UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA
E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DO EXTRATO DA
INFLORESCÊNCIA DA *Achyrocline satureoides* SOBRE A FUNÇÃO
DE NEUTRÓFILOS NA INFLAMAÇÃO**

Eric Diego Barioni

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Prof^a Dr^a Sandra Helena Poliselli Farsky

**São Paulo
2013**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Barioni, Eric Diego
B253c Caracterização das ações do extrato da inflorescência da
Achyrocline satureoides sobre a função de neutrófilos na inflamação
/ Eric Diego Barioni. -- São Paulo, 2013.
112 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Imunotoxicologia 2. Asteraceae : Farmacognosia 3.
Inflamação : Droga : Terapia 4. Toxicologia experimental 5.
Flavonoide : Produtos naturais 5. Neutrófilo : Fisiologia
humana I. T. II. Farsky, Sandra Helena Polizeli, orientador.

615.9 CDD

Eric Diego Barioni

**CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DO EXTRATO DA
INFLORESCÊNCIA DA *Achyrocline satureoides* SOBRE A FUNÇÃO
DE NEUTRÓFILOS NA INFLAMAÇÃO**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Prof^a Dr^a Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientadora/Presidente**

1º. Examinador

2º. Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2013.

**Aos meus pais, Agnaldo Ribeiro Barioni e Maria Elenice
Gomes Barioni. Fonte inesgotável de amor e dedicação,
apoio e paciência. Obrigado pela educação que
construímos. Amo vocês.**

A minha avó, Izaura Ribeiro Barioni, a quem serei grato eternamente. Certamente tudo seria mais difícil, se em minha vida, não existisse uma pessoa tão adorável e auxiliadora! Obrigado por tudo. Amo você.

**A minha amiga e namorada, Mayara Crislaine da Cruz
Carvalho, pelos sonhos que sonhamos juntos, pelo
carinho, e por todo apoio e paciência ao longo desta
jornada! Esta é mais uma conquista nossa! Amo você.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, fonte inexaurível de Inspiração e Paz profunda

Em respeito e memória dos animais de experimentação, utilizados para a realização deste trabalho, dedico esta obra acadêmica. Que juntos possamos contribuir de forma empírica para o progresso da ciência, colaborando com a manutenção da saúde e do bem estar de muitos que habitam esta terra. *“Se não tiveres cuidado com a formiga que está debaixo dos teus pés, ninguém terá cuidado de ti, quando estiveres na trilha do elefante”* Paiva Netto.

A Prof^a Dr^a Sandra Helena Poliselli Farsky, exemplo de determinação e responsabilidade. Obrigado por contribuir de forma tão grandiosa e valiosa com minha formação pessoal e profissional.

A Prof^a Dr^a Regina Lúcia de Moraes Moreau, obrigado pelo apoio, pelos conselhos e por me iniciar nesta jornada junto à Prof^a Dr^a Sandra Farsky.

Aos Professores do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas da USP, em especial, ao Dr^o Maurício Yonamine, Dr. Ernani Pinto, Dr^a Elisabeth de Souza Nascimento, Dr^a Tânia Marcourakis e a Dr^a Ana Paula de Melo Loureiro.

A Prof^a Dr^a Myriam Krasilchik, Prof^a Dr^a Helenice de Souza Spinosa e ao Prof^o Dr^o João Palermo Neto.

Aos membros da banca de qualificação, Prof^a Dr^a Elfriede Marianne Bacchi, Prof^o Dr^o Joilson de Oliveira Martins e a Jovem Pesquisadora Dr^a Adriana Lino.

Aos alunos e professores colaboradores Dr^o Sérgio Faloni de Andrade e Dr^o Rivaldo Niero da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), e ao professor Dr^o Bruno Cogliati da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Aos queridos funcionários da Universidade de São Paulo, Luzia de O. Valderrama, Samantha Carvalho, Edna Batista Lima, Sueli Providelo, Elaine Midori Ychico, Jorge de Lima, e André Nakasato.

A secretária da Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTOX), Nanci Yuri Kawakosi de Amo.

Ao Secretário do Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT) da Universidade de São Paulo, Ângelo Balestrin.

Aos professores e membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e da Comissão de Pós-Graduação (CPG) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Ao Biotério de Criação e Experimentação Animal da FCF/IQ por fornecer os animais utilizados neste trabalho.

Ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN; processo 010062-2012-2) do Ministério do Meio Ambiente, Brasil.

A Coordenadora do curso de Biomedicina do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio (CEUNSP) Prof^a Ms. Maria Tereza Fioravante e ao Prof^o Ms. Jadson de Oliveira Silva.

Ao Prof^o Dr^o Tarcísio Antônio Hess Coelho.

A bibliotecária Leila Aparecida Bonadio pela revisão do trabalho e das referências bibliográficas.

A bibliotecária Marina Mayumi Yamashita pela elaboração da Ficha Catalográfica.

Aos grandes amigos Helder Cravo da Costa, Josué Andrade de Godói, Ricardo Camargo e William Moreira de Almeida (*in memoriam*).

A todos os parceiros e amigos do Laboratório de Toxicologia Experimental: Isabel Machado, Carine Drewes, Celina Goulart, Julliana Diniz, José Roberto Santin, Laísa Castro de Souza, Guilherme Luiz, Tathiana Moreira, Nathalia Pereira, Marina Spatti, Lorena Pantaleão, Rodrigo Azevedo Loiola, Wesley Cruz e Kaléo Elache. Em especial a Stephen Rodrigues, Viviane Ferraz-de-Paula e Ana Lúcia Borges Shimada.

A Dr^a Simone Bolonheis de Campos.

A aluna de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Carolina Costola de Souza.

A Maria Aparecida da Cruz Carvalho, pelo apoio e dedicação. Sempre disposta e preocupada.

A todos os amigos e parceiros do Programa de Análises Clínicas e Toxicológicas e do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas.

A todos os amigos, parceiros e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

A todos os amigos, parceiros e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A FAPESP por conceder a bolsa de Mestrado (processo 2011/15115-2).

A todos o meu *muito obrigado!*

“Que nós, Seres Humanos e Espirituais, saibamos mitigar a dor dos que padecem e regozijar-nos no júbilo dos que se alegram. Ou seremos tudo, menos Humanidade, na Terra ou no Céu da Terra”.

Paiva Netto

RESUMO

Achyrocline satureoides (Lam) D.C., popularmente conhecida como “marcela”, é utilizada popularmente para tratar diversas doenças, como mal estar gástrico e intestinal, inflamações, diabetes e outros. Como os mecanismos de ação do extrato de *A. satureoides* ainda não são conhecidos, o presente trabalho visou esclarecer os mecanismos antiinflamatórios do extrato bruto hidroalcoólico das inflorescências de *A. satureoides*, focando na migração e função fagocítica e microbica de neutrófilos. Para tanto, o extrato hidroalcoólico foi administrado por gavagem (50, 100 e 250mg/kg) em ratos Wistar, machos, adultos, e a inflamação foi induzida pela injeção do lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS; 2mL de solução; 500 µg/mL em PBS) no tecido subcutâneo dorsal (modelo da bolsa de ar). Animais controles receberam volumes equivalentes de veículo do extrato e indometacina (30mg/kg). Foram quantificados o número de neutrófilos (câmara de Neubauer e esfregaços corados por Panótico) e a concentração de Leucotrieno B4 e CINC-1 (ELISA) no foco de lesão; a interação leucócito-endotélio em vênulas da microcirculação mesentérica após estímulo *in situ* pelo lipopolissacarídeo de *E.coli* (LPS; 30µg/40µL; por microscopia intravital); a expressão de moléculas de adesão e do *toll-like receptor* (TLR-4), além da quantificação do *burst* oxidativo (induzido pelo miristato-acetato de forbol – PMA) e fagocitose em neutrófilos circulantes (citometria de fluxo); análise histológica e quantificação dos marcadores hepáticos (AST, ALT e Gama-GT) e renais (uréia e creatinina) no plasma por espectrofotometria. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com o extrato reduziu o número de neutrófilos e a concentração de LTB4 e CINC-1 na bolsa de ar; reduziu a expressão de TLR4 pelos neutrófilos circulantes e a porcentagem de neutrófilos positivos para L-selectina e β 2-integrina; inibiu a adesão e o comportamento *rolling* de leucócitos ao endotélio microvascular; reduziu o *burst* induzido por PMA; aumentou o potencial de fagocitose, sem alterar o *burst* induzido por *Staphylococcus aureus*, não alterou a morfologia tecidual e a concentração sérica dos marcadores de atividade hepática e renal. Em conjunto, os dados obtidos mostram que dose, aparentemente, não tóxica do extrato de *A. satureoides* exerce efeito antiinflamatório *in vivo* frente ao LPS, quantificados pela redução da migração e pelas interferências nas atividades fagocítica e microbica dos neutrófilos.

Palavras-chave: bolsa de ar; microscopia intravital; receptor *toll-like-4*; moléculas de adesão; LPS; toxicidade; marcela.

ABSTRACT

Achyrocline satureoides (Lam) D.C., popularly known as “marcela”, is popularly used to treat several diseases, such as gastric and intestinal disorders, inflammation, diabetes and others. As the mechanisms of the extract of *A. satureoides* have not been elucidated, this study aimed to investigate the anti-inflammatory mechanisms of the crude hydroalcoholic extract of the flowers of *A. satureoides*, focusing on migration and phagocytic and microbicidal neutrophils function. The hydroalcoholic extract was administered by gavage (50, 100 and 250mg/kg) into male Wistar rats, adult, and inflammation was induced by injection of lipopolysaccharide *E. coli* (LPS; 2 mL of solution; 500µg/mL in PBS) into the dorsal subcutaneous tissue (air pouch model). Control animals received equivalent volume of extract vehicle or indomethacin solution (30mg/kg). It was quantified the numbers of neutrophils (Neubauer chamber and stained smears by Panoptic) and concentrations of leukotriene B4 (LTB4) and CINC-1 (ELISA) in the focus of the injury; the leukocyte-endothelium interactions in mesenteric venules of the microcirculation after stimulation by LPS (30µg/40µL; intravital microscopy); the adhesion molecules and toll-like receptor (TLR-4) expressions and quantification of oxidative burst and phagocytosis in circulating neutrophils (flow cytometry); histological analysis and the hepatic markers (AST, ALT and gamma-GT) and kidney (urea and creatinine) concentrations in plasma by spectrophotometry. Data obtained showed that the treatment reduced the numbers of neutrophils and concentrations of LTB4 and CINC-1 in the subcutaneous tissue; reduced the TLR4 expression by circulating neutrophils and the number of β 2-integrin- and L-selectin-positive neutrophils; inhibited the leukocyte adhesion and the rolling behavior to vascular endothelium; reduced the burst evoked by PMA; increased the phagocytosis without changing the burst induced by *Staphylococcus aureus*; and did not alter the tissue morphology and concentration of hepatic and renal enzymes in the serum. Together, these data suggest that dose, apparently non-toxic, of extract of *A. satureoides* exerts anti-inflammatory effect *in vivo*, quantified by the reduced migration and by interference in the phagocytic and microbicidal activities of neutrophils.

Key-words: air pouch; intravital microscopy; toll-like receptor 4; adhesion molecules; LPS; toxicity; marcela.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Achyrocline satureoides</i> (marcela) em seu habitat natural.....	22
Figura 2 - Estruturas moleculares de algumas substâncias naturais encontradas em <i>Achyrocline satureoides</i>	23
Figura 3 - Delineamento experimental do modelo de <i>Air pouch</i>	35
Figura 4 - Delineamento experimental do modelo de Microscopia Intravital.	36
Figura 5 - Reagentes utilizados para a avaliação do metabolismo oxidativo e fagocitose.	38
Figura 6 - Efeito de <i>A. satureoides</i> sobre a migração de neutrófilos <i>in vivo</i>	42
Figura 7 - Efeito de <i>A. satureoides</i> sobre a migração de neutrófilos <i>in vivo</i>	43
Figura 8 - Efeito do extrato de <i>A. satureoides</i> sobre o número total e diferencial de leucócitos no sangue.	44
Figura 9 - Efeito de <i>A. satureoides</i> sobre a porcentagem de neutrófilos viáveis, em necrose, em apoptose e apoptose tardia.	45
Figura 10 - Efeito de <i>A. satureoides</i> sobre o número de leucócitos em comportamento <i>rolling</i> e aderidos (10 minutos, 200µm) no endotélio de vênulas pós-capilares do leito mesentérico.	46
Figura 11 - Efeitos do extrato de <i>A. satureoides</i> sobre a expressão de L-selectina (CD62L) e β2 integrina (CD18).	47
Figura 12 - Efeito do extrato de <i>A. satureoides</i> sobre a expressão do receptor TLR4 em neutrófilos circulantes.	48
Figura 13 - Efeito do extrato de <i>A. satureoides</i> sobre a concentração de LTB4 e CINC-1.	49
Figura 14 - Efeito de <i>A. satureoides</i> sobre o <i>burst</i> induzido pela bactéria <i>S. aureus</i> e pelo PMA.	50
Figura 15 - Efeito de <i>A. satureoides</i> sobre o número de neutrófilos que fagocitam a bactéria <i>S. aureus</i> , e sobre a capacidade de fagocitose destas células.	51
Figura 16 - Efeito de <i>A. satureoides</i> sobre a concentração dos marcadores de atividade hepática aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama glutamiltransferase, e renal, uréia e creatinina.	52
Figura 17 - Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> sobre os parâmetros histológicos do fígado e dos rins de ratos pré-tratados.	53

LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

ADAM-17	<i>Metallopeptidase domain 17</i>
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
C5a	Fração 5a do sistema complemento
CD18	β 2-integrina
CD62L	L-selectina
CD38	<i>Cyclic ADP-ribose hydrolase</i>
CD177	<i>Human neutrophil alloantigen 2a</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CINC	Citocina Quimiotóxica para Neutrófilos
CRBio	Conselho Regional de Biologia
DCFH-DA	Diacetato 2'7' diclorofluoresceína
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
epm	Erro padrão da média
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FITC	Isoticianato de fluoresceína
fMLP	<i>Formil-metionil-leucil-fenilalanina</i>
G	Força centrífuga relativa
Gama-GT	Gama - glutamiltransferase
GC-MS	<i>Gas Chromatography-mass spectrometry</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICAM-1	<i>Intercellular cell adhesion molecule 1</i>
IKK	<i>I kappa beta kinase</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-8	Interleucina-8
IRAK1	<i>IL-1R-associated kinase 1</i>
IRAK4	<i>IL-1R-associated kinase 4</i>
JAMs	<i>Junctional adhesion molecules</i>

JNK	JUN N-Terminal quinase
LADI	<i>Leukocyte Adhesion Deficiency I</i>
LADII	<i>Leukocyte Adhesion Deficiency II</i>
LBP	<i>LPS binding protein</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function Associated-1</i>
LPS	lipopolisacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
Mac-1	<i>Macrophage Antigen-1</i>
MAL	<i>MyD88-adaptor-like</i>
MD2	<i>Myeloid differentiation protein 2</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary-response gene 88</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear NF-κB
NK	Células <i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Solução tampão de fosfato
PE	Ficoeritrina
PECAM-1	<i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PI	Iodeto de Propídio
PKC	Proteína Kinase C
PMA	Miristato-acetato de forbol
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>
QE	Equivalente de quercetina
RIP1	<i>Receptor-Interacting Protein 1</i>
rpm	Rotações por minuto
SAPI	<i>Staphylococcus aureus</i> marcado com Iodeto de Propídio
SUS	Sistema Único de Saúde
TAB1	<i>TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1</i>
TACE	<i>Tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor β activated kinase-1</i>
TBK-1	<i>TANK-binding kinase-1</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>

TIRAP <i>protein</i>	<i>Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor</i>
TLR-4	<i>Toll-like receptor-4</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain containing adaptor protein inducing interferon-β</i>
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UI	Unidade Internacional
USP	Universidade de São Paulo
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Produtos naturais e medicamentos	19
1.2 <i>Achyrocline satureoides</i> – importância no emprego popular	21
1.3 Recrutamento leucocitário no processo inflamatório agudo	25
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Animais	33
3.2 Obtenção do extrato	33
3.3 Inflamação no tecido subcutâneo dorsal	34
3.4 Determinação do número de leucócitos circulantes	35
3.5 Microscopia Intravital	36
3.6 Citometria de fluxo: Quantificação da expressão de <i>toll-like receptor-4</i> , da viabilidade celular, do <i>burst</i> oxidativo e da fagocitose	37
3.7 Quantificação de moléculas de adesão (incubação <i>in vitro</i> com LPS) por citometria de fluxo	38
3.8 Quantificação de mediadores inflamatórios	39
3.9 Quantificação de marcadores hepáticos e renais	40
3.10 Análise histopatológica	40
3.11 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> inibe a migração de neutrófilos para o foco de inflamação induzido pelo LPS	41
4.2 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> não altera o número de leucócitos circulantes	43
4.3 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> não afeta a viabilidade dos neutrófilos circulantes	44
4.4 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> altera as interações dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares do mesentério	46
4.5 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> altera as expressões das moléculas de adesão em neutrófilos circulantes incubados com LPS <i>in vitro</i>	46
4.6 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> reduz a expressão de TLR4	47
4.7 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> inibe a secreção de LTB4 e CINC-1	48

4.8 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> não afeta o <i>burst</i> oxidativo induzido pelo <i>Staphylococcus aureus</i> , mas reduz o <i>burst</i> oxidativo provocado pelo PMA.....	49
4.9 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> não afeta o número de neutrófilos que fagocitam a bactéria <i>S. aureus</i> , mas aumenta a atividade fagocítica dos neutrófilos	50
4.10 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> não altera a concentração de marcadores de atividade hepática e renal na circulação.....	51
4.11 O extrato hidroalcoólico de <i>A. satureoides</i> não causa toxicidade hepática e renal	53
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR.....	79
ANEXO A – FICHA DO ALUNO	92
ANEXO B – CURRÍCULO LATTES.....	93
ANEXO C – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	100
ANEXO D – <i>ACHYROCLINE SATUREOIDES</i> (LAM) D.C. HYDROALCOHOLIC EXTRACT INHIBITS NEUTROPHIL FUNCTIONS RELATED TO INNATE HOST DEFENSE	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais e medicamentos

Desde a antiguidade, o homem tem contado com a natureza para a produção de alimentos, roupas, abrigos, meios de transporte, fertilizantes, aromas, fragrâncias e medicamentos. As plantas têm sido a base para a elaboração destes medicamentos que existem há milhares de anos. Com o decorrer dos tempos, os conhecimentos acerca da preparação e consumo destes produtos naturais foram transmitidos e mantidos dentro das comunidades (CRAGG; NEWMAN, 2009; CALIXTO, 2000; RATES 2001) e, muitas destas plantas, com características alucinógenas, eram utilizadas em rituais místicos e/ou religiosos, permitindo, de maneira geral e segundo a crença popular, a cura, o autoconhecimento e a aproximação dos usuários com o sobrenatural (BENNETT, 1992; PIRES *et al.*, 2010).

Atualmente, as plantas medicinais representam, pelo menos em parte, uma classe de produtos naturais terapeuticamente eficazes e de fácil acesso à população. Além disso, muitas têm sido fonte imensurável de novos fármacos, e/ou protótipos experimentalmente comprovados e seguros para o uso humano e veterinário (YUE-ZHONG, 1998; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; VIEGAS JR *et al.*, 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009). Uma importante classe de medicamentos a base de plantas são os fitoterápicos. Segundo a ANVISA (2010), os fitoterápicos são medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas vegetais¹, e caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

Aproximadamente 20% de toda biodiversidade mundial está localizada no Brasil, o que corresponde a cerca de 60 mil tipos de plantas e a uma enorme variedade de novas estruturas moleculares (SOUZA *et al.*, 2008; FUNARI; FERRO, 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009). No Brasil, programas nacionais de saúde, como o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, incentivam o uso desta biodiversidade e de medicamentos fitoterápicos para garantir maior acesso e cuidados à saúde básica da população (BRASIL, 2008; FUNARI; FERRO, 2006;

¹ Matéria-prima vegetal: compreende a planta medicinal, a droga vegetal ou o derivado vegetal.

AKERELE, 1988). Além disso, o alto custo para a síntese de novos fármacos que possam ser inovadores, além do sucesso comercial das plantas medicinais, ampliou o interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento e pesquisa de novos medicamentos a partir destes produtos (BALUNAS; KINGHORN, 2005; VIEGAS JR. *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; AKERELE *et al.*, 1988; ZÁRATE *et al.*, 2001; TABACH, 2012). Os medicamentos fitoterápicos representam uma parcela significativa no mercado farmacêutico, e esta contribuição para o setor produtivo ainda tende a aumentar, pois a venda destes medicamentos naturais cresce aproximadamente 15% a cada ano, enquanto que a venda dos medicamentos sintéticos cresce apenas 4% no mesmo período (AGRA *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008; AZAIZEH *et al.*, 2010).

Vários estados brasileiros já introduziram os medicamentos fitoterápicos no SUS (SOUZA BRITO; SOUZA BRITO, 1993; WAYLAND, 2001, 2003; CALIXTO, 2000) e, atualmente, o Brasil está entre os 10 primeiros na lista de consumidores destes medicamentos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Outra importante classe de medicamentos naturais, elaborados de forma diferente dos fitoterápicos são as drogas vegetais. Segundo Brasil (2010), estas drogas são classificadas como “a própria planta medicinal ou suas partes, que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização, secagem, podendo ser íntegra, rasurada ou triturada”. As drogas vegetais, utilizadas na preparação dos populares “chás”, são produtos de venda isenta de prescrição médica, destinados ao consumidor final, e a sua efetividade está amparada no uso tradicional² e na revisão de dados disponíveis na literatura. A Resolução-RDC Nº46 de 10 de março de 2010, trata sobre a notificação destas drogas junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e fornece outras providências quanto à sua fabricação, importação, comercialização, qualidade e identificação, visando padronizar e assegurar o uso de algumas espécies, esclarecendo como algumas drogas vegetais devem ser utilizadas para o alcance de seus efeitos benéficos.

Segundo Wilasrusmee (2002), 80% dos habitantes mundiais confiam no tratamento tradicional, à base de plantas medicinais, para o cuidado primário a sua

² Uso tradicional: uso alicerçado na tradição popular, sem evidências conhecidas ou informadas de risco a saúde do usuário, cujas propriedades são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização e documentações científicas.

saúde, e ao longo dos anos, gradativamente, estes números têm aumentado. Fatores como: 1) baixa renda, 2) o fácil acesso e o baixo custo destes produtos, 3) a busca constante por uma vida mais saudável e, 4) a idéia de que o que vem da natureza não causa prejuízos à saúde (TABACH, 2012), impulsionam a procura por estes produtos e a sua utilização. No entanto, na maioria das vezes, o emprego popular é ainda realizado sem critérios adequados, ou seja, sem a fundamentação necessária na literatura para o uso, o que em algumas vezes poderá resultar em efeitos indesejáveis e tóxicos (CALIXTO, 2000; CAPASSO, 2000; VAN ANDEL; WESTERS, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; TABACH, 2012).

Desta forma, estudos mais aprofundados sobre as propriedades farmacológicas e toxicológicas das drogas vegetais, a regulamentação das espécies vegetais, bem como a educação e conscientização da população sobre a forma de cultivo e de utilização de plantas medicinais são necessários para o uso seguro destes produtos (COSENTINO, 2008; TABACH, 2012).

1.2 *Achyrocline satureoides* – importância no emprego popular

Achyrocline satureoides (LAM) D.C., é descrita como uma planta herbácea perene, ereta, muito ramificada. Possui folhas simples alternadas, inteiras, sésseis lineares lanceoladas com revestimento alvotomentoso. As inflorescências são axilares e terminais do tipo capítulos reunidas em panículas corimbosas que apresentam coloração amarelo-dourado e possuem odor característico (LORENZI; MATOS, 2002; FACHINETTO *et al.*, 2007). Popularmente, a espécie vegetal recebe diferentes denominações dependendo da região onde é encontrada (Figura 1; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Destacamos alguns nomes como marcela, marcela do campo, macelinha, macela e camomila-nacional.

Figura 1 - *Achyrocline satureoides* (marcela) em seu habitat natural.

Fonte: Adaptado de Retta *et al.*, 2012

A espécie *Achyrocline satureoides* é membro da família Asteraceae, tribo Inulae, e possui ampla dispersão nos estados da região sul do Brasil, como Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul; além disso, são encontradas também em alguns países como Colômbia, Argentina, Uruguai e Paraguai (CABRERA, 1963, 1974; GATTUSO *et al.*, 2008; RETTA *et al.*, 2012). Nestas mesmas regiões é comum o crescimento de outras espécies morfológicamente semelhantes como a *Achyrocline flácida* e a *Gnaphalium gaudichaudianum*, que quando coletadas juntas podem adulterar o potencial conhecido da espécie *Achyrocline satureoides* (RETTA *et al.*, 2012).

Existem cerca de 40 espécies do gênero *Achyrocline*, a maioria das quais encontradas na América tropical e subtropical, além da África tropical e Madagascar. No Brasil, aproximadamente 25 espécies já foram descritas (DEBLE, 2007). Suas inflorescências são muito utilizadas no preparo de chás, com diversas indicações populares. Destas, destacam-se as voltadas para os males do estômago e do intestino, problemas respiratórios, anemias, inflamações, infecções virais, diabetes, doenças de próstata e para a desintoxicação do organismo. São comumente utilizadas também como calmantes, por apresentarem atividade sedativa e ansiolítica, e estão entre as dez espécies vegetais mais utilizadas no estado do Rio Grande do Sul (RIVERA *et al.*, 2004; AGOSTINI, 2005; FACHINETTO *et al.*, 2007; SANTIN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Neste estado, é tradição a colheita da espécie vegetal antes do sol nascer na sexta-feira Santa, porque acredita-se que seu chá seja mais potente neste dia. De fato, os dias que antecedem a sexta-feira

Santa compreendem o período de floração de *A. saturoides* e, neste período, a quantidade de compostos químicos presentes na espécie vegetal está acima do normal (BOLETIM PLANFAVI, 2012).

