os benefícios para os participantes incluem acompanhamento das condições de saúde, tais como avaliação antropométrica e exames laboratoriais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto avaliado consiste de uma atividade de pesquisa pertinente e que irá agregar grande valor científico. A pesquisa está bem fundamentada quanto aos aspectos teóricos e apresenta

Endereço: Rua Homênio Barros, 58, Quadra 17, Lote 58
Bairro: CANDEIAS **CEP:** 45.020-094
UF: BA **Município:** VITÓRIA DA CONQUISTA
Telefone: (77)3429-2720 **E-mail:** cepira@ufba.br

Página 02 de 01

Justificativa apropriada. Os métodos estão adequados aos objetivos. O projeto e os documentos anexados estão claros e bem delimitados. Os riscos e benefícios foram apresentados conforme legislação aplicável. Informa que será mantido o sigilo e a confidencialidade dos dados dos participantes envolvidos através de medidas como codificação dos participantes e acesso restrito aos pesquisadores envolvidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes termos: Folha Local; Folha de rosto, assinada pelo pesquisador responsável e pela Coordenação de Pesquisa e Extensão da instituição de vínculo do pesquisador; Projeto de Pesquisa Detalhado e Projeto Completo; Cronograma; Currículo Lattes dos pesquisadores envolvidos; Declaração de participação no projeto; Termo de Consentimento Livre Esclarecido e Autorização para coleta de dados emitida pelo vice-diretor da instituição de vínculo do pesquisador.

Recomendações:

A adição de informações acerca do local de coleta de sangue, bem como da qualificação dos coletadores e das condições de coleta das amostras foram acrescentados no TCLE. Todas as recomendações feitas em parecer anterior foram devidamente esclarecidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não havendo pendências éticas, indico a aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O parecer do relator foi apreciado na 66ª reunião ordinária do dia 31 de julho de 2018 sendo aprovado por unanimidade/majoria de votos. Conforme a Resolução nº 466/12 (Item X, Tópico X.1, Ponto 3b), é necessário submeter, na Plataforma Brasil, relatórios semestrais referentes à execução deste projeto. Para este fim verifique o endereço eletrônico: <http://www.ims.ufba.br/cep/sereshumanos/?pagina=relatorios>. Caso haja relatórios pendentes, este Comitê se reserva a não apreciar novas submissões do pesquisador responsável até que estes sejam submetidos.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	FB INFORMACOES BASICAS DO_P PROJETO_983457.pdf	25/06/2018 10:03:23		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLCEorigido2.docx	25/06/2018 10:01:41	Lucas Miranda Marques	Aceito

Endereço: Rua Homêndo Barros, 58, Quadra 17, Lote 58
 Bairro: CANDEIAS CEP: 45.029-094
 UF: BA Município: VITORIA DA CONQUISTA E-mail: cep@ufba.br
 Telefone: (77)3429-2720

Justificativa de Ausência	TCLCEorigido2.docx	25/06/2018 10:01:41	Lucas Miranda Marques	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCEorigido.docx	18/04/2018 17:39:15	Lucas Miranda Marques	Aceito
Outros	AutorizacaoColeta.pdf	11/10/2017 18:01:45	Lucas Miranda Marques	Aceito
Outros	LattesLaisFerrazBrito.pdf	28/09/2017 09:55:56	Lucas Miranda Marques	Aceito
Outros	LattesLucasMirandaMarques.pdf	28/09/2017 09:55:28	Lucas Miranda Marques	Aceito
Outros	anexo1folhalocal.pdf	28/09/2017 09:50:53	Lucas Miranda Marques	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao.jpg	02/09/2017 15:57:33	Lucas Miranda Marques	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	02/09/2017 15:44:36	Lucas Miranda Marques	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	02/09/2017 15:42:54	Lucas Miranda Marques	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	02/09/2017 15:42:33	Lucas Miranda Marques	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	02/09/2017 15:36:17	Lucas Miranda Marques	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

VITORIA DA CONQUISTA, 31 de Julho de 2018

Assinado por:
Luciano Pereira Rosa
 (Coordenador)

Endereço: Rua Homêndo Barros, 58, Quadra 17, Lote 58
 Bairro: CANDEIAS CEP: 45.029-094
 UF: BA Município: VITORIA DA CONQUISTA E-mail: cep@ufba.br
 Telefone: (77)3429-2720

ANEXO C – ARTIGO SUBMETIDO A SCIENTIFIC REPORTS

The association between β -caryophyllene and docosahexaenoic acid has potential antinociceptive and anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo*

Laís Ferraz Brito Sousa¹, Hellen Braga Martins Oliveira², Nathan das Neves Selis², Lorena Lobo Brito Morbeck¹, Lucas Santana Coelho da Silva², Jully Chayra Santos Viana¹, Mariane Mares Reis¹, Beatriz Almeida Sampaio¹, Guilherme Barreto Campos¹, Jorge Timenetsky³, Regiane Yatsuda¹, Lucas Miranda Marques¹

¹Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia (UFBA), Vitória da Conquista, Brazil

²University of Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus, Brazil

³Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

* Corresponding Author:

Instituto Multidisciplinar em Saúde

Rua Rio de Contas, 58 - Quadra 17 - Lote 58, Bairro Candeias - CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista, BA, Brazil

Phone: +55 77 3429-2710. Fax: +55 77 3429-2710. e-mail: lucasm@ufba.br (Lucas Miranda Marques)

Abstract

Inflammation is a complex biological response involving the immune, autonomic, vascular, and somatosensory systems that occurs through the synthesis of inflammatory mediators and pain induction by the activation of nociceptors. *Staphylococcus aureus*, the main cause of bacteremia, is one of the most common and potent causes of inflammation in public health, with worse clinical outcomes in hospitals. Antioxidant substances have been evaluated as alternative therapeutic analgesics, antioxidants, anti-inflammatory agents, antitumor agents, and bactericides. Among these, we highlight the essential oils of aromatic plants, such as β -caryophyllene (BCP), and polyunsaturated fatty acids, such as docosahexaenoic acid (DHA). The objective of this study was to evaluate the biological activities of BCP-DHA association in *in vitro* and *in vivo* experimental models of antinociception and inflammation. For this purpose, the antinociceptive effects were evaluated in animal models using the following tests: acetic acid-induced abdominal writhing, paw edema induced by formalin intraplantar injection, and von Frey hypernociception. To determine the anti-inflammatory effects, monocytes isolated from the peripheral blood of adult male volunteers were infected with methicillin-resistant *S. aureus* and incubated with treatment for cytokine dosage and gene expression analysis. Antinociceptive effects were observed in the three models when comparing the control (saline) and the BCP-DHA treatment groups. Statistically significant results ($p < 0.05$) were obtained in the acetic acid-induced abdominal writhing test, evaluation of paw edema, evaluation of paw flinching and licking in the formalin intraplantar injection model, and the von Frey hypernociception test. There was a significant reduction in the GM-CSF, TNF α , IL-1 β , IL-6, and IL-12 levels and an increase in IL-10 levels in the BCP-DHA treatment groups, in addition to negative regulation of the expression of the genes involved in the intracellular inflammatory signaling cascade (IL-2, IL-6, IRF7, NLRP3, and TYK2) in all groups receiving treatment, regardless of the presence of infection. Therefore, BCP and DHA, either administered individually or combined, demonstrate potent antinociceptive and anti-inflammatory effects.

Keywords: *methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Inflammation. Nociception. β -caryophyllene. Docosahexaenoic acid.*

Introduction

Inflammation is a physiological reaction to tissue injury and damage resulting from the presence of trauma, infection, foreign bodies, or immune reaction¹, which occurs with the synthesis of inflammatory mediators and pain induction by activation and sensitization of nociceptors. Pain plays a crucial role in the body, protecting against harmful stimuli and promoting the repair of local injuries². The coding and neural processing of harmful stimuli are referred to as nociception, a process that begins with the transformation of environmental stimuli (physical or chemical) into action potentials at pain receptors (nociceptors) located in peripheral nerve fibers and culminates in their transfer to the central nervous system through signal transduction^{2,3}.

The largest defense mechanism is in the innate immune system, where there is invasion of microorganisms and tumor cells through the action of macrophages, neutrophils, and dendritic cells. The adaptive immune system includes the activity of more specialized cells, such as B and T lymphocytes, which act in the eradication of pathogens through the production of specific receptors and antibodies⁴. Inflammation is therefore a vital step for the body, as it contributes to the return of homeostasis. At the tissue level, inflammatory signs of pain, flushing, heat, edema, and loss of function result from cellular responses to damage⁵. In this environment, several inflammatory mediators are synthesized and secreted, and are divided into two classes: pro- and anti-inflammatory. Examples include cytokines (interferons, interleukins, and tumor necrosis factor- α), chemokines (monocyte chemoattractant protein-1), eicosanoids (prostaglandins and leukotrienes), and the nuclear transcription factor NF- κ B. Interleukin 10, however, has both pro- and anti-inflammatory properties and is therefore considered to be regulatory.

One of the most common and impactful causes of inflammation in public health is *S. aureus*, a gram-positive bacterium found in the nasal microbiota of 20–40% of the human population. The rupture of mucous and cutaneous barriers through chronic diseases, skin lesions, or surgical interventions allows *S. aureus* to enter tissues and the bloodstream, causing infection⁶. This bacterium may be susceptible to the antibiotic methicillin (MSSA) or methicillin-resistant (MRSA), the latter of which was first described in 1961 and has since become the leading cause of bacteremia with highly

poor clinical outcomes such as endocarditis, osteomyelitis, sepsis, septic shock, and high hospital costs^{6,7}.

Since the discovery of penicillin in the 1990s, the interest in natural products has increased with regard to the inhibition of free radicals, attenuation of inflammation, and in the antibiotics sector. Simultaneously, bacterial resistance has increased due to the frequent prescription of an against non-bacterial infections and its indiscriminate and irregular use, leading to sublethal doses that allow an increase in the resistance spectrum of microorganisms^{4,8}. Therefore, the choice of antibiotics to treat MRSA infections is restricted^{7,9}.