Um grande número de compostos pertencentes a vários grupos fitoquímicos tem sido isolado a partir das inflorescências de *A. saturoides*. Entre estes grupos podemos citar os polifenóis representados, principalmente, pelos flavonóides quercetina e luteolina. Além disso, terpenóides; carotenóides; cumarinas; achyrofuran; ácido cafeico, clorogênico e isoclorogênico; polissacarídeos; glicolipídeos; lactonas; poliacetilenos e esteróides (REINECKE *et al.*, 1995; PUHLMANN *et al.*, 1992; SHMEDA HIRSCHMANN, 1984; KALOGA *et al.*, 1983; DEMBITSKY *et al.*, 2003; RETTA *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2006; DICKEL *et al.*, 2007; MARQUES; FARAH, 2009; CARNEY *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2012). A figura 2 apresenta algumas estruturas moleculares encontradas em *A. saturoides*.

Figura 2 - Estruturas moleculares de algumas substâncias naturais encontradas em *Achyrocline saturoides*.

Legenda: (1) ácido clorogênico; (2) ácido cafeico; (3) quercetina; (4) luteolina e (5) achyrofuran.

Fonte: Adaptado de Retta *et al.*, 2012.

Popularmente, *Achyrocline saturoides* vem sendo empregada a uma diversidade de processos fisiopatológicos. Sua infusão é amplamente utilizada, como já mencionada, em processos de inflamações gastrointestinais e espasmos,

problemas respiratórios incluindo asma e bronquite, infecções do trato respiratório superior, transtornos hepáticos, infecções virais, atividade anti-colesterolêmica e sedativa (COSENTINO *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2006; DICKEL *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Estudos com o extrato aquoso, obtido por maceração e por decocção, e com o macerado etanólico, mostraram efeitos antiinflamatórios significativo no teste de edema de pata induzido por carragenina, e analgésico, no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético (SIMÕES *et al.*, 1984). Adicionalmente, foi demonstrado que o extrato aquoso de *A. satureoides* inibiu o crescimento do agente causador da colite pseudomembranosa e da bactéria *Clostridium difficile* (POZO *et al.*, 1997); o extrato aquoso e hidroalcoólico de *A. satureoides* inibiu a replicação do vírus herpes simplex tipo 1 e 2 (GARCIA *et al.*, 1995; BETTEGA *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2006); e o decocto de inflorescências de *Achyrocline satureoides* apresentou atividade antimicrobiana potente frente ao *Staphylococcus spp.*, além de estimular a produção linfocitária (CALVO, 2006). Finalmente, alguns estudos comprovaram a eficácia de *A. satureoides* como agente hepatoprotetor e colerético, justificando assim seu emprego etnofarmacológico por diversas populações (KADARIAN *et al.*, 2002). Estudo de Polydoro (2004) mostrou a atividade antioxidante de cinco extratos de *A. satureoides*, o que pode ser devido à presença de flavonóides nos extratos, destacando-se a quercetina e luteolina (POLYDORO *et al.*, 2004). Um ponto muito relevante a ser considerado para o emprego terapêutico da Marcela é sua baixa toxicidade. Não foi observada atividade tóxica do extrato aquoso e etanólico de *A. satureoides*, (SIMÕES *et al.*, 2004) e a DL50 foi de 5 g/Kg (RIVERA *et al.*, 2004). Estes estudos tiveram por objetivo confirmar a eficácia e a segurança do extrato aquoso de *A. satureoides* para o uso e tratamento de inúmeras doenças (RIVERA *et al.*, 2004).

O efeito imunomodulatório da infusão de *A. satureoides* foi também avaliado e os resultados obtidos forneceram evidências que a infusão afeta profundamente as respostas funcionais das células polimorfonucleares, apoiando assim seu uso como antiinflamatório. Neste estudo várias concentrações da infusão de *A. satureiodes* foram testadas e avaliadas quanto às alterações na geração de espécies reativas de oxigênio e secreção de interleucinas. Concentrações entre 1,2 e 30ng/mL QE de infusão de *A. satureoides* inibiram profundamente a geração de espécies reativas de oxigênio e a secreção de IL-8, espontânea e induzida por fMLP, em células polimorfonucleadas (COSENTINO *et al.*, 2008). Neste sentido, estudos que

esclareçam o papel do extrato bruto hidroalcoólico da Marcela sobre os processos de recrutamento neutrofílico para o foco inflamatório agudo são importantes para a elucidação dos seus mecanismos antiinflamatórios, visto o papel relevante deste tipo celular na indução do processo inflamatório.

1.3 Recrutamento leucocitário no processo inflamatório agudo

Em condições fisiológicas, os leucócitos circulam na parte central do vaso sanguíneo e, na vigência de um estímulo inflamatório, são recrutados para o foco da lesão. Neste processo, ocorrem alterações vasculares, como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular que, em conjunto, resultam na diminuição do fluxo sanguíneo, no extravasamento de proteínas plasmáticas e no recrutamento celular. Todos estes eventos são mediados pela ação de uma série de substâncias químicas como histamina, bradicinina, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas liberadas ou secretadas por diferentes tipos celulares envolvidos no processo (ABBAS; LICHTMAN, 2003; SEELY *et al.*, 2003; ROIT; DELVES, 2004; CHEN; NUÑES, 2010).

Dentre as células envolvidas no processo inflamatório, os neutrófilos são as primeiras a alcançarem o sítio de lesão e exercerem suas funções fagocíticas e secretoras importantes para a evolução do processo. Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares, provenientes da medula óssea, com núcleo formado por 2 a 5 lóbulos ligados entre si por finas pontes de cromatina. Representa cerca de 50 a 60% dos leucócitos circulantes totais em humanos, e em torno de 9 a 34% dos leucócitos em murinos, com um tempo de meia vida curta, de 6 a 9 horas no sangue circulante.

A ação dos mediadores químicos e/ou as alterações hemodinâmicas citadas acima contribuem para marginalização de leucócitos à parede de vênulas pós-capilares. Este processo denominado interação leucócito-endotélio é altamente complexo, e mediado pela expressão seqüencial de receptores glicoprotéicos, denominados de moléculas de adesão, em leucócitos e na célula endotelial que reveste os vasos da microcirculação. A perfeita interação leucócito-endotélio é fundamental para subsequente migração e ativação dos leucócitos no foco de lesão

(SEELY *et al.*, 2003; ROIT; DELVES, 2004; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; KANTARI *et al.*, 2008; MEDZHITOV, 2008; CHEN; NUÑES, 2010).

A primeira classe de moléculas de adesão envolvida neste processo pertence à família das selectinas (P; E; e L - Selectinas), responsáveis pelo rolamento (*rolling behavior*) dos leucócitos na superfície do endotélio. As selectinas possuem estrutura molecular comum, sendo que o sítio de ligação é um domínio extracelular N-terminal do tipo lectina. Desta forma, seus ligantes são as próprias constituintes desta família ou carboidratos expressos constitutivamente na membrana celular, como as formas sialiladas e fucosiladas do tetrassacarídeo de sialil-Lewisx e a mucina PSGL-1. As interações das selectinas aos ligantes específicos são fracas, sendo interrompidas facilmente, o que permite que os leucócitos deslizem sobre o endotélio, arrastados pelo fluxo sangüíneo. Adicionalmente, as expressões destas moléculas são transientes, decorrente de clivagem ou reinternalização (HARLAN *et al.*, 1991; RAINER, 2002; ROITT; DELVES, 2004; SMALEY; LEY, 2005; LEY *et al.*, 2007; SMITH, 2008; LANGER; CHAVAKIS, 2009; CHAVAKIS *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2010). A deficiência congênita na produção de ligantes fucosilados funcionais de selectinas chamada LADII, resulta em uma deficiência no rolamento dos leucócitos que acomete a capacidade dos leucócitos migrarem subsequentemente para sítios de inflamação (LEY *et al.*, 2007; SMITH, 2007; LANGER; CHAVAKIS, 2009; CHAVAKIS *et al.*, 2009).

A molécula de adesão CD62L é exclusivamente expressa na membrana de leucócitos, e medeia o *rolling* (HAFEZI-MOGHADAM, 2001; RAINER, 2002; PATEL *et al.*, 2002; SMALLEY; LEY, 2005; SMITH, 2008; LANGER; CHAVAKIS, 2009; CHAVAKIS *et al.*, 2009). Existe um *pool* de expressão na membrana celular que é ativado por modificações hemodinâmicas ou por mediadores inflamatórios. Após ativação, a L-selectina é clivada pela ação de metaloproteases de membranas, como a ADAM-17, também conhecido como TACE, resultando, portanto, em expressão passageira (UCHIMURA; ROSEN, 2006; BARTHEL *et al.*, 2007).

A P-Selectina é encontrada em plaquetas e estocada nos corpos de Weibel-Palade na célula endotelial. Na vigência de estimulação, a P-selectina é rapidamente mobilizada para a membrana celular, permitindo sua interação com leucócitos circulantes (GENG *et al.*, 1990). A expressão na superfície celular é transiente e a molécula sofre reinternalização por endocitose para posterior expressão (SUBRAMANIAM *et al.*, 1993; SMITH, 2008). Adicionalmente, a P-selectina pode

ser regulada transcricionalmente e sua expressão induzida por LPS ou citocinas como TNF- α e IL-1 β (PAN *et al.*, 1998; SMITH, 2008).

A expressão de E-selectina é dependente de síntese protéica após estimulação por mediadores específicos e é induzida na célula endotelial por citocinas como IL-1 β ou TNF- α , sendo sua expressão máxima após 4 horas de ativação, com redução de expressão a níveis basais após 24 horas (BEVILACQUA *et al.*, 1989; SMITH, 2008).

Uma vez em comportamento *rolling*, os neutrófilos são capazes de responder a substâncias quimiotáticas, como LTB₄, a fração 5a do sistema complemento (C5a) ou quimiocinas, que por atuarem em receptores específicos nas membranas celulares levam à expressão das integrinas, que medeiam à firme adesão dos leucócitos ao endotélio. As integrinas são capazes de formar ligações entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de neutrófilos, sendo responsáveis pela firme adesão do neutrófilo ao endotélio, bem como pela alteração da conformidade da célula, para posteriormente transmigrar para o foco da lesão. As integrinas são heterodímeros, compostos de uma subunidade α e uma subunidade β , e a perfeita interação entre estas conferem o sítio de ligação extracelular. De acordo com a homologia da subunidade β e sua capacidade de ligar-se a diferentes subunidades α , as integrinas foram subdivididas em subfamílias. A subfamília de maior importância em neutrófilos é a família da β 2-integrina, que por sua vez são heterodímeros não covalentes compostos de uma subunidade α (CD11) e uma subunidade β (CD18) expressos na superfície celular (ALBELDA, 1994; SEELY *et al.*, 2003; LEY *et al.*, 2007; LUO, *et al.*, 2007; SMITH, 2008; CHAVAKIS *et al.*, 2009; LANGER; CHAVAKIS, 2009). Esta subfamília é composta de 4 moléculas: CD11a/CD18 ou LFA-1, CD11b/CD18 ou Mac-1, CD11c/CD18 e CD11d/CD18, que possuem um papel relevante na aderência de leucócitos à parede vascular. Diferentes mutações inibem a síntese da subunidade β 2 o que acarretam expressões protéicas reduzidas das diferentes moléculas pertencentes a esta subfamília e caracterizam uma doença conhecida como LAD I, que se manifesta em diferentes fenótipos de acordo com a severidade da mutação. Nos pacientes com LAD I ou em animais geneticamente modificados para deficiência de expressão da cadeia β 2, os leucócitos deslizam sobre o endotélio normalmente (*rolling behavior*), no entanto, possuem capacidade reduzida de adesão, o que compromete a subsequente diapedese (ALBELDA, 1994;

SEELY *et al.*, 2003; LEY *et al.*, 2007; LUO, *et al.*, 2007; SMITH, 2008; CHAVAKIS *et al.*, 2009; LANGER; CHAVAKIS, 2009).

As $\beta 2$ integrinas ligam-se a diferentes componentes da membrana celular e às moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, a saber: ICAM-1 e/ou 2, VCAM-1, e PECAM-1 (GONZÁLEZ-AMARO; SÁNCHEZ-MADRID, 1999), estas últimas possuem um domínio extracelular constituído por várias unidades repetidas homólogas a domínios de imunoglobulina G, uma região transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática, e são expressas em diferentes tipos celulares. As expressões de ICAM-1 e VCAM-1 no endotélio quiescente são baixas, mas suas expressões são aumentadas na presença de estímulo inflamatório (HUO; LEY, 2001), diferentemente das expressões constitutivas de ICAM-2, isoforma da ICAM-1, e PECAM-1 (HUO; LEY, 2001).

Como já salientado, a PECAM-1 possui expressão constitutiva e, interessantemente, sua expressão ocorre preferencialmente nas bordas da célula endotelial, onde exerce papel relevante na manutenção das junções interendoteliais, juntamente com as moléculas da família das ocludinas, moléculas de junções (*junctional adhesion molecules JAMs*) e caderinas (GARRIDO-URBANI *et al.*, 2008). Além disso, ela é uma molécula essencial para a transmigração de leucócitos para focos de inflamação, já que animais geneticamente modificados para menor expressão de PECAM-1 apresentaram prejuízo na transmigração neutrofílica; e na presença de anticorpos monoclonais anti-PECAM-1, neutrófilos e monócitos, apresentaram menores transmigrações *in vitro* (SCHENKEL *et al.*, 2006; MULLER *et al.*, 1993). Além da expressão endotelial, PECAM-1 também é expressa na superfície de células hematopoéticas e imunes, como plaquetas, neutrófilos, monócitos, megacariócitos, células NK e em alguns subtipos de linfócitos (MULLER, 2003; NOURSHARGH *et al.*, 2006).

A PECAM-1 liga-se a ela mesma e a uma variedade de outras moléculas que incluem as integrinas, a CD38 e CD177 expressas nas membranas celulares, sendo que os efeitos biológicos destas ligações tem sido confirmados *in vivo* e *in vitro*. É importante ressaltar que além da sua reconhecida atividade na transmigração leucocitária, a PECAM-1 está envolvida na angiogênese, apoptose, agregação plaquetária e trombose (PRIVRATSKY *et al.*, 2010; NEWMAN, 1997; ILAN; MADRI, 2003; SOLOWIEJ *et al.*, 2003; WOODFIN *et al.*, 2007).

Uma vez na matriz extravascular, os leucócitos migram, orientadamente, em direção ao foco de lesão, respondendo a um gradiente de moléculas dispersas ou ligadas à matriz extravascular, que são denominadas, coletivamente de substâncias com atividades quimiotáticas ou haptotáticas. Neste sentido, vale ressaltar que a quimiotaxia e haptotaxia é uma resposta celular a um gradiente de concentração de substâncias químicas dispersas ou imobilizadas na matriz extravascular, respectivamente, que induzem mecanismos intracelulares responsáveis pela motilidade, senso de direção e polaridade celular (LI *et al.*, 2005). A motilidade é conferida pela emissão de pseudópodes, gerados pelas ondas espontâneas de filamentos de actina, que são propagadas pelo citoesqueleto, e o senso de direção é mediado por um sistema que detecta variações temporais e espaciais pelo gradiente de concentração, e que altera a sensibilidade e localização dos receptores de membrana. Estas alterações conferem alterações morfológicas e funcionais para a polaridade celular (SWANEY *et al.*, 2010).

Dentre a população leucocitária dos mamíferos, os polimorfonucleares são as células que mais facilmente se locomovem na matriz extravascular. Esta capacidade, indubitavelmente, facilita o rápido acúmulo destas células nos sítios de inflamação. Dois mecanismos têm sido propostos para explicar a capacidade de migração de leucócitos, frente a um gradiente de concentração químico, a saber: 1) no mecanismo temporal, o organismo identifica uma determinada concentração do agente quimiotático, move-se, detecta uma nova concentração do agente, deslocando-se em direção do gradiente positivo. Neste mecanismo, que ocorre em resposta a infecção bacteriana, um único receptor e um sistema primitivo de memória capaz de armazenar eventos passados são necessários; 2) no mecanismo espacial, há comparação da concentração do fator quimiotático em dois ou mais sítios da superfície celular, simultaneamente. Neste, teoricamente, pelo menos dois receptores integrados detectam as diferenças de gradientes quimiotáticos. Pela associação destes dois mecanismos, os leucócitos são capazes de detectar alterações de gradiente em função do tempo e, simultaneamente, estão aptos a reconhecer as ligações dos agentes quimiotáticos aos receptores na superfície celular (SWANEY *et al.*, 2010).

Depois de estimulados, os leucócitos sofrem alterações morfológicas e funcionais, tornando-se polarizados, ou seja, adquirem uma forma alongada, com o surgimento de um amplo lamelipódio na extremidade anterior e um uropódio

posterior. Esta polarização está associada a uma reorganização da membrana plasmática, com agrupamento de receptores de membrana, além da alteração intracelular do citoesqueleto. O núcleo e centríolo passam a se localizar na parte posterior da célula e os microtúbulos e microfilamentos de actina se reorganizam e se agrupam para conferir direcionamento e movimento, respectivamente (MALECH *et al.*, 1977; ZIGMOND *et al.*, 1981).

Dentre as substâncias quimiotáticas para neutrófilos se destacam o PAF, peptídeos formilados constituintes da parede bacteriana, como o fMLP, fator C5a do sistema complemento, o LTB₄ e a IL-8. Em comum, estes agentes ligam-se aos receptores de membrana, em geral, receptores transmembranas ligados à proteína G (STILLIE *et al.*, 2009). A ativação destes receptores leva a sinalizações intracelulares complexas, que desencadeiam não somente a migração orientada, mas também a desgranulação, a secreção de mediadores inflamatórios e a ativação do *burst* respiratório em neutrófilos (JANETOPOULOS; FIRTEL, 2008).

O LPS, um lipopolisacarídeo encontrado na parede celular de bactérias gram-negativa, é capaz de desencadear uma importante resposta inflamatória através da ativação de receptores tipo *toll* (TLRs). Estes receptores foram reconhecidos posterior à descoberta da proteína *toll* em moscas do gênero *Drosophila spp.* Receptores *toll-like* são glicoproteínas de membrana que possuem um domínio extra-celular N-terminal composto por repetições ricas em leucina, e por um domínio intra-celular C-terminal Toll/IL-IR (TIR), homólogo ao receptor da interleucina-1 (IL-1), proteínas como *LPS binding protein* (LBP), CD14 e o MD2, estão envolvidos no auxílio à ativação do receptor TLR-4 pelo LPS (MCGETTRICK e O' NEILL, 2010; TRINCHIERI; SHER, 2007; KAISHO; AKIRA, 2002; MEDZHITOV *et al.*, 1997).

Após a ativação do *toll-like receptor-4* pelo LPS, alterações conformacionais na estrutura deste receptor, permitem o recrutamento de moléculas adaptadoras, que desencadeiam diferentes sinalizações intracelulares, dependendo das combinações entre as moléculas adaptadoras recrutadas (O' NEIL; BOWIE, 2007; MCGETTRICK; O' NEILL, 2010). As ativações dependentes da molécula MyD88 ocorrem pelo domínio TIR e facilitam a associação com a molécula IRAK4 que favorece a fosforilação de IRAK1, e permite a ligação da TRAF6 ao complexo. A molécula TRAF6 ligada, ativa TAK1 que complexa com TAB1 e 2 e ativa o complexo IKK, que por sua vez ativa o NF- κ B. Ao mesmo tempo, dois membros da família das MAP quinases, ativam JUN N-Terminal quinase (JNK) e p38, ativadas pela TAK1,

responsáveis pela produção de uma ampla variedade de citocinas inflamatórias. Outras moléculas adaptadoras estão relacionadas ao receptor TLR-4, como TRAM e TIRAP, conhecido também como MAL (O' NEIL; BOWIE, 2007; AKIRA; TAKEDA, 2004). O receptor TLR-4 é capaz de ativar o NF- κ B por uma via independente da MyD88 e dependente de TRIF. A molécula TRIF possui diferentes regiões de interações que possibilitam o recrutamento de diferentes moléculas efetoras como TBK-1, TRAF-6 e RIP1. A interação entre estas moléculas faz com que TRAF6 ative o NF- κ B (O' NEIL; BOWIE, 2007). A ativação destas vias intracelulares pela interação do LPS ao receptor *toll-like* 4 se faz necessária à indução de funções neutrofílicas importantes, como as envolvidas na migração, atividade secretora, fagocítica e microbicida destas células (O' NEIL; BOWIE, 2007; MCGETTRICK; O' NEILL, 2010; LEE *et al.*, 2012).

Desta forma, fica evidente que o processo de migração de neutrófilos para os focos de lesão é um evento complexo e dependente de uma variedade de moléculas de adesão. Estas, em conjunto com mediadores químicos, induzem sinalizações intracelulares para as funções adesivas e locomotoras dos neutrófilos. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com as propriedades antiinflamatórias da “marcela” sobre os processos de recrutamento neutrofílico, e estes estudos auxiliarão no esclarecimento dos mecanismos antiinflamatórios da *A. saturoides*, contribuindo com a segurança da população diante do uso desta como infusão. Estes dados poderão auxiliar a indústria farmacêutica na elaboração e produção de novos fármacos que levem em sua composição os extratos de “marcela”.

2 OBJETIVOS

Investigar os efeitos antiinflamatórios do extrato bruto hidroalcoólico de *A. saturoides* sobre a inflamação causada pelo LPS *in vivo* e elucidar os mecanismos de ação sobre as propriedades de migração, secreção, atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos, além de investigar as atividades tóxicas do extrato sobre o fígado e o rim dos animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/334).

Para a realização deste trabalho, ratos Wistar machos, com 2 a 3 meses de idade e peso entre 180-220g foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com ciclo de luz e temperatura controlado, bem como acesso a alimento e água *ad libitum* até início dos ensaios.

Os procedimentos experimentais foram realizados após indução de anestesia com cloridrato de ketamina (77mg/kg) e cloridrato de xilazina (7mg/kg) (Vetbrands).

3.2 Obtenção do extrato

As inflorescências de *A. saturoides* (Lam.) D.C. (marcela) foram coletadas no município de Fraiburgo (Latitude 27°01'34"S e longitude 50°55'17"W), estado de Santa Catarina, Brasil, em maio de 2009, pelo biólogo Gilberto Schneiker (CRBio: 63266-03D), e foram identificadas por comparação com uma exsicata depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob o código HUEM-23568.

As inflorescências foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante (40°C), e após este procedimento, foram submetidas à moagem em triturador, resultando em 2kg de material seco.

O material resultante (2kg) foi macerado em solução hidroalcoólica a 70% durante sete dias e após filtração, a solução foi submetida à redução e evaporação do solvente em rota evaporador à pressão reduzida, obtendo-se 192,6g de extrato bruto hidroalcoólico.

Todos os experimentos, bem como a coleta da espécie vegetal, foram autorizados pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN; processo 010062-2012-2) do Ministério do Meio Ambiente, Brasil.

3.3 Inflamação no tecido subcutâneo dorsal

Um compartimento estéril denominado bolsa de ar, foi desenvolvido pela administração de 10mL de ar estéril no tecido subcutâneo da região dorsal de ratos Wistar, os quais foram anestesiados previamente a este procedimento. Cinco dias após a primeira injeção de ar, utilizando filtros (*TPP® Spritzen-Syringe-Filter 0,22µm*) acoplados a seringa, um reforço foi realizado pela injeção de mais 10mL de ar estéril, segundo procedimento descrito por Sedgwick (1986) e por Jain; Parmar (2011).

Dez dias após a primeira injeção, os animais foram pré-tratados por via oral com soluções de extrato bruto de *A. saturoides* (50, 100 ou 250mg/kg) ou indometacina (30mg/kg, controle positivo) ou com o veículo do extrato (PBS/etanol 10%, controle). Animais “sham” receberam somente PBS e a anestesia para a coleta do lavado da bolsa de ar, e não receberam tratamentos farmacológicos, veículo ou LPS. Uma hora após os tratamentos, os animais foram anestesiados e 1mg de LPS (ATC 026B6 Sigma Aldrich) suspensos em 2mL de solução tamponada de fosfato (PBS) foram injetados diretamente na bolsa. Uma ou quatro horas mais tarde, após a injeção de LPS (Figura 3), uma pequena incisão foi realizada na bolsa de ar para obtenção do lavado do infiltrado inflamatório, no qual foram determinados o número de leucócitos e a concentração de mediadores inflamatórios. O número total e diferencial de leucócitos foi determinado em câmara de Neubauer e o diferencial em esfregaços corados por Panótico (Laborclean) em microscopia óptica.

Figura 3 - Delineamento experimental do modelo de *Air pouch*.

Legenda: Dez dias após a primeira injeção de ar estéril no tecido subcutâneo, os animais foram pré-tratados por via oral com soluções de extrato bruto de *A. saturooides* (50, 100 ou 250mg/kg) ou indometacina (30mg/kg, controle positivo) ou com o veículo do extrato (água destilada/etanol 10%, controle). Uma ou quatro horas após a injeção de LPS (2 mL de solução; 500 µg/mL em PBS), os animais foram anestesiados, sacrificados e uma pequena incisão foi realizada na bolsa de ar para obtenção do lavado do infiltrado inflamatório.

Fonte: Autoria própria.

3.4 Determinação do número de leucócitos circulantes

Após os tratamentos com o extrato hidroalcoólico de *A. saturooides*, indometacina (30mg/kg, controle) ou veículo, os animais foram anestesiados, e o sangue foi coletado em EDTA 10% por punção da veia cava abdominal para a contagem dos leucócitos totais e diferencial do sangue circulante. Em seguida, os animais foram sacrificados por exsanguinação pela secção das artérias carótidas, e da veia cava abdominal.

O número de leucócitos totais foi determinado em câmara de Neubauer e o diferencial em esfregaços corados por Panótico (Laborclean) em microscopia óptica.

3.5 Microscopia Intravital

Para a avaliação da interação entre os leucócitos circulantes e o endotélio de vênulas pós-capilares foi utilizada a técnica da microscopia intravital, onde foi possível avaliar a dinâmica dos eventos da microcirculação em animais vivos.

Os animais receberam 100mg/kg de *A. saturooides* ou o veículo e, uma hora mais tarde, foram anestesiados. Em seguida, uma incisão longitudinal na parede abdominal foi realizada para a exposição da microcirculação do leito mesentérico o qual foi, então, transiluminado em microscópio óptico acoplado a sistema de projeção e análise de imagem (Figura 4). Os animais foram mantidos em placa de acrílico com temperatura controlada e o tecido foi mantido úmido pela irrigação com a solução de Ringer (reagentes da Merck), a qual foi posicionada sobre o charriot do microscópio óptico.

As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Axioplan II, Carl-Zeiss equipado com x 5,0/0,30 Plan-neofluar ou x 10,0/0,25 Achroplan objetivas/abertura numérica e x 1,0; 1,25 ou 1,60 optovar), capturadas em câmera de vídeo (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss) e transmitidas simultaneamente ao computador. As imagens obtidas foram analisadas por software (AxionVision).

Foram quantificados os números de leucócitos em comportamento *rolling* (10 minutos, 200µm) e aderidos (mensurado ao final de 10 minutos) ao endotélio de vênulas pós-capilares (diâmetro 10-20µm), após estimulação tópica de LPS (30µg em 40µL de PBS).

Figura 4 - Delineamento experimental do modelo de Microscopia Intravital.

Legenda: Os animais receberam 100mg/kg de *A. saturooides* ou o veículo e, uma hora mais tarde, foram anestesiados. Em seguida, uma incisão longitudinal na parede abdominal foi realizada para a exposição da microcirculação do leito mesentérico o qual foi, então, transiluminado em microscópio óptico acoplado a sistema de projeção e análise de imagem.

Fonte: Autoria própria.

3.6 Citometria de fluxo: Quantificação da expressão de *toll-like receptor-4*, da viabilidade celular, do *burst* oxidativo e da fagocitose

Ensaio de citometria de fluxo foram realizados com leucócitos obtidos do sangue circulante dos animais, pela punção da veia cava abdominal, em seringas contendo heparina (5000UI/mL). Em seguida, o sangue total foi hemolisado (lise hipotônica com solução de NaCl a 0,2% seguida de adição de volume igual de solução hipertônica a 1,6%), e centrifugado (5min; 600g), para obtenção do *pellet* de leucócitos. O sobrenadante foi descartado e o número de leucócitos obtidos foi quantificado em câmara de Neubauer. As células foram coletadas 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar de animais pré-tratados com o extrato de *A. satureoides* (100mg/kg), indometacina (30 mg/kg) ou veículo do extrato (PBS/etanol 10%), como descrito no item 3.3.

Para a quantificação da expressão de TLR4, 1×10^6 leucócitos foram incubados com anticorpos monoclonais anti-CD284/MD-2 (Like Tool Receptor 4) (BD biosciences), conjugado ao fluoróforo ficoeritrina (PE, diluição 1:100) durante 60 minutos em temperatura ambiente (18-25°C). Imediatamente após as incubações, as amostras foram centrifugadas (5min; 600g) e ressuspensas em PBS para a leitura em citômetro de fluxo.

Para excluir possíveis efeitos citotóxicos do extrato de *A. satureoides*, os leucócitos obtidos do sangue circulante foram incubados com anticorpo anti-Anexina V-FITC (BD biosciences) por 20 minutos, e imediatamente antes da leitura, foi acrescentado Iodeto de Propídio (100µg/mL) (SIGMA). As células duplo-negativas, ou seja, aquelas que não foram marcadas com nenhum dos fluorocromos foram consideradas como células viáveis; as células marcadas apenas com PI, foram consideradas em necrose; as células marcadas apenas com Anexina V-FITC, foram consideradas células apoptóticas, e por fim, as células que apresentaram dupla marcação, ou seja, marcadas tanto com PI quanto com Anexina V-FITC, foram consideradas células em apoptose tardia/necrose.

Para a avaliação do metabolismo oxidativo e do potencial de fagocitose dos neutrófilos, o sangue total foi incubado em uma sequência de 5 tubos distintos para cada animal por 30 minutos, em banho-maria sob agitação a 37°C, conforme ilustrado (Figura 5).

Figura 5 - Reagentes utilizados para a avaliação do metabolismo oxidativo e fagocitose.

TUBO	Sangue total/ou 2x10 ⁵ cel/ 100 µl (0,3 mM)	DCFH-DA	S. aureus+ PI	PMA/LPS	PBS
A	100 µl				1000 µl
B	100 µl	200 µl			800 µl
C	100 µl		100 µl		900 µl
D	100 µl	200 µl	100 µl		700 µl
E	100 µl	200 µl		100 µl – PMA	700 µl

Legenda: Diacetato 2'7' Diclorofluoresceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR, USA); CEPA de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (DIFCO®) marcado com iodeto de propídio (SAPI); Miristato-acetato de forbol-(Calbiochem®, San Diego, CA, USA) (PMA) /LPS e PBS.

Fonte: Adaptado de Hasui *et al.*, 1989.

Após este período de incubação, 2mL de solução de EDTA (3mM a 4°C) foi adicionado aos tubos contendo SAPI (*Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídio) e, em seguida, centrifugados (600g/5min). Após a lise hipotônica (solução de NaCl a 0,2 e 1,6%), 100µL de PBS a 4°C foram adicionados a cada tubo.

A população de neutrófilos foi caracterizada pelas diferenças dos parâmetros de granulosidade e complexidade dos diferentes tipos celulares detectados pelo citometro de fluxo FACScalibur (Immunocytometry System, San Jose, Ca, USA). Os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, o que permitiu uma leitura computadorizada (Macintosh Apple, San Jose, CA, USA) pelo software Cellquest Pro (Tree Star, Inc., Ashland, TN, USA). Os dados de 7.000 neutrófilos foram obtidos e os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência após análise pelo software FlowJo.

3.7 Quantificação de moléculas de adesão (incubação *in vitro* com LPS) por citometria de fluxo

Para a quantificação da expressão das moléculas de adesão L-selectina e β2-integrina, animais, não submetidos ao modelo de inflamação na bolsa de ar, foram divididos em três grupos e receberam por gavagem os seguintes tratamentos: 1) sham; 2) veículo (PBS/etanol 10%) e/ou 3) *A. satureoides* (100mg/kg). Após 2 horas, os animais foram anestesiados e o sangue circulante foi obtido pela punção da veia cava abdominal, em seringas contendo heparina (5000UI/mL). O sangue total foi

hemolisado (lise hipotônica com solução de NaCl a 0,2% seguida de adição de volume igual de solução hipertônica a 1,6%), e centrifugado (5min; 600g), para obtenção do *pellet* de leucócitos. O sobrenadante foi descartado e o número de leucócitos obtidos foi quantificado em câmara de Neubauer. 1×10^6 leucócitos foram incubados com ou sem LPS *in vitro* (1 μ g/mL) durante 60min a 37°C. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 1mL de PBS a 4°C e centrifugadas (5min; 600g). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos foram incubados com os anticorpos monoclonais anti-CD62L (L-selectina, 0,5mg/mL), e anti-CD18 (β 2-integrina, 0,5 mg/mL), conjugados respectivamente ao fluoróforo ficoeritrina (PE, diluição 1:100) e isotiocianato de fluoresceína (FITC, diluição 1:100), ambos, (Pharmigen – BD), durante 20 minutos em temperatura ambiente (18 - 25°C). Imediatamente após as incubações, as amostras foram centrifugadas (5min; 600g) e ressuspensas em PBS para a leitura em citômetro de fluxo. A população de neutrófilos foi caracterizada pelas diferenças dos parâmetros de granulosidade e complexidade dos diferentes tipos celulares detectados pelo citometro de fluxo FACScalibur (Immunocytometry System, San Jose, Ca, USA). Os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, o que permitiu uma leitura computadorizada (*Macintosh Apple*, San Jose, CA, USA) pelo software *Cellquest Pro* (Tree Star, Inc., Ashland, TN, USA). Os dados de 7.000 neutrófilos foram obtidos e os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência após análise pelo software *FlowJo*.

3.8 Quantificação de mediadores inflamatórios

A quantificação de mediadores inflamatórios foi realizada no exsudato inflamatório coletado dos animais pré-tratados com *A. satureoides* (100mg/mL), indometacina (30 μ g/mL), ou veículo. Os exsudatos foram coletados 1 hora após a injeção de LPS na bolsa de ar (como descrito no item 3.3), e centrifugados para a obtenção dos sobrenadantes. Estes foram congelados em *freezer* a -80°C para posterior quantificação de LTB₄ e CINC-1, utilizando *kits* comerciais para ELISA. Os protocolos de ensaios estão disponíveis no site da BD Biosciences (www.bdbiosciences.com) e da R&D Systems (www.rndsystems.com).

3.9 Quantificação de marcadores hepáticos e renais

Para a determinação da concentração dos marcadores hepáticos e renais, o sangue dos animais foi coletado sem anticoagulante, duas horas após os tratamentos com *A. satureoides* (100mg/kg), indometacina (30mg/kg), ou veículo. Em seguida foram centrifugados e aliqotados em *ependorfs* para posterior quantificação dos marcadores: AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), Gama - GT (gama - glutamiltransferase), uréia e creatinina, no soro. Estas quantificações foram realizadas utilizando *kits* comerciais e de acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante. Os protocolos de ensaios estão disponíveis no site da Biotécnica (www.biotecnica.ind.br).

3.10 Análise histopatológica

Amostras de rim e fígado foram coletadas 2 horas após os tratamentos por via oral com soluções de extrato bruto hidroalcoólico de *A. satureoides* (100mg/kg), indometacina (30mg/kg) e/ou veículo do extrato (PBS/etanol 10%), e foram lavadas com PBS e fixadas com solução de formalina tamponada 10% durante 24 horas. As amostras de tecido foram desidratadas em diferentes concentrações de etanol, diafanizadas em xileno e incluídas em parafina. Após este procedimento, os cortes seriados (5µm) foram preparados e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As imagens foram capturadas com uma ampliação de 100x (Eclipse E800 Microscópio, Nikon, Japão).

3.11 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), e analisado estatisticamente pela análise da variância com comparações múltiplas (ANOVA) e, quando necessário, foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (SOKAL; ROHLF, 1995). Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism[®], admitindo como significativamente estatístico o $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* inibe a migração de neutrófilos para o foco de inflamação induzido pelo LPS

Os efeitos de diferentes doses do extrato de *A. saturooides* sobre a migração de neutrófilos *in vivo* foram avaliados no tecido subcutâneo dorsal de ratos na vigência de ação do LPS. Os resultados obtidos mostraram que o pré-tratamento com 100 ou 250mg/kg de *A. saturooides* reduziu o número de leucócitos migrados para a bolsa de ar, sendo que os valores obtidos foram equivalente aos encontrados no grupo de animais tratado com indometacina, controle positivo do ensaio (Figura 6A). A análise diferencial das células migradas para a bolsa de ar mostrou que o tratamento com o extrato, bem como a indometacina, reduziu a migração de neutrófilos (Figura 6B). A partir destes resultados, a dose de 100mg/kg foi utilizada para os demais experimentos *in vivo*.

Ensaio adicionais, onde a coleta de leucócitos foi realizada 1 hora após a injeção de LPS (2 horas após os tratamentos farmacológicos), mostraram que a administração de 100mg/kg de *A. saturooides* ou 30mg/kg de indometacina reduziram significativamente a migração de leucócitos para a bolsa de ar (Figura 7A), que foi dependente da menor migração de neutrófilos (Figura 7B).

Figura 6 - Efeito de *A. saturooides* sobre a migração de neutrófilos *in vivo*.

Legenda: Bolsas de ar foram induzidas no tecido subcutâneo dorsal de ratos machos da espécie Wistar. Os animais receberam os tratamentos por via oral uma hora antes da injeção de 2mL de solução de LPS em PBS na concentração de 500 μ g/mL e o lavado do infiltrado inflamatório foi coletado 4 horas após. A determinação do número total de células do exsudato (A) foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica e o valor diferencial (B) foi realizado após citospin em lâminas por microscopia óptica. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com células obtidas de 6 animais em cada grupo. (A) *** $p < 0,001$ vs. grupo Sham; && $p < 0,01$ vs. grupo Veículo; & $p < 0,05$ vs. grupo Veículo; ### $p < 0,001$ vs. grupo Indometacina; \$\$ $p < 0,01$ vs. grupo *A. saturooides* 50mg/kg; (B) *** $p < 0,001$ vs. grupo Sham; && $p < 0,01$ vs. grupo Veículo; ### $p < 0,001$ vs. grupo Indometacina; \$\$\$ $p < 0,01$ vs. grupo *A. saturooides* 50mg/kg.

Fonte: Autoria própria.

Figura 7 - Efeito de *A. saturooides* sobre a migração de neutrófilos *in vivo*.

Legenda: Bolsas de ar foram induzidas no tecido subcutâneo dorsal de ratos machos da espécie Wistar. Os animais receberam os tratamentos por via oral uma hora antes da injeção de 2mL de solução de LPS em PBS na concentração de 500 μ g/mL e o lavado do infiltrado inflamatório foi coletado 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar. A determinação do número total de células do exsudato (A) foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica e o valor diferencial (B) foi realizado em esfregaços corados pelo Panótico por microscopia óptica. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com células obtidas de 6 animais em cada grupo. (A e B) *** $p < 0,001$ vs. grupo Sham; ## $p < 0,01$ vs. grupo Veículo; # $p < 0,05$ vs. grupo Veículo.

Fonte: Autoria própria.

4.2 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* não altera o número de leucócitos circulantes

O número de leucócitos circulantes em animais pré-tratados com *A. saturooides* ou indometacina não foi diferente do valor encontrado em animais Sham, não tratados farmacologicamente e não inflamados pelo LPS (Figura 8A). Os valores foram aferidos 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar e a análise diferencial mostrou que os números de leucócitos mono e polimorfonucleares foram equivalentes em todos os grupos de animais (Figuras 8B e 8C).

Figura 8 - Efeito do extrato de *A. saturoides* sobre o número total e diferencial de leucócitos no sangue.

Legenda: Bolsas de ar foram induzidas no tecido subcutâneo dorsal de ratos machos da espécie Wistar. Os animais receberam os tratamentos por via oral uma hora antes da injeção de 2mL de solução de LPS em PBS na concentração de 500 μ g/mL e o sangue total foi coletado da veia cava abdominal 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar. A determinação do número total de leucócitos (A) foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica, e o valor diferencial (B, PMN, polimorfonucleares e C, MN, mononucleares) em esfregaços sanguíneos corados por Panótico. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com células obtidas de 6 animais em cada grupo.

Fonte: Autoria própria.

4.3 O extrato hidroalcoólico de *A. saturoides* não afeta a viabilidade dos neutrófilos circulantes

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram que os tratamentos farmacológicos ou com o veículo não alteraram a porcentagem de neutrófilos viáveis na circulação. As porcentagens de neutrófilos viáveis foram de cerca de 70 a 80% em todos os grupos de animais estudados (Figura 9A). Apesar da viabilidade não estar alterada, a análise diferencial mostrou que o tratamento com o extrato aumenta

a porcentagem de neutrófilos em necrose, mas reduz significativamente a concentração de neutrófilos em apoptose (Figuras 9B e C). A porcentagem de células em apoptose tardia diminuiu em animais tratados com o veículo em relação ao grupo de animais sham ou tratados com indometacina ou com o extrato de *A. saturooides* (Figura 9D).

Figura 9 - Efeito de *A. saturooides* sobre a porcentagem de neutrófilos viáveis (A), em necrose (B), em apoptose (C) e apoptose tardia (D).

Legenda: Os animais receberam os tratamentos por via oral uma hora antes da injeção de 2 mL de solução de LPS em PBS na concentração de 500 µg/mL e o sangue dos animais foi coletado da veia cava abdominal 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar. Os neutrófilos foram obtidos do sangue circulante. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com os neutrófilos obtidos de 6 animais em cada grupo. (A) * $p < 0,05$ vs. grupo Sham; (B) * $p < 0,05$ vs. grupo Sham; # $p < 0,05$ vs. grupo Veículo; (C) * $p < 0,05$ vs. grupo Sham; ** $p < 0,01$ vs. grupo Sham; ## $p < 0,05$ vs. grupo Indometacina; (D) * $p < 0,05$ vs. grupo Sham; # $p < 0,05$ vs. grupo Veículo.

Fonte: Autoria própria.

4.4 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* altera as interações dos leucócitos circulantes ao endotélio de vênulas pós-capilares do mesentério

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com 100mg/kg do extrato de *A. saturooides* reduziu o número de leucócitos em comportamento *rolling* (10 minutos, 200µm; Figura 10A) quando comparado aos valores obtidos no grupo de animais tratados com veículo. Além disso, o número de leucócitos aderidos (mensurados ao final de 10 minutos) ao endotélio de vênulas pós-capilares (diâmetro 10-20µm) em animais tratados com o extrato de *A. saturooides* foi significativamente menor quando comparado aos valores encontrados no grupo veículo (Figura 10B).

Figura 10 - Efeito de *A. saturooides* sobre o número de leucócitos em comportamento *rolling* (A) e aderidos (B) (10 minutos, 200µm) no endotélio de vênulas pós-capilares do leito mesentérico.

Legenda: Os animais receberam os tratamentos por via oral duas horas antes da aplicação tópica de LPS (30µg em 40µL). Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios com 6 animais em cada grupo. (A) * p<0,05 vs. grupo Sham; # p<0,05 vs. grupo Veículo (B) *** p<0,001 vs. grupo Sham; ### p<0,001 vs. grupo Veículo.

Fonte: Autoria própria.

4.5 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* altera as expressões das moléculas de adesão em neutrófilos circulantes incubados com LPS *in vitro*

Para a quantificação das moléculas de adesão L-selectina e β2-integrina, foram utilizados neutrófilos circulantes obtidos de animais pré-tratados (durante 2 horas) farmacologicamente com o extrato de *A. saturooides* e/ou veículo do extrato. Para tanto, os neutrófilos foram incubados, durante 1 hora, com LPS (1µg/mL) ou

PBS *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com 100mg/kg do extrato bruto hidroalcoólico de *A. saturooides* reduziu a porcentagem de neutrófilos positivos para L-selectina (Figura 11A) e $\beta 2$ integrina (Figura 11B), demonstrando que o tratamento com o extrato foi capaz de afetar a expressão destas moléculas nos neutrófilos.

Figura 11 - Efeitos do extrato de *A. saturooides* sobre a expressão de L-selectina (CD62L, A) e $\beta 2$ integrina (CD18, B).

Legenda: Os animais receberam os tratamentos por via oral e duas horas após o sangue circulante foi coletado e os leucócitos foram incubados com LPS (1 μ g/mL) ou PBS. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com as células obtidas de 6 animais em cada grupo. (A) * p < 0,05 vs. grupo Controle LPS; (B) * p < 0,05 vs. grupo Controle LPS.

Fonte: Autoria própria.

4.6 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* reduz a expressão de TLR4

Os resultados obtidos mostraram que os animais tratados com 100mg/kg de *A. saturooides* apresentaram diminuição da expressão do receptor TLR4 em neutrófilos, na vigência de inflamação induzida por LPS. Os valores encontrados em neutrófilos de animais pré-tratados com *A. saturooides* foram significativamente menores que os encontrados em células obtidas de animais pré-tratados com o veículo. Interessantemente, o tratamento com indometacina não afetou a expressão do TLR-4 (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do extrato de *A. saturooides* sobre a expressão do receptor TLR4 em neutrófilos circulantes.

Legenda: Os animais receberam os tratamentos por via oral uma hora antes da injeção de 2 mL de solução de LPS em PBS na concentração de 500µg/mL e o sangue dos animais foi coletado da veia cava abdominal 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar. Os neutrófilos foram obtidos do sangue circulante. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com as células obtidas de 6 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ vs. grupo Sham; # $p < 0,05$ vs. grupo Veículo.

Fonte: Autoria própria.

4.7 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* inibe a secreção de LTB4 e CINC-1

Os resultados obtidos mostraram que os animais tratados com 100mg/kg de *A. saturooides* apresentaram diminuição significativa na concentração de LTB4 e CINC-1 no exsudato da bolsa de ar inflamada pelo LPS (Figura 13A e B). As concentrações encontradas para o LTB4 em animais tratados com o extrato de *A. saturooides* foram menores que as observadas em animais tratados com veículo ou com a indometacina (Figura 13A). Da mesma forma, o tratamento com o extrato causou redução na concentração de CINC-1 na bolsa de ar em relação ao tratamento com veículo ou indometacina, no entanto, o pré-tratamento com indometacina, diferentemente do observado para o LTB4, também reduziu a concentração deste mediador inflamatório (Figura 13B).

Figura 13 - Efeito do extrato de *A. saturooides* sobre a concentração de LTB₄ e CINC-1.

Legenda: Os animais receberam os tratamentos por via oral uma hora antes da injeção de 2 mL de solução de LPS em PBS na concentração de 500µg/mL e os exsudatos foram coletados 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com o exsudato obtido de 6 animais em cada grupo. (A) * p<0,05 vs. grupo Sham; ## p<0,01 vs. grupo Veículo; (B) *** p<0,001 vs. grupo Sham; ### p<0,001 vs. grupo Veículo.

Fonte: Autoria própria.

4.8 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* não afeta o *burst* oxidativo induzido pelo *Staphylococcus aureus*, mas reduz o *burst* oxidativo provocado pelo PMA

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que a incubação de neutrófilos circulantes com a bactéria *S. aureus* aumentou o *burst* oxidativo, embora não estatisticamente diferente, e que o tratamento com o extrato de *A. saturooides*, ou indometacina não alterou este efeito (Figura 14A). Diferentemente, o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* reduziu significativamente o *burst* oxidativo induzido pelo PMA em relação aos valores obtidos de animais controle, tratados com veículo ou com indometacina (Figura 14B).

Figura 14 - Efeito de *A. saturooides* sobre o *burst* induzido pela bactéria *S. aureus* (A) e pelo PMA (B).

Legenda: Os animais receberam os tratamentos por via oral uma hora antes da injeção de 2 mL de solução de LPS em PBS na concentração de 500 µg/mL e o sangue dos animais foi coletado da veia cava abdominal 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar. Os neutrófilos foram obtidos do sangue circulante. A análise por citometria de fluxo foi realizada imediatamente após a incubação com *S. aureus* ou estimulação com PMA (100ng/100µL de PBS). Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com os neutrófilos obtidos de 6 animais em cada grupo. (B) *** p<0,001 vs. grupo Sham; ### p<0,001 vs. grupo Veículo; &&& p<0,001 vs. grupo Indometacina.

Fonte: Autoria própria.

4.9 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* não afeta o número de neutrófilos que fagocitam a bactéria *S. aureus*, mas aumenta a atividade fagocítica dos neutrófilos

Os resultados obtidos mostram que tanto o tratamento com o extrato de *A. saturooides*, ou com indometacina, não afetou o número de neutrófilos que fagocitam a bactéria *S. aureus* (Figura 15A), mas elevou a capacidade fagocítica destas células (Figura 15B), ou seja, a quantidade de bactérias fagocitadas por neutrófilos foi maior quando estas células foram coletadas de animais tratados com o extrato de *A. saturooides* em comparação com neutrófilos obtidos de animais controle, tratados com veículo ou com indometacina.

Figura 15 - Efeito de *A. saturooides* sobre o número de neutrófilos que fagocitam a bactéria *S. aureus* (A), e sobre a capacidade de fagocitose destas células (B).

Legenda: Os animais receberam os tratamentos por via oral uma hora antes da injeção de 2mL de solução de LPS em PBS na concentração de 500 µg/mL e o sangue dos animais foi coletado da veia cava abdominal 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar. Os neutrófilos foram obtidos do sangue circulante. A análise por citometria de fluxo foi realizada imediatamente após a incubação com *S. aureus*. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com os neutrófilos obtidos de 6 animais em cada grupo. (B) * p<0,05 vs. grupo Sham; # p<0,05 vs. grupo Veículo; *** p<0,001 vs. grupo Indometacina.

Fonte: Autoria própria.

4.10 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* não altera a concentração de marcadores de atividade hepática e renal na circulação

Os marcadores hepáticos aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama – glutamiltransferase (GAMA-GT), e os marcadores renais, uréia e creatinina, foram quantificados no soro coletado dos animais após os tratamentos por via oral com 100mg/kg de *A. saturooides* ou 30mg/kg de indometacina, ou com veículo. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 16, mostram que nenhum dos tratamentos realizados alterou a concentração sérica dos marcadores de atividade hepática ou renal.

Figura 16 - Efeito de *A. saturooides* sobre a concentração dos marcadores de atividade hepática aspartato aminotransferase (A), alanina aminotransferase (B), gama glutamiltransferase (C), e renal, uréia (D) e creatinina (E).

Legenda: Os animais receberam os tratamentos por via oral uma hora antes da injeção de 2 mL de solução de LPS em PBS na concentração de 500 µg/mL e o sangue dos animais foi coletado da veia cava abdominal 1 hora após a injeção de LPS nas bolsas de ar. O soro foi obtido através da centrifugação (600g) do sangue total e em seguida aliquoteado em *ependorfs*. As análises foram realizadas por espectrofotometria. Os valores expressam a média ± e.p.m. de ensaios realizados com o soro obtido de 6 animais em cada grupo.

Fonte: Autoria própria.

4.11 O extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* não causa toxicidade hepática e renal

Os parâmetros histológicos do fígado e dos rins de ratos Wistar pré-tratados com o extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* e/ou veículo do extrato foram avaliados, e corroborando a ausência de alteração na concentração sérica dos marcadores de atividade hepática e renal, nenhuma alteração estrutural no fígado e rins dos animais foi observada (Figura 17).

Figura 17 - Efeito do extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* sobre os parâmetros histológicos do fígado e dos rins de ratos pré-tratados.

Legenda: Controle (sham), veículo do extrato (PBS/etanol 10%), e extrato hidroalcoólico de *A. saturooides* (100mg/kg). Não foram encontrados alterações estruturais nos tecidos hepático e renal. Hematoxilina-eosina. Escala = 20µm.