Among the natural products, essential oils (OE) and volatile and strong-smelling substances present in aromatic plants have been studied in various contexts^{10,11}. β -caryophyllene (BCP), a bicyclic sesquiterpene found in the OE of *Cannabis sativa*, cinnamon, clove, oregano, copaiba oil-resin, and black pepper, exhibits strong anti-edemic, anti-inflammatory, antitumor, and bactericidal properties¹². Polyunsaturated fatty acids such as docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 derivative, have also been studied in the modulation of inflammation through the synthesis of bioactive mediators that act in inflammation resolution¹³. It has also been shown that BCP may have improved effects when administered with DHA; however, only the antinociceptive activity of this combination has been tested thus far in experimental models *in vivo* and *in vitro*¹⁴.

In a previous study, we analyzed the anti-inflammatory activity of β -caryophyllene and docosahexaenoic acid in a model of *S. aureus*-induced sepsis in Balb/C¹⁵ male mice. A positive effect was observed in the reduction of neutrophil migration in the carrageenan-induced peritonitis model, reduction of total and differential leukocyte counts after bacterial infection, lower neutrophil migration in the histological analysis of the kidneys and lungs, and lower bacterial load in the treated group. Therefore, this study proposed a new therapeutic alternative for the treatment of inflammation and pain.

Results

In the acetic acid test, there was a lower number of abdominal writhing among females in the indomethacin-treated group, followed by the isolated BCP and BD

association groups (Figure 1A). In males, there was statistical significance in all test groups regarding the control, and the BCP group presented similar results to indomethacin, but with no statistical difference between the groups (Figure 1B). When comparing the behaviors between the sexes of the treated groups, there was an observable statistical difference only in the comparison of the saline control group.

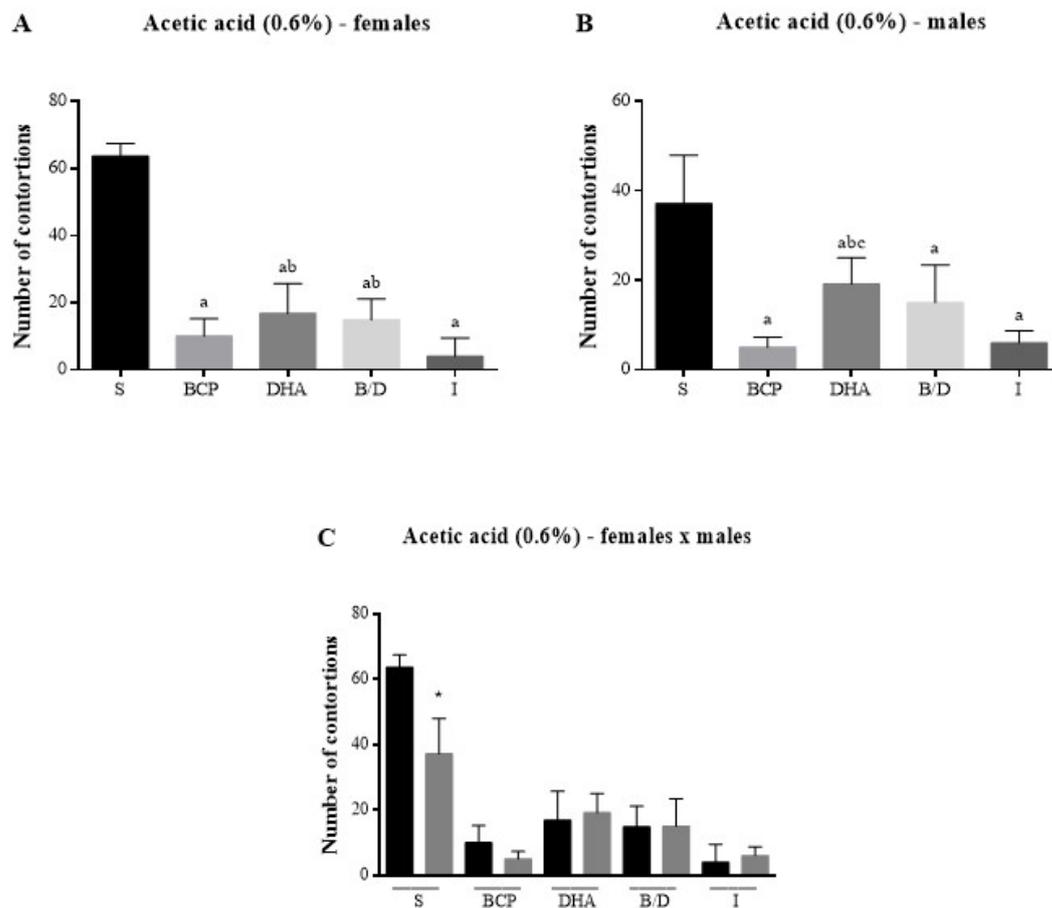


Figure 1. Number of abdominal writhing induced by acetic acid in Balb-C mice. (A) Female mice. (B) Male mice. (C) Comparison between sexes. S = saline; BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexaenoic acid; B/D = BCP and DHA combination; I = indomethacin. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. I; c $p < 0.05$ vs. BCP; * $p < 0.05$.

In the neurogenic phase of the formalin test (first 5 min), the group treated with BCP demonstrated a significant reduction in the number of flinches in females compared to the saline group, which was not observed in the other treatment groups (Figure 2A). There was no statistical difference in the male evaluations during the same period (Figure 2B). In the comparison between sexes (Figure 2C), it was observed that the nociception levels of the males were higher than those of females, but a statistical difference was found only in the group treated with the standard analgesic. When observing the inflammatory phase (5–30 min), the three treatments caused a significant reduction in the number of paw flinches in females, and the group treated with the BCP and DHA combination presented a similar result to that of the group that received morphine (Figure 2D). In males, the best results achieved in the 5–30 min period were from the groups treated separately with BCP and DHA (Figure 2E), but they showed a higher number of flinches when compared to the females, with proven statistical significance in the group treated with the BCP and DHA combination and with morphine (Figure 2F).

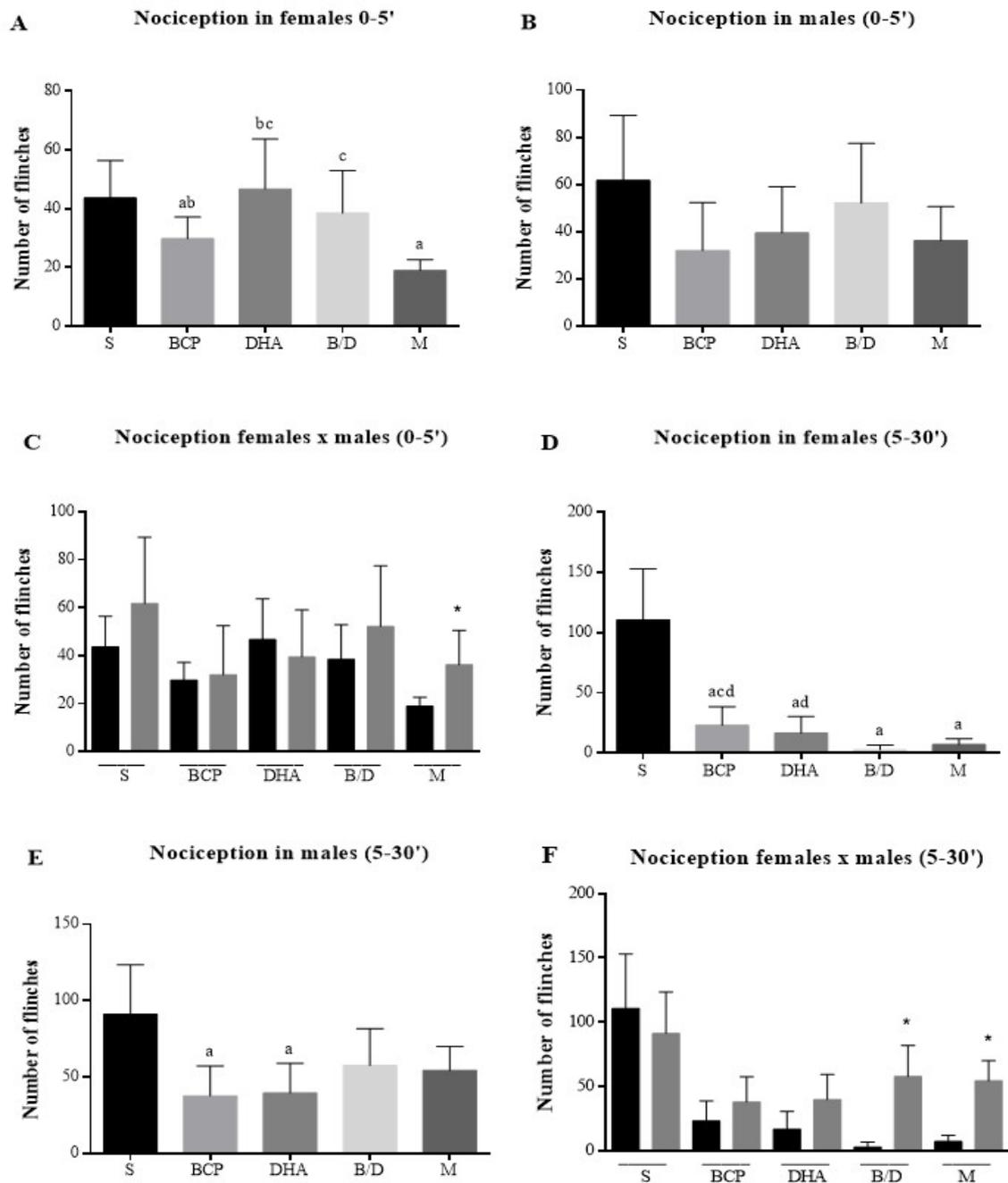


Figure 2. Number of flinches exhibited by Balb-C mice after intraplantar formalin administration (1.5%). (A) Females in 0–5 min period. (B) Females in 530 min period. (C) Males in 0–5 minutes period. (D) Males in 5–30 min period. (E) Comparison between sexes in the period 0–5 min. (F) Comparison between sexes in the period 0–5 minutes. S = saline; BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexanoic acid; BD = BCP and DHA combination; M = morphine. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. M; c $p < 0.05$ vs. BCP; d $p < 0.05$ vs. BD; * $p < 0.05$.