Fonte: Adaptado de Barioni *et al.*, 2013.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o tratamento *in vivo* com o extrato bruto hidroalcoólico de *A. saturooides*, conhecida popularmente como “marcela”, exerce efeitos sobre as funções neutrofílicas ligadas à migração para o foco inflamatório e à capacidade fagocítica e microbicida destas células.

A escolha pela utilização do extrato bruto hidroalcoólico no presente estudo foi baseado na pureza e na totalidade dos produtos fitoquímicos liberados pelas inflorescências da planta, mimetizando, assim, o seu uso pela população como infusão. Dados obtidos, em colaboração, com o grupo coordenado pelo Prof^o Dr. Sérgio Faloni de Andrade, da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), mostram que o extrato bruto hidroalcoólico, obtido a partir das inflorescências de *A. saturooides*, é composto majoritariamente pelos flavonóides quercetina e luteolina, corroborando dados apresentados por Souza *et al.*, (2007). Além disso, análise por GC-MS mostrou a presença de outros compostos fitoquímicos no extrato, como esteróides e ácidos graxos. Ainda, vale ressaltar que as doses empregadas neste estudo foram baseadas em trabalho prévio da literatura (SANTIM *et al.*, 2010), que descreveu que o uso tradicional desta planta é realizado, na maioria das vezes, pela via oral pela sua administração como infusão. Aproximadamente 5.0g de suas inflorescências em 200.0mL de água, ingeridas, três a quatro vezes ao dia, totalizando consumo diário de 15 a 20g. Sendo assim, para uma pessoa com 70 kg, esta administração representa uma ingestão de aproximadamente 215 a 285mg/kg/dia (SANTIM *et al.*, 2010). Desta forma, com base no uso e na preparação desta planta, a via oral foi escolhida, obviamente, por ser a via empregada no tratamento popular.

Os neutrófilos são células fundamentais para a resposta inflamatória inata, pelas suas capacidades de responderem rapidamente a estímulos lesivos e, assim, alcançarem o foco de lesão, onde exercem atividades secretórias, fagocíticas e microbicidas na tentativa de eliminar o agente lesivo (ABBAS; LICHTMAN, 2003; SEELY *et al.*, 2003; ROIT; DELVES, 2004; CHEN; NUÑES, 2010). Assim, se estes processos neutrofílicos são deficientes, há prejuízo na resposta do organismo à agressão, permitindo que a ação deletéria do agente injuriante se manifeste. Mas, por outro lado, a exacerbação das ações neutrofílicas, em especial as atividades oxidativas e a liberação de enzimas proteolíticas durante o processo de migração,

fagocitose e *microbicida* são prejudiciais às células do hospedeiro, uma vez que não são específicas ao agente lesivo. Assim, os neutrófilos são células alvos importantes para ação de agentes terapêuticos.

Os resultados aqui obtidos mostraram que a administração oral do extrato hidroalcoólico de *A. saturoides*, uma hora antes da administração de LPS no tecido subcutâneo dorsal diminuiu, significativamente, o influxo de neutrófilos para o foco de lesão. Esta resposta foi observada tanto na etapa inicial, quanto na mais tardia do processo, indicando que o extrato é rapidamente absorvido e ativo após administração oral.

Os neutrófilos possuem meia vida curta na circulação, cerca de 6 a 8 horas e, assim, são constantemente produzidos pela medula óssea, em um processo complexo que envolve diferentes etapas de diferenciação e maturação celular a partir de um precursor mielóide comum (LAPIDOT; KOLLET, 2002; SEELY *et al.*, 2003; BORREGAARD, 2010). Assim, aproximadamente entre 10^8 a 10^{11} neutrófilos são produzidos diariamente em humanos e integram três populações distintas, a saber: 1) na medula, de granulócitos maduros, prontos para serem recrutados; 2) em vasos da microcirculação de alguns tecidos, como o pulmonar; e 3) o circulante. Durante a agressão ao hospedeiro, o número destas células na circulação aumenta significativamente, provenientes das populações medular e periférica, justamente para aumentar o número de neutrófilos circulantes e o aporte de resposta (SEELY *et al.*, 2003; LAPIDOT; KOLLET, 2002; BORREGAARD, 2010). Assim, a neutrofilia é um parâmetro indicativo de resposta inflamatória e, desta forma, o número de neutrófilos circulantes foi quantificado neste estudo para se aquilatar a capacidade do extrato interferir com a mobilização de neutrófilos para o sangue. Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos com o extrato ou com indometacina não alteraram o número de neutrófilos na circulação em relação aos valores obtidos em animais tratados com o veículo. Interessantemente, os valores em animais tratados com veículo não diferiram dos valores encontrados no grupo de animais sham, o que não nos permite inferir definitivamente sobre o real efeito do extrato, pois esperava-se neutrofilia no grupo de animais tratados com o veículo. No entanto, a rápida mobilização de neutrófilos para o foco de lesão observada em animais tratados com o veículo pode ter contribuído para a ausência de neutrofilia nestes animais.

Uma vez que os ensaios mostravam que os tratamentos *in vivo* com o extrato reduziam a migração de neutrófilos para o foco de lesão induzida pelo LPS, duas

perguntas passaram a ser fundamentais de serem elucidadas: 1) o tratamento com o extrato causa citotoxicidade nas células da circulação, inviabilizando seus fenômenos moleculares de ação e, 2) o mecanismo de ação do extrato seria sobre a expressão do receptor TLR-4.

A primeira hipótese foi excluída pela observação que a viabilidade neutrofílica não foi afetada pelo tratamento com o extrato, apesar de se observar maior número de células em necrose na circulação (14% Sham e 18% nos tratados com extrato), mas por outro lado menor número de neutrófilos em apoptose (2% em Sham e 1% em tratados com extrato). Dados obtidos de ensaios *in vitro*, realizados neste trabalho, reforçam a necessidade e a importância da investigação da citotoxicidade dos extratos de plantas, uma vez que a incubação de neutrófilos diretamente com o extrato bruto hidroalcoólico de *A. satureoides* causou morte celular por necrose (material suplementar). Neste contexto, é importante salientar que a citotoxicidade causada pela ação do extrato *in vitro*, não ocorreu apenas em neutrófilos, mas também sobre a cultura de células endoteliais obtidas através de ensaios realizados com o músculo cremaster (dados não mostrados), inviabilizando a investigação dos mecanismos de ação do extrato bruto hidroalcoólico de *A. satureoides* diretamente sobre as células.

A literatura tem mostrado que os flavonóides atuam de forma efetiva no organismo ao quelar íons e sequestrar radicais livres (KIM *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2009; BEHLING *et al.*, 2004; HEIM *et al.*, 2002; HAYASHI *et al.*, 2012; SAHU *et al.*, 1993; CAO *et al.*, 1998; DECKER, 1997; SUYENAGA *et al.*, 2011). Sua propriedade antioxidante, em parte, está direcionada sobre o radical hidroxil e o ânion superóxido, espécies reativas e envolvidas na peroxidação lipídica e, consequentemente, no dano tecidual (KIM *et al.*, 2011; HEIM *et al.*, 2002; BEHLING *et al.*, 2004; DECKER, 1997; CAO *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2009; SAHU *et al.*, 1993). A quercetina, principal flavonóide encontrado no extrato bruto hidroalcoólico de *A. satureoides*, além de inibir a xantina oxidase e a peroxidação lipídica, possui capacidade de sequestrar radicais de oxigênio, estabilizar o ferro e quelar metais (KIM *et al.*, 2011; NISHIMURA *et al.*, 2008; SAHU *et al.*, 1993; BEHLING *et al.*, 2004; DECKER, 1997; LIU *et al.*, 2005). Entretanto, os flavonóides ao quelar e/ou reduzir metais, podem atuar como pró-oxidantes *in vitro* (BEHLING *et al.*, 2004; VARGAS *et al.*, 1991). Estudo de Cosentino (2008) mostrou que a infusão de *Achyrocline satureoides*, em concentrações maiores ou igual a 60ng/mL QE, aumentou

levemente a geração espontânea de espécies reativas de oxigênio em células polimorfonucleadas. Além disso, dados da literatura mostram que extratos de plantas ricos em flavonóides podem ter efeitos citotóxicos e/ou pró-apoptóticos *in vitro*, promovendo a formação de radicais livres (UEDA *et al.*, 2001; BEHLING *et al.*, 2004; DECKER, 1997; PEREIRA *et al.*, 2009; NISHIMURA *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 1998; CAO *et al.*, 2007). A atividade pró-oxidante dos flavonóides parece ser diretamente proporcional à quantidade total de grupos hidroxila existentes em sua estrutura molecular, ou seja, Behling (2004), sugere que o mesmo atributo estrutural envolvido com o potencial efeito antioxidante *in vivo*, seria o responsável, pelo estresse oxidativo e pelos danos funcionais e estruturais nas células *in vitro* (HEIM *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2009; DECKER, 1997; NISHIMURA *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 1998). Estudo de Hanasaki (1994) mostrou uma série de mono e dihidroxiflavonóides com atividade pró-oxidante não detectável, enquanto que, flavonóides com múltiplos grupos hidroxila, demonstraram, neste mesmo estudo, aumentar, no sistema de Fenton, a produção de radicais hidroxil. Este efeito pode ser responsável pela citotoxicidade e pelos efeitos pró-apoptóticos observados em flavonóides isolados de algumas ervas medicinais (BEHLING *et al.*, 2004; VARGAS *et al.*, 1991). No entanto, não é possível inferir que a citotoxicidade apresentada *in vitro* é decorrente da ação direta de flavonóides, uma vez que o extrato bruto hidroalcoólico de *A. saturooides* possui grande número de compostos fitoquímicos e que sobre a célula, um ou mais destes compostos, atuando ou não em sinergismo, poderão estar envolvidos com os danos às membranas celulares observados neste trabalho (VARGAS *et al.*, 1991; MATERIAL SUPLEMENTAR).

A segunda hipótese, ou seja, que o extrato atue como um inibidor da expressão de receptor TLR-4 em neutrófilos foi ratificada pela observação que o tratamento *in vivo* com o extrato reduziu a expressão de TLR-4 em neutrófilos circulantes após estimulação pelo LPS. Este efeito pode ser o responsável, pelo menos em parte, pelas ações antiinflamatórias do extrato em neutrófilos, já que ativação deste receptor, como já citado na introdução, induz vias intracelulares importantes para a migração e a secreção de mediadores inflamatórios (MCGETTRICK; O' NEILL, 2010; O' NEIL; BOWIE, 2007; AKIRA; TAKEDA, 2004). No entanto, os efeitos moduladores acarretados pelo tratamento com o extrato sobre o *burst* respiratório (neutrófilos estimulados pelo PMA ou incubados com *S. aureus*)

mostram que os efeitos não são somente dependentes de redução da expressão de TLR4, uma vez que o PMA é lipofílico e ativa as vias intracelulares mediadas por proteínas quinases C (HODGSON *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2003; VUORTE *et al.*, 2001).

Como já salientado na introdução, as interações dos leucócitos circulantes ao endotélio microvascular, mediado pelas moléculas de adesão expressas nas superfícies celulares, são etapas iniciais e fundamentais para o recrutamento neutrofílico (SEELY *et al.*, 2003; ROIT; DELVES, 2004; MULLER, 2003; BORREGAARD, 2010), como exemplo desta importância, a deficiência genética na expressão de L-selectina e β 2-integrina pelos leucócitos circulantes, afeta diretamente o comportamento *rolling* e de adesão dos leucócitos, reduzindo o influxo de células para áreas inflamadas, e levando a um acúmulo de leucócitos no sangue (LEY *et al.*, 2007; SMITH, 2007; LANGER; CHAVAKIS, 2009; CHAVAKIS *et al.*, 2009; ALBELDA, 1994; SEELY *et al.*, 2003; LUO, *et al.*, 2007; SMITH, 2008). Por ensaios de microscopia intravital, que nos permitiu avaliar a dinâmica destes fenômenos *in vivo*, mostramos que o tratamento com o extrato de *A. saturoides* inibiu o comportamento *rolling* e de adesão de leucócitos ao endotélio estimulado *in situ* pelo LPS. Este resultado mostrou, claramente, a interferência do extrato de *A. saturoides* sobre a interação leucócito endotélio, o que foi posteriormente confirmado pela ação do mesmo sobre a expressão de moléculas de adesão. Os dados obtidos através de citometria de fluxo mostraram que o tratamento com o extrato de *A. saturoides* reduziu a porcentagem de neutrófilos positivos para L-selectina e β 2 integrina. Vale ressaltar que este ensaio foi realizado com neutrófilos circulantes de animais pré-tratados e estimulados *in vitro* pelo LPS. Desta forma, é possível inferir que a redução na porcentagem de neutrófilos positivos para as moléculas de adesão citadas acima, pode ser responsável, pelo menos em parte, pelas alterações observadas no comportamento *rolling* e de adesão de leucócitos ao endotélio microvascular, uma vez que a interação leucócito-endotélio é dependente, também, da expressão de moléculas de adesão endoteliais (SCHENKEL *et al.*, 2006; MULLER *et al.*, 1993; SEELY *et al.*, 2003).

Dados adicionais do nosso trabalho mostraram que no exsudato inflamatório de animais tratados com o extrato no início do processo inflamatório há concentrações significativamente menores de LTB4 e CINC-1, resultante, possivelmente da ação do extrato sobre células residentes, como macrófagos e/ou

mastócitos, ou até mesmo da menor concentração de neutrófilos no infiltrado inflamatório. A literatura mostra em diferentes modelos de inflamação que a interação do LPS ao TLR-4 em macrófagos, neutrófilos e mastócitos induz a secreção de LTB₄ e CINC (SARIR *et al.*, 2009; CHOW *et al.*, 1999; AKIRA, 2003; HE *et al.*, 2013; BALISTRERI *et al.*, 2007; LEFEBVRE *et al.*, 2010; MOSES *et al.*, 2008; LEFEBVRE *et al.*, 2011; SUPAJATURA *et al.*, 2001; MARSHALL, 2004) e que o LTB₄ e o CINC induzem o aumento da expressão de moléculas de adesão como P; E; e L-selectina, β 2 integrina, ICAM-1 e VCAM-1 em leucócitos e células endoteliais (FUNK, 2001; FRIEDRICH *et al.*, 2003; GRIFFITHS *et al.*, 1991; HUANG *et al.*, 2001; NOGUCHI *et al.*, 1999; DE GENDT *et al.*, 1996) e estes, em associação à fração C5a do sistema complemento são os mais potentes e importantes agentes quimiotáticos endógenos (ALBELDA *et al.*, 1994; MOVAT *et al.*, 1984; WEBSTER *et al.*, 1980; PALMBLAD *et al.*, 1981; FORD-HUTCHINSON, 1981; HUANG *et al.*, 2001; COMPTON *et al.*, 1998; MOLLNES *et al.*, 2002; LAWRENCE *et al.*, 2002; BICKEL, 1993).

No foco de lesão, os neutrófilos fagocitam e exercem atividade microbicida no sentido de eliminar o agente lesivo. Com base nos resultados previamente obtidos, também foi objetivo deste estudo avaliar o efeito do extrato sobre as propriedades fagocíticas e microbicidas dos neutrófilos. A metodologia de citometria de fluxo novamente foi empregada, uma vez que estes parâmetros foram analisados em neutrófilos da circulação dos diferentes grupos de animais, que foram posteriormente incubados *in vitro* com os estímulos bacteriano ou farmacológico. Os dados obtidos mostram, claramente, que o tratamento *in vivo* com o extrato aumentou a capacidade dos neutrófilos fagocitarem à bactéria *S. aureus*, mas não afetou a atividade microbicida destas células, quantificada pela ativação do *burst* respiratório. Este resultado é interessante, pois mostra a especificidade de ação do extrato sobre a fagocitose e que o extrato também é ativo frente a outro estímulo, que não o LPS, como já salientado anteriormente. Se associados, os resultados obtidos mostram a capacidade do extrato de inibir somente o *burst* oxidativo provocado pelo PMA, apesar do extrato favorecer a fagocitose das bactérias. Com base nestas informações é possível inferir que o tratamento *in vivo* com o extrato de *A. saturoides* pode afetar os mecanismos de formação do fagossoma, favorecendo a fagocitose das bactérias e, ainda, supostamente, inibindo a atividade das proteínas quinases C, uma vez que inibiu o

burst oxidativo induzido pelo PMA (HODGSON *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2003; VUORTE *et al.*, 2001). É importante salientar que os efeitos antiinflamatórios foram observados em condições de não toxicidade, uma vez que os parâmetros histológicos do fígado e dos rins, e a concentração sérica dos marcadores de atividade hepática e renal, ambos, de animais pré-tratados com *A. saturooides* e/ou veículo do extrato (PBS/etanol 10%), não foram alterados.

6 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que o tratamento *in vivo* com o extrato bruto hidroalcoólico de *A. saturooides* exerce efeitos sobre as funções neutrofílicas, em condições de não toxicidade, ligadas à migração para o foco inflamatório e à capacidade fagocítica e microbicida destas células.

Esta conclusão está baseada nos seguintes resultados que mostraram que o tratamento *in vivo* com o extrato bruto hidroalcoólico de *A. saturooides*:

1. Reduziu o recrutamento de neutrófilos para o tecido subcutâneo dorsal na vigência de ação do LPS;
2. Reduziu a expressão de receptores TLR-4 em neutrófilos circulantes de animais pré-tratados com o extrato e inflamados pelo LPS;
3. Interferiu com as atividades fagocíticas e microbicidas de neutrófilos circulantes induzidas pelo PMA e/ou pelo *S. aureus*;
4. Inibiu a secreção dos mediadores quimiotáticos LTB₄ e CINC-1 no lavado do infiltrado inflamatório coletado das bolsas de ar;
5. Diminuiu o comportamento *rolling* e de adesão dos leucócitos à parede de vênulas pós-capilares;
6. Reduziu a porcentagem de neutrófilos positivos para L-selectina e β 2-integrina, após incubação *in vitro* com o LPS;
7. Não alterou os parâmetros histológicos do fígado e dos rins, e a concentração sérica dos marcadores de atividade hepática e renal, ambos, de animais pré-tratados farmacologicamente com o extrato bruto hidroalcoólico de *A. saturooides* e inflamados pelo LPS;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica**: funções e distúrbios do sistema imune. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.307p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RDC_N_14_anvisa.pdf. Acesso em: 10 set. 2011.

AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M. R.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFINI, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.3, n.15, p.215-220, 2005.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.114–140, 2007.

AKERELE, O. Medicinal plants and primary health care: an agenda for action. **Fitoterapia**, v.59, n.5, p.355–363, 1988.

AKIRA, S. Toll-like receptor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.38105-38108, 2003.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.499-511, 2004.

ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W.; WARD, P. A. Adhesion molecule and inflammatory injury. **FASEB Journal**, v.8, p.504-512, 1994.

ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.76–91, 2007.

ARIAS, A. R.; FERRO, E.; INCHAUSTI, A.; ASCURRA, M.; ACOSTA, N.; RODRIGUEZ, E.; FOURNET, A. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p.35-41, 1995.

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. and some of its main flavonoides against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.13-20, 2004.

AZAIZEH, H.; SAAD, B.; COOPER, E.; SAID, O. Traditional Arabic and Islamic Medicine, a re-emerging health aid. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v.7, p.419–424, 2010.

BALISTRERI, C. R.; CANDORE, G.; LISTÌ, F.; FAZIO, T.; GANGI, S.; INCALCATERRA, E.; CARUSO, M.; LI VECCHI, M.; LIO, D.; CARUSO, C. Role of TLR4 polymorphisms in inflammatory responses implications for unsuccessful aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1119, p.203-207, 2007.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, n.5, p.431-441, 2005.

BARIONI, E. D.; SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; RODRIGUES, S. F. P.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; WAGNER, T. M.; COGLIATI, B.; CORREA, M.; MACHADO, M. S.; ANDRADE, S. F.; NIERO, R.; FARSKY, S. H. P. *Achyrocline satureoides* (Lam) D.C. hydroalcoholic extract inhibits neutrophil functions related to innate host defense. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v.2013, p.1-12, 2013.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BARTHEL, S. R.; GAVINO, J. D.; DESCHENY, L.; DIMITROFF, C. J. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.11, n.11, p.1473-1491, 2007.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercertina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.3, p.285-292, 2004.

BENNETT, B. C. Hallucinogenic plants of the Shuar and related indigenous groups in Amazonian Ecuador and Peru. **Brittonia**, v.44, n.4, p.483-493, 1992.

BETTEGA, J. M. R.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of the anti herpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureoides*. **Phytotherapy Research**, v.18, p.819-823, 2004.

BEVILACQUA, M. P.; STENGELIN, S.; GIMBRONE Jr., M. A.; SEED, B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. **Science**, v.243, n.4895, p.1160-1165, 1989.

BICKEL, M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. **Journal of Periodontology**, v.64, p.456-460, 1993.

BOLETIM PLANFAVI. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, UNIFESP, v.21, n.5, 2012. 4p. Disponível em: <http://planfavi-cebrid.webnode.com/news/boletim-21/>. Acesso em: 20 set. 2012.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v.33, p.657-670, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC n.48, de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf. Acesso em: 05 nov. 2011.

BRASIL. Portaria Interministerial n.2.960, 09 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.240, 10 dez. 2008. Seção 1, p.56.

BRASIL. Resolução RDC n.46, de 10 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.63, 5 abr. 2010. Seção 1, p.85.

CABRERA, A. L. Compositae. In: BURKARD, A., ed. **Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina)**. Buenos Aires: INTA, 1974.v.4, part 6, p.314–315. (Colección Científica de INTA).

CABRERA, A. L. Compositae. In: CABRERA, A. L., ed. **Flora de la Provincia de Buenos Aires**. Buenos Aires: INTA, 1963. v.4, p.154–155. (Colección Científica INTA).

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179–189, 2000.

CALVO, D.; CARIDDI, L. N.; GROSSO, M.; DEMO, M. S.; MALDONADO, A. M. Achyrocline satureoides (Lam.) DC (Marcela): antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. and immunomodulating effects on human lymphocytes. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.48, n.3/4, p.247-255, 2006.

CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; VITTO, L. A. D.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, J. M. Characterisation of two South American food and medicinal plants by chemometric methods based on their multielemental composition. **Phytochemical Analysis**, v.21, p.550-555, 2010.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v.22, p.749-760, 1997.

CAO, X. G.; LI, X. X.; BAO, Y. Z.; XING, N. Z.; CHEN, Y. Responses of human lens epithelial cells to quercetin and DMSO. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.48, p.3714-3718, 2007.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCOS, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.558-565, 2000.

CARNEY, J. R.; KRENISKY, J. M.; WILLIAMSON, R. T.; LUO, J. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant Achyrocline satureioides. **Journal of Natural Products**, v.65, p.203–205, 2002.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.2, n.18, p.314-319, 2008.

CHANG, Y. F.; HSU, Y. C.; HUNG, H. F.; LEE, H. J.; LUI, W. Y.; CHI, C. W.; WANG, J. J. Quercetin induces oxidative stress and potentiates the apoptotic action of 2-Methoxyestradiol in human hepatoma cells. **Nutrition and Cancer**, v.61, p.735-745, 2009.

CHAVAKIS, E.; CHOI, E. Y.; CHAVAKIS, T. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. **Trombosis and Haemostasis**, v.102, n.2, p.191-197, 2009.

CHEN, G. Y.; NUÑES, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v.10, p.826-837, 2010.

CHEN, S. F.; FEI, X.; LI, S. H. A new simple method for isolation of Microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. **Microvascular Research**, v.50, p.119-128, 1995.

CHOI, E. Y.; SANTOSO, S.; CHAVAKIS, T. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. **Frontiers in Bioscience**, v.14, p.1596-1605, 2010.

CHOW, J. C.; YOUNG, D. W.; GOLENBOCK, D. T.; CHRIST, W. J.; GUSOVSKY, F. Toll like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.10689-10692, 1999.

COMPTON, S. J.; CAIRNS, J. A.; HOLGATE, S. T.; WALLS, A. F. The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 β and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells. **Journal of Immunology**, v.161, p.1939-1946, 1998.

COSENTINO, M.; BOMBELLI, R.; CARCANO, E.; LUINI, A.; MARINO, F.; CREMA, F.; DAJAS, F.; LECCHINI, S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureoides* (LAM) D.C. infusion: a study of human leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.501-507, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de fármacos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V., orgs. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2.ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009, 319p.

CSOKAY, B.; PRAJDA, N.; WEBER, G.; OLAH, E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. **Life Sciences**, v.60, p.2157-2163, 1997.

DANG, X.; RAFFLER, N. A.; LEY, K. Transcriptional regulation of mouse L-selectin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1789, n.2, p.146-152, 2009.

DE GENDT, C. M.; DE CLERCK, L. S.; BRIDTS, C. H.; VAN OSSELAER, N.; STEVENS, W. J. Relationship between interleukin-8 and neutrophil adhesion molecules in rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v.16, p.169-173, 1996.

DEBLE, L. P. **O gênero Achyrocline (Less.) DC. (Asteraceae: Gnaphalieae) no Brasil**. Santa Maria, 2007. 134p. Tese de Doutorado—Centro de Ciências Rurais - Universidade Federal de Santa Maria.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or oxidants. **Nutrition Reviews**, v.55, p.396-407, 1997.

DEMBITSKY, V. M.; TOLSTIKOV, G. A.; TOLSTIKOV, A. G. Natural halogenated polyacetylenides. **Chemistry for Sustainable Development**, v.11, p.341–348, 2003.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Marcela. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.1163–1170, 1998.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, south Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.60-71, 2007.

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.49-54, 2007.

FORD-HUTCHINSON, A. W. Leukotriene B4 and neutrophil function: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.74, p.831-833, 1981.

FRIEDRICH, E. B.; TAGER, A. M.; LIU, E.; PETTERSSON, A.; OWMAN, C.; MUNN, L.; LUSTER, A. D.; GERSZTEN, R. E. Mechanisms of leukotriene B4-triggered monocyte adhesion. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.23, n.10, p.1761-1767, 2003.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.178-182, 2006.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v.30, p.1871-1875, 2001.

GARCIA, G. H.; CAVALLARO, L.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; TORRES, R.; COUSSIO, J.; CAMPOS, R. Antiviral activity of *Achyrocline flaccida* Wein DC aqueous extract. **Phytotherapy Research**, v.9, p.251-254, 1995.

GARRIDO-URBANI, S.; BRADFELD, P. F.; LEE, B. P.; IMHOF, B. A. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. **Biochemical Society Transactions**, v.36, pt.2, p.203-211, 2008.

GATTUSO, M.; CORTADI, A.; RODRÍGUEZ, M. V.; MC CARGO, J.; RETTA, D.; BANDONI, A. L.; FERRARO, G.; GATTUSO, S. Caracteres florales en la identificación de *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline flaccida* y *Gnaphalium gaudichaudianum* (Asteraceae-Inuleae). **Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.7, p.247–256, 2008.

GENG, J. G.; BEVILACQUA, M. P.; MOORE, K. L.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; KIM, J. M.; BLISS, G. A.; ZIMMERMAN, G. A.; MCEVER, R. P. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. **Nature**, v.343, n.6260, p.757-760, 1990.

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, v.99, n.7, p.2507-2515, 2008.

GONZÁLEZ-AMARO, R.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. **Critical Reviews in Immunology**, v.19, n.5/6, p.389-429, 1999.

GRASSI-ZAMPIERON, R.; FRANÇA, L. V.; CAROLLO, C. A.; VIEIRA, M. C.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; SIQUEIRA, J. M. Comparative profiles of *Achyrocline alata* (Kunth) DC., and *A. satureoides* (Lam) DC., Asteraceae, applying HPLC-DAD-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.575-579, 2010.

GREEN, C. E.; PEARSON, D. N.; CAMPHAUSEN, R. T.; STAUNTON, D. E.; SIMON, S. I. Shear-dependent capping of L-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 by E-selectin signals activation of high-avidity beta2-integrin on neutrophils. **Journal of Immunology**, v.172, n.12, p.7780-7790, 2004.

GRIFFITHS, C. E. M.; BARKER, J. N. W. N.; KUNKEL, S.; NICKOLOFF, B. J. Modulation of leukocyte adhesion molecules, a T-cell chemotaxin (IL-8) and a regulatory cytokine (TNF- α) in allergic contact dermatitis (rhus dermatitis). **British Journal of Dermatology**, v.124, p.519-526, 1991.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, v.72, p.279-292, 2002.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. **Life Sciences**, v.71, p.693-705, 2002.

HAFEZI-MOGHADAM, A.; THOMAS, K. L.; PROROCK, A. J.; HUO, Y.; LEY, K. L. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. **Journal of Experimental Medicine**, v.193, n.7, p.863-872, 2001.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.15, p.845-850, 1994.

HARLAN, J. M.; VEDDER, N. B.; WINN, R.; RICE, C. Mechanisms and consequences of Leukocyte-endothelial interaction. **Western Journal of Medicine**, v.155, p.365-369, 1991.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v.117, n.1, p.53-58, 1989.

HAYASHI, Y.; MATSUSHIMA, M.; NAKAMURA, T.; SHIBASAKI, M.; HASHIMOTO, N.; IMAIZUMI, K.; SHIMOKATA, K.; HASEGAWA, Y.; KAWABE, T. Quercetin protects against pulmonary oxidant stress via heme oxygenase-1 induction in lung epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.417, p.169-174, 2012.

HE, W.; QU, T.; YU, Q.; WANG, Z.; LV, H.; ZHANG, J.; ZHAO, X.; WANG, P. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappa B and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. **International Endodontic Journal**, v.46, n.2, p.128-136, 2013.

HEBEDA, C. B.; BOLONHEIS, S. M.; NAKASATO, A.; BELIATI, K.; SOUZA, P. D. C.; GOUVEA, D. R.; LOPES, N. P.; FARSKY, S. H. P. Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, p.261-269, 2011.

HEIM, K. E.; TAGIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

HENG, S.; HARRIS, K. M.; KANTROWITZ, E. R. Designing inhibitors against fructose 1, 6 biphosphatase: exploring natural products for novel inhibitors scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.1478-1484, 2010.

HODGSON, J. C.; WATKINS, C. A.; BAYNE, C. W. Contribution of respiratory burst activity to innate immune function and effects of disease status and agent on chemiluminescence responses by ruminant phagocyte *in vitro*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, p.12-23, 2006.

HUANG, G. T. J.; KIM, D.; LEE, J. K. H.; KURAMITSU, H. K.; HAAKE, S. K. Interleukin 8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms. **Infection and Immunity**, v.69, p.1364-1372, 2001.

HUO, Y.; LEY, K. Adhesion molecules and atherogenesis. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.173, n.1, p.35-43, 2001.

ILAN, N.; MADRI, J. A. PECAM-1: old friend, new partners. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n.5, p.515-524, 2003.

JAIN, M.; PARMAR, H. S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin of the rat air pouch model of inflammation. **Inflammation Research**, v.60, n.5, p.483-491, 2011.

JANETOPOULOS, C.; FIRTEL, R. A. Directional sensing during chemotaxis. **FEBS Letters**, v.582, n.14, p.2075-2085, 2008.

JORAY, M. B.; ROLLÁN, M. R.; RUIZ, G. M.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina – isolation of active principle from *Achyrocline satureoides*. **Planta Medica**, v.77, n.1, p.95-100, 2011.

KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A. M.; MIÑO, J.; LOPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. **Pharmacological Research**, v.45, n.1, p.57-61, 2002.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.13, p.1-13, 2002.

KALOGA, M.; HANSEL, R.; CYBULSKI, E. M. Isolation of a Kawa-Pyrone from *Achyrocline satureioides*. **Planta Medica**, v.48, p.103–104, 1983.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Contributions to Microbiology**, v.15, p.118-146, 2008.

KAPISZEWSKA, M.; CIERNIAK, A.; ELAS, M.; LANKOFF, A. Lifespan of etoposide-treated human neutrophils affected by antioxidant ability of quercetin. **Toxicology In Vitro**, v.21, p.1020-1030, 2007.

KIM, G. N.; KWON, Y. I.; JANG, H. D. Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2' – azobis (2-aminopropane) dihydrochloride or Cu²⁺ -induced oxidative stress in HepG2 cells. **Toxicology In Vitro**, v.25, p.138-144, 2011.

LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.13, n.7, p.1211-1220, 2009.

LAPIDOT, T.; KOLLET, O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. **Leukemia**, v.16, p.1992-2003, 2002.

LAURILA, J. P.; LAATIKAINEN, L. E.; CASTELLONE, M. D.; LAUKKANEN, M. O. SOD3 reduces inflammatory cell migration by regulating adhesion molecule and cytokine expression. **PLoS One**, v.4, p.1-8, 2009.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.2, p.787-795, 2002.

LEE, C. C.; AVALOS, A. M.; PLOEGH, H. L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. **Nature Reviews Immunology**, v.12, p.168-179, 2012.

LEE, J.; PARK, J. H.; KIM, Y. S.; HAN, V. Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v.8, p.1681-1685, 2008.

LEFEBVRE, J. S.; LÉVESQUE, T.; PICARD, S.; PARÉ, G.; GRAVEL, A.; FLAMAND, L.; BORGEAT, P. Extra domain A of fibronectin primes leukotriene biosynthesis and stimulates neutrophil migration through activation of toll-like receptor 4. **Arthritis and Rheumatism**, v.63, n.6, p.1527-1533, 2011.

LEFEBVRE, J. S.; MARLEAU, S.; MILOT, V.; LÉVESQUE, T.; PICARD, S.; FLAMAND, N.; BORGEAT, P. Toll-like receptors ligands induce polymorphonuclear

leukocyte migration: Key roles for leukotriene B₄ and platelet-activating factor. **FASEB Journal**, v.24, p.637-647, 2010.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature**, v.7, p.678-689, 2007.

LI, S.; HUANG, N. F.; HSU, S. Mechanotransduction in endothelial cell migration. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.96, n.6, p.1110-1126, 2005.

LIANG, Y. C.; TSAI, S. H.; TSAI, D. C.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by flavonoids in mouse macrophages. **FEBS Letters**, v.496, p.12-18, 2001.

LIU, J. J.; SONG, C. W.; YUE, Y.; DUAN, C. G.; YANG, J.; HE, T.; HE, Y. Z. Quercetin inhibits LPS-induced delay in spontaneous apoptosis and activation of neutrophils. **Inflammation Research**, v.54, p.500-507, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p.131.

LORENZO, D.; ATTI-SERAFINI, L.; SANTOS, A. C.; FRIZZO, C. D.; PAROUL, N.; PAZ, D.; DELACASSA, E.; MOYNA, P. *Achyrocline satureoides* essential oils from Southern Brazil and Uruguay. **Planta Medica**, v.66, p.476-477, 2000.

LOTUFO, C. M.; YAMASHITA, C. E.; FARSKY, S. H.; MARKUS, R. P. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B₄. **European Journal of Pharmacology**, v.534, p.258-263, 2006.

LOUZADA OLIVEIRA, A.; PADILHA, C. D.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P. R. *Achyrocline satureoides* (LAM.) DC. (marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, v.17, n.1, p.33-38, 2001.

LUO, B.; CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annual Review of Immunology**, v.25, p.619-647, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VIEIRA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MALECH, H. L.; ROOT, R. K.; GALLIN, J. I. Structural analysis of human neutrophil migration. Centriole, microtubule, and microfilament orientation and function during chemotaxis. **Journal of Cell Biology**, v.75, n.3, p.666-693, 1977.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v.113, p.1370-1376, 2009.

MARSHALL, J. S. Mast-cell responses to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.787-799, 2004.

MATTILA, P. E.; GREEN, C. E.; SCHAFF, U.; SIMON, S. I.; WALCHECK, B. Cytoskeletal interactions regulate inducible L-selectin clustering. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v.289, n.2, p.C323-C332, 2005.

MCGETTRICK, A. F.; O' NEILL, L. A. J. Localization and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current Opinion in Immunology**, v.22, p.20-27, 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, p.428-435, 2008.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY Jr., C. A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v.24, p.394-397, 1997.

MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. Triagem de glicolipídeos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.568-575, 2006.

MOLLNES, T. E.; BREKKE, O.-L.; FUNG, M.; FURE, H.; CHRISTIANSEN, D.; BERGSETH, G.; VIDEM, V.; LAPPEGARD, K. T.; KOHL, J.; LAMBRIS, J. D. Essential role of the C5a receptor in *E.coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. **Blood**, v.100, p.1869-1877, 2002.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1, p.315-320, 2009.

MOSES, T.; WAGNER, L.; FLEMING, S. D. TLR4-mediated COX-2 expression increases intestinal ischemia/reperfusion-induced damage. **Journal of Leukocyte Biology**, v.86, p.971-980, 2008.

MOVAT, H. Z.; RETTL, C.; BURROWES, C. E.; JOHNSTON, M. G. The *in vivo* effect of leukotriene B₄ on polymorphonuclear leukocytes and the microcirculation. **American Journal of Pathology**, v.115, p.233-244, 1984.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v.24, n.6, p.327-334, 2003.

MULLER, W. A.; WEIGL, S. A.; DENG, X.; PHILLIPS, D. M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v.178, n.2, p.449-460, 1993.

NEWMAN, P. J. The biology of PECAM-1. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, n.1, p.3-8, 1997.

NG-SIKORSKI, J.; LINDÉN, L.; EIERMAN, D.; FRANZEN, L.; MOLONY, L.; ANDERSSON, T. Engagement of L-selectin impairs the actin polymerizing capacity of β 2-integrins on neutrophils. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2361-2369, 1996.

NISHIMURA, Y.; OYAMA, T. B.; SAKANASHI, Y.; OYAMA, T. M.; MATSUI, H.; OKANO, Y.; OYAMA, Y. Some characteristics of quercetin-induced cytotoxicity on rat thymocytes under *in vitro* conditions. **Toxicology In Vitro**, v.22, p.1002-1007, 2008.

NOGUCHI, T.; KITANO, T.; WARE, F.; BOARD, J.; GOTO, S.; LYNCH, S. V.; STRONG, R. W. The effects of circulating Interleukin-8 and adhesion molecules on pulmonary dysfunction in pediatric orthotopic liver transplantation. **Japanese Journal of Surgery**, v.29, p.1011-1016, 1999.

NOURSHARGH, S.; KROMBACH, F.; DEJANA, E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. **Journal of Leukocyte Biology**, v.80, n.4, p.714-718, 2006.

O'NEILL, L. A.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, v.7, p.353-364, 2007.

OLIVEIRA, S. G. D.; MOURA, F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. S.; DEL PINO, F. A. B.; LUND, F. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, p.428-237, 2012.

OLIVEIRA, S. Q. D.; DAL-PIZZOL, F.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J. C.; SCHENKEL, E. P. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free Radical Research Communications**, v.37, p.555-559, 2003.

ORR, Y.; TAYLOR, J.M.; CARTLAND, S.; BANNON, P. G.; GECZY, C.; KRITHARIDES, L. Conformational activation of CD11b without shedding of L-selectin on circulating human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v.82, n.5, p.1115-1125, 2007.

PALMBLAD, J.; MALMSTEN, C. L.; UDEN, A. M.; RADMARK, O.; ENGSTEDT, L.; SAMUELSSON, B. Leukotriene B4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. **Blood**, v.58, p.658-661, 1981.

PAN, J.; XIA, L.; YAO, L.; MCEVER, R. P. Tumor necrosis factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappaB sites and a variant activating transcription factor/cAMP response element. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.16, p.10068-10077, 1998.

PATEL, K. D.; CUVELEIER, S. L.; WIEHLER, S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. **Seminars in Immunology**, v.14, p.73-81, 2002.

PAZ, J.; BALDOCHI, M. R.; CONTRERA, M. G. D.; RIBEIRO, A. F.; REGALO, S. C. H.; PAZ, K.; LOPES, R. A.; SALA, M. A. Hepatotoxicidade de plantas medicinais. XXXII. Ação da infusão de *Achyrocline satureoides* (LAM) D.C no rato. **Investigação**, v.5, n.1/6, p.154-159, 2005.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B. Phenolics: from chemistry to biology. **Molecules**, v.14, n.6, p.2202-2211, 2009.

PEREIRA, L. P.; LUZ, L. P.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F. Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureoides* Lam. (marcela) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.678-681, 2006.

PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.6, p.541-550, 2006.

PIRES, A. P. S.; OLIVEIRA, C. D. R.; YONAMINE, M. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.15-23, 2010.

POLYDORO, M.; SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureoides* extracts. **Life Sciences**, n.74, p.2815-2826, 2004.

POZO, L. A. P. **Estudo “in vitro” do efeito de extratos aquosos de plantas medicinais sobre *Clostridium difficile***. Viçosa, 1997. 77p. Dissertação de Mestrado - Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa.

PRIVRATSKY, J. R.; NEWMAN, D. K.; NEWMAN, P. J. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. **Life Sciences**, v.87, p.69-82, 2010.

PUHLMANN, J.; KNAUS, U.; TUBARO, L.; SCHAFFER, W.; WAGNER, H. Immunologically active metalcion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v.31, p.2617–2621, 1992.

RAINER, T. H. L-selectin in health and disease. **Resuscitation**, v.52, p.127-141, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

REINECKE, M.; DE MINTER, L.; JIA, Q. Carbon and proton NMR assignments for 6, 7-dimethoxycoumarin. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.33, p.757–758, 1995.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. **Industrial Crops and Products**, v.38, p.27-38, 2012.

RIVERA, F.; GERVAZ, E.; SERE, C.; DAJAS, F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Marcela). **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.359-362, 2004.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Fundamentos de imunologia**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.489p.

RUFFA, M. J.; FERRARO, G.; WAGNER, M. L.; CALCAGNO, M. L.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.335–339, 2002.

RUSSO, M.; SPAGNUOLO, C.; VOLPE, S.; MUPO, A.; TEDESCO, I.; RUSSO, G. L. Quercetin induced apoptosis in association with death receptors and fludarabine in cells isolated from chronic lymphocytic leukaemia patients. **British Journal of Cancer**, v.103, p.642-648, 2010.

SABINI, M. C.; CARIDDI, L. N.; ESCOBAR, F. M.; BACHETTI, R. A.; SUTIL, S. A.; CONTIGIANI, M. S.; ZANON, S. M.; SABINI, L. I. Evaluation of cytogenotoxic effects of cold aqueous extract from *Achyrocline satureoides* by *Allium cepa* L test. **Natural Product Communications**, v.6, p.995-998, 2011.

SAHU, S. C.; GRAY, G. C. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. **Cancer Letters**, v.70, n.1/2, p.73-79, 1993.

SANTIN, J. R.; LEMOS, M.; KLEIN Jr., L. C.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (LAM) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, p.334-339, 2010.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.215-219, 2007.

SARIR, H.; MORTAZ, E.; KARIMI, K.; KRANEVELD, A. D.; RAHMAN, I.; CALDENHOVEN, E.; NIJKAMP, F. P.; FOLKERTS, G. Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages. **Journal of Inflammation**, v.6, p.1-9, 2009.

SCHENKEL, A. R.; CHEW, T. W.; CHLIPALA, E.; HARBORD, M. W.; MULLER, W. A. Different susceptibilities of PECAM-deficient mouse strains to spontaneous idiopathic pneumonitis. **Experimental and Molecular Pathology**, v.81, n.1, p.23-30, 2006.

SCHMEDA HIRSCHMANN, G. The constituents of *Achyrocline satureoides* DC. **Revista Latinoamericana de Química**, v.15, p.134-135, 1984.

SCHMID-SCÖNBEIN, G. W. Analysis of Inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.8, p.93-151, 2006.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. Studies of eicosanoid production in the air pouch model of sinovial inflammation. **Agents and Actions**, v.18, p.429-438, 1986.

SEELY, A. J. E.; PASCUAL, J. L.; CHRISTOU, N. V. Science review: cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Critical Care**, v.7, n.4, p.291-307, 2003.

SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L. A. J.; PERRETI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB Journal**, v.21, p.325-332, 2007.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v.61, n.8, p.1053-1071, 1998.

SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H.; MARTINS, M. V. M. **Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio**. TRAFFIC América do Sul, Quito – Equador/IBAMA, 2001. 44p.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureoides* (Lam.) D.C., Compositae (Marcela)**. Porto Alegre, 1984. 186p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 173p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureoides* (LAM) DC., Compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.22, p.281-293, 1988.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004.

SMALLEY, D. M.; LEY, K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.9, n.2, p.255-266, 2005.

SMITH, C. W. Adhesion molecules and receptors. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.121, p.S375-S379, 2007.

SMITH, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **Journal of Leukocyte Biology**, v.56, p.672-686, 1994.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3.ed. New York: W. H. Freeman, 1995. 887p.

SOLOWIEJ, A.; BISWAS, P.; GRAESSER, D.; MADRI, J. A. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v.162, n.3, p.953-962, 2003.

SOUZA BRITO, A. R. M.; SOUZA BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p.53–67, 1993.

SOUZA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FELIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.4, n.18, p.642-654, 2008.

SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureoides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v.14, n.2/3, p.102-108, 2007.

STILLIE, R.; FAROOQ, S. M.; GORDON, J. R.; STADNYK, A. W. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. **Journal of Leukocyte Biology**, v.86, n.3, p.529-543, 2009.

SUBRAMANIAM, M.; KOEDAM, J. A.; WAGNER, D. D. Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. **Molecular Biology of the Cell**, v.4, n.8, p.791-801, 1993.

SUPAJATURA, V.; USHIO, H.; NAKAO, A.; OKUMURA, O.; RA, C.; OGAWA, H. Protective role of mast cells against enterobacterial infections are mediated by toll-like receptor 4. **Journal of Immunology**, v.167, p.2250-2256, 2001.

SUYENAGA, E. S.; KONRATH, E. L.; DRESH, R. R.; APEL, M. A.; ZUANAZZI, J. A.; CHAVES, C. G.; HENRIQUES, A. T. Appraisal of the antichemotatic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. **Planta Medica**, v.77, p.698-704, 2011.

SWANEY, K. F.; HUANG, C. H.; DEVREOTES, P. N. Eukaryotic chemotaxis: a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. **Annual Review of Biophysics**, v.39, p.265-289, 2010.

TABACH, R. **Uso seguro de plantas medicinais**. In: Planfavi – CEBRID. 2012. Disponível em: <http://planfavi-cebrid.webnode.com/news/uso-seguro-de-plantas-medicinais/>. Acesso em: 2 fev.2012.

TAMURA, E. K.; JIMENEZ, R. S.; WAISMAN, K.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; MALPEZZI-MARINHO, E. A. L.; MARINHO, E. A. V.; FARSKY, S. H. P. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.478-485, 2009.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. **Nature Reviews Immunology**, v.7, p.179-190, 2007.

UCHIMURA K.; ROSEN, S. D. Sulfated I-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. **Trends in Immunology**, v.27, n.12, p.559-565, 2006.

UEDA, S.; NAKAMURA, H.; MASUTANI, H.; SASADA, T.; TAKABAYASHI, A.; YAMAOKA, Y.; YODOI, J. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathways as prooxidant. **Molecular Immunology**, v.38, p.781-791, 2001.

VAN ANDEL, T.; WESTERS, P. Why surinames emigrants in the Netherlands continue to use medicinal herbs from their home country? **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.694–701, 2010.

VARGAS, V. M. F.; GUIDOBONO, R. R.; HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicity of plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p.67-70, 1991.

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, p.326-337, 2006.

VUORTE, J.; JANSSON, S. E.; REPO, H. Evaluation of reed bloom cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay. **Cytometry**, v.43, p.290-296, 2001.

WAYLAND, C. Contextualizing the politics of knowledge: physicians' attitudes toward medicinal plants. **Medical Anthropology Quarterly**, v.17, p.483-500, 2003.

WAYLAND, C. Gendering local knowledge: medicinal plant use and primary health care in the Amazon. **Medical Anthropology Quarterly**, v.15, n.2, p.171-188, 2001.

WEBSTER, R. O.; HONG, S. R.; JOHNSTON Jr., R. B.; HENSON, P. M. Biological effects of the human complement C5a and C5a_{des Arg} on neutrophil function. **Immunopharmacology**, v.2, p.201-219, 1980.

WILASRUSMEE, C.; KITTUR, S.; SIDDIQUI, J.; BRUCH, D.; WILASRUSMEE, S.; KITTUR, D. S. *In vitro* immunomodulatory effects of ten commonly used herbs on murine lymphocytes. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.8, n.4, p.467-475, 2002.

WOODFIN, A.; VOISIN, M. B.; NOURSHARGH, S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.27, n.12, p.2514-23, 2007.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B., eds. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 19-46. (Didática).

ZANON, S. M.; CERIATTI, F. S.; ROVERA, M.; SABINI, L. J.; RAMOS, B. A. Search of antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.41, p.59-62, 1999.

ZÁRATE, R.; DIRKS, C.; VAN DER HEIJDEN, R.; VERPOORTE, R. Terpenoid indole alkaloid profile changes in *Catharanthus pusillus* during development. **Plant Science**, v.160, n.5, p.971-977, 2001.

ZEN, K.; GUO, Y.-L.; LI, L.-M.; BIAN, Z.; ZHANG, C.-Y.; LIU, Y. Cleavage of the CD11b extracellular domain by the leukocyte *serprocidins* is critical for neutrophil detachment during chemotaxis. **Blood**, v.117, p.4885-4894, 2011.

ZHAO, J.; JUETTNER, B.; SCHEINICHEN, D.; JAEGER, K.; HEINE, J.; PIEPENBROCK, S. Respiratory burst activity of polymorphonuclear cells is dependent on the cell preparation technique. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v.47, p.702-706, 2003.

ZIGMOND, S. H.; LEVITSKY, H. I.; KREEL, B. J. Cell polarity: an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. **Journal of Cell Biology**, v.89, n.3, p.585-592, 1981.

ZYGMOND, S. H.; HIRSCH, J. G. Leukocyte locomotion and chemotaxis: new method for evaluation and demonstration of cell-derived chemotactic factor. **Journal of Experimental Medicine**, v.137, p.387-410, 1973.

APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR

1 INTRODUÇÃO

Como já salientado, a infusão de *Achyrocline satureoides*, popularmente conhecida como marcela, é amplamente utilizada no tratamento popular de diversas doenças (ARREDONDO *et al.*, 2004; SANTIM *et al.*, 2010). Dados encontrados na literatura demonstram seus efeitos medicinais como antioxidante, antiviral, antibacteriano, antitumoral e imunomodulador (VARGAS *et al.*, 1991; DESMARCHELIER *et al.*, 1998; SIMÕES *et al.*, 1998; ZANON *et al.*, 1999; RUFFA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; DICKEL *et al.*, 2007; COSENTINO *et al.*, 2008; RETTA *et al.*, 2012).

Como os dados apresentados anteriormente, no modelo de bolsa de ar, mostraram a atividade do extrato bruto hidroalcoólico de *A. satureoides* sobre a migração de neutrófilos *in vivo*, foi nosso objetivo elucidar a ação direta deste extrato sobre estas células *in vitro*, uma vez que estes ensaios nos auxiliariam na busca dos mecanismos de ação deste extrato sobre o comportamento de neutrófilos *in vivo*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/334).

Para a realização deste trabalho, ratos Wistar machos, com 2 a 3 meses de idade e peso entre 180-220g foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com ciclo de luz e temperatura controlado, bem como acesso a alimento e água *ad libitum* até início dos ensaios.

Os procedimentos experimentais foram realizados após indução de anestesia com cloridrato de ketamina (77mg/kg) e cloridrato de xilazina (7mg/kg) (Vetbrands), via intraperitoneal.

2.2 Obtenção do extrato

As inflorescências de *A. saturoides* (Lam.) D.C. (marcela) foram coletadas no município de Fraiburgo (Latitude 27°01'34"S e longitude 50°55'17"W), estado de Santa Catarina, Brasil, em maio de 2009, pelo biólogo Gilberto Schneiker (CRBio: 63266-03D), e foram identificadas por comparação com uma exsicata depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob o código HUEM-23568.