Figure 3 shows the paw weight results. Only female rats had reduced paw edema in the isolated BCP groups and their association with DHA. The comparison between sexes also showed no statistically significant differences.

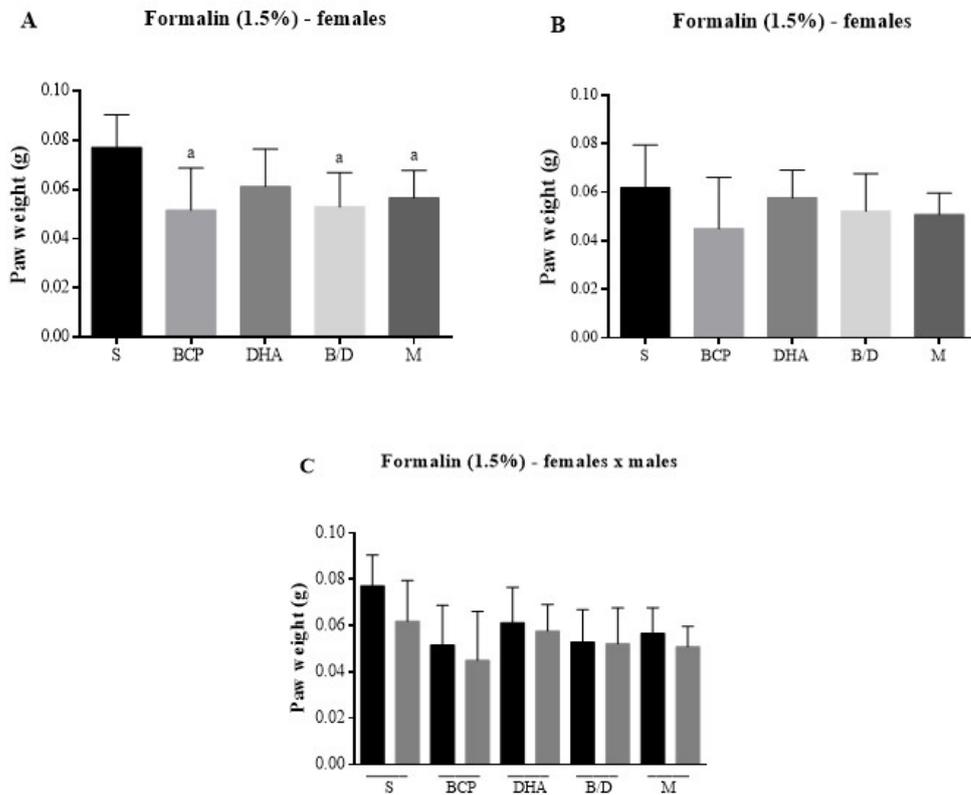


Figure 3. Paw weights of Balb-C mice that received formalin intraplantar injection (1.5%). (A) Female mice. (B) Male mice. (C) Comparison between sexes. S = saline; BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexanoic acid; B/D = BCP and DHA association; M = morphine. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S.

The three treatments significantly reduced the intensity of mechanical nociception measured using the von Frey method in female and male mice, with the best results obtained in the BCP groups in females and DHA groups in males (Figures 4A and 4B). As shown in Figure 4C, males were more sensitive to hypernociception in the BCP-treated group, with statistical significance, whereas females were more sensitive in the DHA-treated and B/D-associated groups, but without statistical significance.

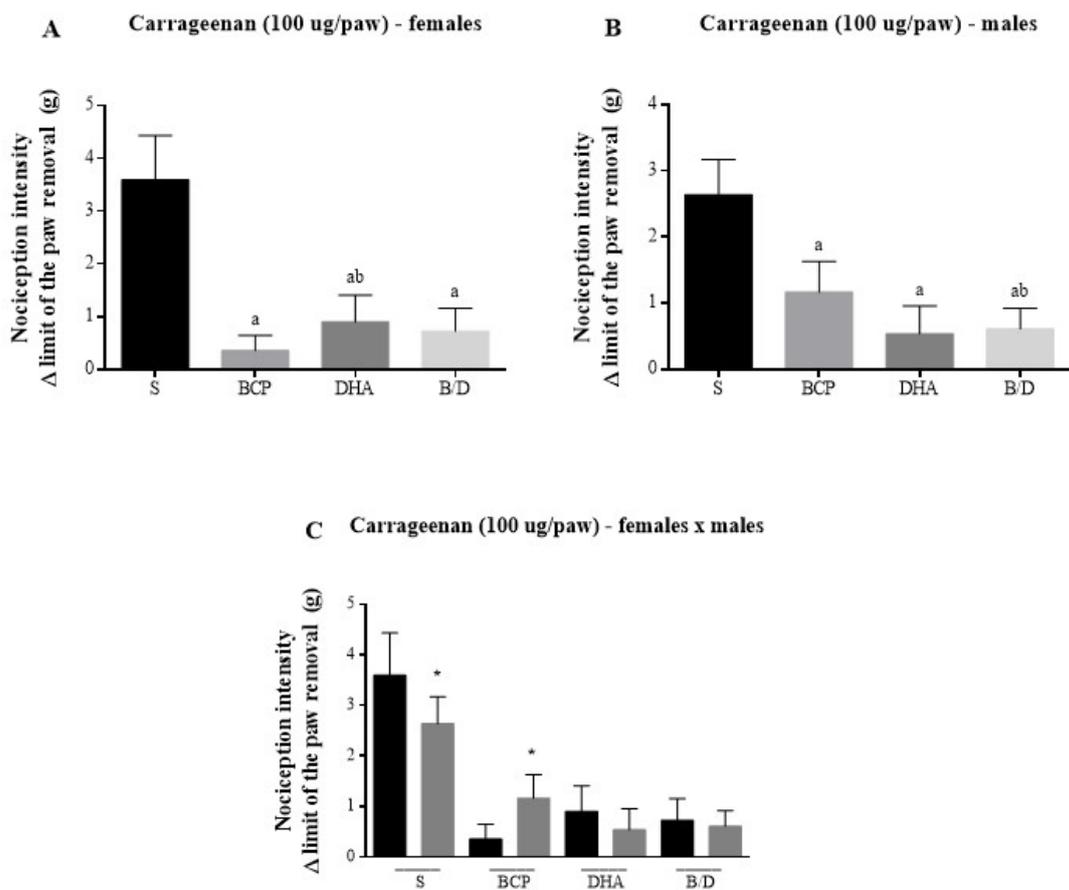


Figure 4. Nociception intensity by Δ limit of the paw removal after Carrageenan injection (100 ug) in Balb-C mice. (A) Female mice. (B) Male mice. (C) Comparison between sexes. S = saline; BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexaenoic acid; BD = BCP and DHA association. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. BCP; * $p < 0.05$.

The volunteers were healthy and fit for the clinical trial according to laboratory analyses (Table S1). The peripheral blood mononuclear cells (CMSPs) inoculated with the *S. aureus* C80 strain showed a significant increase in GM-CSF production when compared to the control group (inoculated with sterile saline, BCP, DHA, and B/D) (Figure 5A). Both the infected and treated groups and the treated and infected groups exhibited a reduction in the expression of this cytokine when compared to the infected-only groups. Those who were first infected and later treated with BCP and DHA had a significant reduction in TNF- α expression compared to the group infected with C80, whereas the group infected and treated with BCP-DHA showed significance with regard to LPS (Figure 5B). The group that was treated and later infected showed a TNF- α

reduction in comparison to the C80 group. These treatments caused a significant reduction in IL-1 β expression, and the group previously infected and treated showed a greater decrease in this cytokine (Figure 5C). Figure 5D shows that there was a significant reduction in IL-6 expression in the treated groups compared to those infected only with C80. The groups infected and treated with BCP and with the BCP-DHA combination showed a significant decrease in IL-12 expression (Figure 5E), whereas the highest IL-10 expression was observed in the group treated with DHA and infected with *S. aureus* (Figure 5E).