As inflorescências foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante (40°C), e após este procedimento, foram submetidas à moagem em triturador, resultando em 2kg de material seco.

O material resultante (2kg) foi submetido à maceração em solução hidroalcoólica a 70% durante sete dias, e após filtração, a solução foi submetida à redução e evaporação do solvente em rota evaporador à pressão reduzida, obtendo-se 192,6g de extrato bruto hidroalcoólico.

Todos os experimentos, bem como a coleta da espécie vegetal, foram autorizados pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN; processo 010062-2012-2) do Ministério do Meio Ambiente, Brasil.

2.2.1 Obtenção das frações

As frações foram obtidas a partir do processo de partição líquido-líquido do extrato bruto hidroalcoólico com o intuito de obter duas frações. Neste aspecto, o extrato bruto (20 g) foi solubilizado em metanol: água (9:1), e o processo de extração líquido/líquido foi realizado utilizando hexano (5x300 mL) como solvente extrator.

As frações apresentaram rendimentos de 1,57 g (15,74%) para a fração hexânica (rica em terpenos e esteróides) e 8,83 g (88,3%) para a fração metanólica (rica em compostos fenólicos).

2.3 Obtenção de neutrófilos para os ensaios *in vitro*

Para a realização dos ensaios *in vitro*, os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos da espécie Wistar, machos, adultos, 4 horas após a injeção intra-peritoneal de 10mL de glicogênio de ostra a 1% (Sigma Aldrich).

2.4 Viabilidade celular por azul de *trypan*

Os neutrófilos (1×10^6 céls/poço) foram incubados em estufa (37°C; 5% de CO₂) por 18 horas com as concentrações de 1, 10, 50 e 100µg/mL do extrato bruto hidroalcoólico de *A. satureoides*. Em seguida, 10µL da suspensão de neutrófilos de cada poço foi misturado com 10µL de uma solução contendo 0,4% de azul de *trypan*. A suspensão (10µL) foi analisada em câmara de Neubauer. Duzentas células foram contadas e a porcentagem de células viáveis (não coradas) foi calculada.

2.5 Citometria de fluxo: Viabilidade celular por Anexina-V e PI

Para excluir possíveis efeitos citotóxicos do extrato de *A. satureoides*, os neutrófilos (1×10^6 cels/tubo) foram incubados com 100µg/mL do extrato de *A. satureoides* e/ou PBS (Controle) a 37°C durante 1 hora. Após este período, 1mL de

PBS 4°C foi adicionado a cada tubo, e em seguida, os tubos foram centrifugados (600g/10min), e novamente incubados por mais duas horas com PBS a 37°C. Após a incubação, 1mL de PBS gelado foi adicionado novamente aos tubos, e em seguida, centrifugados a (600g/10min). Os neutrófilos foram incubados com anticorpo anti-Anexina V-FITC (BD biosciences) por 20 minutos, e imediatamente antes da leitura, foi acrescentado Iodeto de Propídio (100µg/mL) (SIGMA).

Os sinais ópticos emitidos foram convertidos em sinais eletrônicos, o que permitiu uma leitura computadorizada (*Macintosh Apple*, San Jose, CA, USA) pelo software *FlowJo* (Tree Star, Inc., Ashland, TN, USA). Os dados de 5.000 neutrófilos foram obtidos e os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência após análise pelo software *FlowJo*. As células duplo-negativas, ou seja, aquelas que não foram marcadas com nenhum dos fluorocromos foram consideradas como células viáveis; as células marcadas apenas com PI, foram consideradas em necrose; as células marcadas apenas com Anexina V-FITC, foram consideradas células apoptóticas, e por fim, as células que apresentaram dupla marcação, ou seja, marcadas tanto com PI quanto com Anexina V-FITC, foram consideradas células em apoptose tardia/necrose.

2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), e analisado estatisticamente pela análise da variância com comparações múltiplas (ANOVA) e, quando necessário, foi utilizado o teste de Tukey-Kramer (SOKAL; ROHLF, 1995). Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism[®], admitindo como significativamente estatístico o $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 O extrato de *A. satureoides* não altera a viabilidade dos neutrófilos pelo método de Azul de *trypan*

Os resultados obtidos mostraram que o extrato bruto hidroalcoólico de *A. satureoides* nas concentrações de 50 ou 100 µg/mL diminuiu a viabilidade dos neutrófilos, entretanto, não houve diferença estatística entre as concentrações testadas, sendo equivalentes ao grupo controle, não tratado com *A. satureoides* e inflamado pelo LPS (Figura 1).

Figura 1. Efeito de *A. satureoides* sobre a porcentagem de células viáveis por azul de trypan.

Legenda: Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com os neutrófilos obtidos de 6 animais em cada grupo.

Fonte: Autoria própria.

O método de exclusão por azul de *trypan* tem sido amplamente descrito na literatura como um dos ensaios de escolha para avaliação de citotoxicidade *in vitro*, e baseia-se na quantificação, por microscopia óptica, do número de células coradas ou não pela solução de azul de *trypan*. Ou seja, avalia-se a integridade da membrana plasmática, uma vez que, se lesionada, possibilita a permeação do corante para o citosol (MASCOTTI *et al.*, 2000). Desta forma, nossos resultados mostraram que o extrato bruto hidroalcoólico de *A. satureoides* não interfere com as etapas do maquinário celular, preservando a funcionalidade e a integridade da membrana plasmática.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, de modo geral, representam uma importante ferramenta na determinação do número de células viáveis e não viáveis. Em se tratando de extratos de plantas ricos em compostos fitoquímicos, a realização destes testes deve ser ainda mais criteriosa, uma vez que estes compostos, atuando ou não em sinergismo, podem, em contato direto, interferir com o maquinário celular, comprometendo a integridade da membrana plasmática e o funcionamento da célula (MASCOTTI *et al.*, 2000; BEHLING *et al.*, 2004).

Visto que o ensaio de viabilidade por azul de *trypan* é um método não específico, e que a possível coloração de artefatos pode prejudicar sua correta interpretação (MASCOTTI *et al.*, 2000), ensaios adicionais de citometria de fluxo, com a concentração de 100µg/mL de extrato, foram realizados para quantificar a necrose, a apoptose e a apoptose tardia.

3.2 O extrato de *A. saturooides* alterou a viabilidade dos neutrófilos pelo método de Anexina-V e PI

Os resultados obtidos com o extrato bruto hidroalcoólico de *A. saturooides* (100µg/mL) mostraram que o número de neutrófilos viáveis foi insuficiente para a continuidade dos ensaios *in vitro* (Figura 2A), ou seja, o tratamento com o extrato interferiu diretamente na viabilidade destas células, aumentando significativamente o número de neutrófilos em necrose (Figura 2B), enquanto que não interferiu no número de células em apoptose (Figura 2C), mas aumentou significativamente o número de neutrófilos em apoptose tardia (Figura 2D).

Figura 2. Efeito de *A. saturooides* sobre a viabilidade celular *in vitro*.

Legenda: Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com os neutrófilos obtidos de 3 a 6 animais em cada grupo. (A) *** $p < 0,001$ vs. grupo Controle; ### $p < 0,001$ vs. grupo Veículo; (B) *** $p < 0,001$ vs. grupo Controle; ### $p < 0,001$ vs. grupo Veículo; (D) *** $p < 0,001$ vs. grupo Controle; ### $p < 0,001$ vs. grupo Veículo.

Fonte: Autoria própria.

3.3 A fração hexânica não interfere na viabilidade dos neutrófilos, enquanto que a fração metanólica altera significativamente a viabilidade destas células

Os resultados obtidos mostraram que o número de neutrófilos viáveis tratados com a fração hexânica de *A. saturooides* (100 μ g/mL) foi de cerca de 80%, enquanto que com a fração metanólica este número foi significativamente reduzido para cerca de 50% (Figura 3A). O número de neutrófilos em necrose foi significativamente maior quando tratado com a fração metanólica (Figura 3B), enquanto que na apoptose e na apoptose tardia não interferiu no número de células, comparado à fração hexânica (Figura 3C e D).

Figura 3. Efeito das frações de *A. saturoides* sobre a viabilidade celular *in vitro*.

Legenda: Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de ensaios realizados com os neutrófilos obtidos de 3 a 6 animais em cada grupo. (A) *** p < 0,001 e ** p < 0,01 vs. grupo Controle; ### p < 0,001 e # p < 0,05 vs. grupo Veículo; &&& p < 0,001 vs. grupo FH; (B) *** p < 0,001 vs. grupo Controle; ### p < 0,001 vs. grupo Veículo; &&& p < 0,001 vs. grupo FH; (C) *** p < 0,001 vs. grupo Controle; ### p < 0,001 vs. grupo Veículo; &&& p < 0,001 vs. grupo FH; (D) *** p < 0,001 vs. grupo Controle; ### p < 0,001 vs. grupo Veículo; &&& p < 0,001 vs. grupo FH.

Fonte: Autoria própria.

No ensaio de viabilidade, a externalização da proteína fosfatidilserina é mensurado através da marcação celular com Anexina-V, que se liga aos fosfolípidos expressos na membrana plasmática dos neutrófilos de forma reversível e cálcio-dependente (NISHIMURA *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2009; MELINO *et al.*, 2005; ELMORE, 2007; POON *et al.*, 2010; CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2010). Uma fase intermediária no processo de morte celular, denominada apoptose tardia, ocorre quando a externalização da proteína fosfatidilserina é seguida do rompimento da membrana plasmática, permitindo assim, a dupla marcação com a Anexina-V e

iodeto de propídio (PI); na necrose, o rompimento das membranas celulares, promove a entrada do marcador impermeável iodeto de propídio, que possui alta afinidade por estruturas intracelulares, como o DNA (ELMORE, 2007; WILLINGHAM *et al.*, 1999; MASCOTTI *et al.*, 2000).

Um grande número de compostos pertencentes a vários grupos fitoquímicos tem sido isolado a partir das inflorescências de *A. saturooides*, entre estes grupos podemos citar os polifenóis representados, principalmente, pelos flavonóides quercetina e luteolina. Além disso, terpenóides; carotenóides; cumarinas; achyrofuran; ácido clorogênico e isoclorogênico; polissacarídeos; glicolipídeos; lactonas; poliacetilenos e esteróides (POLYDORO *et al.*, 2004; REINECKE *et al.*, 1995; PUHLMANN *et al.*, 1992; SHMEDA HIRSCHMANN, 1984; KALOGA *et al.*, 1983; DEMBITSKY *et al.*, 2003; RETTA *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2006; DICKEL *et al.*, 2007; MARQUES; FARAH, 2009; CARNEY *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Os flavonóides são antioxidantes provenientes da alimentação e que atuam de forma efetiva no organismo, ao quelar íons e sequestrar radicais livres. Sua atividade biológica, não exclusivamente, é diretamente proporcional à quantidade total de grupos hidroxila existente em sua estrutura. Esta relação, segundo Behling (2004), promove o importante efeito antioxidante *in vivo*, enquanto que, *in vitro*, é relacionada com o potencial efeito pró-oxidante. Dados da literatura mostram que extratos de plantas ricos em flavonóides podem ter efeitos pró-oxidantes *in vitro*, promovendo a formação de radicais livres (BEHLING *et al.*, 2004; DECKER, 1997; NISHIMURA *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2009) ainda, estudos com o flavonóide quercetina demonstram sua atividade pró-apoptótica e citotóxica em células normais e tumorais *in vitro* (NISHIMURA *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2009).

Dados encontrados na literatura demonstram que o extrato de *A. saturooides*, possui atividade mutagênica e genotóxica pelo teste de Ames (*Salmonella/microsome*) e *Artemia salina* (VARGAS *et al.*, 1991), além disso, a fração metanólica, apresentou atividade citotóxica frente às células do tipo HepG2 (linhagem de hepatocarcinoma humano; RUFFA *et al.*, 2002); e uma possível toxicidade marginal *in vitro* é relatada por Retta *et al.*, (2012) em sua revisão.

Desta forma, é possível inferir que o sinergismo entre os compostos pertencentes ao extrato pode estar influenciando diretamente a viabilidade destas células *in vitro*, e que ensaios para avaliação da citotoxicidade devem ser realizados

com cautela, por metodologias mais específicas e capazes de identificar os diferentes mecanismos de morte celular.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARIONI, E. D.; SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; RODRIGUES, S. F. P.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; WAGNER, T. M.; COGLIATI, B.; CORREA, M.; MACHADO, M. S.; ANDRADE, S. F.; NIERO, R.; FARSKY, S. H. P. *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. hydroalcoholic extract inhibits neutrophil functions related to innate host defense. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v.2013, p.1-12, 2013.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercertina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.3, p.285-292, 2004.

CARMONA-GUTIERREZ, D.; EISENBERG, T.; BÜTTNER, B.; MEISINGER, C.; KROEMER, G.; MADEO, F. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell Death & Differentiation**, v.17, n.5, p.763-773, 2010.

CARNEY, J. R.; KRENISKY, J. M.; WILLIAMSON, R. T.; LUO, J. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. **Journal of Natural Products**, v.65, p.203–205, 2002.

CHANG, Y. F.; HSU, Y. C.; HUNG, H. F.; LEE, H. J.; LUI, W. Y.; CHI, C. W.; WANG, J. J. Quercetin induces oxidative stress and potentiates the apoptotic action of 2-Methoxyestradiol in human hepatoma cells. **Nutrition and Cancer**, v.61, p.735-745, 2009.

COSENTINO, M.; BOMBELLI, R.; CARCANO, E.; LUINI, A.; MARINO, F.; CREMA, F.; DAJAS, F.; LECCHINI, S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. infusion: a study of human leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.501-507, 2008.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or oxidants. **Nutrition Reviews**, v.55, p.396-407, 1997.

DEMBITSKY, V. M.; TOLSTIKOV, G. A.; TOLSTIKOV, A. G. Natural halogenated polyacetylenides. **Chemistry for Sustainable Development**, v.11, p.341–348, 2003.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Marcela. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.1163–1170, 1998.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, south Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.60-71, 2007.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, n.4, p.495-516, 2007.

KALOGA, M.; HANSEL, R.; CYBULSKI, E. M. Isolation of a Kawa-Pyrone from *Achyrocline satureioides*. **Planta Medica**, v.48, p.103–104, 1983.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v.113, p.1370–1376, 2009.

MASCOTTI, K.; MCCULLOUGH, J.; BURGER, S. R. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. **Transfusion**, v.40, p.693–696, 2000.

MELINO, G.; KNIGHT, R. A.; NICOTERA, P. How many ways to die? How many different models of cell death? **Cell Death & Differentiation**, v.12, p.1457–1462, 2005.

MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. Triagem de glicolipídeos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.568–575, 2006.

NISHIMURA, Y.; OYAMA, T. B.; SAKANASHI, Y.; OYAMA, T. M.; MATSUI, H.; OKANO, Y.; OYAMA, Y. Some characteristics of quercetin-induced cytotoxicity on rat thymocytes under *in vitro* conditions. **Toxicology In Vitro**, v.22, p.1002–1007, 2008.

OLIVEIRA, S. G. D.; MOURA, F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. S.; DEL PINO, F. A. B.; LUND, F. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, p.428–237, 2012.

OLIVEIRA, S. Q. D.; DAL-PIZZOL, F.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J. C.; SCHENKEL, E. P. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free Radical Research Communications**, v.37, p.555–559, 2003.

POLYDORO, M.; SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, n.74, p.2815–2826, 2004.

PONN, I. K. H.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. **Cell Death & Differentiation**, v.17, p.381–97, 2010.

PUHLMANN, J.; KNAUS, U.; TUBARO, L.; SCHAFFER, W.; WAGNER, H. Immunologically active metallicion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v.31, p.2617–2621, 1992.

REINECKE, M.; DE MINTER, L.; JIA, Q. Carbon and proton NMR assignments for 6, 7-dimethoxycoumarin. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.33, p.757–758, 1995.

RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S. A.; BANDONI, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. **Industrial Crops and Products**, v.38, p.27–38, 2012.

RUFFA, M. J.; FERRARO, G.; WAGNER, M. L.; CALCAGNO, M. L.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.335–339, 2002.

SCHMEDA HIRSCHMANN, G. The constituents of *Achyrocline satureioides* DC. **Revista Latinoamericana de Química**, v.15, p.134–135, 1984.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 173p.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. 3.ed. New York: W.H. Freeman, 1995. 887p.

VARGAS, V. M. F.; GUIDOBONO, R. R.; HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicity of plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, p.67-70, 1991.

WILLINGHAM, M. C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.47, p.1101-1109, 1999.

ZANON, S. M.; CERIATTI, F. S.; ROVERA, M.; SABINI, L. J.; RAMOS, B. A. Search of antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.41, p.59–62, 1999.

ANEXO A – FICHA DO ALUNO

25/03/13

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7749620/1 - Eric Diego Barioni

Email: ebarioni@usp.br
Data de Nascimento: 05/08/1986
Cédula de Identidade: RG - 33.953.965-3 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio - Brasil - 2010

Curso: Mestrado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 10/06/2011
Início da Contagem de Prazo: 10/06/2011
Data Limite: 10/12/2013
Orientador: Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 10/06/2011 até o presente.
 E.Mail: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 10/06/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 29/06/2012
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 10/06/2011
 Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Impresso em: 25/03/13 09:25:17

25/03/13

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7749620/1 - Eric Diego Barioni

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-2/6	Tópicos Avançados em Toxicologia I	09/08/2011	29/11/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5803-1/4	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	09/08/2011	22/08/2011	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	14/11/2011	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5800-4/1	Temas Avançados em Ciências e Tecnologia Farmacêutica I	17/10/2011	23/10/2011	30	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5784-2/7	Tópicos Avançados em Toxicologia II	06/03/2012	26/06/2012	30	2	90	A	N	Concluída
FBC5728-3/1	Aspectos Toxicológicos da Dopagem no Esporte	16/05/2012	19/06/2012	45	3	93	A	N	Concluída
FBC5741-6/1	Análise Toxicológica de Fármacos e Drogas que Causam Dependência	25/06/2012	29/07/2012	60	4	80	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC-0210 Toxicologia Ambiental, ministrada aos alunos de graduação do Curso de Engenharia Ambiental da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (Universidade de São Paulo) (1)	01/07/2012	30/11/2012	-	3	0	-	-	-
FBC5758-2/1	Toxicologia dos praguicidas	25/09/2012	05/11/2012	90	6	85	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
Para exame de qualificação		Para depósito da dissertação
Disciplinas:	10	25
Estágios:		30
Total:	10	25
		30

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 22/02/2013.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

<https://uspdigital.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.jsf>

2/3

ANEXO B – CURRÍCULO LATTES

20/03/13

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eric Diego Barioni)

Eric Diego Barioni

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1110315289116810>

Última atualização do currículo em 15/02/2013

Graduado em Biomedicina pelo Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio em Itú - SP (2009). Atualmente realiza o Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - SP. Possui ampla experiência em alguns setores das Análises Clínicas e no gerenciamento técnico de laboratórios. Áreas de atuação: toxicologia de produtos naturais com atividade anti e/ou pró-inflamatória. Membro da Sociedade Brasileira de Toxicologia SBTOx. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Eric Diego Barioni
Nome em citações bibliográficas	BARIONI, E. D.
Sexo	Masculino

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13B Cidade Universitária 05508-900 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30912197 URL da Homepage: http://www.fcf.usp.br/
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2011	Mestrado em andamento em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 4). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DO EXTRATO DA INFLORESCÊNCIA DA Achyrocline satureioides SOBRE A FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA INFLAMAÇÃO., Orientador: Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2006 - 2009	Graduação em Biomedicina. Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. Título: As Principais Alterações Orgânicas Provocadas pelo uso do Crack. Orientador: Prof. Ms. Jadson de Oliveira Silva.

Formação Complementar

2012 - 2012	Extensão universitária em Neuroinflamações e Doenças Neurodegenerativas. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Descartes Laboratoriais. (Carga horária: 3h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Aplicação de Nanopartículas na Área Farmacêutica. (Carga horária: 2h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

13/13

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eric Diego Barioni)

2011 - 2011	Extensão universitária em Sistema de Imagem em Alto Conteúdo. (Carga horária: 3h). Molecular Devices do Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Logística de Medicamentos. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em ApoCIII, a risk factor for Diabetes. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Toll Like Receptor. (Carga horária: 1h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2010 - 2010	Extensão universitária em Primeiros Socorros/Acidentes no Lar. (Carga horária: 1h). Fundação São Paulo - Hospital Santa Lucinda.
2010 - 2010	Extensão universitária em Manutenção do equip. COBAS B 221. (Carga horária: 5h). AIMARA - Comércio e Representações LTDA..
2009 - 2009	VI Semana de Estudos. (Carga horária: 16h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio.
2009 - 2009	Qnd e como discutir casos de medicina molecular. (Carga horária: 1h). Total Laboratórios / Serviço de Apoio a Laboratórios.
2009 - 2009	Treinamento Técnico Comercial 2009. (Carga horária: 30h). Biotécnica Indústria e Comércio.
2008 - 2008	Gerenciamento e Conservação do Sangue. (Carga horária: 6h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio.
2008 - 2008	O Lab. Clin. no diag. das doenças auto-imunes. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial.
2008 - 2008	V Semana de Estudos. (Carga horária: 12h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio.
2007 - 2007	IV Semana de Estudos. (Carga horária: 40h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio.
2006 - 2006	III Semana de Estudos. (Carga horária: 12h). Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio.

Atuação Profissional**Universidade de São Paulo, USP, Brasil.****Vínculo institucional**

2011 - 2013	Vínculo: Aluno de Mestrado, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.
--------------------	---

Associação Policial de Assistencia a Saude - Labormed.**Vínculo institucional**

2010 - 2010	Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Biomédico, Carga horária: 40
Outras informações	Biomédico responsável pelo Laboratório do Hospital Santa Lucinda.

RCL - Comercial.**Vínculo institucional**

2009 - 2010	Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Assessor Científico, Carga horária: 40
--------------------	---

Colégio Atos.**Vínculo institucional**

2009 - 2010	Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 8
--------------------	--

0/03/13

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eric Diego Barioni)

Colégio CENEP.

Vínculo institucional

2008 - 2010

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 8

Colégio Archimedes.

Vínculo institucional

2008 - 2008

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 4

Lab. Clín. Trianaálises.

Vínculo institucional

2006 - 2008

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Plantonista, Carga horária: 36

Projetos de pesquisa

2011 - Atual

CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DO EXTRATO DA INFLORESCÊNCIA DA Achyrocline satureoides SOBRE A FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA INFLAMAÇÃO.

Descrição: Desde a antiguidade, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas para o tratamento de diversas doenças e, gradativamente, o uso destes medicamentos naturais tem aumentado, porém, na maioria das vezes, o emprego do medicamento popular é realizado sem critérios adequados, ou seja, sem a fundamentação necessária na literatura para o uso, o que em algumas vezes, poderá resultar em efeitos indesejáveis e tóxicos. Achyrocline satureoides (Lam) D.C., popularmente conhecida como marcela, marcela do campo, macelinha, macela ou camomila-nacional é muito utilizada popularmente para tratar males do estômago e do intestino, problemas respiratórios, anemias, inflamações, infecções virais, diabetes e doenças de próstata. Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo trabalhos com o objetivo de esclarecer os mecanismos antiinflamatórios das inflorescências da Marcela. No presente projeto serão investigadas as ações do extrato das inflorescências da Achyrocline satureoides sobre as funções de neutrófilos..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Eric Diego Barioni / Sandra Helena Poliselli Farsky - Coordenador.
 Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa.

2011 - Atual

ESTUDO DA AÇÃO DO INIBIDOR DE SERINOPROTEASE AMBLYOMIN-X SOBRE AS PROPRIEDADES ADESIVAS E MIGRATÓRIAS DE CÉLULAS CANCEROSAS DA LINHAGEM SK-MEL-28

Descrição: As serinoproteases são enzimas proteolíticas encontradas em vários tecidos e fluidos biológicos e, em equilíbrio com seus inibidores, são importantes para a homeostase. Enquanto o aumento das serinoproteases está relacionado ao maior poder invasivo de células tumorais, seus inibidores parecem conferir fenótipo de anti malignidade, com capacidade de desenvolver regressão do tumor primário e diminuir o seu potencial de invasão e migração. O Amblyomin-X é uma proteína recombinante obtida de uma biblioteca de cDNA, extraída da glândula salivar do carrapato Amblyomma cajannense e identificada como inibidor de serinoprotease do tipo Kunitz. Estudos experimentais têm demonstrado o seu efeito antitumoral in vivo, através da regressão da massa tumoral, inibição de metástases e da angiogênese. Desta forma, este trabalho visa complementar os mecanismos celulares da ação do Amblyomin X, sobre os processos de migração celular vigentes no processo de metastização. Para tanto, serão empregadas culturas de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e de melanoma humano (SK-MEL-28). Os efeitos estudados

20/03/13

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eric Diego Barioni)

do Amblyomin-X serão sobre a: apoptose e necrose de ambos os tipos celulares, sobre a interação das células tumorais ao endotélio, sobre as expressões protéicas das moléculas de adesão nos dois tipos celulares em condições basais e sob a ação do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF-A), sobre a migração das células cancerosas frente ao VEGF-A, e sobre a adesão focal. Em conjunto os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos antitumoral de inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eric Diego Barioni / Sandra Helena Poliselli Farsky - Coordenador.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Anatomia Patológica e Patologia Clínica/Especialidade: Patologia Clínica.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análise Toxicológica.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2012	2º lugar no prêmio Jovem Cientista Prof. Dr. Mario Mariano, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. ★ **BARIONI, E. D.** ; Santin, J. R. ; Machado, I. ; Rodrigues, S. ; Ferraz-de-Paula, V. ; WAGNER, T. M. ; COGLIATI, B. ; CORREA, M. ; MACHADO, M. S. ; Andrade, S. F. ; Niero, R. ; FARSKY, S. H. P. . Achyrocline satureoides (Lam.) D.C. HYDROALCOHOLIC EXTRACT INHIBITS NEUTROPHIL FUNCTIONS RELATED TO INNATE HOST DEFENSE. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print) **JCR**, v. 2013, p. 1/ 787916-12, 2013.

Apresentações de Trabalho

1. ★ **BARIONI, E. D.** ; Santin, J. R. ; Shimada, A. L. ; Rodrigues, S. ; Machado, I. ; Ferraz-de-Paula, V. ; Niero, R. ; Andrade, S. F. ; FARSKY, S. H. P. . O TRATAMENTO ORAL COM Achyrocline satureoides (Lam.) D.C., PREVINE A MIGRAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS NO MODELO DE BOLSA DE AR. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. **BARIONI, E. D.** ; Santin, J. R. ; Shimada, A. L. ; Rodrigues, S. ; Machado, I. ; Ferraz-de-Paula, V. ; Niero, R. ; Andrade, S. F. ; FARSKY, S. H. P. . ORAL ADMINISTRATION OF Achyrocline satureoides EXTRACT PREVENTS IN VIVO NEUTROPHIL MIGRATION INDUCED BY LPS. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

/03/13

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eric Diego Barioni)

3. **BARIONI, E. D.** ; Santin, J. R. ; Shimada, A. L. ; Rodrigues, S. ; Machado, I. ; Ferraz-de-Paula, V. ; Niero, R. ; Andrade, S. F. ; FARSKY, S. H. P. . Achyrocline satureoides (LAM) D.C. EXTRACT TREATMENT PREVENTS NEUTROPHIL MIGRATION IN AIR POUCH MODEL. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. **BARIONI, E. D.** . Atividade Biológica dos Produtos Naturais. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
5. **BARIONI, E. D.** ; DREWES, C. C. ; SIMONS, S. M. ; TAVASSI, A. M. C. ; FARSKY, S. H. P. . Study of the Action of the Serine Protease Inhibitor Amblyomin-X on Properties Adhesives and Migration of Cancer Cells Lineage SK-MEL-28. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Demais tipos de produção técnica

1. **BARIONI, E. D.** . Atuação Profissional em Pesquisa. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
2. **BARIONI, E. D.** . Treinamento do Analisador Automático Hitachi 911. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 44º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Achyrocline satureoides (LAM) D.C. EXTRACT TREATMENT PREVENTS NEUTROPHIL MIGRATION IN AIR POUCH MODEL. 2012. (Congresso).
2. XLVII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. ORAL ADMINISTRATION OF Achyrocline satureoides EXTRACT PREVENTS IN VIVO NEUTROPHIL MIGRATION INDUCED BY LPS. 2012. (Simpósio).
3. XXI Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli. O TRATAMENTO ORAL COM Achyrocline satureoides (Lam.) D.C., PREVINE A MIGRAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS NO MODELO DE BOLSA DE AR. 2012. (Simpósio).
4. Semana de Estudos do Curso de Biomedicina. Atividade Biológica dos Produtos Naturais. 2012. (Simpósio).
5. XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Estudo da ação do inibidor de serino protease Amblyomin-X sobre as propriedades adesivas e migratórias de células cancerosas da linhagem SK-MEL-28. 2011. (Simpósio).
6. XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Study of the Action of the Serine Protease Inhibitor Amblyomin-X on Properties Adhesives and Migration of Cancer Cells Lineage SK-MEL-28. 2011. (Simpósio).
7. VIII Semana de Estudos do Curso de Biomedicina. Atuação Profissional em Pesquisa. 2011. (Simpósio).
8. 43 Congresso Brasileiro de Patologia Clínica - Medicina Laboratorial. 2009. (Congresso).
9. 42 Congresso Brasileiro de Patologia Clínica - Medicina Laboratorial. 2008. (Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **BARIONI, E. D.** . VI Semana de Estudos da Faculdade de Saúde e Ciências da Vida do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. 2009. (Outro).
2. **BARIONI, E. D.** . IV Semana de Estudos da Faculdade de Ciências Biomédicas do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. 2007. (Outro).

3. **BARIONI, E. D.** . III Semana de Estudos da Faculdade de Ciências Biomédicas do Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio. 2006. (Outro).

Educação e Popularização de C & T

Artigos

Artigos completos publicados em periódicos

1. ★ **BARIONI, E. D.** ; Santin, J. R. ; Machado, I. ; Rodrigues, S. ; Ferraz-de-Paula, V. ; WAGNER, T. M. ; COGLIATI, B. ; CORREA, M. ; MACHADO, M. S. ; Andrade, S. F. ; Niero, R. ; FARSKY, S. H. P. . Achyrocline satureoides (Lam) D.C. HYDROALCOHOLIC EXTRACT INHIBITS NEUTROPHIL FUNCTIONS RELATED TO INNATE HOST DEFENSE. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print) **JCR**, v. 2013, p. 1/ 787916-12, 2013.

Apresentações de Trabalho

1. **BARIONI, E. D.** . Atividade Biológica dos Produtos Naturais. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Outras informações relevantes

Representante discente junto a Comissão de Pós-Graduação (CPG) e o Comitê de Ética em Pesquisa com humanos (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - SP - período: julho 2011/julho 2012. Projeto de Pesquisa Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA/FCF/334) .

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 20/03/2013 às 22:16:49

[Imprimir currículo](#)

ANEXO C – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/84/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **“Caracterização das ações do extrato da inflorescência da 'Achyrocline satureoides', sobre a função de neutrófilos na inflamação”** (Protocolo CEUA/FCF/334), de responsabilidade do pesquisador **Eric Diego Barioni** sob a orientação da Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi **APROVADO** em reunião de 05 de setembro de 2011.

São Paulo, 06 de setembro de 2011.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

ANEXO D – *ACHYROCLINE SATUREOIDES* (LAM) D.C. HYDROALCOHOLIC EXTRACT INHIBITS NEUTROPHIL FUNCTIONS RELATED TO INNATE HOST DEFENSE

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2013, Article ID 787916, 12 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/787916>

Research Article

Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. Hydroalcoholic Extract Inhibits Neutrophil Functions Related to Innate Host Defense

Eric Diego Barioni,¹ José Roberto Santin,¹ Isabel Daufenback Machado,¹ Stephen Fernandes de Paula Rodrigues,¹ Viviane Ferraz-de-Paula,¹ Theodoro Marcel Wagner,² Bruno Cogliati,³ Matheus Corrêa dos Santos,² Marina da Silva Machado,² Sérgio Faloni de Andrade,² Rivaldo Niero,² and Sandra Helena Poliselli Farsky¹

¹ Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Próf. Lineu Prestes, 580 Bl 13B, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

² Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), University of Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, 88302-202 Itajaí, SC, Brazil

³ Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Av. Próf. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, 05508-270 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Sandra Helena Poliselli Farsky; sfarsky@usp.br

Received 28 November 2012; Accepted 31 December 2012

Academic Editor: David Baxter

Copyright © 2013 Eric Diego Barioni et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. is a herb native to South America, and its inflorescences are popularly employed to treat inflammatory diseases. Here, the effects of the *in vivo* actions of the hydroalcoholic extract obtained from inflorescences of *A. satureioides* on neutrophil trafficking into inflamed tissue were investigated. Male Wistar rats were orally treated with *A. satureioides* extract, and inflammation was induced one hour later by lipopolysaccharide injection into the subcutaneous tissue. The number of leukocytes and the amount of chemotactic mediators were quantified in the inflammatory exudate, and adhesion molecule and toll-like receptor 4 (TLR-4) expressions and phorbol-myristate-acetate- (PMA-) stimulated oxidative burst were quantified in circulating neutrophils. Leukocyte-endothelial interactions were quantified in the mesentery tissue. Enzymes and tissue morphology of the liver and kidney were evaluated. Treatment with *A. satureioides* extract reduced neutrophil influx and secretion of leukotriene B₄ and CINC-1 in the exudates, the number of rolling and adhered leukocytes in the mesentery postcapillary venules, neutrophil L-selectin, β 2-integrin and TLR-4 expression, and oxidative burst, but did not cause an alteration in the morphology and activities of liver and kidney. Together, the data show that *A. satureioides* extract inhibits neutrophil functions related to the innate response and does not cause systemic toxicity.

1. Introduction

Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. is a herb native to South America. In Brazil, it predominantly occurs in southern regions, where it is popularly known as Marcela or Macela and is largely employed in folk medicine [1]. The ethnopharmacological use of infusions prepared from inflorescences of *A. satureioides* leads to the relief of symptoms of inflammatory disorders, asthma, anxiety, gastric ulcers, and other digestive diseases [2–7]. Investigations on its chemical composition

showed that the extract obtained from inflorescences is rich in flavonoids, mainly quercetin and luteolin [1, 8, 9].

Experimental assays *in vivo* and *in vitro* have confirmed the ethnopharmacological employment of the extracts obtained from inflorescences of *A. satureioides*. In this context, the anti-inflammatory activity of aqueous and ethanolic extracts from *A. satureioides* in carrageenan-induced rat paw edema was shown [10], which may be correlated with the modulation of the innate immune response. Puhlmann and coauthors [11] showed enhanced *in vivo* phagocytic activity

of carbon particles by macrophages obtained from rats treated with *A. saturooides* extract. In addition, *A. saturooides* infusion increased peripheral blood human mononuclear phytohemagglutinin- (PHA-) induced proliferation, interferon gamma (IFN γ), and interleukin-4 (IL-4) secretion [6, 11]. Although the anti-inflammatory effects of *A. saturooides* have been demonstrated, its direct actions on neutrophil functions have not been shown.

Neutrophils express a wide range of membrane receptors, such as adhesion molecules and chemoattractant receptors, prompting them to react to exogenous stimuli and endogenous chemical mediators. In this context, neutrophils express the toll-like receptor 4 (TLR-4), which is responsible for the recognition of lipopolysaccharides (LPSs) from Gram-negative bacteria. LPS binds to TLR-4 on the cell membrane and activates signal-transduction pathways, mainly via MyD88, which is a central adapter protein that leads to activation of the nuclear transcription factor factor- κ B (NF- κ B). NF- κ B is the most important regulator of proinflammatory gene expression and induces a release of critical inflammatory molecules that are necessary to induce leukocyte migration into injured tissue and suitable immune responses [12, 13].

Leukocyte influx to the site of the inflammatory lesion is initially dependent on interactions between circulating cells and the endothelial cells of postcapillary venules, mediated by expression/activity of adhesion molecules on the surface of both cell types. L-selectin mediates the rolling of the neutrophils along endothelial cells, as it is rapidly expressed by activated neutrophils and interacts with constitutive carbohydrates or even with P- or E-selectin expressed on endothelial cells [14]. L-selectin is cleaved, by action of metalloproteases, pointing to the leukocytes become arrested to the endothelium [15]. Therefore, integrin family molecules, especially β 2-integrin subfamily molecules, which are mostly expressed by leukocytes, mediate firm adhesion by interacting with a diversity of endothelial membrane components and immunoglobulin superfamily molecules. Ultimately, neutrophils transmigrate between interendothelial junctions, via heterophilic and homophilic interactions of immunoglobulin superfamily molecules, such as platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), to subsequently migrate to the inflammatory focus [16]. In the extravascular matrix, neutrophils directly move to the site of the lesion in response to chemotactic chemical mediators [17]. At the lesion site, they phagocytose the lesion-causing agent and release preformed chemical substances that contribute to the destruction of the damaging agent. However, in the case of noncontrolled inflammation, blockage of phases of neutrophil mobilization into focus of the inflammatory reaction is an important therapeutic strategy.

This study investigated the *in vivo* actions of hydroalcoholic extract obtained from inflorescences of *A. saturooides* on neutrophil trafficking from the blood into inflamed tissue. Data confirmed quercetin and luteolin to be the main constituents in the hydroalcoholic extract and showed the absence of systemic toxicity. However, results clearly showed that *A. saturooides* hydroalcoholic extract inhibits LPS-induced pathways of neutrophil migration via a mechanism that might be partially dependent on TLR-4 expression.

Additional anti-inflammatory mechanisms might exist, as the extract also inhibited neutrophil activation caused by a direct intracellular stimulation of protein kinases.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS, serotype 026:B6), indomethacin, EDTA, and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ketamine and xylazine were purchased from Vetbrands (Paulinia, SP, Brazil), and heparin (Liquemine) was purchased from Roche Pharmaceuticals (Brazil). Anti-L-selectin-phycoerythrin (PE), anti- β 2-integrin-fluorescein-isothiocyanate (FITC), Annexin-V-FITC, and anti-CD284/MD-2-PE (toll-like receptor 4) antibodies were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). Leukotriene B4 (LTB4) enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) was obtained from GE Healthcare (Salt Lake City, UT, USA). The biochemical assays aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transferase (gamma-GT), urea, and creatinine were purchased from Biotécnica (Varginha, MG, Brazil). Phorbol myristate acetate (PMA) was obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA), and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). CINC-1 was also determined using EIA kits obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Air filters were purchased from TPP, Switzerland, and all reagents used in preparing the phosphate buffered solution (PBS) and ringer solution were purchased from Merck, USA.

2.2. Plant Material. Inflorescences of *A. saturooides* were collected in Fraiburgo, in the State of Santa Catarina, Brazil. The material was identified, and a voucher specimen was deposited at the herbarium of the State University of Maringá (UEM) with the code HUEM-23568. The material collection and all experiments were authorized by the Council of Management of Genetic Patrimony, Brazil (CGEN, process number 010062-2012-2). Air-dried plant material was cut into small pieces and macerated with 70% (v/v) aqueous ethanol at room temperature for 7 days. The macerate was filtered and the solvent removed by rotary evaporation under reduced pressure.

2.3. Apparatus and Chromatographic Conditions. Analysis was conducted using a high performance liquid chromatography (HPLC) system (Waters) equipped with a 600-F pump, 717 plus autosampler, followed by a line degasser (AF) and equipped with a UV-Vis detector (PDA 2996). A reverse-phase C18 column (25 cm, 4.6 mm i.d.; 0.5 μ m film thickness and 100Å) was employed (Luna, Phenomenex) at 25°C. Chromatographic separation was performed at room temperature with a flow rate 0.8 mL/min of gradient elution using two solvents: A (aqueous methanol, 50% (v/v)) and B (water acidified with acetic acid at pH 2.3). The gradient system used was 50% A (15 min), 50%–60% A (15 min), 60%–70% A (10 min), 70%–80% A (10 min), 80%–90% A (10 min), and 95% A (5 min). UV-Vis spectra were recorded at wavelengths

200–400 nm (detection at 350 nm). Solvents used were of HPLC grade, filtered (0.2 μ m, Schleicher & Schuell, Maidstone, Kent, UK), and degassed by sonication before use. The samples of hydroalcoholic extract (0.54 mg/mL) and standard quercetin and luteolin (0.5 mg/mL) were dissolved in methanol and filtered through a 0.45 μ m membrane filter, and 20 μ L was analyzed in triplicate.

2.4. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis (GC-MS). The GC-MS analysis was carried out using a Shimadzu Gas Chromatograph (Model QP-2010S series) equipped with an AOC-20i injector. The GC was equipped with a fused silica capillary column-TRX-1 (30 m $\times$ 0.25 mm), film thickness 0.1 μ m. The oven temperature was maintained at 220°C for 5 min holding time and was then raised from 220 to 300°C at a rate of 20°C/min, then held for 2 min and raised further to 310°C at a rate of 10°C/min, and once more held at this temperature for 15 min, employing helium gas (99.999%) as a carrier gas at a constant flow rate of 0.80 mL/min. Hydroalcoholic extract of *A. saturoides* (1 μ L) at a split ratio of 1:20 was injected. An MS transfer line temperature of 250°C was performed on a Shimadzu (Model QP-2010S series) coupled Gas Chromatograph equipped with an NIST08 Library software database. Mass spectra were taken at a 70 eV scanning rate of 1 scan/s. Identification of compounds was conducted using the database of the NIST08 Library. The mass spectrum of the individual unknown compounds was compared with that of known compounds stored in the software database Library.

2.5. Animals. Male Wistar rats (180–220 g) were obtained from the Central Animal House of the School of Pharmaceutical Sciences and Chemistry Institute of the University of São Paulo. The animals were housed in standard cages, at room temperature (25 $\pm$ 3°C), with 12 h dark/light cycles, and supplemented with food and water *ad libitum*. All procedures were performed according to the Brazilian Society of Science of Laboratory Animal guidelines for the proper care and use of experimental animals, and the experiments were approved by the local ethics committee (protocol number CEUA/FCF/334). The animals were anesthetized before each experimental procedure with ketamine/xylazine (80:8 mg/kg *i.p.*), thus preventing stress. 5–6 animals were used in each assay.

2.6. Treatments. The doses used in this study were based on data previously published by Santin et al. [2], which, in turn, applied doses based on the traditional folk use of this plant. In this study, the extract was administered orally at 50, 100, and 250 mg/kg. Assays were carried out 1 or 2 hours after treatments.

2.7. In Vivo Leukocyte Migration: Air Pouch Model. Animals were anesthetized, and 10 mL of sterile air was injected subcutaneously into the dorsal region. After six days, the pouch was refilled with 10 mL air. On the tenth day following the first air injection, the animals were divided into six groups and received one of the following treatments by oral gavage: (1) sham; (2) vehicle (PBS/ethanol 10%); (3)

indomethacin (30 mg/kg; positive control); or (4)–(6) *A. saturoides* (50, 100, or 250 mg/kg). After 1 h, LPS from *E. coli* (serotype 026:B6; 1 mg/2 mL PBS) was injected directly into the pouches. At 1 h or 4 h after the LPS injection, the animals were reanesthetized and sacrificed. The pouches were washed with 2 mL ice-cold PBS, and the total leukocyte number was determined using a Neubauer chamber. Differential cell counts were performed on smears stained with May-Grünwald-Giemsa.

2.8. Cell Viability and TLR-4 Expression by Flow Cytometry. Peripheral blood samples from male Wistar rats submitted to the air pouch model (after 1 h LPS injection) were obtained via abdominal aorta punctures. Heparin (5000 UI/mL) was used as an anticoagulant. Subsequently, the whole blood was hemolyzed (hypotonic lysis with NaCl solution at 0.2% and 1.6%) and centrifuged (5 min at 600 g) to obtain the leukocytes. The total number of leukocytes was quantified using a Neubauer chamber. Peripheral leukocytes (1×10^6 cells) were incubated with Annexin V conjugated to FITC (1:100) for 20 min, and PI (100 μ g/mL) was added immediately to evaluate cell viability. To quantify TLR-4 expression, leukocytes (1×10^6 cells) were incubated with anti-CD284/MD-2 (TLR-4) monoclonal antibodies conjugated to PE (1:100) for 60 min at room temperature. Immediately after incubations, all the samples, except for Annexin V, were centrifuged (5 min, 600 g) and resuspended in PBS for analysis in the flow cytometer FACSCalibur (Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). Data were obtained from 10,000 cells, and only the morphologically viable leukocytes were considered for analysis. The neutrophil population was characterized by different size and complexity parameters of different cell types detected by flow cytometry. The optical signals emitted were converted into electronic signals and were analyzed by FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, TN, USA). Results of TLR-4 expression are presented as fluorescence units, and apoptosis and necrosis are shown as the percentage of Annexin V- or PI-positive cells.

2.9. Adhesion Molecule Expression and Oxidative Burst by Flow Cytometry. Male Wistar rats (not submitted to the air pouch model) were divided into three groups and received one of the following treatments by oral gavage: (1) sham (2) vehicle (PBS/ethanol 10%), or (3) *A. saturoides* (100 mg/kg). Circulating leukocytes (1×10^6) from the whole blood were collected as described in Section 2.8. To measure the adhesion molecules expression, cells were incubated with or without LPS (1 μ g/mL) for 60 min at 37°C. Subsequently, the leukocyte suspension was washed with 1 mL ice-cold PBS. The supernatant was discarded, and leukocytes were incubated with monoclonal anti-CD62L antibodies conjugated to PE (1:100) and anti-CD18 conjugated to FITC (1:100), for 20 minutes at room temperature. To assess the leukocyte oxidative metabolism, leukocytes (1×10^6 cells) were incubated with 100 μ L of PMA (100 ng), 200 μ L of DCFH-DA (0.3 mM), and 700 μ L of PBS for 30 min at 37°C.

Immediately after incubations, the samples were centrifuged (5 min, 600 g) and were resuspended in PBS for quantification by flow cytometry. The neutrophil population

was characterized as described in Section 2.8. Results of oxidative metabolism are expressed as units of fluorescence, and data of adhesion molecules are expressed as the percentage of positive cells.

2.10. Intravital Microscopy. Rats were divided into three groups and received one of the following treatments by oral gavage: (1) sham (PBS), (2) vehicle (PBS/ethanol 10%), or (3) *A. saturooides* (100 mg/kg). The rats were anesthetized 1 h after the treatment, and 30 min later, the mesentery was surgically exteriorized. Animals were maintained on a board thermostatically controlled at 37°C, which included a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was placed. The preparation was kept moist and warm by irrigating the tissue with a warmed (37°C) Ringer-Locke solution (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2 mM CaCl₂·2H₂O, 6 mM NaHCO₃, 5 mM glucose and 1% (w/v) gelatin, and pH 7.2–7.4). The rate of solution outflow onto the exposed tissue was controlled to keep the preparation in continuous contact with a film of the solution. Transilluminated images were obtained by optical microscopy (Axioplan II, Carl-Zeiss equipped with 5.0/0.30 × Plan-Neofluar or 10.0/0.25 × Achroplan longitudinal distance objectives/numeric aperture and 1.0 × 1.25 × or 1.60 × Optovar). The images were captured by a video camera (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss) and were transmitted simultaneously to a TV monitor and to a computer. Images obtained on the TV monitor were recorded on software. Digitized images on the computer monitor were subsequently analyzed by image analyzing software (AxioVision).

The interaction between leukocytes and the vessel walls was analyzed by determining the number of rolling and adherent leukocytes on the postcapillary venule wall (20–30 μm diameter, 200 μm length) of the mesentery. Leukocytes moving in the periphery of the axial stream, in contact with the endothelium, were considered to be rolling, and their number was determined in 10 min periods. The number of leukocytes that adhered to the endothelium (stopped at the vessel wall) was determined in the same vascular segment after 10 min. The number of rolling and adherent cells was quantified after topical application of LPS (30 μg/40 μL in PBS) to the venules of the mesentery microcirculation. Three fields were evaluated per animal after application. The results were then averaged for each animal.

2.11. Inflammatory Mediators. The air pouch lavage fluid was collected 1 h after LPS injection to evaluate the concentration of inflammatory mediators. LTB₄ and CINC-1 were quantified using EIA Kits according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as pg/mL or ng/mL, respectively.

2.12. Biochemical Parameters. The whole blood was collected 2 hour after treatments without anticoagulant to serum separation after centrifugation (10 min, 600 g). The concentration of kidney and liver markers was analyzed using commercial biochemical kits for urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and gamma-GT.

2.13. Histopathology. Liver and kidney samples were collected 2 hour after treatments, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and fixed in 10% buffered formalin for 24 hours. Tissue samples were dehydrated in graded ethanol solutions, cleared in xylene, and embedded in paraffin wax. After that, serial sections (5 μm) were prepared and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Images were taken at original magnification of 100x (Eclipse E800 Microscope, Nikon, Japan).

2.14. Statistical Analysis. Means and the standard error of the mean (S.E.M.) for all data are presented and were compared using Student's *t*-tests or ANOVA. Tukey's Multiple Comparisons test was performed to determine the significance of the differences between experimental conditions. GraphPad Prism 4.0 software (San Diego, CA, USA) was employed. Values of *P* < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Chromatographic Analysis. The phytochemical profile of the *A. saturooides* hydroalcoholic extract showed six compounds, and two main compounds were identified (Figure 1(a)). The major components of the extract were compounds 1 and 2, which were identified by direct comparison with authentic samples and area peaks as luteolin and quercetin, respectively. Although these compounds occurred in other tissues of *A. saturooides*, the relative content of these two flavonoids from inflorescences was 12.31 and 13.65 μg/mL for 1 and 2, respectively. The GC-MS analysis showed seven distinct peaks, identified via the NIST08 library software database as ethyl ester derivatives of oleic, palmitic and stearic acids. In addition, the steroids stigmaterol, gamma-sitosterol, and sitostenone were also identified in the *A. saturooides* extract (Figure 1(b)).

3.2. *A. saturooides* Hydroalcoholic Extract Inhibits In Vivo Neutrophil Migration into LPS-Inflamed Tissue. The *in vivo* anti-inflammatory effect of the hydroalcoholic *A. saturooides* extract on LPS-induced inflammation in the subcutaneous tissue of rats (air pouch model) was investigated. Different doses were tested, and the number of cells migrating into the pouches was determined 4 h after injection of LPS or PBS. Results presented in Figure 2(a) show that *A. saturooides* treatment reduced leukocyte migration to the inflammatory site, which reflected an impaired influx of neutrophils (Figure 2(b)). The effect caused by 100 mg/Kg of *A. saturooides* extract was similar to that evoked by indomethacin treatment (Figures 2(a) and 2(b)).

Assays were conducted to evaluate the inhibitory mechanism of *A. saturooides* extract on cellular mechanisms involved in neutrophil migration to the site of the lesion. For this purpose, neutrophils were isolated from rats and incubated *in vitro* with the extract; thus, the direct action of the extract in each phase of neutrophil migration could be investigated. However, *in vitro* incubation with the extract caused cell death, especially by necrosis (data not shown). For this reason, all the following assays were conducted using

FIGURE 1: (a) HPLC overlap chromatogram profile of hydroalcoholic extract of *A. saturooides*. L: luteolin; Q: quercetin. (b) GC-MS chromatogram showing peaks of the main phytochemicals present in extract of *A. saturooides*.

FIGURE 2: Effects of *A. saturooides* hydroalcoholic extract on *in vivo* leukocyte migration induced by LPS. Air pouch animals received orally: vehicle (PBS/ethanol 10%), (2) indomethacin (30 mg/kg), or (3) *A. saturooides* (50, 100, or 250 mg/kg). LPSs from *E. coli* 026:B6 (1 mg/2 mL) PBS were injected after 1 h directly into the air pouch, and 4 h later, the number of cells in the pouch was quantified. The dotted line indicates number of neutrophils in the noninflamed tissue. (a) Number of total leukocytes in the air pouch. (b) Number of neutrophils in the air pouch. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 5-6 animals in each group. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. * $P < 0.05$ versus vehicle.