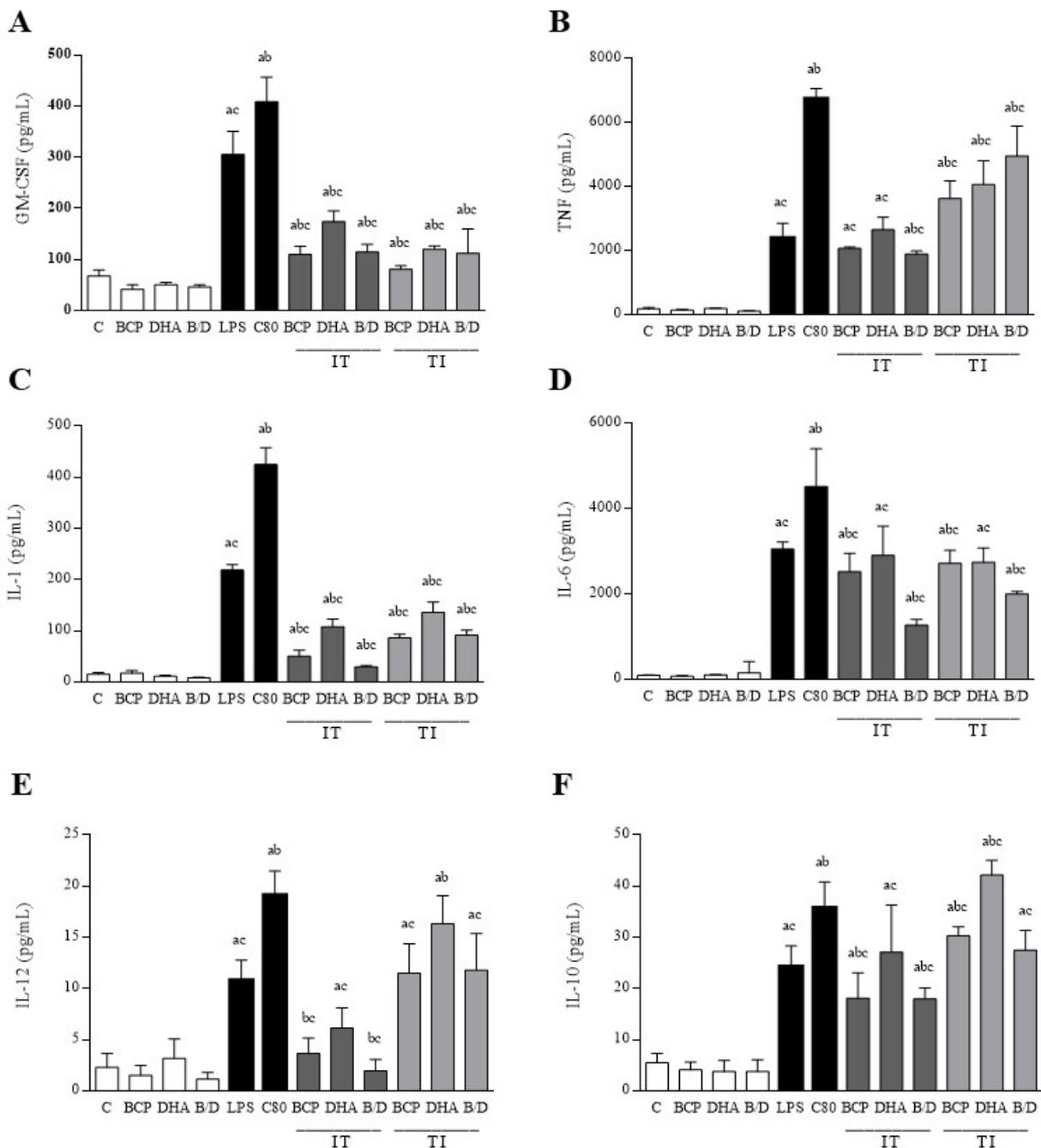
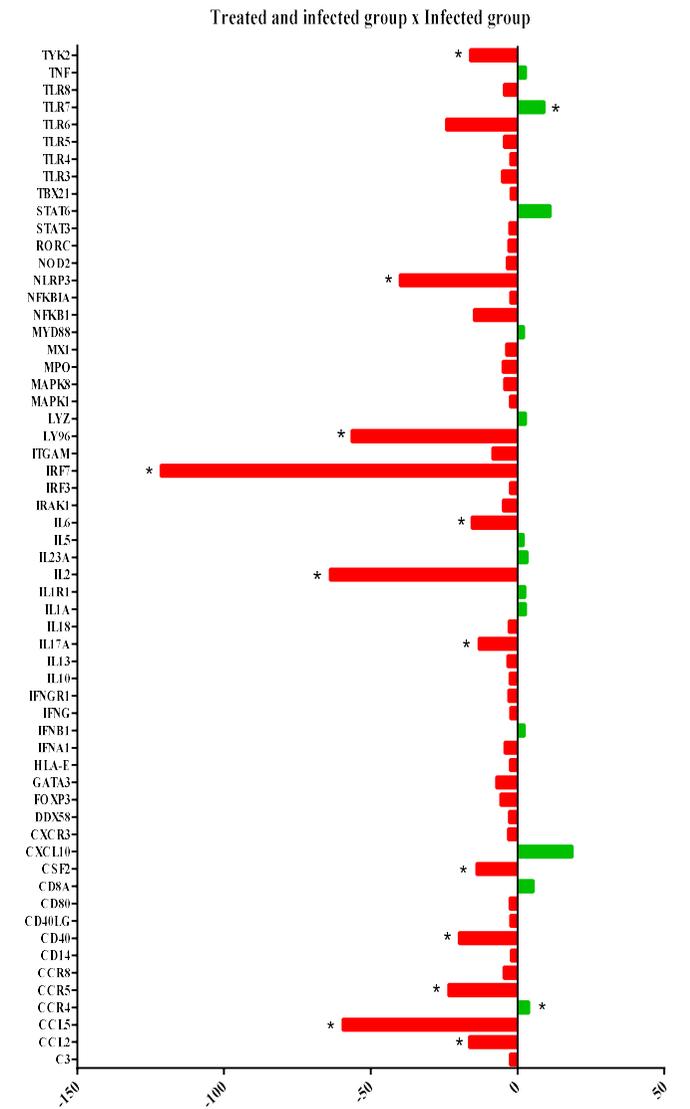
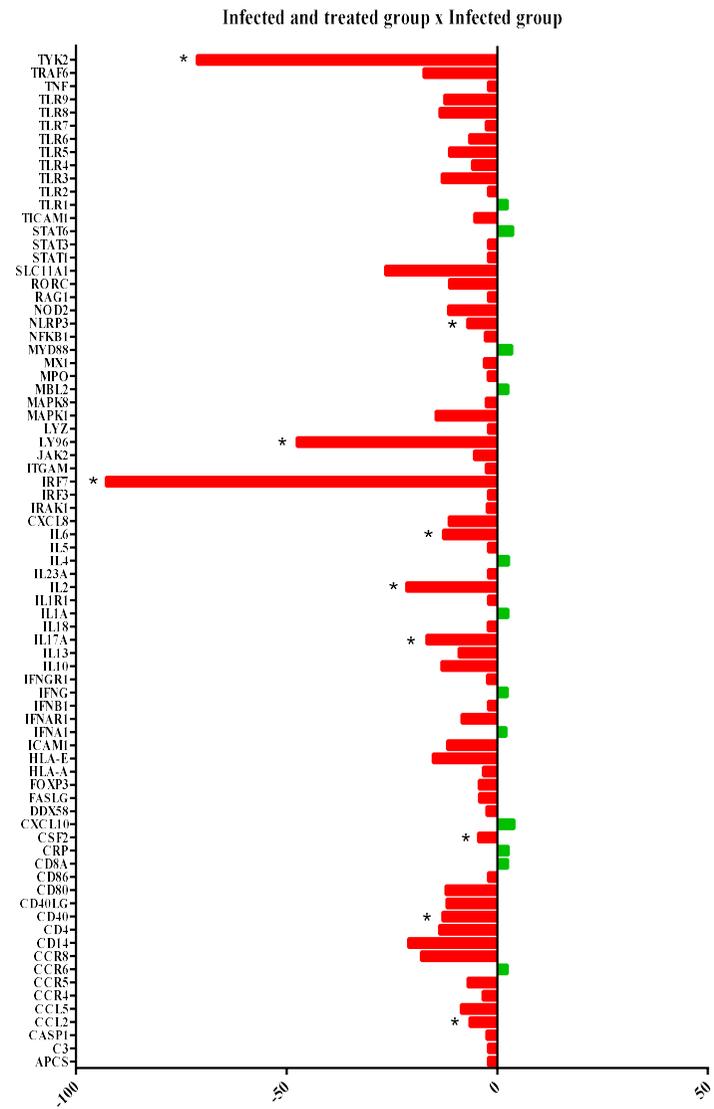
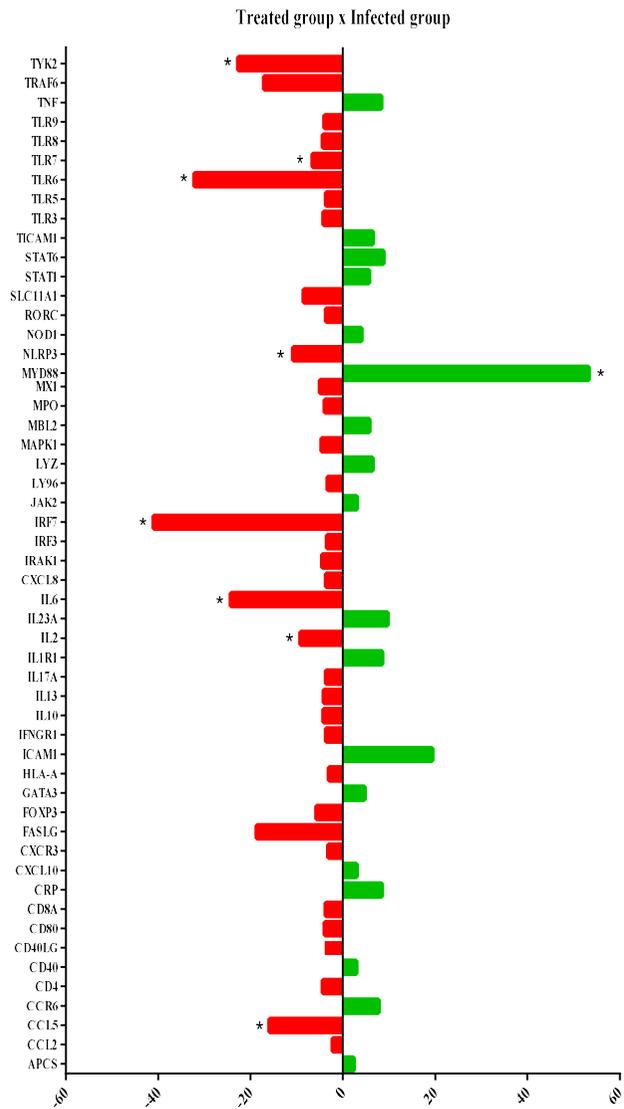


Figure 5. Concentration of GM-CSF (A), TNF α (B), IL-1 β (C), IL-6 (D), IL-10 (E), and IL-12 (F) cytokines in the peripheral blood of male volunteers. C = control (sterile saline); BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexaenoic acid; B/D = BCP and DHA association; LPS = lipopolysaccharides; C80 = strain C80; IT B = infected and treated with BCP; IT D = infected and treated with DHA; IT B/D = infected and treated with BCP and DHA association; TI B = treated with BCP and infected; TI D = treated with DHA and infected; TI B/D = treated with BCP and DHA association and infected. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. C; b $p < 0.05$ vs. LPS; c $p < 0.05$ vs. C80.

Figure 6 illustrates the comparative analysis of the treated group with the infected group with regard to innate and adaptive immunity genes. The innate immunity genes CCL5, IL-2, and IL-6, which are related to the synthesis of pro-inflammatory cytokines IRF7, NLRP3, TLR6, TLR7, and TYK2, associated with standard recognition and the defense response of the organism, were under-expressed with BD treatment. MYD88, the defense response gene, was hyper-expressed. Comparison between the infected and treated groups with the group that was only treated revealed that there was no hyperexpression of any gene with statistical significance; however, pro-inflammatory cytokine activation genes such as CCL2, CSF2, IL-2, IL-6, and IL-17A, and those involved in the standard recognition and defense response to viruses and bacteria such as CD40, IRF7, LY96, NLRP3, and TYK2 were under-expressed. The comparison between the treated and infected versus infected-only groups showed significant under-expression of CCL2, CCL5, CSF2, IL-2, IL-6, IL-17A, CD40, IRF7, NLRP3, LY96, and TYK2, as in the previous groups, as well as in the CCR5-Th1 adaptive response gene marker, and hyperexpression of TLR7 and CCR4-Th2 markers.



1

Figure 6. Comparison of the gene expression of the treated group with the association of β -caryophyllene and docosahexaenoic acid (50 + 50 mg/dL) with the infected-only group with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (A), the group infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the group treated with BCP-DHA (B) and the group treated with BCP-DHA and infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (C). Data are expressed as mean \pm DPM. * $p < 0.05$.

Discussion

Natural products have long been used in medicinal preparations and studied in the development of medicines, such as analgesic, antimicrobial, antitumor, and anti-inflammatory treatment¹⁶. The mechanisms of inflammation and infection constitute important research focuses, as they involve several cellular processes, such as chemotaxis, phagocytosis, immune response, differentiation, and apoptosis¹⁷. In the present study, we showed that BCP-DHA association and isolated BCP presented the best antinociceptive responses in the acetic acid-induced writhing test in both sexes. The formalin test demonstrated a significant reduction in the number of flinches in females treated with BCP during the neurogenic phase. In the inflammatory phase, a better treatment result was observed with BCP-DHA in relation to morphine in females, and better results were seen for isolated compounds in males. Reduced paw edema was also observed in females of the mentioned groups. Both isolated and combined BCP and DHA promoted a significant reduction in mechanical nociception in intraplantar Cg injections in the von Frey test in females and males.

Our findings of better pain responses of isolated BCP and BCP-DHA are similar to those found by Fiorenzani et al.¹⁴ with the formalin test in the first study that associated these substances, except that they worked only with male rats, and the present study used both sexes. Recent studies have shown that differences between sexes contribute to individual differences in pain perception and treatment, but the specific mechanisms of disparity remain inconclusive. It is possible that interactions between biological, sociocultural, and psychological factors, mainly sex hormones (androgens and estrogens), the endogenous opioid system, and genetic factors, are involved in the process^{17,18}. Experimental pain models highlight the pronociceptive role of estrogen in male rats that received intracerebroventricular estradiol injections, as well

as the antinociceptive effect on neuropathic pain in mice¹⁹. Male and female rats reacted differently to structural and functional changes related to pain induced by sciatic nerve ligation, with males showing gradual allodynia reduction and complete recovery, whereas allodynia and gliosis in females lasted for 4 months, suggesting that male results are associated with testosterone and that females are sensitive to changes in serum testosterone²⁰. Overall, women appear to have greater pain sensitivity and better pain responses than men. In addition, studies suggest that there are differences in responses to pharmacological and non-pharmacological treatments, depending on the type of treatment and the characteristics of the pain¹⁸.

Nociception, as a part of the inflammatory process, can be neurogenic or inflammatory, and its stages depend on the duration of the process, as well as immunological factors²¹. The antinociceptive effect of BCP was described in the acetic acid test, with a result similar to that of indomethacin^{22,23} in neuropathic pain in a model of diabetes induced by streptozotocin in mice²⁴ and in study that used a partial ligation model of the sciatic nerve in mice²⁵. This may be due to its binding to the CP55.940 site of cannabinoid receptor type 2 (CB2r), which leads to inhibition of microglial activation during neuropathic pain, causing analgesia through supraspinatus, spinal, and peripheral CB2r activation²⁶. The antinociceptive activity of DHA in thermal and chemical pain models is abolished in the presence of naloxone, indicating that it acts in the opioid pathway as a receptor antagonist²⁷. Therefore, the potential antinociceptive effects of this combination were highlighted in this study.

In the MRSA infection model in our study, the cytokine dosage showed that treatment with BCP-DHA significantly reduced the levels of GM-CSF, TNF α , IL-1 β , IL-6, and IL-12. The synthesis of IL-10 was higher in the previously treated and later-infected groups and lower in the infected and later-treated groups. GM-CSF is a hematopoietic growth factor known for its ability to form granulocyte and macrophage colonies, with its receptor activation, the GM-CSFr, as an initiator to an intracellular signaling cascade that includes signal transducer activation and transcription activator 5 (STAT5), Janus kinase (JAK), MEK/ERK pathway, phosphatidylinositol 2-kinase (PI3K), and NF-kB²⁸ acting on myeloid cells in inflammation and autoimmune diseases²⁹. In the aging model and memory analysis used by Lindsey et al.³⁰, BCP had no effect on this cytokine. In addition, the presence of DHA in the medium containing GM-CSF resulted in depletion of the hematopoietic stimulant factor in a cystic fibrosis

model, showing that the deficiency of AGPI and its derived inflammation resolution is limiting to the unregulated inflammation present in the disease³¹.

TNF- α has broad functional relevance, mainly in terms of stimulation of cellular apoptosis through Fas and caspases, and pro-inflammatory responses through NF- κ B activation³². In a previous study, an increase in TNF- α in the group treated with the BCP-DHA combination was found in the sepsis model, which may be related to its susceptibility to stimulation by COX inhibitors. Both natural products develop this role¹³. We now find divergent results with decreased concentrations of this cytokine using an *in vitro* model. The main IL-1 β secretors are hematopoietic cells such as monocytes, macrophages, microglia, Kupffer cells, and dendritic cells after activation by damage-associated molecular patterns (DAMPs)³². It is a cytokine that is closely linked to inflammation and fever, and its synthesis is associated with inflammasome activation³³. The pro-inflammatory characteristic also represents IL-6, a cytokine involved in immune responses, hematopoiesis, bone metabolism, the development of autoimmune diseases, bacterial infections, and metabolic side effects^{32,34}. *In vitro* research suggests that the BCP agonist activity on CB2r is the main mechanism responsible for the inhibition of pro-inflammatory pathways and cytokine synthesis, such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α ^{35,36}. Inhibition of IL-1 β and TNF- α by DHA has also been described in the literature, with emphasis on greater PPAR- γ activation and NF- κ B inhibition^{37,38}. The IL-12 cytokine family is involved in modulating the behavior of T-cell populations and targeting immune responses in various diseases owing to their pro-inflammatory role³⁹. They are link between innate and adaptive immunity, mediating the differentiation of naive CD4 T cells into T helper subtypes, and regulating the functions of different cell effectors⁴⁰. A reduction in IL-23, a cytokine of the IL-12 family, was observed in the animal senescence model treated with BCP²⁹, and DHA inhibited dendritic cell maturation, reducing IL-12 family levels (IL-12p70, IL-23, and IL-27)⁴¹.

Following a regulatory pathway, the IL-10 family plays an important role in regulating the immune response during host defense, autoimmune and inflammatory diseases, and cancer. IL-10 acts primarily with immunosuppressive functions on leukocytes, whereas other members of the family act preferentially on epithelial cells, where they control defense mechanisms against viral, bacterial, and fungal infections, protect tissue integrity, and promote repair and regeneration^{42,43}. DHA supplementation

promotes the reduction of IL-10 synthesis by conferring cardioprotection in a myocardial injury model⁴⁴. A study with the essential oil of *Polygonum minus* identified BCP as one of its components and used it as a positive control in the cisplatin-induced hepatotoxicity model, demonstrating a reduction in the concentration of IL-10 and, therefore, hepatoprotection.⁴⁵ Therefore, the reduction in our study demonstrates protection against exacerbation of inflammation during the infectious process.

Many anti-inflammatory effects occur in the body by altering the expression patterns of innate immune genes. In our study, we observed that treatment with BCP-DHA, regardless of the presence of infection, negatively regulated the gene expression of IL-2, IL-6, IRF7, NLRP3, and TYK2, acting directly in NF- κ B inhibition and the synthesis and activity of pro-inflammatory cytokines (Figure 7). Within the interferon (IFN) signaling pathway, IRF7 has been recognized as the major signaling regulator of IFN type 1 and is involved in the control of excessive inflammation and autoimmunity^{46,47}. In a silica-induced lupus model, DHA inhibited the expression of IRF7 and other IFN-associated genes involved in the inflammatory response⁴⁸. In the inflammatory pathway, NLRP3, a component of the inflammasome cytosolic multiprotein complex generated in bone marrow-derived macrophages, stimulated by microbial agents, is also involved. The NLRP3 inflammasome plays a critical role in innate immunity by stimulating active caspase-1 synthesis, which converts IL-1 β and IL-18 precursors into their biologically active forms in a sequence of inflammatory responses that leads to pyroptosis⁴⁹. Inhibitory activity of BCP on NLRP3 was observed in a gouty arthritis model in animals⁵⁰ and of DHA on the NLRP3 inflammasome induced using silica inhalation. The role of BCP-DHA in the negative regulation of the non-receptor tyrosine kinase TYK2, whose activation regulates the signal transduction pathways of IL-12, IL-23, and IFN type 1 receptors, has brought novelty to the literature, each of which is implicated in the pathogenesis of various inflammatory diseases^{52,53}.