FIGURE 3: Effect of *A. saturooides* hydroalcoholic extract on leukocyte-endothelial interaction *in vivo*. Animals received orally (1) sham (surgical manipulation without treatment), (2) vehicle (PBS/ethanol 10%), or (3) *A. saturooides* (100 mg/kg). After 1 h, LPS from *E. coli* 026:B6 (30 μg/40 μL) was applied topically into the mesenteric network, and the number of rolling and adherent leukocytes was quantified. (a) Number of rolling leukocytes. (b) Number of adherent leukocytes. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 5-6 animals in each group. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus sham; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ versus vehicle.

blood and circulating leukocytes collected after *in vivo* vehicle or *A. saturooides* extract treatments.

3.3. *A. saturooides* Hydroalcoholic Extract In Vivo Treatment Does Not Affect Neutrophil Viability. Based on cell viability data obtained from *in vitro* studies, it was also relevant to investigate leukocyte viability from circulating blood following *in vivo* treatments with *A. saturooides* extract. Data presented in Table 1 show that extract treatment did not cause cell death, as determined by the Annexin V/PI labeled flow cytometry assay.

3.4. *A. saturooides* Hydroalcoholic Extract Impairs In Vivo Leukocyte-Endothelial Interactions. The behavior of leukocytes in the peripheral blood was evaluated by direct observation of the microcirculation network. Administration of *A. saturooides* extract slightly reduced the number of LPS-induced rolling leukocytes in comparison to the number observed in vehicle-treated rats (Figure 3(a)). However, administration of the extract markedly reduced the LPS-induced adherence of leukocytes to the vessel wall of the mesentery network (Figure 3(b)). It was further shown that *A. saturooides* extract did not induce toxicological effects on the microcirculation, such as hemorrhage, thrombus formation, or vascular stasis (data not shown).

3.5. *A. saturooides* Hydroalcoholic Extract Alters Neutrophil Adhesion Molecule Expression. Leukocyte-endothelial interaction is mediated by adhesion molecule expression. As *A. saturooides* extract reduced the *in vivo* leukocyte-endothelial interactions, assays were performed to investigate the actions of the extract on the expression of L-selectin and $\beta 2$ -integrin on the neutrophil surface. Results show that a dose of

100 mg/kg *A. saturooides* extract reduced the number of $\beta 2$ -integrin- (Figure 4(a)) and L-selectin-positive (Figure 4(b)) neutrophils after LPS stimulation, showing that treatment with the extract affected the ability of neutrophils to express both molecules.

3.6. *A. saturooides* Hydroalcoholic Extract Reduces CINC-1 and LTB-4 Secretion in LPS-Induced Inflamed Exudates. Chemical mediators including neutrophils are secreted in inflammatory condition by different cells. To investigate the ability of *A. saturooides* extract to inhibit the secretion of the chemotactic mediators CINC-1 and LTB-4, exudate was collected from animals treated with *A. saturooides* hydroalcoholic extract or vehicles, 1 h following LPS injection into the air pouch. This experimental strategy was employed to avoid large differences in the number of migrated leukocytes into air pouches, as observed 4 hours after LPS injection (Figure 2(b); vehicle: 92×10^6 ; *A. saturooides*: 25×10^6), which could be responsible for altered secretion of these chemokines. As shown in Figure 5(a), treatment with *A. saturooides* extract reduced neutrophil migration into the air pouch 1 hour after LPS injection (vehicle: 1.15×10^6 ; *A. saturooides*: 0.5×10^6) and decreased both LTB-4 and CINC-1 levels in the inflammatory exudate (Figures 5(b) and 5(c)).

3.7. *A. saturooides* Hydroalcoholic Extract Reduces TLR-4 Expression and PMA-Induced Oxidative Burst on Neutrophils. To elucidate the molecular mechanism of the anti-inflammatory effect shown by *A. saturooides* extract, membrane TLR-4 expression was evaluated by flow cytometry. The results showed that neutrophils obtained from animals

FIGURE 4: $\beta 2$ -integrin and L-selectin expression on neutrophils from animals treated with *A. saturooides* hydroalcoholic extract. Animals received orally (1) control (untreated animals), (2) vehicle (PBS/ethanol 10%), or (3) *A. saturooides* (100 mg/kg). Neutrophils were incubated with PBS or LPS from *E. coli* 026:B6 (5 μ g/mL) for 60 min at 37°C. (a) The percentage of $\beta 2$ -integrin-positive neutrophils and (b) the percentage of L-selectin-positive neutrophils. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 5-6 animals in each group. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. * $P < 0.05$ versus respective LPS-stimulated control.

TABLE 1: Effects of *A. saturooides* hydroalcoholic extract on *in vivo* cell viability.

Treatment	Dose (mg/kg)	ALT (mg/dL)	AST (mg/dL)	Gama-GT (mg/dL)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Sham	—	37.65 $\pm$ 1.96	124.60 $\pm$ 9.46	9.04 $\pm$ 2.20	37.02 $\pm$ 2.83	0.53 $\pm$ 0.08
Vehicle	—	41.60 $\pm$ 2.57	113.60 $\pm$ 17.45	3.25 $\pm$ 2.34	33.59 $\pm$ 0.83	0.53 $\pm$ 0.41
<i>A. saturooides</i>	100	35.07 $\pm$ 1.92	106.60 $\pm$ 10.63	5.44 $\pm$ 2.18	37.20 $\pm$ 2.57	0.35 $\pm$ 0.06

Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 6 animals in each group. Sham (air pouch induced without treatment). Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test.

orally treated with *A. saturooides* extract showed lower TLR-4 expression than animals treated with vehicle (Figure 6(a)). The reduction of TLR-4 expression might be totally or partially responsible for the anti-inflammatory activities observed in this study and might also suggest that this mechanism is a unique pathway of *A. saturooides* extract action. To investigate this hypothesis, neutrophils collected from treated rats were stimulated with PMA *in vitro*. PMA is lipophilic and directly stimulates the phosphorylation of PKC kinases, which are responsible for activation of the respiratory burst [18, 19]. Neutrophils from animals treated with *A. saturooides* extract and incubated with PMA for 30 min demonstrated a significant reduction in the production of PMA-stimulated reactive oxygen species (ROS), as measured by DCFH formation (Figure 6(b)).

3.8. *A. saturooides* Hydroalcoholic Extract Treatment Does Not Cause Systemic Toxicity. Liver and kidney biochemical and histological parameters were investigated in rats treated with vehicle or *A. saturooides*. Data showed that activities of the main hepatic enzymes, AST, ALT, and gamma-GT, as well as levels of creatinine and urea were equivalent in samples collected from rats treated with *A. saturooides* hydroalcoholic extract or vehicle (Table 2). Furthermore, no alteration in

liver and kidney structures was observed in animals from both treatments (Figure 7).

4. Discussion

Neutrophils exert an important role in the induction of innate inflammatory reactions and in the transition between innate and immune responses. Therefore, in the case of exacerbated reactions, blockage of their functions represents a therapeutic strategy. Here, we show that *in vivo* treatment with *A. saturooides* inflorescence hydroalcoholic extract significantly impaired neutrophil migration into LPS-induced inflamed exudates, and effects on neutrophil migratory properties and secretion of chemotactic mediators might be involved in its anti-inflammatory action. Although expression of TLR-4, the main receptor for LPS binding, was reduced on the neutrophil membrane and might be responsible for the activity of *A. saturooides* extract in these cells, other forms of action might be involved, as a lower oxidative burst was observed following direct intracellular activation of PKC kinases in neutrophils.

Much evidence has shown that plant extracts containing flavonoids exert anti-inflammatory effects [20–24]. Previous

TABLE 2: Effects of *A. satureoides* hydroalcoholic extract on biochemical parameters.

Treatment	Dose (mg/kg)	Apoptotic cells (%)	Later apoptotic cells (%)	Necrotic cells (%)	Viable cells (%)
Sham	—	2.23 ± 0.39	6.90 ± 0.69	13.13 ± 1.79	70.12 ± 5.55
Vehicle	—	1.31 ± 0.14	3.77 ± 0.19	12.45 ± 1.15	82.71 ± 1.38
<i>A. satureoides</i>	100	0.82 ± 0.05	7.32 ± 0.56	19.13 ± 1.25	74.01 ± 2.38

Data are expressed as mean ± S.E.M. of 6 animals in each group. Sham (air pouch induced without treatment). Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test.

FIGURE 5: Effects of *A. satureoides* hydroalcoholic extract on *in vivo* leukocyte migration induced by LPS, LTB-4, and CINC-1 secretion. Air pouch animals received orally (1) sham (air pouch induced without treatment), (2) vehicle (PBS/ethanol 10%), (3) indomethacin (30 mg/kg), (4) *A. satureoides* (100 mg/kg). After 1 h, LPSs from *E. coli* 026:B6 (1 mg/2 mL) or PBS were injected directly into the air pouch, and 1 h later, the number of cells in the pouch was quantified. (a) Number of neutrophils in the air pouch, (b) levels of LTB-4 on air pouch exudate, and (c) levels of CINC-1 secretion on air pouch exudate. Data are expressed as mean ± S.E.M. of 5-6 animals in each group. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus sham; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, and ### $P < 0.01$ versus vehicle.

Studies have shown that *A. satureoides* extracts contain luteolin and quercetin [1, 2, 8, 9], and here, HPLC analysis corroborated that the two flavonoids are the main compounds within the inflorescence extract; however, GC-MS analysis showed that the *A. satureoides* extract also contains steroids and fatty acids. Based on the anti-inflammatory effects of

flavonoids, it is expected that *A. satureoides* inflorescence extract can reduce neutrophil influx. Here, we show for the first time that *A. satureoides* extract reduces *in vivo* LPS induced neutrophil migration, which might relate to reduced TLR-4 membrane expression and therefore corroborate the action of quercetin and luteolin on TLR-4 expression [25–28].

FIGURE 6: Effects of *A. saturooides* hydroalcoholic extract on TLR-4 expression and DCFH PMA-induced formation. Animals received orally 1) sham (air pouch induced without treatment), (2) vehicle (PBS/ethanol 10%), or (3) *A. saturooides* (100 mg/kg). (a) After 1 h, LPSs from *E. coli* 026:B6 (1 mg/2 mL) or PBS were injected directly into the air pouch, and 1 h later TLR-4 expression was measured in blood leukocytes by flow cytometry. (b) Circulating leukocytes were collected and *in vitro* stimulated by PMA. DCFH formation was measured by flow cytometry. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 5-6 animals in each group. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Tukey's test. $P < 0.05$ and $***P < 0.001$ versus vehicle; $\#P < 0.05$ and $###P < 0.001$ versus sham.

FIGURE 7: Effects of *A. saturooides* hydroalcoholic extract on liver and kidney histology in treated rats. Control (sham, air pouch induced without treatment), vehicle (PBS/ethanol 10%), and *A. saturooides* extract (100 mg/kg). There were no histological alterations on liver and kidney tissues. Hematoxylin-eosin. Scale bar = 20 μ m.

LPS treatment induced TLR-4 expression, as visualized by enhanced membrane density in cells collected from vehicle-treated animals in comparison to those obtained from sham animals. TLR-4 expressions on cells collected from extract-treated rats were reduced. However, it is notable that reduced TLR-4 is not the only pathway of action of *A. saturooides* extract on neutrophils, as neutrophils collected from rats treated with *A. saturooides* extract showed a reduced oxidative

burst elicited by *in vitro* PMA stimulation, which directly activates PKC phosphorylation and phagocyte NADPH oxidase, leading to the release of reactive metabolites [29].

Data in our study do not show the direct effect of *A. saturooides* extract on neutrophil function, as *in vitro* neutrophil incubation with hydroalcoholic extract caused necrosis, even at low concentrations (data not shown). Cell death was not detected in vehicle-incubated cells, excluding

the action of alcohol in the toxic effect (data not shown). It is relevant here that cytotoxicity caused by *in vitro* incubation with flavonoids is not cited in the literature. Many *in vitro* experimental studies have shown the direct action of extracts containing flavonoids on neutrophil function, but this has not been associated with cell death [30–33]. It is possible that the experimental conditions and technical approach to quantify cell death are responsible for divergent results. In the present study, flow cytometry quantification of Annexin-V- and PI-labeled neutrophils was used to detect cell membrane alterations, as modifications of the cell surface structure also alter the adhesion and locomotory response of neutrophils. Notably, *in vivo* extract treatment did not alter neutrophil viability, and subsequent assays were performed using this experimental strategy. Kinetic studies will be carried out to investigate the mechanisms in the absence of extract toxicity *in vivo*. In addition, the lack of functional or morphological alterations in kidney and liver following *A. saturooides* extract treatment strongly supports the absence of *in vivo* toxicity.

As previously mentioned, neutrophil migration is dependent on initial contact of neutrophils with the endothelial cells from postcapillary venules [14], and intravital microscopy assays allow the visualization of leukocyte behavior in the microcirculatory network [34–36]. Data here clearly show that *in vivo* administration of the *A. saturooides* extract reduced the number of rolling and adhered leukocytes in LPS-stimulated mesentery. These data were further corroborated by the altered number of L-selectin- and β 2-integrin-positive neutrophils, suggesting that *in vivo* extract treatment modifies the adhesive properties of neutrophils to the endothelium, which then impairs their migration into inflamed tissue. It has been shown that genetic deficiency of L-selectin or β 2-integrin on leukocyte membranes reduces cell influx into inflamed areas, leading to accumulation of neutrophils in the blood [37–39].

Leukocyte adhesion to endogenous substrates, such as endothelium and extravascular matrix constituents, and direct migration to the damage site are dependent on the interaction between chemotactic mediators and specific receptors, mainly those expressed on cell membranes which activate pathways involved in adhesion and migration [40–43]. In this context, leukotriene B₄ and CINC-1 are chemoattractants secreted by different cells in the inflammatory process, including migrated neutrophils, resident macrophages, mast cells, and fibroblasts [44–48]. Data in this study show that *in vivo* treatment with *A. saturooides* extract reduced the amount of both mediators in the inflammation exudates, showing the ability of the extract to inhibit the secretion of inflammatory cells. The cells that are responsible for this reduced secretion have been not established; nevertheless, *A. saturooides* treatment might inhibit the secretory activity of resident cells in the subcutaneous tissue, as the reduced levels of chemoattractants were similar in exudates collected 1 or 4 h after LPS injections, irrespective of the number of neutrophils in the pouches.

Taken together, data presented here show the mecha-

influx using *in vivo* approaches, which might be responsible for the ethnopharmacological application of the extract. This might also be the mechanism involved in antiulcerogenic activity of the extract [2], as neutrophil influx into damaged stomachs is a hallmark of acute gastric disease.

5. Conclusions

Taken together, data presented here from different *in vivo* studies show the mechanisms of the anti-inflammatory effect of *A. saturooides* hydroalcoholic extract. Based on these findings, we have highlighted the inhibitory actions of *A. saturooides* hydroalcoholic extract on adhesive and migration properties, TLR-4 expression, and oxidative metabolism of neutrophils, which might contribute to its anti-inflammatory effects and help to explain the use of *A. saturooides* extract as a therapeutic agent.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors thank FAPESP for financial support (Grant no. 2011/15115-2). S. H. P. Farsky is a fellow of the Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq). E. D. Barioni, J. R. Santin, and I. D. Machado are postgraduate fellows of FAPESP. V. Ferraz-de-Paula and S. Fernandes de Paula Rodrigues are postdoctoral fellows of FAPESP. The authors thank the Neuroimmunomodulation Research Group for flow cytometry measurements (FAPESP no. 2009/51886-3).

References

- [1] G. Ferraro, C. Anesini, A. Ouvina et al., "Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline saturooides* flowers from different zones in Argentina," *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 27, no. 4, pp. 626–628, 2008.
- [2] J. R. Santin, M. Lemos, L. C. K. Júnior, R. Niero, and S. F. de Andrade, "Antiulcer effects of *Achyrocline saturooides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 130, no. 2, pp. 334–339, 2010.
- [3] A. Gugliucci and T. Menini, "Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited *in vitro* by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline saturooides*," *Life Sciences*, vol. 71, no. 6, pp. 693–705, 2002.
- [4] C. Kadarian, A. M. Broussalis, J. Miño et al., "Hepatoprotective activity of *Achyrocline saturooides* (Lam) D. C.," *Pharmacological Research*, vol. 45, no. 1, pp. 57–61, 2002.
- [5] M. F. Arredondo, F. Blasina, C. Echeverry et al., "Cytoprotection by *Achyrocline saturooides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 91, no. 1, pp. 13–20, 2004.
- [6] M. Cosentino, R. Bombelli, E. Carcano et al., "Immunomodulatory properties of *Achyrocline saturooides* (Lam.) D.C. infusion: a study on human leukocytes," *Journal of Ethnopharmacology*.

- L. A. Del Vitto, E. M. Petenatti, M. E. Petenatti, S. M. Mazza, and E. J. Marchevsky, "Major and trace elements contents in crude drug and infusions of two South American species of Achyrocline (Asteraceae) named "marcelas," *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 28, no. 4, pp. 552–559, 2009.
- K. B. C. De Souza, V. L. Bassani, and E. E. S. Schapoval, "Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route," *Phytomedicine*, vol. 14, no. 2-3, pp. 102–108, 2007.
- J. M. Fachinnetto, M. D. Bagatini, J. Durigon, A. C. F. Silva, and S. B. Tedesco, "Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*," *Revista Brasileira De Farmacognosia*, vol. 17, no. 1, pp. 49–54, 2007.
- C. M. Simoes, E. P. Schenkel, L. Bauer, and A. Langeloh, "Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 22, no. 3, pp. 281–293, 1988.
- J. Puhlmann, U. Knaus, L. Tubaro, W. Schaefer, and H. Wagner, "Immunologically active metallic ion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*," *Phytochemistry*, vol. 31, no. 8, pp. 2617–2621, 1992.
- J. C. Kagan and R. Medzhitov, "Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls toll-like receptor signaling," *Cell*, vol. 125, no. 5, pp. 943–955, 2006.
- J. H. Peng, T. Cui, Z. L. Sun et al., "Effects of puerariae radix extract on endotoxin receptors and TNF- α expression induced by gut-derived endotoxin in chronic alcoholic liver injury," *Evidence Based in Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 234987, 12 pages, 2012.
- C. E. Green, D. N. Pearson, R. T. Camphausen, D. E. Staunton, and S. I. Simon, "Shear-dependent capping of L-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 by E-selectin signals activation of high-avidity β 2-integrin on neutrophils," *Journal of Immunology*, vol. 172, no. 12, pp. 7780–7790, 2004.
- D. M. Smalley and K. Ley, "L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 9, no. 2, pp. 255–266, 2005.
- K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh, "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 9, pp. 678–689, 2007.
- C. N. Serhan, S. D. Brain, C. D. Buckley et al., "Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms," *The FASEB Journal*, vol. 21, no. 2, pp. 325–332, 2007.
- M. A. Myers, L. C. McPhail, and R. Snyderman, "Redistribution of protein kinase C activity in human monocytes: correlation with activation of the respiratory burst," *Journal of Immunology*, vol. 135, no. 5, pp. 3411–3416, 1985.
- Y. Yasui, K. Yamada, S. Takahashi et al., "PMA induces GCMA phosphorylation and alters its stability via the PKC- and ERK-dependent pathway," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 417, no. 4, pp. 1127–1132, 2012.
- A. R. Tapas, D. M. Sakarkar, and R. B. Kadke, "Flavonoids as nutraceuticals: a review," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 7, pp. 1089–1099, 2008.
- A. García-Lafuente, E. Guillaumon, A. Villares, M. A. Rostagno, and J. A. Martínez, "Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease," *Inflammation Research*, vol. 58, no. 9, pp. 537–553, 2009.
- [22] C. R. Liao, Y. S. Chang, W. H. Peng, S. C. Lai, and Y. L. Ho, "Analgesic and anti-inflammatory activities of the methanol extract of *Elaeagnus oldhamii* Maxim. in mice," *American Journal of Chinese Medicine*, vol. 40, no. 3, pp. 581–597, 2012.
- [23] T. H. Quang, N. T. Ngan, C. V. Minh et al., "Anti-inflammatory and PPAR transactivational properties of flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*," *Phytotherapy Research*, 2012.
- [24] B. T. Chen, W. X. Li, R. R. He et al., "Anti-inflammatory effects of a polyphenols-rich extract from tea (*Camellia sinensis*) flowers in acute and chronic mice models," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, Article ID 537923, 7 pages, 2012.
- [25] M. Kaneko, H. Takimoto, T. Sugiyama, Y. Seki, K. Kawaguchi, and Y. Kumazawa, "Suppressive effects of the flavonoids quercetin and luteolin on the accumulation of lipid rafts after signal transduction via receptors," *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, vol. 30, no. 4, pp. 867–882, 2008.
- [26] J. K. Lee, S. Y. Kim, Y. S. Kim, W. H. Lee, D. H. Hwang, and J. Y. Lee, "Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of toll-like receptors by luteolin," *Biochemical Pharmacology*, vol. 77, no. 8, pp. 1391–1400, 2009.
- [27] S. Bhaskar, V. Shalini, and A. Helen, "Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF- κ B signaling pathway," *Immunobiology*, vol. 216, no. 3, pp. 367–373, 2011.
- [28] H. Qiao, X. Zhang, C. Zhu et al., "Luteolin downregulates TLR4, TLR5, NF- κ B and p-p38MAPK expression, upregulates the p-ERK expression, and protects rat brains against focal ischemia," *Brain Research*, vol. 448, pp. 71–81, 2012.
- [29] H. Lundqvist, P. Follin, L. Khalfan, and C. Dahlgren, "Phorbol myristate acetate-induced NADPH oxidase activity in human neutrophils: only half the story has been told," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 59, no. 2, pp. 270–279, 1996.
- [30] E. S. Suyenaga, E. L. Konrath, R. R. Dresch et al., "Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils," *Planta Medica*, vol. 77, no. 7, pp. 698–704, 2011.
- [31] M. Ciz, P. Denev, M. Kratchanova, O. Vasicek, G. Ambrozova, and A. Lojek, "Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2012, Article ID 181295, 6 pages, 2012.
- [32] A. K. Kiss, A. KapThlon-Cieslicka, K. J. Filipiak, G. Opolski, and M. Naruszewicz, "Ex vivo effects of an *Oenothera paradoxa* extract on the reactive oxygen species generation and neutral endopeptidase activity in neutrophils from patients after acute myocardial infarction," *Phytotherapy Research*, vol. 26, no. 4, pp. 482–487, 2012.
- [33] H. R. Liao, J. J. Chen, Y. H. Chien, S. Z. Lin, S. Lin, and C. P. Tseng, "5-Hydroxy-7-methoxyflavone inhibits N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine-induced superoxide anion production by specific modulate membrane localization of Tec with a PI3K independent mechanism in human neutrophils," *Biochemical Pharmacology*, vol. 84, no. 2, pp. 182–191, 2012.
- [34] S. H. P. Farsky, P. Borelli, R. A. Fock, S. Z. Proto, J. M. C. Ferreira Jr., and S. B. V. Melo, "Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment," *Inflammation Research*, vol. 53, no. 9, pp. 442–452, 2004.
- [35] C. B. de Lima, E. K. Tamura, T. Montero-Melendez et al., "Actions of translocator protein ligands on neutrophil adhesion and motility induced by G-protein coupled receptor signaling,"

Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 417, no. 2, pp. 918–923, 2012.

F. N. Gavins, “Intravital microscopy: new insights into cellular interactions,” *Current Opinion of Pharmacology*, vol. 12, no. 5, pp. 601–607, 2012.

E. Van de Vijver, A. Maddalena, Ö. Sanal et al., “Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency (first update),” *Blood Cells and Molecular Disease*, vol. 15, no. 1, pp. 53–61, 2012.

Y. Shimada, M. Hasegawa, Y. Kaburagi et al., “L-selectin or ICAM-1 deficiency reduces an immediate-type hypersensitivity response by preventing mast cell recruitment in repeated elicitation of contact hypersensitivity,” *Journal of Immunology*, vol. 170, no. 8, pp. 4325–4334, 2003.

Y. Li, J. Brazzell, A. Herrera, and B. Walcheck, “ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding,” *Blood*, vol. 108, no. 7, pp. 2275–2279, 2006.

S. I. Simon and C. E. Green, “Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation,” *Annals Review of Biomedical Engineering*, vol. 7, pp. 151–185, 2005.

S. Y. Yuan, Q. Shen, R. R. Rigor, and M. H. Wu, “Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function,” *Microvascular Research*, vol. 83, no. 1, pp. 82–88, 2012.

M. J. Sanz and P. Kubes, “Neutrophil-active chemokines in *in vivo* imaging of neutrophil trafficking,” *European Journal of Immunology*, vol. 42, no. 2, pp. 278–283, 2012.

S. D. Chase, J. L. Magnani, and S. I. Simon, “E-selectin ligands as mechanosensitive receptors on neutrophils in health and disease,” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 40, no. 4, pp. 849–859, 2012.

J. Palmblad, “The role of granulocytes in inflammation,” *Scandinavian Journal of Rheumatology*, vol. 13, no. 2, pp. 163–172, 1984.

E. J. Leonard and T. Yoshimura, “Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]),” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 2, no. 6, pp. 479–486, 1990.

S. Koyama, E. Sato, H. Numanami, K. Kubo, S. Nagai, and T. Izumi, “Bradykinin stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activity,” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 22, no. 1, pp. 75–84, 2000.

J. Witowski, H. Tayama, K. Ksiek, M. Wanic-Kossowska, T. O. Bender, and A. Jörres, “Human peritoneal fibroblasts are a potent source of neutrophil-targeting cytokines: a key role of IL-1 β stimulation,” *Laboratory Investigation*, vol. 89, no. 4, pp. 414–424, 2009.

Z. Weng, B. Zhang, S. Asadi et al., “Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans,” *PLoS One*, vol. 7, no. 3, Article ID e33805, 2012.