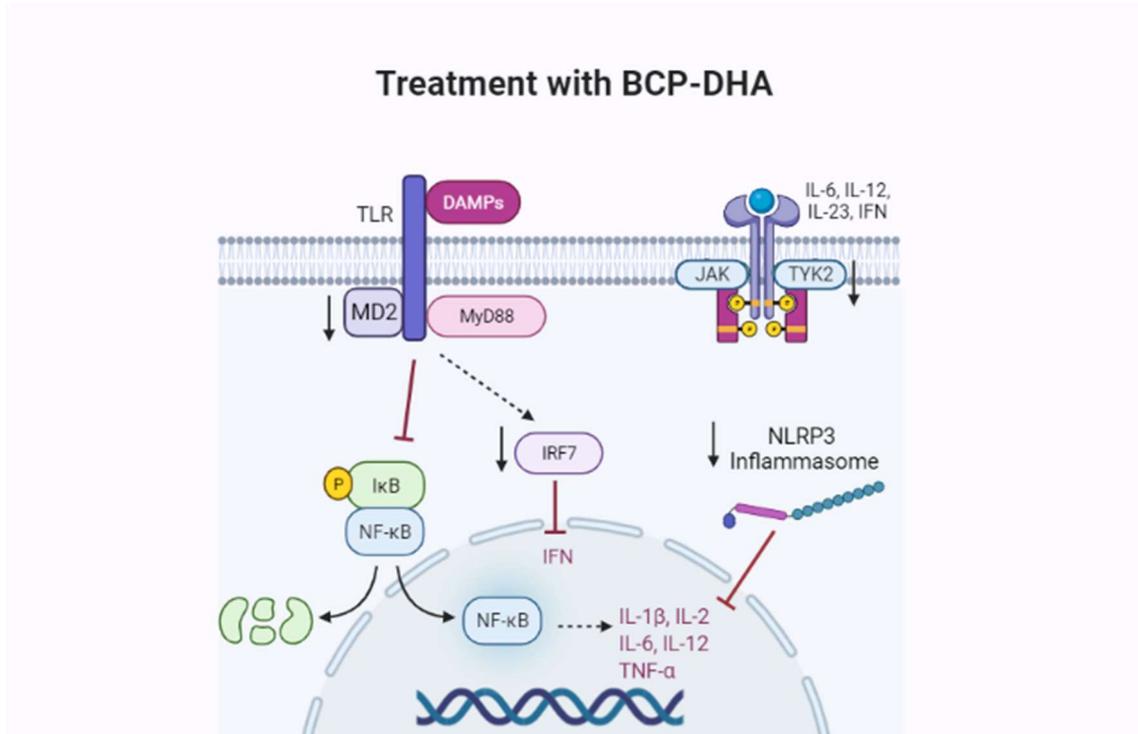


Figure 7. Anti-inflammatory characterization of the BCP-DHA treatment in the face of MRSA infection. The recognition of *S. aureus* by toll-like receptors present in the cell membrane initiates an intracellular signaling cascade that results in the dissociation of the NF-κB/Iκb complex, NF-κB translocation to the cell nucleus, and stimulation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines. BCP-DHA treatment acts through inhibiting different pathways that result in the activation of NF-κB, negatively regulating the expression of the MD2, IRF7, NLRP3, and TYK2 genes, which culminates in lower synthesis and acting of pro-inflammatory cytokines.

Under infectious stimuli, we observed that there was also an under-expression of genes related to inflammatory pathways, such as CCL2, CSF2, CD40, and LY96. CCL2 is a monocyte chemoattractive protein expressed in endothelial cells, smooth muscles, fibroblasts, astrocytes, T cells, and tumor cells after an inflammatory stimulus (e.g., IL-1 β , IL-6, TNF α , LPS, and GM-CSF)⁵⁴. Treatment with DHA led to rapid and limited CCL2 expression in a myocardial injury model, indicating restricted inflammation⁴⁴. In a dextran sulfate-induced colitis, there was negative regulation of CCL2 expression after treatment with BCP⁵⁵. CSF2, which encodes the GM-CSF cytokine, is directly involved in the conversion of the M1 to M2 phenotype in macrophages and plays a crucial role in inflammation⁵⁶. CD40 belongs to the TNF α family and therefore has pro-inflammatory and pro-thrombotic effect⁵⁷. As mentioned previously, BCP and DHA act by negatively regulating the expression of GM-CSF and TNF- α cytokines. LY96, or myeloid

differentiation factor 2 (MD2), is a co-receptor that, by identifying the LPS, is coupled to TLR4, forming the LPS-MD2-TLR4 complex, and promotes the recruitment of myeloid differentiation protein (Myd88), activating the MAPKs and NF- κ B, resulting in stimulation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines⁵⁸. The literature describes the agonist effects of BCP on CB2r, including inhibition of the CD14/TLR4/MD2 complex as a potent pathway for regulating inflammation^{59,60}. It has recently been suggested that DHA inhibits the formation of this complex, preventing the intracellular inflammatory signaling cascade by competing with LPS for the binding site⁶¹.

In the treated-only group, positive regulation of Myd88 was observed; this is a downstream TLRs adaptor protein, with the exception of TLR3, which is critical for signal transduction in the pathway that results in NF- κ B⁶² activation. Although studies have shown that BCP and DHA promote the suppression of Myd88 expression^{50,63,64}, the present study showed the opposite effect. In the treated and later infected groups, there was increased expression of TLR7 and CCR4, a chemokine receptor predominantly expressed by Th2 cells and related to inflammatory diseases and T cell neoplasms, such as leukemias and lymphomas⁶⁵⁻⁶⁷.

The above observations show the relevant antinociceptive potential of the BCP-DHA combination with results compatible with the first-choice drugs in the nociception tests performed, as well as its anti-inflammatory ability by significantly inhibiting the cytokine levels of pro-inflammatory GM-CSF, TNF α , IL-1 β , IL-6, and IL-12. The present study showed the negative regulation of crucial genes in the inflammatory process, such as IL-2, IL-6, IRF7, NLRP3, CCCL2, CSF2, CD40, and LY96, whose pathways result in the inhibition of NF- κ B dissociation and in the synthesis of the pro-inflammatory cytokine/acting. TYK2 inhibition through treatment using BCP-DHA was also shown for the first time. In addition, our results strongly suggest a possible new therapeutic alternative in the context of pain and inflammation, requiring further study to improve the doses and routes of administration.

Materials and methods

Ethical and legal aspects

This study was conducted at the Microbiology and Immunology Laboratory of the Multidisciplinary Health Institute of the Bahia Federal University (IMS/UFBA)

after approval was obtained from the Ethics Committee on Research on Human Beings (CEPSH) and the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Bahia Federal University, under protocols nos. 2,791,699 and 060/2018, respectively. All procedures were initiated only upon approval by the latter, and after the donors provided informed consent. The 80 strains of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) used in the study were isolated from the nasal swabs of healthy children, aged between 6–8 years, from daycare centers located in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. The strain was obtained from another study approved by the IMS/UFBA CEPSH (protocol no. 08731912.5.0000.5556).

Animals

A total of 168 mice (84 females and 84 males) of the Balb-C lineage, aged between 6–8 weeks, from the Multidisciplinary Center for Biological Research in the Animal Science Laboratory of Campinas State University (CEMIB/UNICAMP) were used. The animals were kept in the IMS/UFBA Vivarium for mice (six animals per cage) under controlled conditions of light (lights on from 7a.m to 7p.m) and temperature (23 ± 3 °C) and had free access to water and food.

BCP and DHA

In the experiments, BCP and DHA marketed by Sigma-Aldrich ® were used. DHA was diluted in 10% ethanol, as recommended by the manufacturer.

Test of abdominal writhing induced by acetic acid

Five experimental groups of six mice (BALB/c) each, fasted for 12 h, were used per sex. Before the test (24 h), the following was administered subcutaneously: 0.9% NaCl solution (10 mg/kg), indomethacin (10 mg/kg), BCP (5 mg/kg), BCP + DHA (2.5 mg/kg each), and DHA (5 mg/kg). The next day, the animals received an injection of acetic acid (0.6%; 10 mL/kg, intraperitoneal). The produced abdominal wall writhing, followed by trunk turning and hind limb extension, was counted for 20 min as an indication of nociception⁶⁸.

Test of nociception induced by formalin intraplantar injection

Five experimental groups of six mice (BALB/c) each, fasted for 12 h, were used per sex. Animals were subcutaneously administered the following 24 h before the test: 0.9% NaCl solution (10 mg/kg), morphine (5 mg/kg), BCP (5 mg/kg), BCP+DHA (2,5 mg/kg each), and DHA (5 mg/kg). The next day, a formalin solution was administered at a 1,5% concentration (formaldehyde, intraplantar, 20 μ L) to the right posterior paws of the animals. The number of flinches was quantified over 30 min as an indicator of nociception. The first 5 min determined the response to pain of neurogenic origin, whereas the final 15 min determined the response to pain of inflammatory origin. In this test, edema in the right paw was also measured, and the difference between the weight of the right paw and the weight of the left paw was calculated by weighing the paws⁶⁸.

Hypernociception evaluation to test increasing pressure in the paw

Von Frey filaments were used to determine mechanical nociception⁶⁹. The animals were placed in acrylic boxes with mesh network floors consisting of non-malleable wire for 30 min before the experiment to adapt to the environment. The test consisted of producing pressure on the paws of the animals with a hand force transducer adapted with a tip (0.8 mm² tip diameter, Von Frey electronic, Insight Equipment ©, Brazil). The stimulus was automatically stopped when the animal presented a response characterized by flinching in response to the stimulated paw and the intensity was recorded. The interval between two consecutive tests on the same paw was at least 1 min, totaling six trials per animal. The maximum force applied was 50 g. Four experimental groups of six mice (BALB/c) each, fasted for 12 h, were used per sex. Animals were subcutaneously administered the following 24 h before the test: 0.9% NaCl solution (10 mg/kg), BCP (5 mg/kg), BCP+DHA (2.5 mg/kg each), and DHA (5 mg/kg). The next day, carrageenan (100 μ g/paw, i.pl.) was injected into the ventral surface of the right hind paws of the animals, and after 3 h, the von Frey test was performed. The hypernociception intensity was used to quantify the change in pressure (Δ of reaction in grams) obtained by subtracting the value observed before the experimental procedure (0 h) from the reaction value.

Human peripheral blood monocyte isolation and infection

Peripheral blood collections were performed on three male participants, older than 18 years, who agreed to participate in the study and signed the free informed and clear consent form (TCLE) (Annex A). Previously, the volunteers had been subjected to an evaluation of their general health status through laboratory tests because alterations in these parameters can interfere with the cell culture and immunological response. On the day of the experiment, blood samples (20 mL) were kept at room temperature and processed within 2 h of collection. CMSPs were separated using centrifugation in with a Ficoll column ($200 \times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) and resuspended in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL). After the evaluation of the quantity and adequate viability of the cells, they were maintained for 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 . Monocytes were incubated in an oven until inoculation and/or treatment with BPC and DHA^{8,70,71}.

Monocytes were previously grown in polystyrene bottles using specific media for each cell type (incubation: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2). Upon reaching an ideal confluence of approximately 70% ($\sim 10^6/\text{mL}$), the cells were infected with *S. aureus* (1×10^6) and incubated with BCP-DHA (Sigma Aldrich) for 30 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10^{-10} a 10^{-7} M)⁷². Negative controls, containing infected cells without treatment or untreated cells, were also analyzed. All experiments were performed in triplicate. After this process and the determined time of evaluation had passed, the supernatant of each culture was collected and frozen at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for later cytokine production. For gene expression testing, cell suspensions were transported to microtubes for RNA extraction^{72,73}.

Cytokine dosage in the cell culture supernatant was measured using flow cytometry with a Human Th1/Th2/Th17/Th22 13plex – Flow Cytomix commercial kit (eBioscience: Bender Med Systems Gmbh) to quantify GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, and TNF α , according to the procedures described by the manufacturer's instructions. FlowCytomix Pro software was used for data analysis, according to the manufacturer's guidelines.

The gene expression of inflammatory markers was evaluated using the PCR array methodology. The mRNA of the macrophage samples was extracted using TRIzol® LS (Life Technologies™) and following the manufacturer's protocol. cDNA was obtained using retro-transcription (RT) of mRNA with the SuperScript® IV Reverse Transcriptase kit with the addition of complementary oligonucleotides to the

poly-A mRNA tail (Oligodt) and an RNase inhibitor. The cDNA obtained was subjected to analysis using the *Human Innate & Adaptive Immune Responses* PCR Array (Qiagen-AS Bioscience) for the evaluation of 84 genes involved in host response associated with inflammation and bacterial infection. These genes are involved in innate immunity, adaptive, humoral, and inflammatory and defense responses to bacteria and viruses.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (version 6.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The comparisons performed in the different experiments were determined using individual variation or variation of error (s²), the analysis of the Shapiro-Wilk normality test, and the Mann-Whitney test by pairs, because the data did not present a normal distribution. The results are expressed as mean ± standard deviation of the mean (DPM). Statistical differences were considered significant at $p < 0.05$, using a 95% confidence interval.

References

1. Etienne, R., Viegas, F.P.D. & Viegas Jr, C. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. *Rev. Virtual Quim.* **13**, 0000-0000 (2021).
2. Matsuda, M., Huh, Y. & Ji, R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. *Journal of Anesthesia.* **33**, 131–139 (2019).
3. Alves, J. E. O. et al. Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. *Acta Biomedica Brasiliensia*, **8**, 56-68 (2017).
4. Azab, A., Nassar, A. & Azab, A.N. Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules.* **21**, 1321 (2016).
5. Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, **9**, 7204-7218, (2018).
6. Lee, A.S., Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A. & Harbarth, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews | Disease Primers.* **4**, 1-23 (2018).

7. Hassoun, A., Linden, P.K. & Friedman, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Critical Care*. **21**, 211 (2017).
8. Oliveira, H.B.M. et al. Citral modulates virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, **11**, 1-11 (2021).
9. de Carvalho, S. P. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying SCCmec type IV and V isolated from healthy children attending public daycares in northeastern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **21**, 464–467 (2017).
10. Ferreira, A.R.A. Uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos. Dissertação de mestrado. 87 p. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
11. Negreiros, M.O. Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Heterothalamus* sp. sobre *Enterococcus faecalis*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (2014).
12. Bakir, B., Him, A., Özbek, H., Düz, E., Tütüncü, M. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of β -caryophyllene. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, **2**, 41-44 (2008).
13. Calder, P.C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *J. Nutr.*, **142**, 592S-599S (2012).
14. Fiorenzani, P., Lamponi, S., Magnani, A., Ceccarelli, I., Aloisi, A.M. *In Vitro* and *In Vivo* Characterization of the New Analgesic Combination Beta-Caryophyllene and Docosahexaenoic Acid. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**, 1-12 (2014).
15. Brito, L.F. et al. Anti-inflammatory activity of β -caryophyllene combined with docosahexaenoic acid in a model of sepsis induced by *Staphylococcus aureus* in mice. *J Sci Food Agric.*, **99**, 1-11 (2019).
16. Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R. A. & Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*. AOP, published online (2015).
17. Pieretti, S. et al. Gender differences in pain and its relief. *Ann Ist Super Sanità*, **52**, 164-189 (2016).

18. Bartley, E.J. & Fillingim, R.B.. Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *British Journal of Anaesthesia*, **111**, 52–58 (2013).
19. Aloisi, A.M. & Ceccarelli, I. Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. *Neuroscience*, **95**, 559-66 (2000).
20. Vacca, V., Marinelli, S., Pieroni, L., Urbani, A., Luvisetto, S. et al. 17beta-estradiol counteracts neuropathic pain: a behavioural, immunohistochemical, and proteomic investigation on sex-related differences in mice. *Sci Rep*, **8**, 18980 (2016).
21. Arulselvan, P. et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**, 1-15 (2016).
22. Silva, E.A. Avaliação química e farmacológica do óleo destilado de copaiba (*Copaifera* spp. – Leguminosae - *Caesalpinoideae*) e aplicações biotecnológicas. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica. Universidade Federal do Amazonas. 138 págs. 2019.
23. Ferraz, I.G. Estudo de atividades farmacológicas do óleo essencial extraído de *Eugenia brejoensis* Mazine. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente. Universidade Federal de Pernambuco, 59 págs. 2016.
24. Aguilar-Ávila, D.S. et al. B-Caryophyllene, a natural sesquiterpene, attenuates neuropathic pain and depressive-like behavior in experimental diabetic mice. *J Med Food*, **0**, 1-9 (2019).
25. Kuwahata, H. et al. Local peripheral effects of β -caryophyllene through cb2 receptors in neuropathic pain in mice. *Pharmacology & Pharmacy*, **3**, 397-403 (2012).
26. Ceccarelli, I. et al. The CB2 agonist β -Caryophyllene in male and female rats exposed to a model of persistent inflammatory pain. *Frontiers in neuroscience*, **14**, 1-11 (2020).
27. Nakamoto, K. Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 1070-1072 (2010).
28. Mc Lee, K., Achuthan, A.A. & Hamilton, J.A. GM-CSF: a promising target in inflammation and autoimmunity. *ImmunoTargets and Therapy*, **9**, 225–240 (2020).
29. Hamilton, J.A. GM-CSF in inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 1-19 (2019).

30. Lindsey, L.P. et al. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, improves working memory and reduces circulating levels of specific proinflammatory cytokines in aged male mice. *Behav Brain Res*, **17**, 1-22 (2017).
31. Bravo, E., Napolitano, M.R., Valentini, S.B. & Quattrucci, S. Neutrophil unsaturated fatty acid release by GM-CSF is impaired in cystic fibrosis. *Lipids Health Dis.*, **9** (2010).
32. Kany, S., Vollrath, J.T. & Relja, B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1-31 (2019).
33. Dinarello, C.A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.*, **281**, 8–27 (2018).
34. Murakami, M., Kamimura, D. & Hirano, T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity*, **50**, 812-831 (2019).
35. Kuwahata, H. et al. Local peripheral effects of β -caryophyllene through cb2 receptors in neuropathic pain in mice. *J Interferon Cytokine Res*, **32**, 60-5 (2012).
36. Ferreira, D.A.S. Avaliação do efeito protetor do beta cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.
37. Cerqueira, S.R.P. Os ácidos gordos ômega-3 e os seus efeitos anti-inflamatórios. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências da Saúde. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Porto. Porto, 2013.
38. Luzete, B.C. Efeitos do ácido docosahexaenoico (DHA) e do ácido araquidônico (AA) sobre a morte celular da linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. Brasília, 2015.
39. Vignali, D.A.A. & Kuchroo, K. IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nat Immunol.*, **13**, 722–728 (2012).
40. Yan, J., Smyth, M.J. & Teng, M.W.L. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **10**, a028530 (2018).
41. Kong, W., Yen, J., Vassiliou, E., Adhikary, S., Toscano, M.G. & Ganea, D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and *in vitro* and *in vivo* expression of the IL-12 cytokine Family. *Lipids in Health and Disease*, **9**, 1-10 (2010).

42. Wang, X., Wong, K., Ouyang, W. & Rutz, S. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **11**, a028548 (2019).
43. Walter, M.R. The molecular basis of IL-10 function: from receptor structure to the onset of signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.*, **380**, 191–212 (2014).
44. Habicht, I. et al. DHA supplementation attenuates MI-induced LV matrix remodeling and dysfunction in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2020**, 1-14 (2020).
45. Rashid, N.A. et al. *Polygonum minus* essential oil modulates cisplatin induced hepatotoxicity through inflammatory and apoptotic pathways. *EXCLI Journal*, **19**, 1246-1265 (2020).
46. Wu, M. et al. Interferon regulatory factor 7 (IRF7) represents a link between inflammation and fibrosis in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.*, 1–9 (2019).
47. Sousa, J.C. Fatores reguladores de interferon (IRFs) em pacientes com síndrome mielodisplásica. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE. 2015.
48. Benninghoff, A.D. et al. Docosahexaenoic acid consumption impedes early interferon- and chemokine-related gene expression while suppressing silica-triggered flaring of murine lupus. *Frontiers in Immunology*, **10**, 1-26 (2019).
49. Ozenver, N. & Efferth, T. Phytochemical inhibitors of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Pharmacological Research*, **170**, 1-28 (2021).
50. Li, W., Yang, F., Chen, J. & Ren, G. β -caryophyllene ameliorates MSU-induced gouty arthritis and inflammation through inhibiting NLRP3 and NF- κ B signal pathway: *in silico* and *in vivo*. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, 1-13 (2021).
51. Wierenga, K.A. Docosahexaenoic acid suppresses silica-induced inflammasome activation and IL-1 cytokine release by interfering with priming signal. *Frontiers in Immunology*, **10**, 1-19 (2019).
52. Zarrin, A.A.; Bao, K., Lupardus, P. & Vucic, D. Kinase inhibition in autoimmunity and inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*, **20**, 39-63 (2020).

53. Burke, J.R. et al. Autoimmune pathways in mice and humans are blocked by pharmacological stabilization of the TYK2 pseudokinase domain. *Sci. Transl. Med.*, **11**, eaaw1736 (2019).
54. Gschwandtner, M., Derler, R. & Midwood, K.S. More than just attractive: how CCL2 influences myeloid cell behavior beyond chemotaxis. *Frontiers in Immunology*, **10**, 1-29 (2019).
55. Cho, J. Y. et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Sciences*, **80**, 932-939 (2007).
56. Li, Y. et al. Csf2 attenuated sepsis-induced acute kidney injury by promoting alternative macrophage transition. *Frontiers in Immunology*, **11**, 1-14 (2020).
57. Antoniadis, C., Bakogiannis, C., Tousoulis, D., Antonopoulos, A. S. & Stefanadis, C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *Journal of the American College of Cardiology*, **54**, 669-677 (2009).
58. Wang, Y. MD2 activation by direct AGE interaction drives inflammatory diabetic cardiomyopathy. *Nature Communications*, **11**, 1-16 (2020).
59. Sharma, C. Polypharmacological properties and therapeutic potential of β -Caryophyllene: a dietary phytocannabinoid of pharmaceutical promise. *Current Pharmaceutical Design*, **22**, 1-28 (2016).
60. Johnson, S. A., Rodriguez, D. & Allred, K. A systematic review of essential oils and the endocannabinoid system: a connection worthy of further exploration. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2020**, 1-13 (2020).
61. Hwang, D.H., Kim, J. & Lee, J.Y. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *Eur J Pharmacol.*, **15**, 24-35 (2016).
62. Zheng, C., Chen, J., Chu, F., Zhu, J. & Jin, T. Inflammatory role of TLR-MyD88 signaling in multiple sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 1-12 (2020).
63. Younis, N.S. & Mohamed, M. E. β -Caryophyllene as a potential protective agent against myocardial injury: the role of toll-like receptors. *Molecules*, **24**, 1-16 (2019).
64. Li, J. et al. Resolvin D1 mitigates non-alcoholic steatohepatitis by suppressing the TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK pathways and activating the Nrf2 pathway in mice. *International Immunopharmacology*, **88**, 1-13 (2020).

65. Bozza, S. et al. Small molecule CCR4 antagonists protect mice from aspergillus infection and allergy. *Biomolecules*, **11**, 1-11 (2021).
66. Matsuo, K. et al. CCR4 is critically involved in skin allergic inflammation of BALB/c mice. *J Invest Dermatol.*, **138**, 1764-1773 (2018).
67. Yoshie, O. & Matsushima, K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *International Immunology*, **27**, 11–20 (2014).
68. Cruz, M. P. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and flavones isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). *PLoS One*, **11**, 1-29 (2016).
69. Frey, V. Abhandlungen der Königl. Sächsische. *Gesellschaft der Wissenschaften*, **23**, (1896).
70. Agnew, L.L. & Colditz, I.G. Development of a method of measuring cellular stress in cattle and sheep. *Vet Immunol Immunopathol.*, **123**, 197-204 (2008).
71. Lewandowska-Sabat, A. M., Boman, G. M., Downing, A., Talbot, R., Storset, A. K., Olsaker, I. The early phase transcriptome of bovine monocyte-derived macrophages infected with *Staphylococcus aureus* in vitro. *Genomics*, **14**, 1-15 (2013).
72. Aomatsu, M.; Kato, T.; Kasahara, E.; Kitagawa, S. Gender difference in tumor necrosis factor- α production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- γ . *Biochem Biophys Res Commun.*, **441**, 220-225 (2013).
73. Rosendal, G. The convention on biological diversity: a viable instrument for conservation and sustainable use? *Green Globe Yearbook of International Cooperation on Environment and Development*, 69-81 (1995).

Acknowledgements

Jim Hesson copyedited the manuscript (<https://www.academicenglishsolutions.com>).

Author contributions

Conceived and designed the experiments: HBMO, GBC, JT, APTU, RY, and LMM. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and subinhibitory dose assays: HBMO, NNS, BAS, SPC, JBA, and TLSB. Citral interference in antibiotics assay: HBMO, NNS, BAS, SPC, JBA, LOS, MMT, HILNC, CDB, RSB, JCSV and TLSB. Biofilm assay: HBMO, NNS, BAS, MNSJ, CNTO, and PPA. Virulence gene expression: HBMO, BAS, TLSB, YMFSA, MNSJ, CNTO, GBC, and LMM. Analyzed the data: HBMO, IBSS, GBC, RY, APTU, JT, and LMM. Contributed reagents/materials/analysis tools: JT, RY, APTU, and LMM. Wrote the paper: HBMO, GBC, RY, APTU, and LMM. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo em Pesquisa do Estado da Bahia (JCB0035/2016) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Code 001), Brazil. The funding agencies played no role in the design or conclusion of the study.

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics declarations and approval for human experiments

Ethics approval and consent were deemed unnecessary in this study, according to the Animal Ethics Committee (AEC) of the Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia. The strains used were obtained from other studies after approval by the Ethics Committee of Research with Human Beings of the Multidisciplinary Health Institute campus Anísio Teixeira (CAAE n° 08730012.4.0000.5556) and 08731912.5.0000.5556 (nasal strains). For nasal samples, informed consent was obtained from the parents or guardians.

Consent to publish

Not applicable.

Figure legends

Figure 1. Number of abdominal writhing induced by acetic acid in Balb-C mice. (A) Female mice. (B) Male mice. (C) Comparison between sexes. S = saline; BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexaenoic acid; B/D = BCP and DHA combination; I = indomethacin. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. I; c $p < 0.05$ vs. BCP; * $p < 0.05$.

Figure 2. Number of flinches exhibited by Balb-C mice after intraplantar formalin administration (1.5%). (A) Females in 0–5 min period. (B) Females in 530 min period. (C) Males in 0–5 minutes period. (D) Males in 5–30 min period. (E) Comparison between sexes in the period 0–5 min. (F) Comparison between sexes in the period 0–5 minutes. S = saline; BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexanoic acid; BD = BCP and DHA combination; M = morphine. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. M; c $p < 0.05$ vs. BCP; d $p < 0.05$ vs. BD; * $p < 0.05$.

Figure 3. Paw weights of Balb-C mice that received formalin intraplantar injection (1.5%). (A) Female mice. (B) Male mice. (C) Comparison between sexes. S = saline; BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexanoic acid; B/D = BCP and DHA association; M = morphine. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S.

Figure 4. Nociception intensity by Δ limit of the paw removal after Carrageenan injection (100 μ g) in Balb-C mice. (A) Female mice. (B) Male mice. (C) Comparison

between sexes. S = saline; BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexaenoic acid; BD = BCP and DHA association. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. S; b $p < 0.05$ vs. BCP; * $p < 0.05$.

Figure 5. Concentration of GM-CSF (A), TNF α (B), IL-1 β (C), IL-6 (D), IL-10 (E), and IL-12 (F) cytokines in the peripheral blood of male volunteers. C = control (sterile saline); BCP = beta-caryophyllene; DHA = docosahexaenoic acid; B/D = BCP and DHA association; LPS = lipopolysaccharides; C80 = strain C80; IT B = infected and treated with BCP; IT D = infected and treated with DHA; IT B/D = infected and treated with BCP and DHA association; TI B = treated with BCP and infected; TI D = treated with DHA and infected; TI B/D = treated with BCP and DHA association and infected. Data are expressed as mean \pm DPM. a $p < 0.05$ vs. C; b $p < 0.05$ vs. LPS; c $p < 0.05$ vs. C80.

Figure 6. Comparison of the gene expression of the treated group with the association of β -caryophyllene and docosahexaenoic acid (50 + 50 mg/dL) with the infected-only group with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (A), the group infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the group treated with BCP-DHA (B) and the group treated with BCP-DHA and infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (C). Data are expressed as mean \pm DPM. * $p < 0.05$.

Figure 7. Anti-inflammatory characterization of the BCP-DHA treatment in the face of MRSA infection. The recognition of *S. aureus* by toll-like receptors present in the cell membrane initiates an intracellular signaling cascade that results in the dissociation of the NF- κ B/I κ b complex, NF- κ B translocation to the cell nucleus, and stimulation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines. BCP-DHA treatment acts through inhibiting different pathways that result in the activation of NF- κ B, negatively regulating the expression of the MD2, IRF7, NLRP3, and TYK2 genes, which culminates in lower synthesis and acting of pro-inflammatory cytokines.